

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA EM FASE
REVERSA PARA AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11
HUMANA RECOMBINANTE. CORRELAÇÃO COM O
BIOENSAIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ricardo Bizogne Souto

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE
REVERSA PARA AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11
HUMANA RECOMBINANTE. CORRELAÇÃO COM O
BIOENSAIO**

por

Ricardo Bizogne Souto

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

2011

**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 MÉTODO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE
REVERSA PARA AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11
HUMANA RECOMBINANTE. CORRELAÇÃO COM O
BIOENSAIO**

elaborada por
Ricardo Bizogne Souto

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, Dr^a. (IPEN-USP)

Rui Oliveira Macedo, Dr. (UFPB)

Santa Maria, 28 de Julho de 2011.

AGRADECIMENTOS

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

aos meus pais pelo amor e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa;

aos meus amigos pelo companheirismo, compreensão e altruísmo;

aos colegas e bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência;

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

aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial;

à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

à CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

*“É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê.”*

Marcelo Camelo

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11 HUMANA RECOMBINANTE. CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO

AUTOR: RICARDO BIZOGNE SOUTO

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de Julho de 2011.

A interleucina 11 (IL-11) é uma citocina multifuncional que pertence a família da interleucina-6 e estimula a proliferação, diferenciação e maturação de células hematopoiéticas. A interleucina-11 humana recombinante (rhIL-11) é produzida pela tecnologia do DNA em *Escherichia coli* e é usada clinicamente para a prevenção de trombocitopenia grave e redução da necessidade de transfusão de plaquetas após quimioterapia mielossupressiva em pacientes com neoplasias malignas não mielóides. No presente trabalho foi desenvolvido e validado método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para a avaliação de rhIL-11 em formulações de produtos farmacêuticos. Utilizou-se coluna Júpiter C₄ (250 mm x 4,6 mm d.i.), mantida a 25°C. A fase móvel A foi constituída de TFA 0,1% e a fase móvel B de acetonitrila com 0,1% TFA, eluídas no seguinte gradiente: 0 – 0,1 min, 40% de B; 0,1 – 30 min, 40 – 65% de B; 30,01 a 31 min, 65 – 40% de B, mantendo-se nesta proporção até 40 min. Utilizou-se vazão de 1 mL/min e detector de arranjo de diodos (DAD) a 214 nm. A eluição cromatográfica foi obtida no tempo de 27,6 min, sendo linear na faixa de concentração de 1 – 200 µg/mL ($r^2 = 0,9995$). Os limites de detecção e quantificação foram 0,34 e 1,12 µg/mL, respectivamente. A especificidade foi avaliada em estudos de degradação, que também demonstraram que não houve interferência dos excipientes. A exatidão foi 100,20%, com bias inferior a 1,25%. Além disso, realizou-se o teste de citotoxicidade *in vitro* das formas degradadas, as quais não apresentaram diferença significativa em relação a forma intacta ($p > 0,05$). O método proposto foi aplicado para a avaliação da potência de rhIL-11 e de proteínas relacionadas em formulações farmacêuticas, e os resultados foram comparados com o bioensaio, observando-se diferenças das médias de conteúdo/potência 2,60% superiores para o método por CL-FR. Contribuiu-se assim para estabelecer procedimentos que aprimoram o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biotecnológico.

Palavras-chave: interleucina-11 humana recombinante, cromatografia líquida em fase reversa, bioensaio, validação, correlação.

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE EVALUATION OF RECOMBINANT HUMAN INTERLEUKIN-11. CORRELATION WITH THE BIOASSAY

AUTHOR: Ricardo Bizogne Souto
ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA
Presentation date: Santa Maria, July 28th 2011.

Interleukin 11 (IL-11) is a multifunctional cytokine in the IL-6 type family of long-chain helical cytokines, which modulates the proliferation, differentiation and maturation of various types of hematopoietic cells. Recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) produced by DNA technology in *Escherichia coli* is currently being used worldwide for the prevention of thrombocytopenia and to reduce the need for platelet transfusions after myelosuppressive chemotherapy in patients with nonmyeloid malignancies. A stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the assessment of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in biopharmaceutical formulations. The RP-LC method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at 25°C. The mobile phase A consisted of 0.1% TFA and the mobile phase B was acetonitrile with 0.1% TFA, run as follows: time 0 to 0.1 min 40% of B; from 0.1 to 30 min linear up to 65% of B; from 30.01 to 31 min linear down to 40% of B, maintained up to 40 min. The flow rate was 1 mL/min, and using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. Chromatographic separation was obtained with a retention time of 27.6 min, and was linear over the concentration range of 1 – 200 µg/mL ($r^2 = 0.9995$). The limits of detection and quantitation were 0.34 and 1.12 µg/mL, respectively. Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.22% with bias lower than 1.25%. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed non-significant differences ($p > 0.05$). The proposed method was applied to the assessment of rhIL-11 and related proteins in biopharmaceutical dosage forms, and the results were correlated to those of a bioassay, showing a higher mean difference of the estimated content/potencies of 2.60% for the RP-LC method, aiming to establish new alternatives to monitor stability, improve quality control and thereby assure therapeutic efficacy of the biological medicine.

