

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE  
INTERFERON-ALFA 2<sup>a</sup> EM FORMULAÇÕES  
FARMACÊUTICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lucélia Magalhães da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE  
INTERFERON-ALFA 2a EM FORMULAÇÕES  
FARMACÊUTICAS**

**por**

**Lucélia Magalhães da Silva**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Departamento de Farmácia Industrial**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE INTERFERON-ALFA  
2a EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

elaborada por  
**Lucélia Magalhães da Silva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sérgio Luiz Dalmora, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Paolo Bartolini, Dr. (IPEN-USP)**

**Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, Dr<sup>a</sup>. (IPEN-USP)**

Santa Maria, 17 de Março de 2009.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, iluminação, saúde e força para enfrentar os obstáculos;

ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, confiança, orientação e revisão crítica;

aos colegas e bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência, em especial Ricardo e Daniele, pelo auxílio e amizade;

aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial;

aos meus pais, Elizário e Nadir, pelo amor, educação e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa;

às minhas irmãs e cunhados, pelo carinho e incentivo;

ao meu namorado Orcial, companheiro que me incentivou constantemente, pelo amor, alegria, paciência e compreensão;

à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

à CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

*“O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”*

**Cora Coralina**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE INTERFERON-ALFA 2a EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

AUTOR: LUCÉLIA MAGALHÃES DA SILVA

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de Março de 2009.

O interferon é uma citocina que possui ação antiviral, imunomoduladora e antiproliferativa. É uma proteína sintetizada pelas células em resposta a infecção viral, gerando sucessivas alterações bioquímicas. No presente trabalho foram validados métodos cromatográficos para a avaliação de interferon-alfa 2a (rhIFN- $\alpha$ 2a) em produtos farmacêuticos. O método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) foi desenvolvido e validado empregando coluna Júpiter C<sub>4</sub> (250 mm x 4,6 mm), mantida a temperatura ambiente (25°C). A fase móvel A foi composta de ácido trifluoracético 0,1% e a fase móvel B de ácido trifluoracético 0,1% em acetonitrila, eluídas no gradiente: 0,01 – 1 min, 38% de B; 1 – 5 min, 38 – 43% de B; 5,01 – 20 min, 43 – 45% de B; 20,01 – 30 min, 45 – 48% de B; 30,01 – 40 min, 48 – 38% de B, mantendo-se nesta proporção até 42 min. Utilizou-se vazão de 1 mL/min e detecção no ultravioleta a 214 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 42 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,5 - 50 MUI/mL ( $r^2=0,9999$ ). Paralelamente, desenvolveu-se e validou-se método cromatográfico por exclusão molecular (CL-EM) empregando coluna BioSep-SEC-S 2000 (300 mm x 7,8 mm), mantida a temperatura ambiente (25°C). A fase móvel foi composta de tampão fosfato de potássio monobásico 1mM, fosfato de sódio dibásico 8mM e cloreto de sódio 200mM, pH 7,4, eluída no gradiente de fluxo: 0,01 – 20 min, 0,5 mL/min; 20 – 25 min, 0,5 – 1,7 mL/min; 25 – 35 min, 1,7 mL/min; 35 – 38 min, 1,7 – 0,5 mL/min; 38 – 40 min, 0,5 mL/min. O método foi linear na faixa de concentração de 0,5 - 50 MUI/mL ( $r^2=0,9996$ ). Ambos os procedimentos foram validados com base nos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e detecção. Os métodos foram aplicados para avaliação de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos, contribuindo para o estabelecimento de alternativas que aprimoram o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biológico.

Palavras-chave: cromatografia líquida, exclusão molecular, fase reversa, interferon alfa, validação.

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science  
Federal University of Santa Maria

### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR THE EVALUATION OF INTERFERON-ALFA 2a IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS**

AUTHOR: LUCÉLIA MAGALHÃES DA SILVA

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, March 17<sup>th</sup> 2009.

The interferon is a cytokine with antiviral, antiproliferative, and immunomodulatory properties. It is a protein synthesized by cells in response to viral infection, producing successive biochemistry alterations. The chromatographic methods for evaluation of recombinant interferon-alfa 2a (rhIFN- $\alpha$ 2a) in pharmaceutical products were validated in the present work. The reversed-phase liquid chromatography method (RP-LC) was developed and validated using a Jupiter C<sub>4</sub> column (250 mm x 4.6 mm), maintained at ambient temperature (25°C). The mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B consisted of 0.1% TFA in acetonitrile, run in gradient: 0.01 – 1 min, 38% of B; 1 – 5 min, 38 – 43% of B; 5.01 – 20 min, 43 – 45% of B; 20.01 – 30 min, 45 – 48% of B; 30.01 – 40 min linear back to 38% of B and 40 – 42 min, 38% of B. The flow rate used was 1 mL/min with detection at 214 nm. The chromatographic separation was obtained within 42 min and it was linear in the concentration range of 0.5 – 50 MIU/mL ( $r^2=0.9999$ ). The size exclusion method was developed and validated using a BioSep-SEC-S 2000 (300 mm x 7.8 mm), maintained at ambient temperature (25°C). The mobile phase consisted of 1mM potassium phosphate monobasic, 8mM sodium phosphate dibasic and 200mM sodium chloride buffer, pH 7.4, run at a gradient flow rate: 0.01 – 20 min, 0.5 mL/min; 20 – 25 min, 0.5 – 1.7 mL/min; 25 – 35 min, 1.7 mL/min; 35 – 38 min, 1.7 – 0.5 mL/min; 38 – 40 min, 0.5 mL/min. The method was linear in the concentration range of 0.5 - 50 MIU/mL ( $r^2=0.9996$ ). The procedures were validated by the parameters of specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of quantitation and limit of detection. The methods were applied for the evaluation of the rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical products, contributing for the establishment of alternatives which improve the quality control, assuring the safety and therapeutic efficacy of the biological product.

Keywords: interferon alfa, liquid chromatography, reversed phase, size exclusion, validation.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Estrutura primária do rhIFN- $\alpha$ 2a com suas duas pontes dissulfeto, adaptada (CINDRIC & VULETIC, 2003).....17
- FIGURA 2 - Representação da estrutura tri-dimensional do rhIFN- $\alpha$ 2a, adaptada (KLAUS et al., 1997).....17
- FIGURA 3 - Eventos celulares de indução, produção e ação do IFN, adaptada (BARON & DIAZANI, 1994).....18
- FIGURA 4 - Ligação e sinalização do IFN- $\alpha$ , adaptada (PESTKA et al., 2004).....19

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

- FIGURE 1 – LC chromatograms of interferon- $\alpha$ 2a (6 MIU/mL). (a) Interferon- $\alpha$ 2a reference standard substance solution: peak 1 = rhIFN- $\alpha$ 2a. (b) After degradation by oxidative conditions: peak 1 = deamidates, 2 = sulphoxides, 3 = rhIFN- $\alpha$ 2a. (c) Interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations: peak 1 = deamidates, 2 = sulphoxides, 3 = rhIFN- $\alpha$ 2a .....36

### CROMATOGRAFIA LÍQUIDA POR EXCLUSÃO MOLECULAR 4.1

- FIGURA 1 - Cromatogramas obtidos por CL-EM na concentração de 6 MUI/mL : (A) SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a: pico 1 – excipiente, pico 2 - rhIFN- $\alpha$ 2a.(B) Produto farmacêutico: picos 1,3 e 4 – excipientes e pico 2 - rhIFN- $\alpha$ 2a. (C) Produto farmacêutico após degradação: picos 1,5 e 7 – excipientes, pico 2- agregado, pico 3 – dímero, pico 4 – rhIFN- $\alpha$ 2a não-alterado e pico 6 – glutaraldeído.....54
- FIGURA 2 – Representação gráfica da curva de calibração da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a obtida por cromatografia líquida por exclusão molecular na faixa de 0,5 a 50 MUI/mL (n = 3).....55



## LISTA DE TABELAS

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1**

TABLE 1 – Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations.....	37
TABLE 2 – Accuracy of RP-LC for interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations .....	38
TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing. ...	39
TABLE 4 – Determination of interferon- $\alpha$ 2a (rhIFN- $\alpha$ 2a) in pharmaceutical formulations by the RP-LC method .....	40

### **CROMATOGRAFIA LÍQUIDA POR EXCLUSÃO MOLECULAR 4.1**

TABELA 1 – Parâmetros do método analítico otimizado por cromatografia líquida por exclusão molecular.....	46
TABELA 2 – Resultados da curva de calibração calculados pelos métodos dos mínimos quadrados.....	55
TABELA 3 – Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método analítico para análise de rhIFN- $\alpha$ 2a por cromatografia líquida por exclusão molecular .....	56
TABELA 4 – Determinação da exatidão do método analítico para análise de rhIFN- $\alpha$ 2a por cromatografia líquida por exclusão molecular.....	57
TABELA 5 – Resultados da avaliação da robustez do método analítico para análise de rhIFN- $\alpha$ 2a por cromatografia líquida por exclusão molecular .....	58
TABELA 6 – Determinação das potências obtidas por cromatografia líquida por exclusão molecular de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BP	Farmacopéia Britânica
Células NK	Células natural killer
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human use
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMCV	Vírus da encefalomiocardite
EMA	European Medicines Agency
EP	Farmacopéia Européia
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de interferon- $\alpha$
ISRE	Elemento responsivo pelo estímulo de interferon
kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minutos
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MUI	Milhões de unidades internacionais
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pI	Ponto isoelétrico
$r^2$	Coefficiente de determinação
rhIFN- $\alpha$ 2a	Interferon-alfa 2a humano recombinante
SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a	Substância biológica de referência de interferon- $\alpha$ 2a humano recombinante
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
VSV	Vírus da estomatite vesicular
°C	Grau Celsius
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
<b>3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	28
<b>4 METODOLOGIA DESENVOLVIDA A SER PUBLICADA</b> .....	43
<b>4.1 Cromatografia líquida por exclusão molecular</b> .....	44
4.1.1 Materiais .....	44
4.1.2 Método .....	46
4.1.3 Resultados .....	53
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66

## **INTRODUÇÃO**

---

# 1 INTRODUÇÃO

---

Os interferons são citocinas potentes que possuem atividade antiviral, imunomoduladora e antiproliferativa, influenciando o metabolismo, crescimento e diferenciação das células. São produzidos pelas células, em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo ácidos nucleicos virais, células estranhas, particularmente as neoplásicas, antígenos de bactérias, protozoários e vírus (BARON et al., 1992; PFEFFER et al., 1998).

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a clonagem e expressão do gene do interferon alfa humano (hIFN $\alpha$ ) em bactérias, especialmente *Escherichia coli*, com produção do interferon alfa humano recombinante (rhIFN $\alpha$ ), que encontra-se disponível sob a forma não-glicosilada. Devido às suas atividades farmacológicas, está sendo cada vez mais utilizado clinicamente para tratamento de infecções virais, como hepatites B e C crônicas, leucemias, condiloma, sarcoma de Kaposi, linfomas, melanomas, mielomas e carcinomas (FELD & HOOFNAGLE et al., 2005; SILVA et al., 2008).

Existem dois tipos de interferons- $\alpha$  recombinantes, o rhIFN- $\alpha$ 2a e o  $\alpha$ 2b que, estruturalmente, são proteínas bioterapêuticas não glicosiladas com 165 aminoácidos, diferindo pela presença dos aminoácidos lisina e arginina, respectivamente, na posição 23, com duas pontes dissulfeto e peso molecular de, aproximadamente, 19,2 kDa (KLAUS et al., 1997).

A avaliação de biomoléculas produzidas por expressão em sistemas celulares, por métodos eficientes e validados é fundamental para assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos, durante o processo de registro. Além disso, são importantes para viabilizar possíveis estudos de similaridade de macromoléculas biologicamente ativas. Por sua vez, as especificações preconizadas para os produtos biológicos visam garantir a eficácia e segurança clínica (EMEA, 2005; LONGSTAFF et al., 2009).

A presença de formas relacionadas e degradadas nas proteínas recombinantes de uso terapêutico, pode causar efeitos indesejáveis com redução ou perda de toda a atividade farmacológica. Desse modo, devem ser submetidas a técnicas de controle da qualidade determinando o conteúdo de cada forma e estabelecendo limites nos produtos farmacêuticos. Nesse sentido, diferentes técnicas analíticas encontram-se disponíveis para avaliação da identidade, pureza e potência. A avaliação de potência dos rhIFN- $\alpha$  tem sido realizada através

de ensaio biológico *in vitro*, baseado na inibição do efeito citopático de linhagens virais (VSV e EMCV) sobre linhagens celulares (MDBK e WISH), com as respostas espectrofotométricas determinadas pela incorporação de corantes vitais como azul de alamar e sais de tetrazólio (MEAGER et al., 2001). Recentemente, também foram introduzidos bioensaios baseados na atividade antiproliferativa utilizando células Daudi e linhagem de células geneticamente modificadas (CASERMAN et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Por sua vez, os métodos por cromatografia líquida viabilizam a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas, sendo estudados como alternativa ou para uso em combinação com os bioensaios. Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) com detecção no ultravioleta são amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e determinação das formas oxidadas e desamidadas de proteínas (RIBELA et al., 2006; ZARRIN et al., 2006). Do mesmo modo, a cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) é uma técnica versátil e bastante utilizada para determinação de proteínas e das formas agregadas na sua configuração nativa, pois suas condições de eluição são compatíveis com macromoléculas biológicas (QIAN et al., 2008). Acrescenta-se que após o desenvolvimento do método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que o procedimento atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (WANG, 1999; ICH, 2005).

O presente trabalho teve por objetivos desenvolver e validar métodos por cromatografia líquida: a) em fase reversa para a avaliação de proteínas relacionadas e da forma não-alterada de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos, b) por exclusão molecular para a avaliação de potência e determinação de dímeros e agregados de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos sem albumina na formulação. Desse modo, pretendeu-se contribuir para o aprimoramento do controle da qualidade e estabelecimento de alternativas, garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse medicamento.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

---



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

Os interferons são citocinas produzidas pelas células, em resposta a diferentes estímulos, incluindo ácidos nucleicos virais, células estranhas, particularmente as neoplásicas, antígenos de bactérias, protozoários e vírus. Apresentam ação antiviral, imunomoduladora e antiproliferativa, que influenciam o metabolismo, crescimento e diferenciação das células (BARON et al., 1992; PFEFFER et al., 1998).

Estudos baseados na relação estrutura-atividade e de “competição-cruzada” de ligação com receptores permitiram classificar os IFNs em: tipos I e II (MEAGER et al., 2002; ARDUINI et al., 2004). Os IFNs tipo I classificam-se em IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\omega$ , com base nas suas propriedades imunogênicas e seqüência de aminoácidos, sendo geralmente estáveis em pH ácido. Os IFN- $\alpha$  e IFN- $\omega$  são produzidos por leucócitos e podem ser induzidos por células alogênicas, células infectadas por vírus, células tumorais, bactérias e envelopes virais que estimulam linfócitos B, células NK e macrófagos. O IFN- $\beta$ , produzido por fibroblastos, é induzido por ácido nucleico de vírus e outros microorganismos que infectam células como fibroblastos, células epiteliais e macrófagos. O IFN tipo II, também denominado de IFN- $\gamma$  ou IFN imune, é instável em meio ácido e é induzido por linfócitos T estimulados por antígenos estranhos, sendo produzido principalmente por células T ativadas e células NK (PFEFFER et al., 1998; TÖLÖ et al., 2001; LANGER, 2007).

Estruturalmente o rhIFN- $\alpha$ 2a é um proteína constituída de 165 aminoácidos, contendo duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições (Cis<sup>1,98</sup> e Cis<sup>29,138</sup>), com ponto isoelétrico (pI) entre 5,8 e 6,3 e massa molecular de, aproximadamente, 19,2 kDa. A fórmula química é C<sub>860</sub>H<sub>1353</sub>N<sub>229</sub>O<sub>255</sub>S<sub>9</sub> e a estrutura primária está representada na Figura 1. Os rhIFN- $\alpha$ 2a e  $\alpha$ 2b diferem pela presença dos aminoácidos lisina e arginina, respectivamente, na posição 23 (KLAUS et al., 1997; CINDRIC & VULETIC, 2003; BP, 2007; THITINAN & McCONVILLE, 2008).

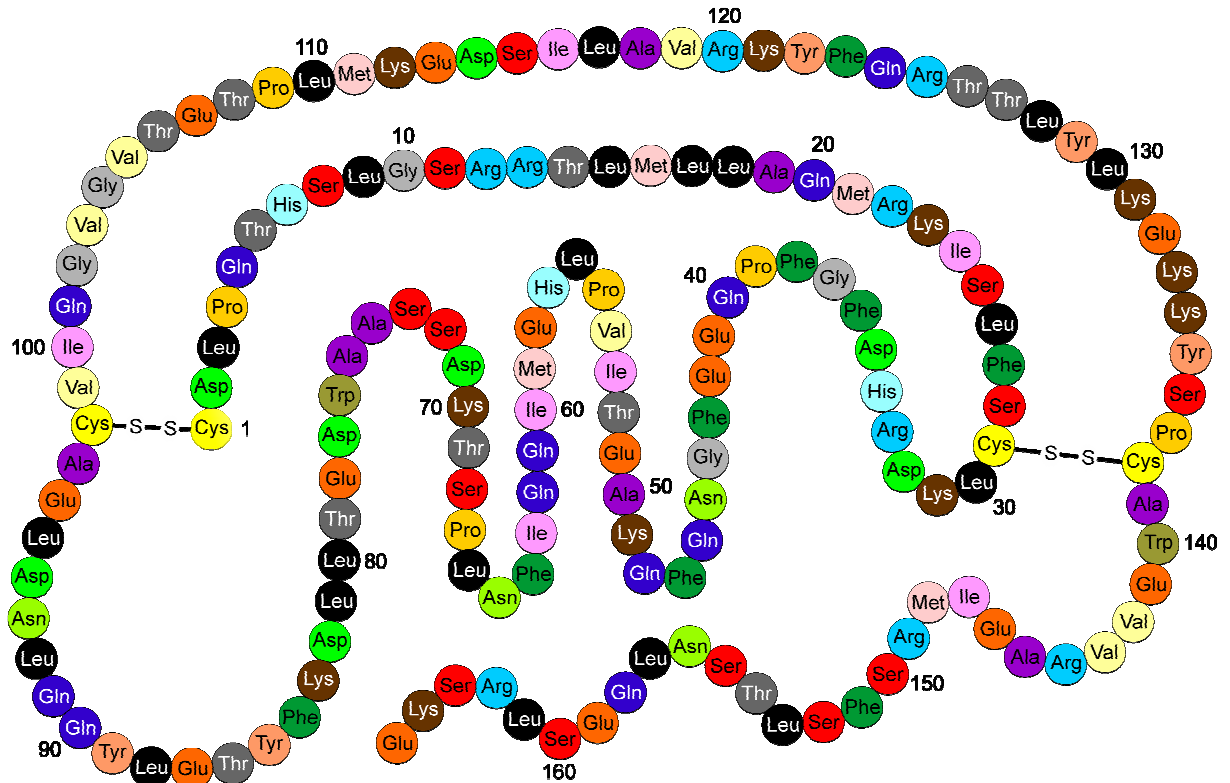


Figura 1 – Estrutura primária do rhIFN- $\alpha$ 2a com suas duas pontes dissulfeto, adaptada (CINDRIC & VULETIC, 2003).

A estrutura tridimensional do rhIFN $\alpha$ -2a está representada na Figura 2 (KLAUS et al., 1997).



Figura 2 – Representação da estrutura tri-dimensional do rhIFN- $\alpha$ 2a, adaptada (KLAUS et al., 1997).

A produção inicial do IFN ocorre através de indutores, que podem ser componentes de célula alogênica, ácido nucléico ou antígeno estranhos, que interagem com as células, ativando os genes do IFN, seguido da produção do mRNA. Após tradução, o IFN é secretado para o fluído extracelular onde interage com receptor na membrana das células produtoras ou células ativadas. Essas ativam os genes que codificam proteínas efetoras, as quais estabelecem resistência antiviral e a alteração de células vizinhas para então produzir proteínas efetoras, como mostra a figura 3 (BARON & DIAZANI, 1994; MATTHEWS & McCOY, 2004; PESTKA et al., 2004; FELD & HOOFNAGLE, 2005).

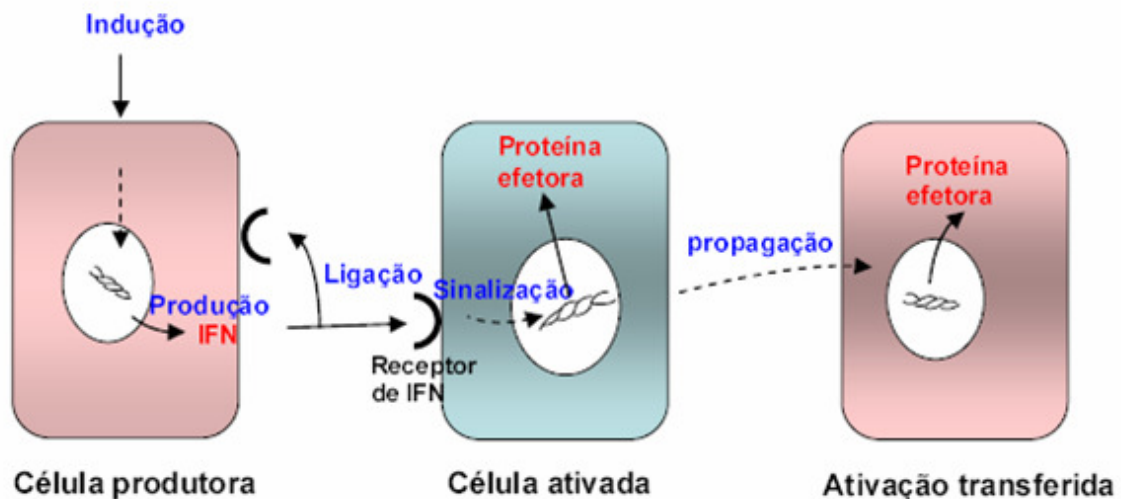


Figura 3: Eventos celulares de indução, produção e ação do IFN, adaptada (BARON & DIAZANI, 1994).

A ligação do IFN- $\alpha$  com seus receptores desencadeia cascata de reações intracelulares, envolvendo a fosforilação de resíduos de tirosina, conforme a figura 4. Ao ligar-se ao receptor, o IFN- $\alpha$  desencadeia a fosforilação de 2 membros da família da JAK (*Janus* quinase): a tirosina quinase 2 (Tyk 2) e a Janus quinase 1 (Jak 1), que ativadas são mediadoras da fosforilação dos resíduos de tirosina das subunidades IFNAR 1 e IFNAR 2c, respectivamente. Após a fosforilação do receptor, ocorre a fosforilação do STAT 1 e do STAT 2 (transdutor de sinal e ativador de transcrição) e a seguir o heterodímero fosforilado STAT 1-STAT 2 combina-se com outra proteína citoplasmática denominada p48. Este complexo é rapidamente translocado para o núcleo e liga-se ao ISRE (elemento responsivo pelo estímulo de interferon), presente nas regiões regulatórias de genes induzidos pelo IFN- $\alpha$ ,

para iniciar a transcrição. A seguir, esses genes são traduzidos para proteínas efetoras tais como: a 2',5'-oligoadenilato sintetase,  $\beta$ 2-microglobulina, neopterin e outras. Essas proteínas são responsáveis pelos efeitos antiviral, antiproliferativo e imunomodulador, indução de citocinas e regulação do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) I e II (LI et al., 1997; ORITANI et al., 2001; PESTKA et al., 2004; THITINAN & McCONVILLE, 2008).

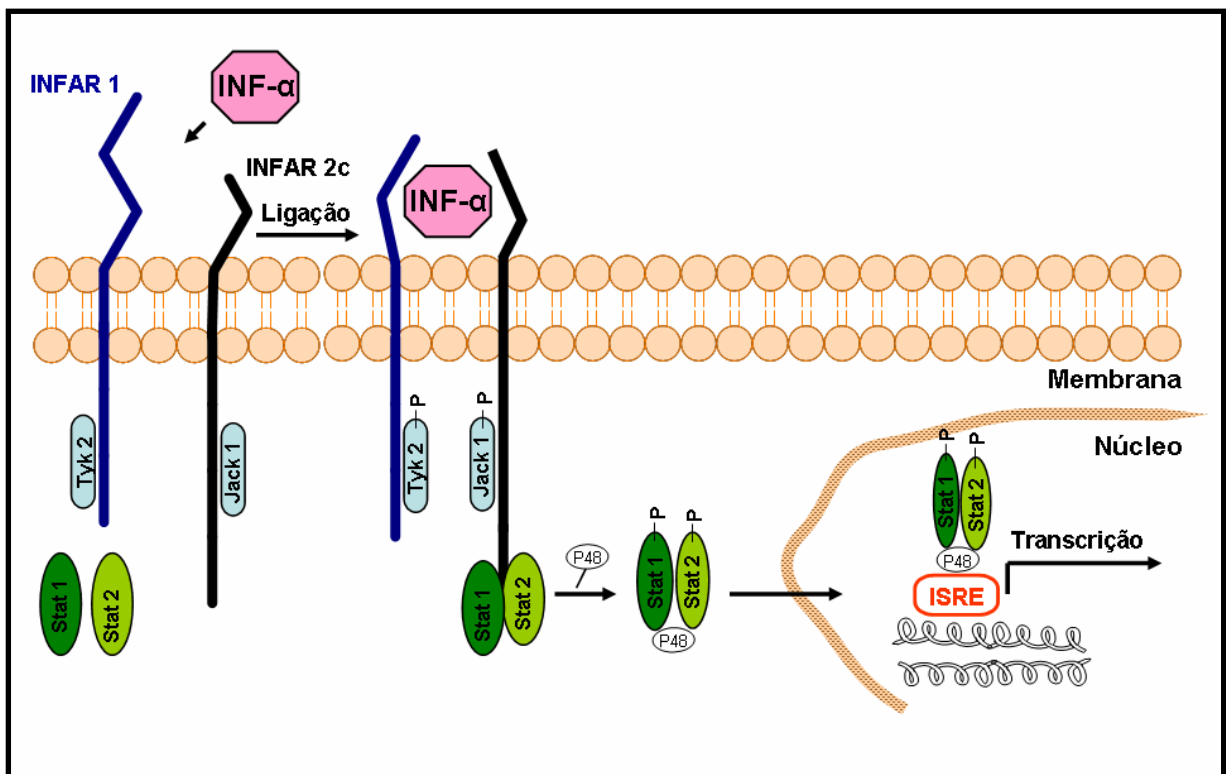


Figura 4: Ligação e sinalização do IFN- $\alpha$ , adaptada (PESTKA et al., 2004).

Portanto, o IFN- $\alpha$  possui potente atividade antiviral, agindo através da indução de genes, protegendo as células da infecção ou atenuando a produção de pró-genes em células já infectadas e ativando mecanismos indiretos que levam a resposta imune adaptativa (SAMUEL, 2001; FELD & HOOFNAGLE, 2005).

A atividade antiproliferativa do IFN- $\alpha$  ocorre pela ação nas células tumorais de maneira direta ou mediante a ativação das células citotóxicas do sistema imune do hospedeiro, tais como linfócitos T, células NK e macrófagos. O IFN- $\alpha$  também participa da regulação da diferenciação celular, sendo este efeito a base da terapia da leucemia pilosa, anomalia que é

causada por bloqueio na diferenciação das células mielóides em fase de maturação (MEAGER, 2002; LANGER, 2007).