Keywords: recombinant human interleukin-11, reversed-phase liquid chromatography, bioassay, validation, correlations.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura primária da rhIL-11, adaptada (YOKOTA et al., 2000a)	17
FIGURA 2 - Representação da estrutura tridimensional da IL-11, adaptada (HARMEGNIES et al., 2003).....	19
FIGURA 3 - Vias de sinalização mediada pela IL-11, adaptada DU & WILLIAMS, 1997)	20

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

FIGURE 1 – RP-LC chromatograms of rhIL-11 (50 µg/mL). (a) BRS-rhIL-11: peak 1 = rhIL- 11, peak 2 = excipients. (b) Biopharmaceutical formulations: peak 1 = rhIL-11, peak 2 = excipients. (c) After degradation by oxidative conditions: peak 1 = rhIL-11, peak 2 = excipients, peak 3 = sulphoxides, peak 4 = deamidated.....	51
---	----

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

TABLE 1 – Inter-days and between-analysts precision data of RP-LC for rhIL-11 in biopharmaceutical formulations.....	47
TABLE 2 – Accuracy of RP-LC for rhIL-11 in the formulations.	48
TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing. ..	49
TABLE 4 – Comparative content/potencies evaluation of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations, by RP-LC method and TF-1 proliferation bioassay.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

BP	Farmacopéia Britânica
BRS-rhIL-11	Substância biológica de referência de interleucina-11 humana recombinante
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human use
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CSF	Fator estimulador de colônias
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMEA	European Medicines Agency
EP	Farmacopéia Européia
FDA	Food and Drug Administration
GDP	Guanosina difosfato inativa
GTP	Guanosina difosfato ativa
HES	Hidroximetilamido
His	Histidina
ICH	International Conference on Harmonisation
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina-6
IL-11	Interleucina-11
IL-11R	Receptor da interleucina-11
IV	Intravenoso
JAK	Janus Kinase

kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
Met	Metionina
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
RNA	Ácido ribonucleico
pH	Potencial hidrogeniônico
r ²	Coefficiente de determinação
rhIL-11	Interleucina-11 humana recombinante
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SC	Subcutâneo
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TGFβ	Fator de transformação de crescimento beta
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TNFβ	Fator de necrose tumoral beta
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopéia Americana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	26
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÕES.....	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As citocinas constituem-se em grupo de proteínas envolvidas na sinalização entre as células modulando respostas imunes. Podem ser classificadas de acordo com suas funções em: interleucinas (IL), interferons (IFN), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF α e TNF β), fator de transformação de crescimento (TGF β) e quimiocinas.

As interleucinas são produzidas na medula óssea e possuem diferentes funções, sendo a maioria delas envolvidas na indução da divisão de células. A interleucina-11 (IL-11) é um fator de crescimento trombopoietico que estimula diretamente a proliferação de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras megacariocíticas, induzindo o amadurecimento megacariocítico, resultando no aumento da produção de plaquetas.

As pesquisas recentes, especialmente na área de biotecnologia, possibilitaram a transferência de genes de um organismo para outro e viabilizaram a produção de moléculas altamente purificadas em quantidades consideráveis. Entre elas destaca-se a interleucina-11 humana recombinante (rhIL-11) que é produzida pela tecnologia do DNA recombinante e constituída por cadeia polipeptídica de 177 aminoácidos. Possui massa molecular de aproximadamente 19 kDa e difere da IL-11 natural somente pela ausência do resíduo prolina amino-terminal. É clinicamente indicada para a prevenção de trombocitopenia grave e na redução de transfusão de plaquetas após quimioterapia mielossupressiva em pacientes com neoplasias malignas não mielóides.

A avaliação de potência da rhIL-11 tem sido realizada através do ensaio biológico *in vitro* baseado na atividade proliferativa de células TF-1. Por sua vez, os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) viabilizam a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas, e também tem sido estudados para uso em combinação com os bioensaios ou como alternativa. Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) com detecção no ultravioleta (UV) são amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e determinação das formas oxidadas e desamidadas de proteínas (RIBELA et al., 2006; SILVA et al., 2009a). A presença de formas relacionadas e degradadas nas proteínas recombinantes de uso terapêutico pode causar alterações com redução ou perda da atividade farmacológica e efeitos imunológicos (DIRESS et al., 2010). Desse modo, deve ser determinado seu teor e estabelecidos limites nos produtos farmacêuticos.

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 da atividade biológica e enzimaensaio (ELISA), possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, bem como avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos (WANG, 1999; ICH, 1999; FDA, 2001; E.P. 2011; PARNHAM et al., 2007; KRESSE, 2009).

Acrescenta-se que após o desenvolvimento de um método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que este atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ICH, 2005; ROZET et al., 2007). A avaliação de biomoléculas produzidas por expressão em sistemas celulares diversos, 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; BRASIL, 2010). Destaca-se que até o presente momento não existe na literatura oficial metodologia para a avaliação da potência de rhIL-11.

Neste trabalho, objetivou-se: a) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa para a avaliação de proteínas relacionadas e da forma não-alterada de rhIL-11 em produtos farmacêuticos; b) avaliar se há correlação entre o método por cromatografia líquida em fase reversa e o bioensaio em células TF-1. Desse modo, pretendeu-se estudar metodologias que possam contribuir para a avaliação de identidade, pureza e teor/potência, aprimorando o controle da qualidade e garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A interleucina-11 (IL-11) é uma citocina produzida pelo estroma dos fibroblastos da medula óssea, originalmente identificada com base na sua capacidade de estimular a proliferação da linhagem de células T1165 de plasmacitoma de camundongo (PAUL et al., 1990, 1991; BERGER et al., 1994). Pertence ao grupo de citocinas da família da interleucina-6, que apresentam estrutura tridimensional com cadeia longa de α -hélice, entre as quais se incluem: interleucina-6, interleucina-12, fator estimulador da colônias de granulócitos e eritropoietina (BAZAN, 1990; CHACHADE, 2009). Mais especificamente pertence à subfamília de citocinas dependentes do receptor gp130, que inclui a interleucina-6, fator de crescimento de neurotrófilos, entre outras (BELLIDO et al., 1996; UNDERHILL-DAY et al., 2003).