O IFN- $\alpha$  exerce atividades regulatórias sobre o sistema imune, tais como: aumento da expressão do antígeno de MHC classe I, aumento da expressão de receptores de Fc, elevação da produção de anticorpos por maturação de células B, ativação de macrófago, estimulação da atividade de células NK, aumento da produção de interleucina-1 e fator de necrose tumoral por macrófagos e monócitos e aumento da citotoxicidade (PFEFFER et al., 1998, ORITANI et al., 2001; SAMUEL, 2001).

Com base nessas atividades biológicas, o IFN- $\alpha$  é utilizado em cerca de 40 países para tratamento de mais de 14 tipos de câncer e de infecções virais, incluindo leucemia mielóide crônica, leucemia pilosa, câncer de ovário, melanoma, condiloma, sarcoma de Kaposi relacionado a AIDS, hepatite B e C, linfomas de células B e T, mielomas e carcinoma de células renais (PFEFFER et al., 1998; PESTKA et al., 2004).

O IFN- $\alpha$  foi o primeiro medicamento a demonstrar efeitos benéficos em pacientes com hepatite C em 1986. Atualmente, todos os tratamentos da hepatite C são baseados no uso de preparações de IFN- $\alpha$  combinado ou não com a ribavirina. A terapia resulta em rápido declínio dos níveis do vírus da hepatite C no soro e, a longo prazo, ocorre sua extinção no soro e fígado, ocorrendo a cura da infecção crônica (FELD & HOOFNAGLE, 2005; THITINAN & McCONVILLE, 2008).

O rhIFN- $\alpha$ 2a encontra-se disponível como produto farmacêutico para injeção intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). A dose inicial para pacientes com hepatite C crônica é de 3 milhões de unidades internacionais, sendo administrada três vezes por semana durante 24-48 semanas (THITINAN & McCONVILLE, 2008).

Os IFNs não são absorvidos pelo trato gastrointestinal, pois são degradados pelo ácido gástrico e enzimas proteolíticas, sendo então administrados via parenteral para efeitos sistêmicos. Após injeção IM ou SC, a absorção é alta (maior que 80%), com tempo para atingir o pico de concentração (Tmax) de 3,8 horas e 7,3 horas, respectivamente. IFN- $\alpha$ 2a é detectado no plasma por 4-8 horas após injeção intravenosa (IV) rápida ou infusão e por 16-30 horas após administração IM ou SC (AHFS DRUG INFORMATION, 2007). É amplamente distribuído pelos tecidos corporais com altas concentrações encontradas no baço, rins, fígado e pulmão. O volume de distribuição em humanos é de 20-60% do peso corporal e a meia-vida de eliminação do plasma após injeção ou infusão IV é rápida (2-3 horas) e após administração SC e IM é mais lenta (3-8 horas). Os IFNs são totalmente filtrados nos glomérulos e degradados por proteases durante a reabsorção tubular, de maneira que não

reaparecem na circulação sistêmica nem na urina (CHATELUT et al., 1999; THITINAN & McCONVILLE, 2008). Estudos de farmacocinética em humanos mostraram que a meia-vida *in vivo* de IFN- $\alpha$  é relativamente curta devido à depuração renal rápida e susceptibilidade às proteases do soro (WILLS et al.1984; BAILON et al., 2001; SHECHTER et al., 2001; WANG et al., 2002).

Radwanski et al. (1987) realizaram estudo com 12 voluntários saudáveis, para avaliar a biodisponibilidade de IFN- $\alpha$ 2b. Os voluntários receberam uma dose de 5 MUI de IFN- $\alpha$ 2b /m<sup>2</sup> de superfície corporal através das vias de administração IV, IM e SC. Amostras de sangue e urina foram coletadas em tempos específicos e analisadas por radioimunoensaio. Após administrações IM e SC observou-se concentração máxima de 42,1 UI/mL (6 horas) e 45,8 UI/mL (8 horas), respectivamente. A área sob a curva (concentração plasmática x tempo) para administrações SC e IM foi maior que a obtida por IV.

O tratamento com IFN- $\alpha$  apresenta efeitos colaterais, como fadiga, mialgias, dores de cabeça, perda de apetite, depressão, irritabilidade, ansiedade, dificuldade de concentração, insônia, trombocitopenia e neutropenia (LIANG et al., 2000; AHFS DRUG INFORMATION, 2007).

Devido aos efeitos colaterais indesejados, foram estudadas mudanças na molécula protéica, como a conjugação de IFN- $\alpha$ 2a com polímeros de polietilenoglicol (PEG), propiciando a preparação de formas peguiladas sítio-direcionadas que se encontram em uso terapêutico. As reações, método de conjugação e purificação foram revisados destacando-se os avanços necessários e a compreensão da peguilação (FEE & ALISTINE, 2006). A peguilação de proteínas é um método bem estabelecido para diminuição de sua eliminação, redução de sua imunogenicidade e aprimoramento das propriedades físicas (GLUE et al., 2000). Essas propriedades possibilitaram diminuir a frequência de administração para uma vez por semana, mantendo-se estável a concentração sanguínea e aumentando a eficácia do tratamento de pacientes com hepatite C crônica. As meias-vida observadas de IFN- $\alpha$ 2a não modificado e peguilado foram de 2,3 e 50 horas, respectivamente (MATTHEWS & McCOY, 2004).

Os ensaios biológicos *in vitro* têm sido amplamente utilizados para determinação de potência de rhIFN- $\alpha$ . Esses ensaios baseiam-se na inibição do efeito citopático de linhagens virais (VSV e EMCV) sobre linhagens celulares (MDBK e WISH), com as respostas espectrofotométricas determinadas pela incorporação de corantes vitais como azul de alamar e sais de tetrazólio (MEAGER et al., 2001; FOSER et al., 2003; BP, 2007).

No estudo colaborativo internacional da Organização Mundial da Saúde (OMS) que estabeleceu o padrão biológico de referência de rhIFN- $\alpha$  foram adotados vários modelos de ensaios antivirais, com diferentes células, vírus e procedimentos, demonstrando-se respostas semelhantes. Além disso, existem os bioensaios alternativos que não utilizam linhagem viral, que com calibração e validação adequadas podem ser usados para a avaliação de potência em formulações farmacêuticas (MEAGER et al., 2001). Nesse contexto, foi introduzido recentemente o bioensaio baseado na atividade antiproliferativa utilizando células Daudi, que expressam receptores de interferons tipo I. Os resultados têm sido determinados por leituras espectrofotométricas dos corantes vitais incorporados nas células. Igualmente, tem sido aplicado o bioensaio com linhagem de células geneticamente modificadas com ativação de promotor e expressão de marcadores enzimáticos como fosfatase alcalina (MEAGER et al., 2002; CASERMAN et al., 2007; SILVA et al., 2008).

A substância de referência de rhIFN- $\alpha$ 2a da farmacopéia européia é indicada para métodos físico-químicos, sem apresentar informação sobre sua atividade biológica. Por outro lado, o 2º Padrão Internacional de rhIFN- $\alpha$ 2a da Organização Mundial da Saúde possui atividade definida e é indicado para avaliação de potência biológica de rhIFN- $\alpha$ 2a. Nesse sentido, Silva et al. (2007) compararam a atividade biológica das duas preparações de referência, em diferentes modelos de bioensaios, demonstrando atividades específicas similares. Os autores sugeriram o uso do padrão de referência da farmacopéia européia também para bioensaios.

As proteínas requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com o sítio de ação. Por essa razão, é enfatizada a caracterização físico-química para demonstrar estruturas correspondentes às formas biologicamente ativas dos produtos biotecnológicos. As instabilidades químicas e físicas de proteínas recombinantes têm sido investigadas por diferentes técnicas analíticas que incluem cromatografia líquida, espectrometria de massas, análise térmica e eletroforese capilar. Esses procedimentos juntamente com os ensaios de atividade biológica e enzimaensaio, possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, bem como avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos, que por sua vez, podem contribuir para o desenvolvimento de novas moléculas similares (ICH, 1999; WANG, 1999; FDA, 2001; RAO & NAGARAJU, 2003; CHMP, 2005; EMEA, 2005; EP, 2005; LONGSTAFF et al., 2009).

Wang (1999) publicou estudo de revisão sobre os avanços na compreensão do comportamento de proteínas, incluindo o IFN- $\alpha$ , instabilidades e estabilização em meio líquido, importante no desenvolvimento das formulações. Paralelamente, destacou as formas

degradadas e metodologias analíticas publicadas na literatura, usadas juntamente com os ensaios biológicos, para a caracterização e avaliação de proteínas.

A cromatografia líquida destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como um método específico, sensível, robusto e reproduzível, com custo e duração de análise adequados (ZARRIN et al., 2006).

Silva Jr. (2004) destacam a cromatografia líquida por fase reversa (CL-FR) e exclusão molecular (CL-EM), baseadas na hidrofobicidade e tamanho das moléculas, respectivamente, como duas das técnicas mais amplamente empregadas para a separação e controle de qualidade de proteínas. Nesse contexto, esses métodos podem ser utilizados para avaliação de alterações físico-químicas e modificações pós-traducionais na estrutura, que incluem glicosilação, oxidação de resíduos de metionina, sulfatação, desamidação e agregação, causadas por vários fatores como o modo de produção, escolha do sistema de expressão, formulação e condições de armazenamento (HERMELING et al., 2004; SILVA et al., 2008).

As proteínas podem formar dímeros e oligômeros de alta massa molecular, cujas variantes podem ser resultado de ligações covalentes, não-covalentes ou por pontes dissulfeto. Essas agregações podem ser induzidas por temperaturas elevadas, agitação mecânica, mudanças de pH, liofilização, aumento da concentração de sais e interação com a embalagem da preparação farmacêutica. Agregação de proteínas pode gerar bioatividade reduzida e reações imunogênicas. A CL-EM é a melhor opção analítica para avaliar a provável presença de impurezas resultantes da fragmentação, agregação ou oligomerização. É uma técnica versátil e amplamente utilizada para determinação de proteínas e suas espécies agregadas na sua forma nativa, utilizando fase móvel tipicamente constituídas de tampões na faixa de pH de 6-8, minimizando assim, a desnaturação das proteínas (BARTH et al., 1998; TREUHEIT et al., 2002; GOETZ et al., 2004; QIAN et al., 2008).

Por outro lado, os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas e, em combinação com detecção no ultravioleta, têm sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e quantificação de formas oxidadas e desamidadas das proteínas (BUCHHEIT et al., 2002; AHRER & JUNGBAUER, 2006; DALMORA et al., 2006; RIBELA et al., 2006). Um inconveniente deste método é a possível desnaturação ou dissociação das proteínas adsorvidas à matriz da coluna, não sendo apropriado para estabelecer a potência dos produtos farmacêuticos que contêm oligômeros não covalentes e



polímeros biologicamente inativos (DALMORA et al., 1997; WANG, 1999; OLIVEIRA et al., 2007).

Silva et al. (2008) investigaram procedimentos físico-químicos e ensaios biológicos para detectar alterações nas preparações de rhIFN- $\alpha$ 2a e rhIFN- $\alpha$ 2b submetidas às condições de estresse. As amostras foram tratadas por condições que incluíram oxidação dos resíduos de metionina e armazenamento à elevadas temperaturas, induzindo a vários graus de degradação, agregação ou oxidação de rhIFN. A atividade biológica das preparações foi avaliada por três diferentes bioensaios baseados em cultura de células, demonstrando redução da atividade. Além disso, métodos físico-químicos como eletroforese em gel, CL-FR, CL-EM e dispersão de luz dinâmica foram utilizados para detectar alterações estruturais nas amostras que possam refletir na atividade biológica.

Beldarraín et al. (2001) realizaram a purificação e o estudo das propriedades conformacionais utilizando rhIFN- $\alpha$ 2b produzido em *E. coli*. Os autores realizaram análises por calorimetria diferencial para avaliar a estabilidade da biomolécula com base no pH e força iônica, demonstrando a importância do procedimento físico-químico para sua caracterização e atividade.

Cindric & Vuletic (2003) caracterizaram rhIFN- $\alpha$ 2b expresso em *E. coli* por mapeamento trípico, análise por CL-FR em coluna C<sub>18</sub> e por espectrometria de massas, acrescentando informações sobre sua estrutura.

Ruiz et al. (2003) estudaram formulações aquosas de rhIFN- $\alpha$ 2b sem albumina, avaliando os efeitos de estabilizantes como polissorbatos e polietilenoglicol, visando também reduzir os efeitos imunogênicos de possíveis agregados. As análises foram realizadas por CL-FR, ensaio de atividade antiviral, ensaio imunoenzimático e também por estudos de farmacodinâmica e farmacocinética para demonstrar a estabilidade de longa duração.

Gitlin et al. (1996) investigaram o perfil de pureza do rhIFN- $\alpha$ 2b, obtido através da técnica do DNA recombinante, empregando diferentes métodos cromatográficos e eletroforéticos. A CL-FR sob gradiente, revelou baixa porcentagem de impurezas protéicas que eluíam antes do pico principal. As impurezas foram isoladas por CL-FR, identificadas e caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Huang et al. (2005) demonstraram a aplicação da titulação por calorimetria isotérmica no estudo da estabilidade física de interferon  $\alpha$ -2a, avaliando a influência dos diferentes fatores, incluindo temperatura, sais e tensoativos, e a importância do equilíbrio entre as forças intra e intermoleculares. As análises de formas agregadas foram realizadas por CL-EM, sendo

sugerido o procedimento para monitorar os estágios de purificação, desenvolvimento e armazenagem de formulações.

Luykx et al. (2005) adotaram diferentes métodos analíticos incluindo cromatografia com detecção por UV, dicroísmo circular e fluorescência intrínseca para monitorar as propriedades conformacionais do rhIFN- $\alpha$ 2b, submetido a análises por CL-FR e por CL-EM. Demonstraram também a importância dos procedimentos para a análise quantitativa, das propriedades conformacionais das biomoléculas, formas agregadas e de impurezas.

Ruiz et al. (2006a) pesquisaram rhIFN- $\alpha$ 2b em solução avaliando a influência de tampões, estabilizantes, agentes estressantes e concentração da proteína através da análise por eletroforese e CL-FR, demonstrando estabilidade da formulação. Os autores concluíram que a agregação é aumentada com tampão fosfato de sódio e diminuída com citrato de sódio. O estabilizante EDTA foi mais eficaz do que os polissorbatos 20 e 80 na prevenção da formação de agregados. Os íons metálicos  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  aumentaram a agregação, provavelmente por reação indeterminada catalisada por metal. No mesmo sentido, Ruiz et al. (2006b) avaliaram a influência da concentração na estabilidade de rhIFN- $\alpha$ 2b, realizando estudos de estabilidade acelerada e de longa duração de formulação líquida sem albumina, com análises de atividade biológica, ELISA e CL-FR.

Sharma & Kalonia (2003) estudaram os efeitos das características da solução na conformação estrutural de rhIFN- $\alpha$ 2a, investigando a tendência de formar intermediários parcialmente alterados. As propriedades estruturais da proteína foram estudadas em diferentes pHs (2,0 - 7,4) e temperaturas (5 - 80 °C) utilizando espectrometria por fluorescência, dicroísmo circular e calorimetria diferencial. Os autores observaram maiores alterações nas soluções com altas temperaturas e baixos pH.

Recentemente, foi desenvolvido e parcialmente validado método por CL-FR para determinação de rhIFN- $\alpha$ 2b usando coluna  $C_4$ . O limite de quantificação obtido foi de 0,25 MUI/mL, sendo sugerida a aplicação da metodologia para o controle da qualidade sem, entretanto, avaliar a especificidade do método (ZARRIN et al., 2006).

Destaca-se também o avanço no sentido do desenvolvimento de novas moléculas, especialmente a forma peguilada, que foi estudada e caracterizada por diferentes técnicas analíticas que incluem eletroforese, cromatografia líquida e espectrometria de massas avaliando-se também a atividade de isômeros. Paralelamente, foi efetuada a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos, em ratos, comparando diferentes vias de administração para produtos peguilados e não-modificados, demonstrando suas vantagens terapêuticas (FOSER et al., 2003; HARRIS & CHESS, 2003; ARDUINI et al., 2004).

O rhIFN- $\alpha$ 2b peguilado foi submetido à caracterização estrutural e biológica por diferentes técnicas analíticas, comparando com a forma nativa (GRACE et al., 2001). O rhIFN- $\alpha$ 2a foi monoconjugado com polietilenoglicol e os diferentes isômeros de posição foram isolados e caracterizados por técnicas analíticas incluindo eletroforese, CL-FR e CL-EM, espectrometria de massas e bioensaio antiviral, demonstrando atividade variável de cada forma (FOSER et al., 2003). Derivados do rhIFN $\alpha$  foram preparados usando a combinação de metoxipolietilenoglicol, com pesos de 2 e 5 kDa, com técnicas de microencapsulação, e submetidos à estudos de caracterização (DIWAN & PARK, 2003). A peguilação sítio-específica de rhIFN  $\alpha$ -2a foi estudada através da adsorção por interação eletrostática, da proteína em matriz de troca iônica com PEG-aldeído de pesos moleculares 5, 10 e 20 kDa, em meio ácido. Diferentes técnicas foram usadas para caracterizar a forma modificada incluindo estabilidade térmica e ensaio da atividade antiviral (LEE et al., 2007).

A Farmacopéia Britânica 2007 (BP, 2007), em sua monografia da solução concentrada de rhIFN- $\alpha$ 2a, especifica potência de não menos que 140 MUI/mg de proteína e, além disso, conter quantidade superior a 200 MUI/mL de rhIFN- $\alpha$ 2a. A potência estimada nos ensaios deve estar entre 80 – 125% e o intervalo de confiança ( $P=0,95$ ) de 64 – 156%. A Farmacopéia Americana (USP 30, 2007) não faz referência ao rhIFN- $\alpha$ 2a.

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005). Os principais parâmetros a serem avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito, na presença de outros constituintes da amostra que inclusive poderiam interferir na sua determinação, como excipientes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa. A linearidade corresponde à capacidade do método analítico para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância sob análise. A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. É medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser feita a partir de, no mínimo, seis determinações na concentração estabelecida correspondente a 100%. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão normalmente é

expressa através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação. O limite de detecção corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, porém não necessariamente quantificada com valor exato, utilizando o procedimento experimental. O limite de quantificação representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. A robustez descreve a reprodutibilidade do método analítico, frente a pequenas variações nas condições experimentais, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, entre outros. O teste de adequabilidade do sistema consiste na verificação da resolução e reprodutibilidade do procedimento analítico, e deve ser realizado através da análise de parâmetros como simetria, fator de capacidade, pratos teóricos, resolução, área e tempo de retenção. Desse modo, esses parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (SWARTZ & KRULL, 1998; FDA, 2001; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; USP 30, 2007).

Os estudos de métodos físico-químicos alternativos aos bioensaios *in vitro*, são importantes para as análises qualitativas e quantitativas das proteínas relacionadas, e das formas de alta massa molecular das macromoléculas biologicamente ativas. Além disso, a precisão, exatidão, condições e facilidade de execução em relação ao ensaio biológico contribuem para aprimorar o controle da qualidade dos produtos biológicos. Atualmente, os métodos preconizados para as etapas pré-clínicas, avaliação de identidade, pureza, potência e caracterização das biomoléculas são importantes também para fundamentar estudos de biosimilaridade conforme preconizam os guias internacionais, com os avanços sucessivos na área de bioterapêuticos (CHMP, 2005; EMEA, 2005).

## **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA**

---

### 3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

---

3.1 – SILVA, L. M.; SOUTO, R. B.; SANGOI, M. S.; ALCORTE, M. D.; DALMORA, S. L. Validation of an RP-LC method for the determination of Interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.32, p. 370-382, 2009.

## Validation of an RP-LC Method for the Determination of Interferon- $\alpha$ 2a in Pharmaceutical Formulations

Lucélia Magalhães da Silva, Ricardo Bizogne Souto, Maximiliano da Silva Sangoi, Mariel Dourado Alcorde, and Sérgio Luiz Dalmora

Department of Industrial Pharmacy and Postgraduate Program  
in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria,  
Santa Maria-RS, Brazil

**Abstract:** A reversed phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the determination of interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations. The RP-LC method was carried out on a Jupiter C<sub>4</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm I.D.), maintained at room temperature. The mobile phase A consisted of 0.1% TFA and the mobile phase B was acetonitrile with 0.1% TFA, run at a flow rate of 1 mL/min, and using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The chromatographic separation was obtained with the retention time of 32.6 min, and was linear in the concentration range of 0.5–50 MIU/mL ( $r^2 = 0.9999$ ). The specificity was proven through degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.84% with bias lower than 1.87%. The limits of detection and quantitation were 0.19 and 0.5 MIU/mL, respectively. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision and robustness. The proposed method was applied for the analysis of the interferon- $\alpha$ 2a and their related proteins in parenteral dosage forms, contributing to establishing alternatives to improve the quality control assuring the therapeutic efficacy of the biological medicine.

**Keywords:** Formulations, Interferon- $\alpha$ 2a, Pharmaceutical, Reversed phase liquid chromatography, Validation

Correspondence: Sérgio Luiz Dalmora, Department of Industrial Pharmacy and Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105–900 Santa Maria-RS, Brazil. E-mail: sdalmora@terra.com.br

## INTRODUCTION

Interferons are cytokines with antiviral, antiproliferative, and immunomodulatory properties.<sup>[1-4]</sup> Due to this broad spectrum of biological activities, the recombinant human interferon- $\alpha$ 2a (rhIFN- $\alpha$ 2a) produced by recombinant DNA technology, it is currently being used worldwide for the therapy of various neoplastic disorders and chronic viral diseases, which includes leukemia, multiple myeloma, and hepatitis B and C, with or without other complementary drugs.<sup>[5-7]</sup> The polypeptidic structure of rhIFN- $\alpha$ 2a consists of 165 amino acids with two disulphide bonds between Cys<sub>1</sub> and Cys<sub>98</sub> and Cys<sub>29</sub> and Cys<sub>138</sub>, and molecular mass of 19.2 kDa.<sup>[4,8]</sup>

The antiviral assays, the majority based on cell cultures, were the first type of biological assays to measure the relative activity of interferons. The assessment of the biological potency of rhIFN- $\alpha$ 2a has been performed by the *in vitro* cytopathic assay based on its protective effect of a variety of cell/virus systems and assay designs. Mainly, the rhIFN- $\alpha$ 2a sensitive human amniotic cell line (WISH) has been used against the vesicular stomatitis virus (VSV), evaluating the responses as viable protected cells stained with vital dyes, such as tetrazolium salts and alamar blue, followed by spectrophotometric measurements of dye absorbances in the microplates reader.<sup>[9,10]</sup> However, subsequent discoveries of several other biological activities of interferon has opened the way to the development of assays based on one or other of these activities. The latter include inhibition of cell proliferation, regulation of functional cellular activities, regulation of cellular differentiation, and immunomodulation.<sup>[1]</sup>

The availability of robust, precise, and low time consuming assay methods for detection and quantitation of rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical matrices, is crucial in the development, process monitoring, and quality control of pharmaceuticals.<sup>[11,12]</sup> Liquid chromatography (LC) has been successfully used to monitor the purity, identity, chemical stability, and potency of biologicals obtained through recombinant DNA technology, being also capable of monitoring minor structural as well as conformational variations occurring in the protein structure, which could lead to significant changes in biological activity of the drug.<sup>[13-16]</sup> Size exclusion liquid chromatography (SE-LC) is performed under separation conditions, which are expected not to affect the conformational structure of the protein, and was used to quantify native protein of biopharmaceuticals and to determine dimers and oligomers.<sup>[17,18]</sup> LC, with UV circular dichroism and intrinsic fluorescence detection, was applied to monitor conformational properties of rhIFN- $\alpha$ 2b during reversed phase liquid chromatography (RP-LC) analysis, and to discriminate conformational properties of aggregates from the corresponding native protein during SE-LC.<sup>[17]</sup> Besides, the RP-LC was applied for quantification of pharmaceutical proteins, including interferons, and for the analysis of closely related protein



variants.<sup>[19]</sup> Different analytical techniques such as peptide mapping, RP-LC on a C<sub>4</sub> column and mass spectrometry, were used to characterize the primary structure of rhIFN- $\alpha$ 2b produced by *Escherichia coli*.<sup>[4]</sup> The RP-LC method was developed and partially validated on a C<sub>4</sub> column with UV detection and retention time of 9.67 min, for the quantification of rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical dosage forms and delivery systems. However, the robustness of the method was not demonstrated, the resolution is not appropriate, and the related proteins were not considered in the method development. The complete validation of the method is essential to show that the procedure is suitable for the intended purpose.<sup>[11,20,21]</sup>

The aim of the present study was to optimize and fully validate a specific and accurate gradient RP-LC method with UV detection that could be used for the quantitative analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations, contributing to establishing alternatives to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy of the biological.

## EXPERIMENTAL

### Chemicals and Reagents

European Pharmacopoeia Certificated Reference Standard (Ph. Eur. CRS) for interferon- $\alpha$ 2a, a total of eight batches of rhIFN- $\alpha$ 2a from three manufacturers, containing 6 MIU/mL of rhIFN- $\alpha$ 2a was identified by Arabic numbers from 1 to 6, and two batches containing 9 MIU/mL were identified by Arabic number 7 and 8. The samples were obtained from commercial sources within their shelf life period. Hydrogen peroxide 30% in aqueous solution, potassium phosphate monobasic, polysorbate 80, acetonitrile, and trifluoroacetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### Apparatus and Analytical Conditions

The LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, DGU-14A degasser, SIL-10AD<sub>VP</sub> autosampler, and a SPD-M10A<sub>VP</sub> PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP<sup>®</sup> V 6.14 software program. The experiments were performed on a reversed phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C<sub>4</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm I.D., with a pore size of 300Å). A security guard holder was used to protect the analytical column. The Shimadzu

LC system was operated at ambient controlled temperature (25°C). The elution was performed by a gradient at a constant flow rate of 1 mL/min. Mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B consisted of 0.1% TFA in acetonitrile. The applied gradient was as follows: 0.1 min 38% of B, from 1–5 min linear to 43% of B, from 5.01–20 min linear to 45% of B, from 20.01–30 min linear to 48% of B, from 30.01–40 min linear back to 38% and 40–42 min 38% of B. The mobile phases were filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA). The injection volume was 50  $\mu$ L for both standard and samples.

## Procedure

### Samples and Standard Solutions

Working standard and sample solutions of rhIFN- $\alpha$ 2a were prepared daily by diluting the Ph. Eur. CRS for rhIFN- $\alpha$ 2a and the samples of pharmaceutical formulations in phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 M; pH 7.4) containing 0.5 mg/mL polyssorbate 80, to a final concentration of 6 MIU/mL, respectively.

### Validation of the Method

Once the chromatographic and the experimental conditions were optimized, the method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, and system suitability test, following the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines.<sup>[21]</sup>

#### Specificity

Specificity of the method towards the drug was established through the determination of the peak purity of the reference sample solution of rhIFN- $\alpha$ 2a (6 MIU/mL) subjected to degradation by oxidative conditions, by adding 30  $\mu$ L of hydrogen peroxide 30% during 1 and 2 hours. Besides, the in-house mixture of the pharmaceutical formulations excipients were also analyzed by the RP-LC method using a PDA detector.

#### Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves, each one with eight reference standard substance concentrations of rhIFN- $\alpha$ 2a, in the range of 0.5–50 MIU/mL prepared in phosphate

buffer containing 0.5 mg/mL polysorbate 80. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 20 min with the mobile phase flowing through the system. Three replicates of 50  $\mu$ L injections of the reference solutions were made to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of rhIFN- $\alpha$ 2a to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

#### Precision and Accuracy

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of the same concentration sample of rhIFN- $\alpha$ 2a, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the drug, to obtain solutions at concentrations of 4.8, 6, and 7.2 MIU/mL, equivalent to 80, 100, and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and added concentrations.