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a clonagem e expressão do gene da IL-11 em *Escherichia coli* (*E. coli*), com produção da interleucina-11 humana recombinante (rhIL-11), também denominada Oprelvecina. Estruturalmente é constituída por cadeia polipeptídica de 177 aminoácidos com massa molecular de aproximadamente 19 kDa. Difere-se da IL-11 natural somente pela ausência do resíduo de prolina amino-terminal que se observou não influenciar significativamente a bioatividade *in vitro* e *in vivo* (NEUMEGA[®], 2004; CZUPRYN et al., 1995 AOYAMA et al., 1997). A fórmula química da rhIL-11 é $C_{854}H_{1411}N_{253}O_{235}S_2$ e a sua estrutura primária está representada na Figura 1 (DRUG BANK, 2011; YOKOTA et al., 2000a).

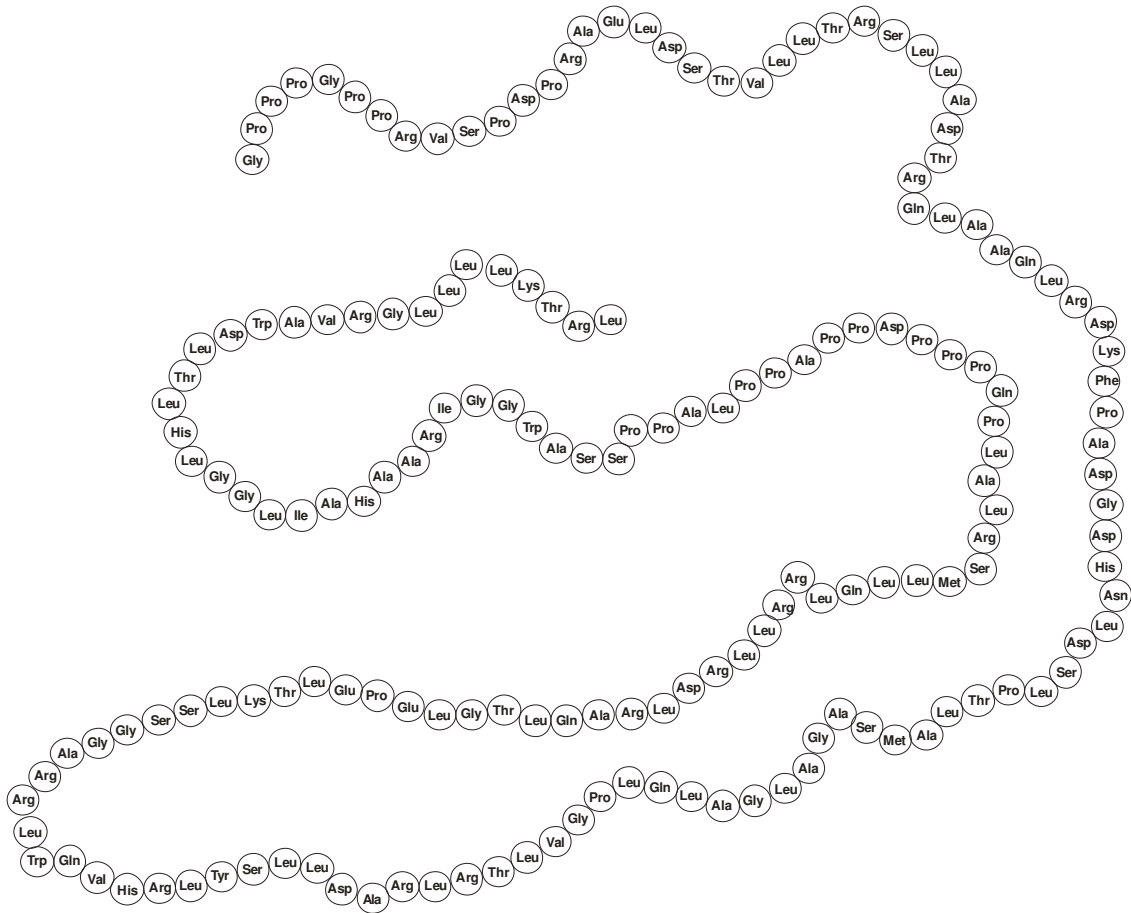


Figura 1 – Estrutura primária da rhIL-11, adaptada (YOKOTA et al., 2000a).

A rhIL-11 encontra-se disponível no Brasil como produto farmacêutico denominado Plaquemax[®], do Laboratório Bergamo, sob a forma de pó líofilo para injeção, nas apresentações de 3 e 5 mg/frasco. Sua dose recomendada em adultos é de 50 µg/kg administrada subcutaneamente, 24 a 48 horas após o término da quimioterapia ou após a ocorrência de trombocitopenia, uma vez ao dia por 7 a 14 dias. O produto farmacêutico Neumega[®], do Laboratório Wyeth, teve sua comercialização descontinuada no Brasil em julho de 2009.

A rhIL-11 é um fator de crescimento hematopoiético que estimula diretamente a produção de células tronco-hematopoiéticas e células progenitoras megacariocíticas e induz amadurecimento megacariocítico, que resulta no aumento da produção de plaquetas (PAUL et al., 1990, 1991). A rhIL-11 foi o primeiro agente trombopoiético a receber aprovação do US Food and Drug Administration (FDA), sendo clinicamente indicada para o tratamento de trombocitopenia grave e na redução da necessidade de transfusão de plaquetas após quimioterapia mielossupressiva em pacientes com neoplasias malignas não mielóides (KAYE,

1998; USUKI et al., 2007; YANAKA et al., 2011). Possui também atividades não-hematopoiéticas incluindo: inibição da adipogênese (KELLER et al., 1993), estimulação da osteoclastogênese e neurogênese (GIRASOLE et al. 1994), inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (TREPICCHIO et al., 1996, 1997; ELLIS et al., 2006) e regulação do crescimento e absorção do epitélio intestinal (ALAVI et al., 2000).

A estimulação das células hematopoiéticas ocorre através da ligação com receptores específicos e emissão de sinais transportados por mediadores até o núcleo celular, onde induzem a transcrição de genes e posterior tradução para proteínas efetoras. Inicialmente a IL-11 liga-se a subunidade α do receptor IL-11R (responsável pela especificidade da ligação) resultando na formação do complexo IL-11-IL-11R α . Este interage com a subunidade β do receptor gp130 (responsável pela transdução de sinal para o citoplasma das células). Com base na estrutura tridimensional do modelo de 4 α -hélices, 3 regiões são responsáveis por sua afinidade com os receptores: a região 1 que está relacionada à interação com o receptor IL-11R α e as regiões 2 e 3 que são responsáveis pela interação com a subunidade β do receptor gp130, conforme a Figura 2a. A energia principal para que ocorram as ligações com estes receptores é fornecida por aminoácidos hidrofóbicos apolares cercados por resíduos polares ou carregados, o que acontece nas regiões 2 e 3 (possuem alta afinidade de interação). A região 1 possui 2 aminoácidos hidrofílicos, histidina¹⁸² e asparagina¹⁸⁶, que diminuem sua afinidade de interação como mostra a Figura 2b (HILTON et al., 1994; PANAYOTATOS et al., 1995; HUDSON et al., 1996; HARMEGNIES et al., 2003).

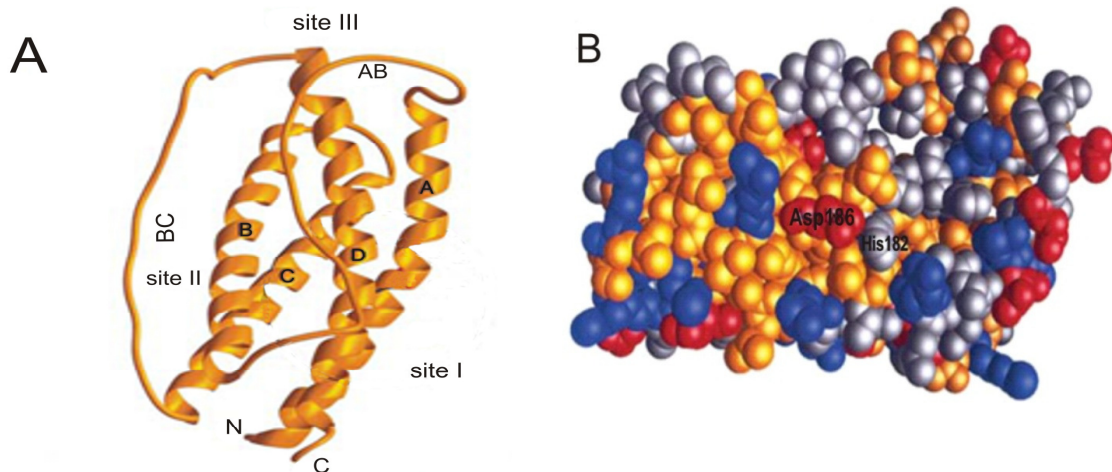


Figura 2: Representação da estrutura tridimensional da IL-11, adaptada (HARMEGNIES et al., 2003).

(A) Modelo tridimensional da IL-11 destacando as 3 regiões de interação com receptores.

(B) Modelo tridimensional da região 1 da IL-11. Aminoácidos carregados positivamente em azul, negativamente em vermelho, hidrofílicos em cinza e hidrofóbicos em amarelo.

A interação do complexo IL-11-IL-11R α com a subunidade β do receptor gp130 induz sua heterodimerização, fosforilação e ativação (YIN et al., 1992, 1993; FOURCIN et al., 1994). Logo após, este receptor ativa as proteínas citoplasmáticas tirosina quinase da família Janus Kinase (JAK) tornando possíveis duas vias de sinalização (BERGER et al., 1994; YIN et al., 1994). Uma mais simples, através da interação das proteínas JAK com as proteínas da família STAT (do inglês signal transducers and activators of transcription), que resulta na transdução rápida de sinais para o núcleo. E outra mais complexa, que envolve a interação das proteínas JAK com a proteína adaptativa Grb2. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da proteína Ras, ou seja, induz a passagem conformacional da Ras do estado inativo para o ativo. Uma vez ativada, a Ras estimula a fosforilação da serina da cascata da proteína quinase MAPK, que transduz finalmente os sinais para o núcleo. No núcleo, estes sinais induzem a transcrição de genes, que a seguir são traduzidos em proteínas efetoras, etapa final da expressão gênica. A IL-11 pode estimular também a transformação de alguns lipídios em ácido fosfatídico, o qual provoca a fosforilação tirosínica das MAPKs intensificando sua transdução de sinais (SIDDIQUI & YANG, 1995; (WANG et al., 1995). As vias de sinalização mediada pela IL-11 estão esquematizadas na Figura 3 (DU & WILLIAMS, 1997).