#### Limits of Detection and Quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH,<sup>[21]</sup> using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

#### Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same samples (6 MIU/mL) under a variety of conditions of the method parameters, such as: injection volume, percent of acetonitrile, flow rate, and the wavelength. To assess the stability of sample solutions of rhIFN- $\alpha$ 2a, the samples were tested

being maintained at 2–8°C for 48 h and also placed into the autosampler, at room temperature, for 24 h. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

#### System Suitability Test

To ensure the validity of the analytical procedure, data from five injections of 50  $\mu$ L of the working standard solution containing 6 MIU/mL were used for evaluation of the system suitability parameters, such as asymmetry, number of theoretical plates, retention time, and area, through the CLASS-VP<sup>®</sup> V 6.14 software.

#### Analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a in Pharmaceutical Formulations

For the quantitation of rhIFN- $\alpha$ 2a in the pharmaceutical formulations, the respective solutions were diluted to appropriate concentration with phosphate buffer containing 0.5 mg/mL polysorbate 80, injected in triplicate, and the percentage recoveries of the drug calculated against the reference standard substance.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Optimization of Chromatographic Conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phases were optimized to provide appropriate selectivity and sensitivity. The use of gradient elution resulted in better sensitivity, improving the peak symmetry (about 1.04) with the retention time suitable for the separation also of deamidates and sulphoxides, as usually suggested.<sup>[9,19]</sup> The PDA detector was used for the selection of the best wavelength detection, and the LC method was validated due to the capability and application for the analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a in bulk and pharmaceutical formulations.

### Method Validation

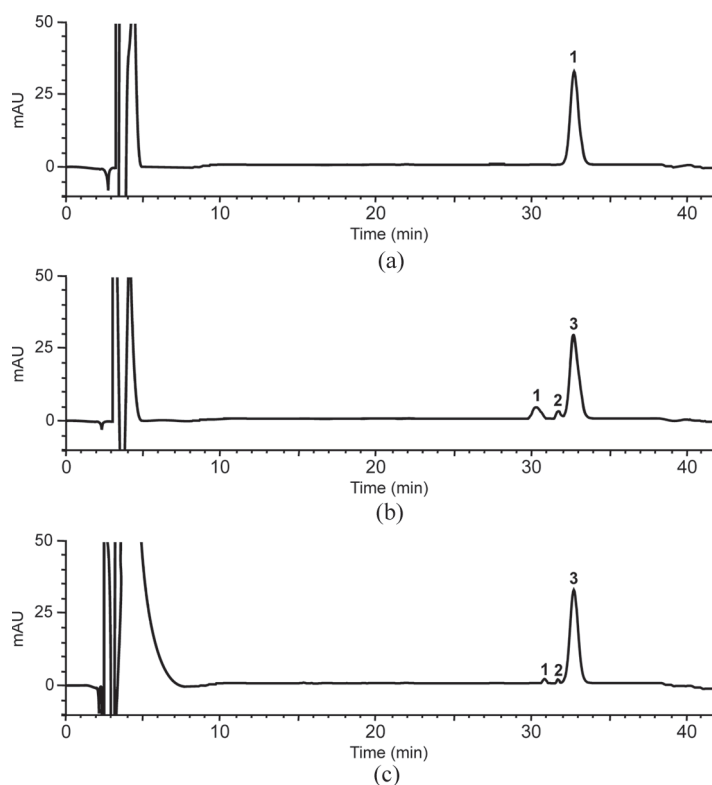
#### Specificity

The specificity of the analytical method was indicated by the oxidative conditions that generated the main peak at 32.6 min and additional peaks of the related proteins with the retention times at 30.5 min and 31.8 min,

as shown in the typical chromatograms in Figure 1. No interference from formulation excipients was found, showing that the peak was free from any coeluting peak, with values of peak purity index higher than 0.9999, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a.

#### Linearity

The analytical curves constructed for rhIFN- $\alpha$ 2a were found to be linear in the 0.5–50 MIU/mL range. The value of the determination coefficient calculated ( $r^2 = 0.9999$ ,  $y = (179698.24 \pm 626.08) x + (4895.37 \pm 11501.32)$ , where,  $x$  is concentration and  $y$  is the peak absolute area) indicated the linearity of the analytical curve for the method. Moreover, the relative



**Figure 1.** LC chromatograms of interferon- $\alpha$ 2a (6 MIU/mL). (a) Interferon- $\alpha$ 2a reference standard substance solution: peak 1 = rhIFN- $\alpha$ 2a. (b) After degradation by oxidative conditions: peak 1 = deamidates, 2 = sulphoxides, 3 = rhIFN- $\alpha$ 2a. (c) Interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations: peak 1 = deamidates, 2 = sulphoxides, 3 = rhIFN- $\alpha$ 2a.

standard error of slope can be used as a parameter with respect to the precision of the regression, as a general acceptance criterion for the linearity performance of the analytical procedure.<sup>[22]</sup> This parameter should be comparable to the relative standard deviation obtained in the evaluation of the precision. The result obtained for the relative standard deviation of the slope is 0.35%, which is lower than the mean value 0.60%, of the RSD of the precision.

### Precision

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the 6 MIU/mL performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 0.77%.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulations on three different days (inter-day); the mean values obtained were 94.38 and 97.73% with RSD 0.55 and 0.41%, respectively. Between analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulations by three analysts; the values were found to be 95.04 and 98.01% with RSD 0.77 and 0.52%, respectively. The results are shown in Table 1.

### Accuracy

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 4.8, 6, and 7.2 MIU/mL. The absolute means obtained for rhIFN- $\alpha$ 2a are shown in Table 2 with a mean value

**Table 1.** Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations

Sample	Inter-day			Between-analysts		
	Day	Recovery <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Analysts	Recovery <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)
1	1	94.02	0.55	A	95.88	0.77
	2	94.98		B	94.64	
	3	94.15		C	94.59	
2	1	98.14	0.41	A	98.56	0.52
	2	97.72		B	97.92	
	3	97.33		C	97.56	

<sup>a</sup>Mean of three replicates.

<sup>b</sup>RSD = Relative Standard Deviation.

**Table 2.** Accuracy of RP-LC for interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations

Nominal concentration (MIU/mL)	Mean concentration found <sup>a</sup> (MIU/mL)	RSD <sup>b</sup> (%)	Accuracy (%)	Bias <sup>c</sup> (%)
4.8	4.89	0.29	101.92	1.87
6	5.95	0.44	99.22	-0.83
7.2	7.30	0.22	101.38	1.25

<sup>a</sup>Mean of three replicates.

<sup>b</sup>RSD = Relative Standard Deviation.

<sup>c</sup>Bias = [(Measured concentration - Nominal concentration) / Nominal concentration]  $\times$  100.

of 100.84% and bias lower than 1.87%, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

#### Limits of Detection and Quantitation

For the calculation of the LOD and LOQ, a calibration equation,  $y = 179698.24x + 4895.37$ , was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LOD and LOQ were obtained by using the mean of the slope,  $179698.24 \pm 626.08$ , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as 11501.32. The LOD and LOQ calculated were 0.19 and 0.64 MIU/mL, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision ( $\leq 5\%$ ) and accuracy within  $\pm 5\%$ , was found to be 0.5 MIU/mL, which is significant, also considering that the previously published value of 0.25 MIU/mL for the LOQ was found with the precision ( $\leq 20\%$ ).<sup>[11]</sup>

#### Robustness

The results and the experimental range of the selected variables evaluated in the robustness assessment are given in Table 3, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when the modifications were made in the experimental conditions, thus showing the method to be robust. The stability of the sample solutions was studied and the data obtained showed the stability during 24 h into the autosampler and during 48 h when maintained at 2–8°C.

#### System Suitability

The system suitability test was carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicate injections of a reference standard substance solution containing

**Table 3.** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

Variable	Range investigated	Interferon- $\alpha$ 2a <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Optimized value
Flow rate (mL/min)	0.9	98.54	1.69	1
	1	97.81	1.45	
	1.1	98.25	1.35	
Injection volume ( $\mu$ L)	30	96.28	0.38	50
	40	96.86	1.89	
	50	97.55	0.34	
Acetonitrile (%)	46	95.37	0.66	48
	48	97.01	0.28	
	50	97.74	0.35	
Solution stability	Auto sampler 24 h	97.90	0.36	–
	2–8°C 24 h	97.33	1.22	–
	2–8°C 48 h	96.95	0.68	–
Wavelength (nm)	210–320	–	–	214

<sup>a</sup>Mean of three replicates.<sup>b</sup>RSD = Relative Standard Deviation.

6 MIU/mL of rhIFN- $\alpha$ 2a. The RSD values calculated for the retention time, peak symmetry, and peak area were 0.39, 0.66, and 0.90%, respectively. The number of theoretical plates was about 220250.86, with RSD of 1.29%. The experimental results show that the parameters tested were within the acceptable range (RSD <2.0%), indicating that the system is suitable for the analysis intended.

### Method Application

The proposed method was applied for the determination of rhINF- $\alpha$ 2a in parenteral formulations giving content/potencies within 91.53 and 100.75% of the stated potency, with calculated RSD lower than 1.93%, and related proteins lower than 0.78%, as shown in Table 4, meeting the specifications existing only for concentrated solutions (<5%),<sup>[9]</sup> and demonstrating also the quality of the pharmaceutical preparations.

### CONCLUSION

The results of the validation studies show that the gradient RP-LC method is specific, accurate with mean value of 100.84%, and possesses



**Table 4.** Determination of interferon- $\alpha$ 2a (rhIFN- $\alpha$ 2a) in pharmaceutical formulations by the RP-LC method

Theoretical amount		Experimental amount		
		Content/potencies		
Sample	MIU/mL <sup>a</sup>	MIU/mL	rhIFN- $\alpha$ 2a <sup>a</sup> (%)	Deamidates/ Sulphoxides (%)
1	6	5.99	99.81	n.d. <sup>b</sup>
2	6	5.52	91.99	0.42
3	6	5.56	92.61	0.34
4	6	5.49	91.53	0.56
5	6	5.58	92.95	0.78
6	6	5.87	97.84	n.d. <sup>b</sup>
7	9	9.07	100.75	n.d. <sup>b</sup>
8	9	8.61	95.62	0.22

<sup>a</sup>Mean of three replicates.<sup>b</sup>n.d. = not detected.

significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients. The separation was achieved with the retention time of 32.6 min, and the method has been successfully used for the analysis of commercial pharmaceutical formulations, with advantages, also, of lower time consumption related to the biological assay. Moreover, the RP-LC method can represent an important alternative, improving the existing procedures for the potency evaluation of rhIFN- $\alpha$ 2a, which can be applied to the purification process and to the batch consistency assessment in bulk and finished biological products.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), projects 475029/2007–0, 305148/2005–2, and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

#### REFERENCES

1. Meager, A. Biologicals assays for interferons. *J. Immunol. Methods.* **2002**, *261*, 21–36.

2. Ruiz, L.; Reyes, N.; Aroche, K.; Báez, R.; Aldana, R.; Hardy, E. Some factors affecting the stability of interferon alpha 2b in solution. *Biologicals* **2006**, *34*, 15–19.
3. Matthews, S.J.; McCoy, C. Peginterferon alfa-2a: A review of approved and investigational uses. *Clin. Ther.* **2004**, *26*, 991–1025.
4. Cindric, M.; Vuletic, M. Characterization of interferon  $\alpha$ -2b by liquid chromatography and mass spectrometry techniques. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 1263–1268.
5. Ruiz, L.; Reyes, N.; Duany, L.; Franco, A.; Aroche, K.; Rando, E.H. Long-term stabilization of recombinant human interferon  $\alpha$  2b in aqueous solution without serum albumin. *Int. J. Pharm.* **2003**, *264*, 57–72.
6. Arduini, R.M.; Li, Z.; Rapoza, A.; Gronke, R.; Hess, D.M.; Wen, D.; Miatkowski, K.; Coots, C.; Kaffashan, A.; Viseux, N.; Delaney, J.; Doman, B.; Young, C.N.; Boynton, R.; Chen, L.L.; Chen, L.; Betzenhauser, M.; Miller, S.; Gill, A.; Pepinsky, R.B.; Hochman, P.S.; Baker, D.P. Expression, purification, and characterization of rat interferon- $\beta$  and preparation of an N-terminally PEGylated form with improved pharmacokinetic parameters. *Protein Expr. Purif.* **2004**, *34*, 229–242.
7. Glue, P.; Fang, J.W.S.; Rouzier-Panis, R.; Raffanel, C.; Sabo, R.; Gupta, S.K.; Salfi, M.; Jacobs, S. Hepatitis C Intervention Therapy Group. PEGylated interferon- $\alpha$ 2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, *68*, 556–567.
8. Klaus, W.; Gsell, B.; Labhardt, A.M.; Wipf, B.; Senn, H. The three dimensional high resolution structure of human interferon- $\alpha$  2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 661–675.
9. *European Pharmacopoeia*, 6th Ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2007.
10. Meager, A.; Das, R.G.; Zoon, K.; Mire-Sluis, A. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha and omega. *J. Immunol. Methods.* **2001**, *257*, 17–33.
11. Zarrin, A.; Foroozesh, M.; Hamidi, M.; Mohammadi-Samani, S. A simple and rapid HPLC method for quantification of interferon- $\alpha$ 2b in dosage forms and delivery systems. *J. Chromatogr. B.* **2006**, *833*, 199–203.
12. Grace, M.; Youngster, S.; Gitlin, G.; Sydor, W.; Xie, L.; Westreich, L.; Jacobs, S.; Brassard, D.; Bausch, J.; Bordens, R. Structural and biological characterization of PEGylated recombinant IFN- $\alpha$ 2b. *J. Interferon and Cytokine Res.* **2001**, *21*, 1103–1115.
13. Barth, T.; Sangoi, M.S.; Silva, L.M.; Ferretto, R.M.; Dalmora, S.L. Assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by a reversed-phase liquid chromatography method and bioassay. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2007**, *30*, 1277–1288.
14. Beldarrain, A. Purification and conformational properties of a human interferon- $\alpha$ 2b produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2001**, *33*, 173–182.