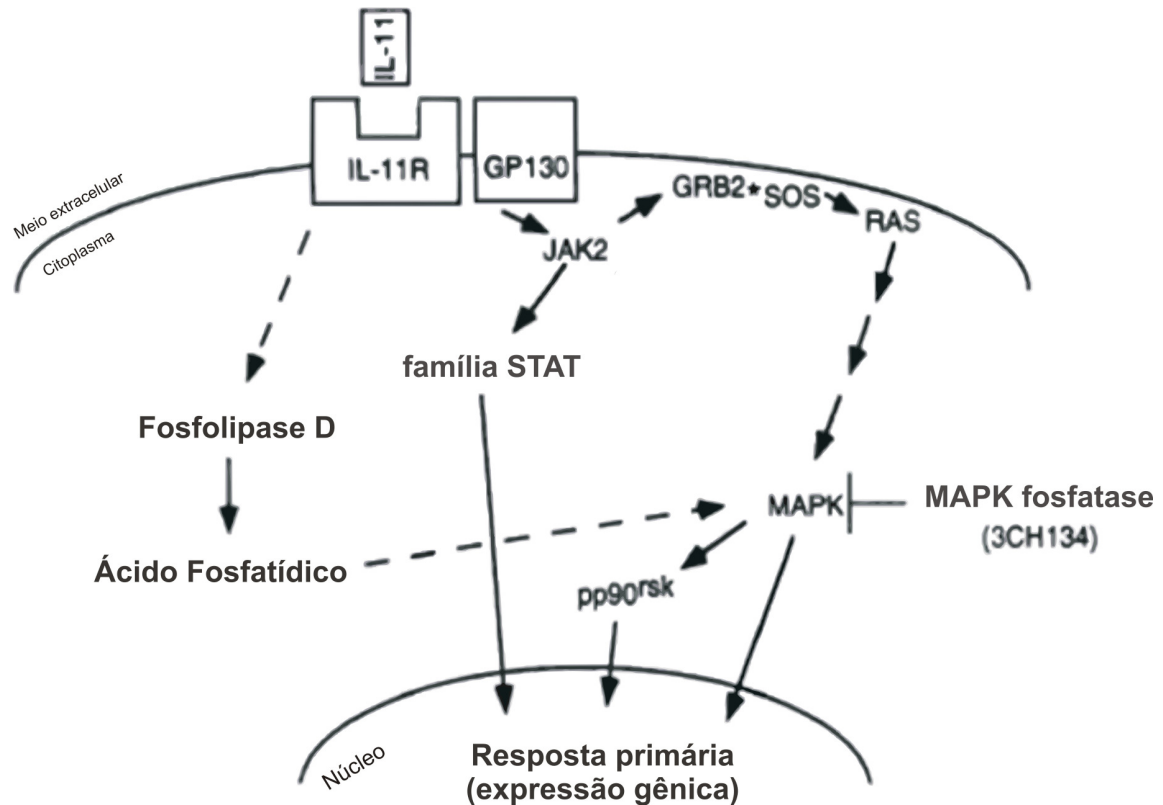


Figura 3: Vias de sinalização mediadas pela IL-11, adaptada (DU & WILLIAMS, 1997).

Schlerman et al. (1996) pesquisaram a resposta hematológica em macacos saudáveis e com mielossupressão induzida após tratamento com rhIL-11, observando aumento significativo de plaquetas em relação aos grupos controle.

Por sua vez, para esclarecer os mecanismos envolvidos na estimulação da hematopoiese pela rhIL-11, a cinética da megacariopoiese foi investigada em camundongos mielossuprimidos. Os animais foram tratados com mitomicina C injetada pela via intravenosa na dose de 2 mg/kg, durante os dois primeiros dias. Após, foi administrada rhIL-11 até o 21º dia. Com base nos resultados, observou-se que o biofármaco melhorou a trombocitopenia através da estimulação, maturação e proliferação de células megacariocíticas *in vivo* (SAITOH et al. 2001).

Estudos preliminares em diferentes modelos comprovaram a eficácia da rhIL-11 no tratamento da artrite reumatóide (HERMANN et al., 1998; MORELAND et al., 2001), doença de Crohn's e colite ulcerosa (SANDS et al., 1999; MEERVELD et al., 2001), cirrose e hepatite C crônica (LAWITZ et al., 2004; GIANNINI, 2006), hemofilia A leve e Von Willebrand (DENIS et al., 2001; NICHOLS et al., 2009) e atenuação da fibrose cardíaca após infarto do miocárdio (KIMURA et al., 2007; OBANA et al., 2010). Observa-se, entretanto, a

recomendação de experimentos complementares para a avaliação da eficácia/segurança a fim de justificar seu uso no tratamento destas doenças.

Kaye (1998) relatou efeitos adversos significativos ($p < 0,05$) causados pelo uso de rhIL-11 em pacientes após serem submetidos à quimioterapia como edema, dispnéia, taquicardia conjuntiva e derrame pleural. O tratamento da trombocitopenia imune púrpura com a rhIL-11, em pacientes não neoplásicos, revelou-se ineficaz e apresentou efeitos colaterais intensos como edema, dispnéia, dor nas articulações e petéquias (BUSSEL et al., 2001).

Yin et al. (1993) investigaram os mecanismos envolvidos na emissão de sinais mediados pela rhIL-11 em células da linhagem humana multifatorial eritroleucêmica dependente, TF-1. Evidenciaram que a rhIL-11 possui proteína de ligação específica, mas dependente do receptor gp130, assim como a IL-6, para a transdução de seus sinais. Observaram aumento na indução da fosforilação de proteínas, ativação da expressão celular proto-oncogene e proliferação celular.

Yokota et al. (2000b) desenvolveram ensaio por cultura de células derivadas da linhagem T10 para avaliar a atividade biológica da rhIL-11. A proliferação celular foi detectada com azul de tetrazólio e a absorbância determinada em leitor de microplacas, observando-se coeficiente de variação percentual (CV%) inferior a 8%. O bioensaio foi sugerido para o controle da qualidade devido a sua simplicidade, reprodutibilidade e precisão.

Kenley et al. (1994) realizaram análises por CL-FR e espectrometria de massas por tempo de voo para avaliar o perfil de degradação da solução à 50°C na faixa de pH entre 3,0 e 9,5. Os resultados obtidos demonstraram estabilidade da solução na região de pH 6,5 a 7,0. Em meio ácido a principal degradação ocorreu por clivagem do aspartato¹³³ e prolina¹³⁴. Os produtos de degradação em meio alcalino não foram identificados.

Yokota et al. (2000a) verificaram a oxidação da metionina⁵⁸ da rhIL-11 quando armazenada em tubos plásticos de polipropileno e poliestireno. Método por CL-FR com coluna C₄ e gradiente de eluição foi utilizado para separar e coletar a forma oxidada. Confirmaram através de mapeamento peptídico e análise por espectrometria de massas a identidade da fração oxidada da metionina⁵⁸. Observaram maior oxidação nas amostras armazenadas em tubos de polipropileno do que aquelas em tubos de poliestireno, sendo a oxidação intensificada quando os tubos eram previamente expostos à luz.

Zhang et al. (2002) utilizaram procedimentos de eletroforese em gel de poli(acrilamida), eletroforese capilar, espectrometria de massas e CL-FR para investigar a deamidação da asparagina e isomerização do aspartato em solução líquida submetida à temperatura de 30° C

por 6 semanas. Observaram significativa isomerização do aspartato⁴⁵ e aspartato⁴⁷ e níveis baixos de isomerização do aspartato⁵¹ e deamidação da asparagina⁴⁹. A atividade biológica foi avaliada pelo bioensaio baseado na proliferação de células da linhagem T10, que demonstrou redução de atividade da preparação sob estresse em relação ao controle, embora com tendência não significativa.

Garzon-rodriguez et al. (2004) investigaram a estabilidade da rhIL-11 liofilizada utilizando dissacarídeos e hidroxietilamido (HES) como excipientes. Os níveis de agregados foram monitorados por CL-EM usando coluna SW 2.000 com detecção a 225 nm e os produtos de oxidação e clivagem foram determinados por CL-FR usando coluna Poros R1/H, eluição com gradiente e detecção a 214 nm. Concluíram que a combinação de dissacarídeos e HES proporcionou melhor estabilidade para a proteína.

Czupryn et al. (1995) efetuaram modificações químicas e mutagênese sítio-dirigida na estrutura molecular da rhIL-11 e posteriormente analisaram suas formas alteradas por métodos de eletroforese em gel de poliacrilamida, bioensaio *in vitro* em células da linhagem T10, espectrometria de massas e cromatografia líquida por troca iônica, fase reversa (CL-FR) e exclusão molecular (CL-EM). Estas análises possibilitaram a caracterização estrutural com identificação das regiões/resíduos essenciais para a expressão da sua atividade. Demonstraram especialmente, que a supressão apenas do resíduo metionina⁵⁸ reduz cerca de 25 vezes a atividade e a ausência dos últimos resíduos de aminoácidos da porção carboxi-terminal podem reduzir ou até inativar a ação da rhIL-11.

Amari & Mazsaroff (1996) analisaram proteína de fusão de rhIL-11 expressa em lisado de *E. coli* por métodos cromatográficos. Primeiramente separaram as proteínas de baixa e alta massa molecular derivadas da *E. Coli* por CL-EM. Em seguida, utilizaram método por CL-FR para separar e quantificar a proteína. Os métodos mostraram-se reprodutíveis e confiáveis, sendo úteis para o monitoramento do processo de produção e purificação.

Tan et al. (2005) expressaram forma truncada de rhIL-11 como proteína de fusão em *E. coli*. Realizaram sua caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida e por CL-FR obtendo pureza de 96%. A bioatividade foi avaliada pela proliferação das células da linhagem 7TD1 e apresentou perfil de atividade semelhante ao da rhIL-11. Os autores destacaram a proteína truncada como candidata promissora para desenvolvimento de nova forma do biofármaco.