15. Foser, S. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon- $\alpha$ 2a (PEGASYS). *Protein Expr. Purif.* **2003**, *30*, 78–87.
16. Dalmora, S.L.; Masiero, S.M.K.; Oliveira, P.R.; Sangoi, M.S.; Brum, Jr., L. Validation of an RP-LC method and assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2006**, *29*, 1753–1767.
17. Luykx, D.M.A.M.; Goerdal, S.S.; Dingemans, P.J.; Jiskoot, W.; Jongen, P.M.J.M. HPLC and tandem detection to monitor conformational properties of biopharmaceuticals. *J. Chromatogr. B.* **2005**, *821*, 45–52.
18. Rao, R.N.; Nagaraju, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 335–377.
19. Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **1999**, *185*, 129–188.
20. Dalmora, S.L.; Sangoi, M.S.; Silva, L.M.; Macedo, R.O.; Barth, T. Validation of a capillary zone electrophoresis method for the comparative determination of etoricoxib in pharmaceutical formulations. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 169–176.
21. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), November **2005**, 1–13.
22. Ermer, J.; Ploss, H.J. Validation in pharmaceutical analysis part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 859–870.

Received May 10, 2008  
Accepted August 1, 2008  
Manuscript 6345

## **METODOLOGIA DESENVOLVIDA A SER PUBLICADA**

---

## **4. METODOLOGIA DESENVOLVIDA A SER PUBLICADA**

---

### **4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA POR EXCLUSÃO MOLECULAR**

#### **4.1.1 MATERIAIS**

##### **4.1.1.1 Substância Biológica de Referência (SBR)**

Substância biológica de referência da Farmacopéia Européia de rhIFN- $\alpha$ 2a (SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a) -1,46 mg/mL (367.9 MUI/mL).

##### **4.1.1.2 Produtos farmacêuticos comerciais**

Utilizaram-se amostras de seis lotes do produto farmacêutico comercial Roferon A<sup>®</sup> (Roche, Rio de Janeiro, Brasil), contendo 6 MUI/mL e 9 MUI/mL de rhIFN- $\alpha$ 2a, em seu prazo de validade. As amostras foram identificadas com números arábicos de 1 a 6.

##### **4.1.1.3 Solventes e reagentes**

- Ácido fosfórico 85%, Tedia<sup>®</sup>.
- Cloreto de sódio, Merck<sup>®</sup>.
- Fosfato de sódio dibásico, Merck<sup>®</sup>.
- Fosfato de potássio monobásico, Merck<sup>®</sup>.
- Hidróxido de sódio, Merck<sup>®</sup>.

- Metanol, Tedia<sup>®</sup>.
- Glutaraldeído 2%, Rioquímica<sup>®</sup>.

#### 4.1.1.4 Equipamentos e acessórios

- Balança eletrônica digital, modelo CP225D, Sartorius<sup>®</sup>.
- Bomba de vácuo, Tecnal<sup>®</sup>.
- Coluna cromatográfica de exclusão molecular BioSep-SEC-S 2000, 300 mm x 7,8 mm, Phenomenex<sup>®</sup>.
- Cromatógrafo líquido, Shimadzu<sup>®</sup>:
  - Bomba LC-10 AD<sub>VP</sub>.
  - Controlador SCL-10 A<sub>VP</sub>.
  - Degaseificador DGU-14 A.
  - Detector de arranjos de diodos (DAD) SPD-M10A<sub>VP</sub>.
  - Injetor automático SIL-10 AD<sub>VP</sub>.
  - Válvula quaternária FCV-10 AL<sub>VP</sub>.
  - Forno para colunas CTO-10 AD<sub>VP</sub>.
  - Software CLASS-VP 6.14.
- Membrana filtrante de nylon 0,45 µm, Whatman<sup>®</sup>.
- Microcomputador, Dell<sup>®</sup>.
- Micropipetas de volume ajustável P10, P20, P100, P200 e P1000, Gilson<sup>®</sup>.
- Microtubos estéreis, Eppendorf<sup>®</sup>.
- pHmetro, Thermo Orion<sup>®</sup>.
- Ponteiras descartáveis de 200 e 1000 µL, Brand<sup>®</sup>.
- Pré-coluna GCF-2000 (Kit Security Guard Cartridges), Phenomenex<sup>®</sup>.
- Sistema purificador de água, Milli-Q, Millipore<sup>®</sup>.
- Refrigerador, Brastemp<sup>®</sup>.
- Sistema de filtração, Millipore<sup>®</sup>.

### 4.1.2 MÉTODO

As condições experimentais estabelecidas para análise da rhIFN- $\alpha$ 2a, através do método de CL-EM, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros do método analítico otimizado por cromatografia líquida por exclusão molecular.

<b>Características</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	BioSep-SEC-S 2000 (300 mm × 7,8 mm ) Phenomenex <sup>®</sup>
Fase móvel	Tampão fosfato de potássio monobásico 1mM, fosfato de sódio dibásico 8mM e cloreto de sódio 200 mM ( pH 7,4).
Vazão	Gradiente: 0,01-20 min (0,5 mL/min); 20-25 min (0,5-1,7 mL/min); 25-35 min (1,7 mL/min); 35-38 min (1,7-0,5 mL/min) e 38-40 min (0,5 mL/min).
Temperatura da coluna	25 °C
Comprimento de onda	214 nm
Volume de injeção	50 $\mu$ L

#### 4.1.2.1 Preparação da fase móvel

Pesaram-se 1,15 g de fosfato de sódio dibásico, 0,2 g fosfato de potássio monobásico e 11,7 g de cloreto de sódio e dissolveram-se em 900 mL de água purificada. Quando necessário, ajustou-se o pH 7,4 com ácido fosfórico 85% ou hidróxido de sódio 1M. Transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água purificada. Homogeneizou-se e filtrou-se, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45  $\mu$ m e 47 mm de diâmetro. Preparou-se no momento do uso.

#### **4.1.2.2 Preparação da solução da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a**

A solução do padrão foi preparada com base na atividade específica (252 MUI/mg) do 2º Padrão Internacional de interferon- $\alpha$ 2a (WHO 95/650) e na concentração de 1,46 mg/mL da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a. Deste modo, quantidade apropriada da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a foi pipetada e diluída com fase móvel contendo 0,15 mg/mL de polissorbato 80, de modo a obter a solução com concentração de 6 MUI/mL, equivalente a 0,024 mg/mL.

#### **4.1.2.3 Preparação da solução da amostra de rhIFN- $\alpha$ 2a**

As soluções foram preparadas com fase móvel contendo 0,15 mg/mL de polissorbato 80, de modo a obter a solução com concentração de 6 MUI/mL.

#### **4.1.2.4 Validação do método analítico por CL-EM**

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (ICH, 2005). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

##### **4.1.2.4.1 Especificidade**

A especificidade do método analítico foi estabelecida pela determinação da pureza do pico do rhIFN- $\alpha$ 2a na SBR e em produtos farmacêuticos, submetidos à degradação por glutaraldeído. Além disso, a mistura de excipientes da formulação farmacêutica foi também analisada pelo método CL-EM, utilizando detector DAD.



#### **4.1.2.4.2 Linearidade**

Para a curva de calibração, preparou-se uma solução da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a na concentração de 50 MUI/mL (solução-mãe). A partir da solução-mãe, foram realizadas diluições sucessivas com fase móvel, obtendo-se concentrações de 0,5, 1,5, 3, 6, 10, 15, 25 e 50 MUI/mL. As curvas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e calculada a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a validade dos parâmetros estatísticos.

#### **4.1.2.4.3 Precisão**

Avaliou-se a precisão do método através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. Paralelamente foi analisada a solução da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a na concentração de 6 MUI/mL.

##### **4.1.2.4.3.1 Repetibilidade**

Preparou-se amostra na concentração 6 MUI/mL e realizaram-se seis determinações sucessivas no mesmo dia. Desse modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

##### **4.1.2.4.3.2 Precisão intermediária**

Avaliou-se a precisão intermediária através de análises executadas por diferentes analistas e em diferentes dias, usando os mesmos lotes de amostras e método, na concentração de 6 MUI/mL. As análises foram realizadas em três replicatas.

#### 4.1.2.4.3.2.1 Interdias

Prepararam-se, diariamente, duas amostras, na concentração de 6 MUI/mL, e analisaram-se três replicatas em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

#### 4.1.2.4.3.2.2 Entre analistas

Prepararam-se duas amostras, na concentração de 6 MUI/mL, e analisaram-se três replicatas, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

#### 4.1.2.4.3.3 Cálculos

A concentração de rhIFN- $\alpha$ 2a nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SBR}) / A_{SBR}$$

Em que:

$A_A$  = Área média absoluta das amostras

$A_{SBR}$  = Área média absoluta da SBR

$C_A$  = Concentração de rhIFN- $\alpha$ 2a na amostra

$C_{SBR}$  = Concentração da SBR

O valor percentual de rhIFN- $\alpha$ 2a nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A \% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Em que:

$C_A \%$  = Concentração percentual da amostra

$C_A$  = Concentração de rhIFN- $\alpha$ 2a encontrado na amostra

$C_T$  = Concentração teórica de rhIFN- $\alpha$ 2a na amostra

#### 4.1.2.4.4 Exatidão

A exatidão foi verificada adicionando-se concentrações de 4,8, 6 e 7,2 MUI/mL da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a à mistura de excipientes (placebo) e avaliando-se em paralelo a solução da SBR na concentração de 6 MUI/mL. As análises de cada concentração foram realizadas em três replicatas.

##### 4.1.2.4.4.1 Cálculos

A concentração da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SBR}) / A_{SBR}$$

Em que:

$A_A$  = Área média absoluta da amostra placebo adicionada de SBR.

$A_{SBR}$  = Área média absoluta da SBR.

$C_{SBR}$  = concentração da SBR

$C_A$  = Concentração da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a na amostra placebo

O valor percentual da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a nas amostras foi calculado pela expressão abaixo

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Em que:

$C_A\%$  = Concentração percentual da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a na amostra placebo

$C_A$  = Concentração da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a encontrado na amostra placebo

$C_T$  = Concentração teórica da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a na amostra placebo

#### 4.1.2.4.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. A fórmula usada para o cálculo foi a seguinte:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$$

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

#### 4.1.2.4.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em três replicatas. O cálculo foi realizado segundo a fórmula:

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$$

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

#### **4.1.2.4.7 Robustez**

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: volume de injeção: 30, 40 e 50  $\mu$ L; pH da fase móvel : 7,0, 7,4 e 7,8; temperatura da coluna: 25, 30 e 35  $^{\circ}$ C; estabilidade da solução analítica no injetor automático na temperatura ambiente (25  $^{\circ}$ C) por 24 horas e na faixa de temperatura de 2-8  $^{\circ}$ C por 24 e 48 horas. Realizou-se a análise do teor de rhIFN- $\alpha$ 2a nas diferentes condições.

#### **4.1.2.4.8 Teste de performance do sistema cromatográfico**

Para assegurar a performance do cromatógrafo líquido antes e durante a realização das análises, realizou-se o teste avaliando os seguintes parâmetros: simetria do pico, número de pratos teóricos, tempo de retenção e área do pico do padrão através do programa CLASS-VP 6.14. A repetibilidade das injeções foi determinada através de cinco replicatas da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a na concentração 6 MUI/mL e do cálculo do coeficiente de variação percentual da área.

#### **4.1.2.5 Avaliação de rhIFN- $\alpha$ 2a por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM)**

##### **4.1.2.5.1 Preparação das amostras**

As soluções foram preparadas com fase móvel contendo 0,15 mg/mL de polissorbato 80, de modo a obter a solução com concentração de 6 MUI/mL.

##### **4.1.2.5.2 Preparação dos Dímeros e Agregados**

Conforme previamente publicado (BRAUN & ALSENG, 1997), os dímeros e agregados foram preparados artificialmente através da adição de glutaraldeído 2% nas amostras de produtos farmacêuticos e na SBR de rhIFN- $\alpha$ 2a, na proporção (1:1), durante 5 minutos.

#### **4.1.3 RESULTADOS**

##### **4.1.3.1 Resultados da validação do método analítico por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM)**

A especificidade do método analítico foi determinada através da degradação submetendo a SBR e o produto farmacêutico de rhIFN- $\alpha$ 2a à degradação com glutaraldeído. Pode-se observar na Figura 1 os cromatogramas obtidos por CL-EM com a presença do pico não-alterado, com tempo de retenção de 17,48 min, bem como dos dímeros e agregados com tempo de retenção de 16,13 e 15,28 min, respectivamente. Os estudos com detector de DAD mostraram o pico de rhIFN- $\alpha$ 2a livre de picos co-eluídos, demonstrando a especificidade do

método proposto para a análise de produtos farmacêuticos de rhIFN- $\alpha$ 2a que apresentou regressão linear significativa ( $P < 0,05$ ), sem desvio de linearidade ( $P > 0,05$ ).

Os valores das áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração, foram plotados em relação a cada concentração respectiva, observando-se linearidade adequada na faixa de 0,5 a 50 MUI/mL, conforme ilustrado na Figura 2.

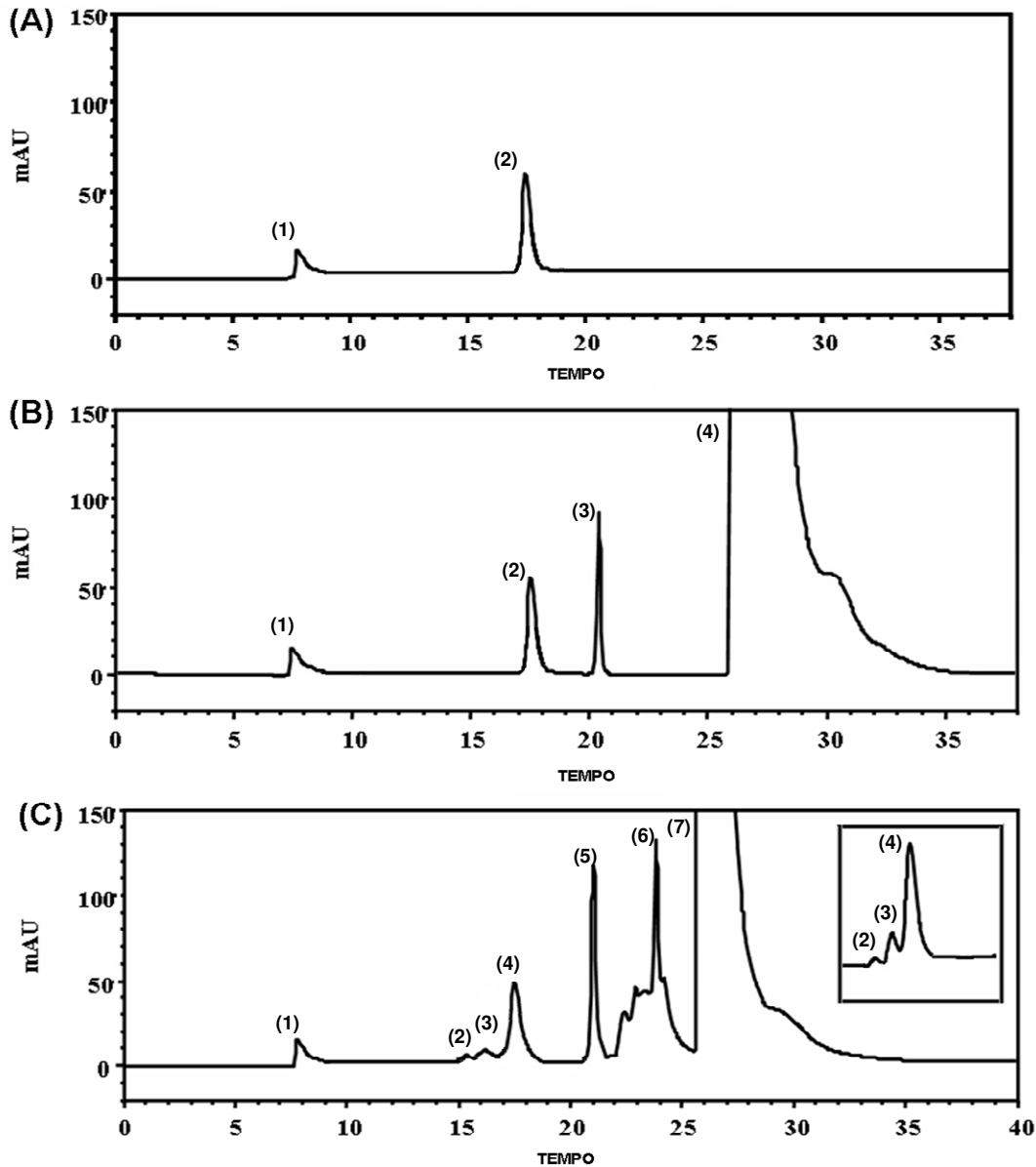


Figura 1 – Cromatogramas obtidos por CL-EM na concentração de 6 MUI/mL : (A) SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a: pico 1 – excipiente, pico 2 - rhIFN- $\alpha$ 2a. (B) Produto farmacêutico: picos 1,3 e 4 – excipientes e pico 2 - rhIFN- $\alpha$ 2a. (C) Produto farmacêutico após degradação: picos 1,5 e 7 – excipientes, pico 2- agregado, pico 3 – dímero, pico 4 – rhIFN- $\alpha$ 2a não-alterado e pico 6 – glutaraldeído.

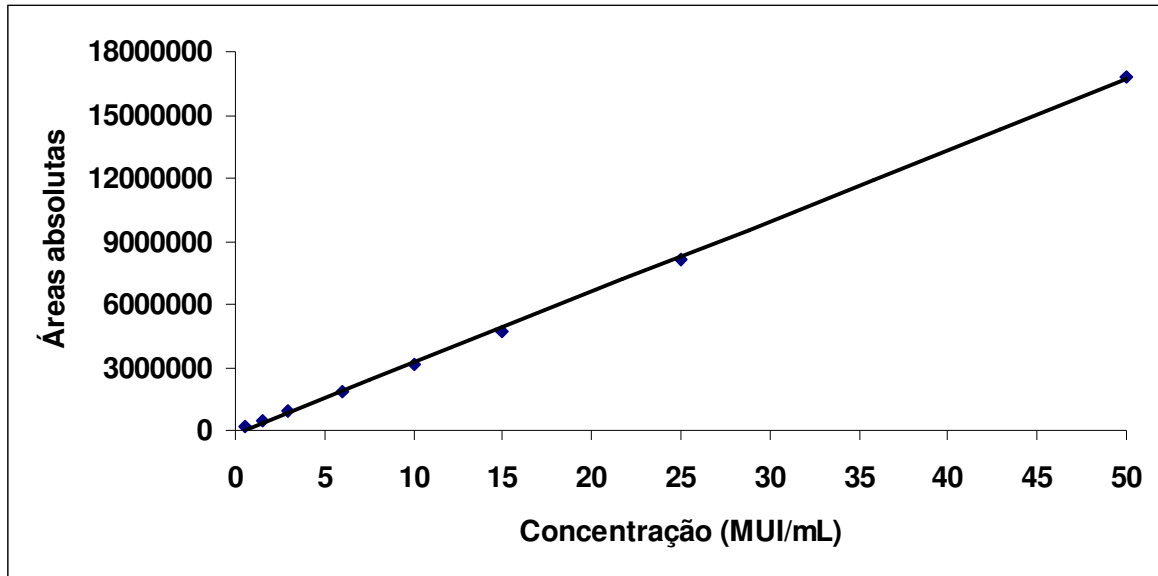


Figura 2 – Representação gráfica da curva de calibração da SBR-rhIFN- $\alpha$ 2a obtida por cromatografia líquida por exclusão molecular na faixa de 0,5 a 50 MUI/mL (n = 3).

A equação calculada da reta e o coeficiente de determinação indicam a linearidade significativa do método conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados da curva de calibração calculados pelo método dos mínimos quadrados.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	0,5 a 50 MUI/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 337228,86x + 163792,29$
Inclinação (b) $\pm$ desvio padrão	$337228,86 \pm 3610,69$
Intercepto (a) $\pm$ desvio padrão	$163792,29 \pm 22449,9$
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9996

Realizou-se também o cálculo da análise de variância (ANOVA), com base nos valores experimentais das áreas, observaram-se parâmetros válidos com regressão linear significativa ( $P < 0,05$ ), sem desvio de linearidade ( $P > 0,05$ ).

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação percentual. A amostra preparada na concentração de 6 MUI/mL foi submetida a seis análises sucessivas, e os dados



obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram valor médio de 99,36% com CV de 0,41%.

Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de duas amostras, em três dias consecutivos, obtendo-se valores experimentais médios de 101,76 e 104,96%, com CV de 0,27 e 1,21%, respectivamente. Na precisão entre analistas, duas amostras foram avaliadas por três analistas, obtendo-se valores experimentais médios de 101,90 e 102,32%, com CV de 0,76 e 1,29%, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método analítico para análise de rhIFN- $\alpha$ 2a por cromatografia líquida por exclusão molecular.

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor <sup>a</sup> (MUI/mL)	Teor <sup>a</sup> (%)	CV <sup>b</sup> (%)		Teor <sup>a</sup> (MUI/mL)	Teor <sup>a</sup> (%)	CV <sup>b</sup> (%)
1	1	6,09	101,45	0,27	A	6,16	102,66	0,76
	2	6,11	101,91		B	6,11	101,91	
	3	6,12	101,93		C	6,07	101,12	
2	1	6,36	106,04	1,21	A	6,21	103,56	1,29
	2	6,21	103,56		B	6,15	102,46	
	3	6,32	105,28		C	6,06	100,94	

<sup>a</sup> média de três determinações,

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

Determinou-se também, a exatidão do método, através da análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida e os resultados experimentais, que correspondem à percentagem média de 101,38%, encontram-se na Tabela 4.

A sensibilidade do método cromatográfico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração detectada pelo processo analítico, foi 0,20 MUI/mL. Por sua vez, o LQ calculado foi 0,66 MUI/mL e o encontrado experimentalmente, com CV menor que 5%, foi de 0,5 MUI/mL.

Tabela 4 – Determinação da exatidão do método analítico para análise rhIFN- $\alpha$ 2a por cromatografia líquida por exclusão molecular.

Concentração Teórica (MUI/mL)	Concentração			
	Média Determinada <sup>a</sup> (MUI/mL)	CV <sup>b</sup> (%)	Exatidão (%)	Desvio <sup>c</sup> (%)
4,8	4,88	1,32	101,66	1,66
6	6,05	0,56	100,83	0,83
7,2	7,32	1,59	101,66	1,66

<sup>a</sup> média de três determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

<sup>c</sup> Bias = [(Concentração encontrada – Concentração teórica) / Concentração teórica] x 100.

Avaliou-se também a robustez através de pequenas modificações nos parâmetros do método, tais como: volume de injeção, pH da fase móvel, temperatura da coluna, estabilidade da solução no injetor automático por 24 horas e na geladeira por 24 e 48 horas. Na execução de análises de produtos farmacêuticos, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 1,84%, comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 5.

Verificou-se a performance do sistema cromatográfico pela análise quantitativa de rhIFN- $\alpha$ 2a, através da simetria dos picos, número de pratos teóricos da coluna, tempo de retenção e área do padrão. Os coeficientes de variação calculados para simetria do pico, tempo de retenção e área foram 1,11, 0,10 e 0,77%, respectivamente. O número de pratos teóricos foi em média 5999, com CV de 1,17%.

Tabela 5 – Resultados da avaliação da robustez do método analítico para análise de rhIFN- $\alpha$ 2a por cromatografia líquida por exclusão molecular.

Variável	Faixa Investigada	Interferon- $\alpha$ 2a <sup>a</sup> (MUI/mL)	Interferon- $\alpha$ 2a <sup>a</sup> (%)	CV <sup>b</sup> (%)	Valores Otimizados
Temperatura da Coluna (°C)	25	6,09	101,43	0,37	25
	30	6,06	100,93	0,39	
	35	6,00	100,04	1,27	
Volume de Injeção ( $\mu$ L)	30	5,99	99,78	0,45	50
	40	6,12	102,03	1,62	
	50	6,08	101,36	0,31	
pH da Fase Móvel	7,0	6,03	100,50	1,84	7,4
	7,4	6,01	100,19	1,20	
	7,8	5,98	99,63	1,76	
Estabilidade da Solução	Autoinjeter 24 h	6,16	102,67	0,48	-
	2-8°C 24 h	6,08	101,34	0,22	-
	2-8°C 48 h	6,01	100,11	1,28	-

<sup>a</sup> média de três determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

#### 4.1.3.2 Determinação de rhIFN- $\alpha$ 2a em formulações farmacêuticas por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM)

O método desenvolvido e validado por cromatografia líquida foi utilizado para avaliação de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos (tabela 6).

Tabela 6 – Determinação das potências obtidas por cromatografia líquida por exclusão molecular de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos.

Concentração Teórica		Concentração Encontrada		
Interferon- $\alpha$ 2a		Interferon- $\alpha$ 2a <sup>a</sup>		
Amostra	MUI/mL	MUI/mL	Teor (%)	Dímeros/Agregados (%)
1	6	6,27	104,42	n.d. <sup>b</sup>
2	6	6,19	103,29	0,13
3	6	5,87	97,97	0,32
4	6	6,02	100,39	n.d. <sup>b</sup>
5	9	8,36	92,95	0,57
6	9	8,22	91,39	n.d. <sup>b</sup>

<sup>a</sup> média das três determinações.

<sup>b</sup>n.d. = não detectado.

## **DISCUSSÃO**

---

## 4 DISCUSSÃO

---

A produção de proteínas de interesse terapêutico tem evoluído significativamente nos últimos anos, devido à tecnologia do DNA recombinante. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a avaliação da identidade, pureza e potência, fundamenta-se na combinação de técnicas biológicas, físico-químicas e imunológicas, necessárias para a completa caracterização de bioterapêuticos de uso clínico.

A atividade biológica do rhIFN  $\alpha$ -2a tem sido determinada por bioensaios *in vitro* (BORDENS et al., 1997; MEAGER, 2002). Paralelamente, são realizados procedimentos por eletroforese em gel, focalização isoeletrica e imunoenaios com anticorpos específicos (PISCITELLI et al., 1997; HENNIG et al., 2000). Porém, justifica-se o estudo dos métodos cromatográficos que têm sido usados para diferentes produtos biológicos recombinantes como importante técnica de separação, purificação e análise qualitativa e quantitativa, possibilitando estudos de correlação com os bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Além disso, é adequada para aplicação durante o processo de produção/formulação para monitorar pequenas variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica (KAISER et al., 1997).