Jung et al. (2011) efetuaram mutagênese sítio-dirigida na estrutura molecular da rhIL-11 obtendo forma modificada. Avaliaram a eficácia em relação a molécula íntegra após a administração subcutânea em roedores e primatas. Foi observado aumento superior a três

vezes da concentração plasmática máxima (C_{max}) e área-sob a curva (AUC), bem como aumento três vezes maior na contagem de plaquetas, após sete dias consecutivos de injeções. Estudos de degradação demonstraram melhor estabilidade da forma modificada em relação a rhIL-11, que apresentou maior eficácia e menor toxicidade.

Aoyama et al. (1997) estudaram a farmacocinética da rhIL-11 após injeção intravenosa (IV) nas doses de 10 e 50 µg/kg e subcutânea (SC) nas doses de 3 e 50 µg/kg em voluntários sadios do sexo masculino. Foi administrado também, dose de 3 µg/kg por via SC durante 7 dias consecutivos. As amostras de sangue e urina foram coletadas em tempos específicos e analisadas por ELISA. Observou-se farmacocinética linear. Os valores de meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) e tempo médio de retenção (TMR) no plasma indicaram taxa de absorção limitada, de 65%, após administração subcutânea quando comparados com os valores obtidos após IV. A rhIL-11 não foi detectada na urina após dose única de 50 µg/Kg.

Kaye (1998) realizou testes farmacocinéticos em voluntários sadios demonstrando biodisponibilidade da rhIL-11 superior a 80% após injeção SC, para dose única de 50 µg/Kg, obtendo concentração plasmática máxima (C_{max}) de 17,4 ng/ml e tempo para atingir esta concentração (T_{max}) de 3,2 h. Evidenciaram que a rhIL-11 não se acumulou no soro após administração SC durante quatro dias consecutivos, pois apresentou perfil farmacocinético semelhante ao obtido pela administração SC de dose única.

Experimentos *in vivo* em camundongos e ratos demonstraram que a eliminação da rhIL-11 acontece predominantemente nos rins e no fígado. Este processo foi detalhadamente monitorado após infusões pela vias SC e IV de rhIL-11, e de rhIL-11 associada a biomarcadores. Foram determinados os perfis de liberação plasmática e depuração corporal por técnicas de perfusão renal e hepática, imunorreatividade e atividade biológica em diferentes publicações (TAKAGI et al., 1995; TAKAGI et al., 1997; TAKAGI et al., 1998; UCHIDA et al., 1998).

Tseng et al. (2000) avaliaram, em ratos, a biodistribuição e biodisponibilidade de formulação de rhIL-11 multiparticulada com revestimento entérico na dose de 1 mg/kg. Os resultados foram determinados por ELISA, sendo encontrada quantidade insignificante ($\leq 0,2\%$ da dose total) distribuída em órgãos sistêmicos e tecidos em todos os períodos analisados.

Destaca-se também o avanço farmacêutico no desenvolvimento de moléculas conjugadas, especialmente da 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 vantagens terapêuticas das formas modificadas, como por exemplo, a diminuição da frequência de injeções devido ao prolongamento do tempo de meia vida (FOSER et al., 2003; HARRIS & CHESS, 2003; ARDUINI et al., 2004).

Neste sentido, Takagi et al. (2006) avaliaram a incorporação de ácido hialurônico e de protamina como matriz polimérica na formulação farmacêutica de rhIL-11. No ano seguinte, Takagi et al. (2007) continuaram suas investigações desenvolvendo formas peguiladas de rhIL-11. As formulações foram testadas através da administração subcutânea em ratos, determinando o perfil plasmático por ELISA e a atividade farmacológica pelo modelo do aumento da contagem de plaquetas. Observaram em ambos os estudos, que as formulações farmacêuticas desenvolvidas prolongaram o tempo de retenção plasmática da rhIL-11 e aumentaram consideravelmente a contagem de plaquetas quando comparados com o controle.

A cromatografia líquida destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como método específico, sensível, robusto e reproduzível, com custo e duração de análise adequados (ZARRIN et al., 2006; ALMEIDA et al 2010). Os métodos por CL-FR exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas e têm sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, separação e quantificação de formas oxidadas e desamidadas das proteínas, com detecção no ultravioleta (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).

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (FDA, 2001; ICH, 2005; USP 33, 2010). Os principais parâmetros a serem avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. Esses parâmetros encontram-se detalhadamente descritos em dissertações já desenvolvidas no laboratório de produtos biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (BARTH, 2007; SILVA, 2009b) e no artigo (**ARTIGO 3.1**). Desse modo, esses parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos

resultados (SWARTZ & KRULL, 1998; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; SHABIR, et al. 2007; ROZET, et al. 2007; INJAC, et al. 2008).

Os estudos de métodos físico-químicos que possam ser usados em combinação ou como alternativa aos bioensaios *in vitro* e *in vivo*, 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 também importantes para fundamentar estudos de biosimilaridade conforme preconizam os guias internacionais, com os avanços sucessivos na área de bioterapêuticos (CHMP, 2005; EMEA, 2005). As estruturas moleculares tridimensionais complexas de alta massa molecular dos biofármacos e sua heterogeneidade dependente do processo de produção de células vivas, fazem com que as biomoléculas sejam diferentes dos fármacos clássicos. Assim, os métodos analíticos usuais não conseguem caracterizar estas moléculas suficientemente para confirmar a sua equivalência estrutural com o fármaco de referência. Consequentemente tem sido usada a combinação de métodos que representam a tecnologia do estado-da-arte para caracterização e estudos de comparabilidade. Os guias oficiais e parâmetros de especificação têm sido avaliados e atualizados com destaque para o impacto na segurança e eficácia terapêutica (SCHELLEKENS, 2009; KRESSE, 2009; SCHELLEKENS & MOORS, 2010).