Desse modo, optou-se por pesquisar os métodos por cromatografia líquida que possibilitam a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Acrescenta-se que os teores foram expressos em unidades internacionais para possibilitar a análise dos resultados em relação ao teor declarado dos diferentes produtos farmacêuticos em uso terapêutico. Estabeleceu-se a transformação de massa para unidades internacionais com base na expressão preconizada no 2º Padrão Internacional de interferon- $\alpha$ 2a (WHO 95/650), no qual 252 MUI correspondem a 1 miligrama. Desenvolveu-se e validou-se procedimento por cromatografia líquida em fase reversa para a determinação de rhIFN- $\alpha$ 2a e suas proteínas relacionadas em produtos farmacêuticos (**ARTIGO 3.1**). A separação foi alcançada com tempo de corrida de 42 min (figura 1). A geração de picos adicionais, relativos aos desamidados e sulfóxidos, sob condições oxidativas e a análise de amostra preparada com excipientes, confirmaram a especificidade do método, uma vez que o pico do rhIFN- $\alpha$ 2a permaneceu puro conforme demonstrado com detector de arranjo de diodos (DAD). O método apresentou regressão linear

significativa na faixa de concentração de 0,5 a 50 MUI/mL,  $r^2 = 0,9999$ . Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV inferiores a 0,77% o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Pode ser observado na tabela 2, o valor médio experimental de 100,84%, confirmando exatidão significativa. As potências obtidas na execução das análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstra a tabela 3. Por sua vez, os dados obtidos na verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, não apresentando CV% superior a 2% (ICH, 2005; USP 30, 2007). Conforme descrito pela literatura, um inconveniente deste método é a desnaturação ou dissociação das proteínas quando adsorvidas à matriz da coluna (DALMORA et al., 1997).

Nesse contexto, foi desenvolvido e validado o método por cromatografia líquida por exclusão molecular (**ITEM 4**) para determinação de potência, dímeros e substâncias de alta massa molecular de rhIFN- $\alpha$ 2a em formulações farmacêuticas sem albumina. O método apresentou regressão linear significativa  $r^2 = 0,9996$ , na faixa de concentração de 0,5 a 50 MUI/mL. A vazão da fase móvel foi aplicada sob gradiente para adequada separação dos picos relativos ao rhIFN- $\alpha$ 2a e aos excipientes da formulação e também, para obtenção de menor tempo de corrida, que foi de 40 min (figura 1). O método demonstrou-se exato durante a validação, obtendo-se valor médio de 101,38% para exatidão, com desvio menor que 1,66% (tabela 4). Os resultados da precisão apresentaram CV inferiores a 1,29% como pode ser observado na tabela 3. Por sua vez, os valores calculados (ICH, 2005) para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) de 0,20 e 0,66 MUI/mL, respectivamente, indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos comerciais. O LQ encontrado experimentalmente, com precisão ( $\leq 5\%$ ) e exatidão de  $\pm 5\%$ , foi de 0,5 MUI/mL. Na avaliação da robustez do método, as alterações realizadas nas condições otimizadas não provocaram mudanças significativas nos resultados de teor rhIFN- $\alpha$ 2a (tabela 5). Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico, mostraram que as condições da metodologia são adequadas para assegurar a exatidão e precisão dos dados analíticos. A especificidade do método foi testada sob condições de degradação com glutaraldeído, originando picos adicionais relativos a dímeros e agregados, e também, através da análise da amostra preparada com os excipientes obtendo-se picos com tempo de retenção diferentes em relação ao do rhIFN- $\alpha$ 2a. Os estudos através do DAD mostraram o pico de rhIFN- $\alpha$ 2a livre de picos co-

eluídos, confirmando a especificidade do procedimento proposto para a análise de produtos farmacêuticos.

Demonstrou-se, portanto, que os métodos propostos cumprem os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregados para análise de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos.

A matéria-prima de rhIFN- $\alpha$ 2a está descrita na literatura oficial (BP., 2007), porém nenhuma referência é feita para o produto acabado. Além disso, não há métodos cromatográficos validados publicados para avaliação de rhIFN- $\alpha$ 2a em formulações farmacêuticas, o que é altamente aplicável no contexto da produção de produtos biológicos recombinantes. Sugere-se, portanto, que os métodos por CL-EM e por CL-FR, sejam adotados como alternativa ou em combinação com o bioensaio para a avaliação de potência e pureza de rhIFN- $\alpha$ 2a durante as etapas do processo de produção/purificação e para o controle da qualidade do produto farmacêutico acabado. Desse modo, contribui-se para aprimorar o controle da qualidade através de uma melhor caracterização da biomolécula, ampliando os procedimentos disponíveis para os estudos de comparabilidade no contexto de biosimilares, garantindo sua eficácia terapêutica e segurança.



## **CONCLUSÕES**

---

## 5 CONCLUSÕES

---

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método específico, preciso, exato e robusto por cromatografia líquida em fase reversa, fornecendo resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e avaliação de desamidados, sulfóxidos e da forma não-alterada de rhIFN- $\alpha$ 2a.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular, que apresentou parâmetros de validação adequados para identificação, determinação de dímeros, agregados de alta massa molecular e monômero do rhIFN- $\alpha$ 2a, podendo ser aplicado para a avaliação de potência.
- ✓ Sugere-se a aplicação dos métodos cromatográficos para avaliação de pureza e potência de rhIFN- $\alpha$ 2a, representando alternativa para análise de produtos farmacêuticos, com vantagens de precisão, exatidão, especificidade, segurança e tempo de execução em relação aos ensaios biológicos *in vitro*.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho contribuem para estabelecer bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, de comparabilidade com biomoléculas da área e procedimentos importantes para aprimorar o controle de qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos biotecnológicos disponíveis no País.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AHFS DRUG INFORMATION, Electronic version, American Society of Health-System Pharmacists. Bethesda, M.D., 2007.

AHRER, K.; JUNGBAUER, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. **Journal of Chromatography B**, v. 841, p. 110-122, 2006.

ARDUINI, R. M. et al. Expression, purification, and characterization of rat interferon- $\beta$  and preparation of an N-terminally PEGylated form with improved pharmacokinetic parameters. **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 229-242, 2004.

BAILON, P. et al. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. **Bioconjugate Chemistry**, v. 12, p. 195-202, 2001.

BARON, S. et al. Introduction to the interferon system. In: BARON, S. et al. **Principles and medical applications**. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1992. p.1-15.

BARON, S.; DIAZANI, F. The interferons: biological system with therapeutic potential in viral infections. **Antiviral Research**, v. 24, n. 2-3, p.97-110, 1994.

BARTH, H.G.; BOYES, B.E.; JACKSON, C. Size exclusion chromatography and related separation techniques. **Analytical Chemistry**, v.70, p. 251R-278R, 1998.

BELDARRAIN, A. et al. Purification and conformational properties of a human interferon  $\alpha$  2b produced in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 33, p. 173-182, 2001.

BORDENS, R. et al. Molecular and biologic characterization of recombinant interferon-alpha2b. **Seminars in Oncology**, v. 24, n. 3, p. S9 (41-51), 1997.

BRAUN, A.; ALSENZ, J. Development and use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of protein aggregates in interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, p. 1394-1400, 1997.

BRITISH Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2007, p. 1096-1099.

BUCHHEIT, K. H.; DAAS, A.; JÖNSEN, K. H. Collaborative study for establishment of an hplc-method for batch consistency control of recombinant interferon- $\alpha$ -2. **Pharmeuropa Special Issue Biol**, v. 1, p. 7-27, 2002.

CASERMAN, S. et al. Thermal stability of the WHO international standard of interferon  $\alpha$  2b (INF-  $\alpha$ -2b): Application of new reporter gene assay for IFN-  $\alpha$ -2b potency determinations. **Journal of Immunological Methods**, v. 319, p. 6-12, 2007.

CHATELUT, E. et al. A pharmacokinetic model for alpha interferon administered subcutaneously. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p. 365-371, 1999.

CHMP – Committee for medicinal products for human use, “**Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues**”, 2005.

CINDRIC, M.; VULETIC, M. Characterisation of interferon  $\alpha$ -2b by liquid chromatography and mass spectrometry techniques. **Journal of Separation Science**, v.26, p.1263-1268, 2003.

DALMORA, S.L. et al. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **Journal Chromatography A**, v. 782, p. 199 – 210, 1997.

DALMORA, S.L. et al. Validation of an RP-LC method and assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 1753-1767, 2006.

DIWAN, M.; PARK, T.G. Stabilization of recombinant interferon- $\alpha$  by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252 p. 111-122, 2003

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guidance on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Quality Issues**”. London, 30 June 2005.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.

FDA – Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, May 2001.

FEE, C. J.; ALSTINE, J.M.V.. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 924-939, 2006.

FELD, J.; HOOFNAGLE, J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v. 436, p. 967-972, 2005.

FOSER, S. et al. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon  $\alpha$ -2a (PEGASYS). **Protein Expression and Purification**, v.30, p. 78-87, 2003.

GITLIN, G. et al. Isolation and characterization of a monomethioninesulfoxide variant of interferon  $\alpha$ -2b. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 5, p. 762-769, 1996.

GLUE, P. et al. Pegylated interferon- $\alpha$ 2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, p. 556-567, 2000.

GOETZ, H. et al. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 60, p. 281-293, 2004.

GRACE, M. et al. Structural and Biologic characterization of pegylated recombinant IFN- $\alpha$ 2b. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 21, p. 1103-1115, 2001.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 214-221, 2003.

HENNIG, C. et al. The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. **Journal of Immunological Methods**, v. 235, p. 71-80, 2000.

HERMELING, S. et al. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n.6, p.897-903, 2004.

HUANG, S.; LIN, F.; YANG, C. Microcalorimetric studies of the effects on the interactions of human recombinant interferon- $\alpha$ 2a. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 545-552, 2005

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for human use, “**Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**”, 2005.

KAISER, R. E.; STREGE, M. A.; LAGU, A. L. Assessment of protein drugs obtained by recombinant DNA technology. **Process Control and Quality**, v. 10, n. 1-2, p. 205-228, 1997.

KLAUS, W. et al. The three-dimensional high resolution structure of human interferon  $\alpha$ -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, p. 661-675, 1997.

LANGER, J.A. Interferon at 50: New molecules, new potential, new (and old) questions. **Science's STKE**, v. 405, pe53, 2007.

LEE, B. K. et al. Solid-Phase PEGylation of Recombinant Interferon  $\alpha$ -2a for Site-Specific Modification: Process Performance, Characterization, and in Vitro Bioactivity. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 1728-1734, 2007.

LI, X. et al. Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, n. 4, p.2048-2056, 1997.

LIANG, T. J. et al. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 4, p. 296-305, 2000.

LONGSTAFF, C. et al. How do we assure the quality of biological medicines? **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 1/2, p. 50-55, 2009.

LUYKX, D. M. A. M. et al. HPLC and tandem detection to monitor conformational properties of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography B**, v. 821, p. 45-52, 2005.

MATTHEWS, S. J.; McCOY, C. Peginterferon alfa-2a: A review of approved and investigational uses. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 7, p. 991-1025, 2004.

MEAGER, A. et al. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha and omega. **Journal of Immunological Methods**, v. 257, p. 17-33, 2001.

MEAGER, A. Biological assays for interferons. **Journal of Immunological Methods**, v. 261, p. 21-36, 2002.

ORITANI, K. et al. Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 12, p. 337-348, 2001.

OLIVEIRA, J.E. et al. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography method for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, p. 206-211, 2007.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 8-32, 2004.

PFEFFER, L.M. et al. Biological properties of recombinant  $\alpha$ - interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. **Cancer Research**, v.58, p. 2489-2499, 1998.

PISCITELLI, S. C.; REISS, W. G.; FIGG, W. D.; PETROS, W. P. Pharmacokinetic studies with recombinant cytokines. Scientific issues and practical considerations. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 32, n. 5, p. 368-381, 1997.

QIAN, J. et al. Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of human serum albumin in a lyophilized formulation of interferon alfa-2b. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, p. 48-56, 2008.

RADWANSKI, E. et al. Pharmacokinetics of interferon  $\alpha$ -2b in healthy volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 432-435, 1987.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 335-377, 2003.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBELA, M. T. C. P. et al. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 103-126, 2006.



RUIZ, L. et al. Long-term stabilization of recombinant human interferon  $\alpha$  2b in aqueous solution without serum albumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 57-72, 2003.

RUIZ, L.; AROCHE, K.; REYES, N. Aggregation of recombinant human interferon alpha 2b in solution: technical note. **AAPS PharmSciTech**, v.7, n. 4, p. E1-E5, 2006a.

RUIZ, L. et al. Some factors affecting the stability of interferon alpha 2b in solution. **Biologicals**, v. 34, p. 15-19, 2006b.

SAMUEL, C.E. Antiviral actions of Interferons. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n. 4, p.778-809, 2001.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHARMA, V. K.; KALONIA, D. S. Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon- $\alpha$ 2a: possible implications in protein stability. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 11, p. 1721-1729, 2003.

SHECHTER, Y. et al. Prolonging the half-life of human interferon-alpha 2 in circulation: Design, preparation, and analysis of (2-sulfo-9-fluorenylmethoxycarbonyl)(7)-interferon-alpha 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 3, p. 1212-1217, 2001.

SILVA, M. M. C. G. et al. Biological activity of EDQM CRS for interferon alfa-2a and interferon alfa-2b - assessment in two in vitro bioassays. **Pharmeuropa Bio**, v. 1, p. 1-6, 2007.

SILVA, M. M. C. G. et al. Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceuticals: Interferon alfa-2 case study. **Biologicals**, v. 36, p. 383-392, 2008.

SILVA Jr., J. G. **Cromatografia de Proteínas**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. 111p.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n. 1, p. 12-20, 1998.

THE UNITED States Pharmacopeia. 30. ed. Rockville: The United states Pharmacopeial Convention, 2007.

THITINAN, S.; McCONVILLE, J. T. Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, p. 121-135, 2009.

TÖLÖ, H. et al. Development of a highly purified multicomponent leukocyte IFN- $\alpha$  product. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 21, p. 913-920, 2001.

TREUHEIT, M. J.; KOSKY, A. A.; BREMS, D. N. Inverse relationship of protein concentration and aggregation. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 4, p. 511-516, 2002.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, p. 129-188, 1999.

WANG, Y. S. et al. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon-alpha-2b and its therapeutic implications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 547-570, 2002.

WILLS, R. J. et al. Interferon kinetics and adverse reactions after intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 722-727, 1984.

ZARRIN, A. et al. A simple and rapid HPLC method for quantification of interferon- $\alpha$ 2b in dosage forms and delivery systems. **Journal of Chromatography B**, v. 833, p. 199-203, 2006.