A publicação científica efetuada no contexto da dissertação está anexada a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos na mesma.

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3.1 – Ricardo Bizogne Souto, Fernanda Pavani Stamm, Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, Paolo Bartolini, Guilherme Zanini Calegari and Sérgio Luiz Dalmora. Assessment of Recombinant Human Interleukin-11 by Stability-indicating RP-LC Method and its Correlation with Bioassay.

Assessment of Recombinant Human Interleukin-11 by Stability-indicating RP-LC Method and its Correlation with Bioassay

Ricardo Bizogne Souto ², Fernanda Pavani Stamm ², Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela ³, Paolo Bartolini ³, Guilherme Zanini Calegari ¹ and Sérgio Luiz Dalmora ¹

Department of Industrial Pharmacy¹, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences², Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS and Biotechnology Department³, IPEN-CNEN, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil

Running Title: “Recombinant human interleukin-11 assessment”

*Corresponding author. Phone/fax: + 55 55 32208952

*E-mail address: sdalmora@terra.com.br (Sérgio Luiz Dalmora)

Abstract: A stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the assessing of the recombinant human interleukin-11 (rhIL-11). The RP-LC method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d.). 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. Chromatographic separation was obtained with a retention time of 27.6 min, and was linear over the concentration range of 1-200 µg/mL ($r^2 = 0.9995$). Specificity was established in degradation studies. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed non-significant differences ($p > 0.05$). The method was applied to the assessment of rhIL-11 and related proteins, and the results were correlated to those of a bioassay, aiming to establish alternatives to monitor the stability, improve quality control and thereby assure therapeutic efficacy of the biological medicine.

1. Introduction

Interleukin 11 (IL-11) is a multifunctional cytokine in the IL-6 type family of long-chain helical cytokines, which modulates the proliferation, differentiation and maturation of various types of hematopoietic cells. Recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) produced by DNA technology in *Escherichia coli* is currently being used worldwide for the prevention of severe chemotherapy-induced thrombocytopenia and to reduce the need for platelet transfusions in patients with nonmyeloid malignancies. Further anti-inflammatory applications of rhIL-11 include chemotherapy-induced oral mucositis, treatments of Crohn's disease, rheumatoid arthritis, protection of intestinal epithelial cells from tissue damage and attenuation of cardiac fibrosis after myocardial infarction [1-3].

The polypeptide structure of rhIL-11 contains 177 amino acids with a molecular mass of 19 kDa and differs from the naturally occurring protein only by the absence of the amino-terminal proline, and the presence of two residues of Met⁵⁸ and Met¹²² [4].

The biological potency of rhIL-11 has been assessed by the *in vitro* cell culture-based bioassay using T10 cells derived from the T1165 murine plasmacytoma line [5]. The bioassay was used to evaluate the effect on the bioactivity of chemical modifications combined with site-directed and deletion mutagenesis on bioactivity and to identify functionally critical regions/residues of the biomolecule [4, 6]. Also, early signals triggered by IL-11 were assessed in a multifactor-dependent human erythroleukemic cell line, TF1, which showed that this protein stimulated cell proliferation, induced a protein tyrosine phosphorylation, and activated proto-oncogene expression in the cell line [7]. The bioactivity of recombinant truncated human interleukin-11 expressed as a fusion protein in *E. coli* was also evaluated by the *in vitro* proliferation assay using the 7TD1 cell line [8].

The kinetics of megakaryopoiesis induced by rhIL-11 was analyzed in myelo-suppressed mice after intravenous injection of 40 µg of mitomycin C/20 g and treatment with a dose of 10

$\mu\text{g}/20 \text{ g/day}$ for 21 consecutive days. The results suggested that rhIL-11 ameliorates thrombocytopenia via the stimulation of both maturation and commitment followed by the proliferation of megakaryocytic cells [9].

Many analytical techniques are available to monitor the purity, the chemical stability, and the potency of biopharmaceutical proteins obtained through recombinant technology. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants or degradation products which may have reduced activity and altered immunogenicity [10, 11]. One drawback of this technique is that proteins are usually denatured or dissociated as they are adsorbed on to the column matrix, and, therefore is not appropriate for use as a single technique for establishing the potency of preparations that contain biologically inactive, non-covalent oligomers and polymers. Chemical modification approaches, combined with site-directed and deletion mutagenesis performed to identify functionally critical regions/residues of rhIL-11, were analyzed by gradient RP-LC using a C_{18} column with detection at 214 and 280 nm [4]. A RP-LC using a C_4 column was used to separate and quantify rhIL-11 fusion protein expressed in *E. coli* and also for degradation kinetics studies [12, 13]. A linear gradient RP-LC method using C_4 column and UV detection at 214 nm was employed to determine the oxidative effect of disposable laboratory plastic tubes used for storage of rhIL-11 samples [14]. Also a RP-LC method has been applied together with electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis for the characterization of isomeric and deamidated forms [6]. Optimal storage stability of lyophilized rhIL-11 was evaluated by quantifying the oxidation levels and cleavage products by gradient RP-LC using a Poros R1/H column with detection at 214 nm [15]. However, validation of the method is essential to show that the procedure is suitable for its intended purpose [16]. Moreover, a combination of physicochemical, immunological, and biological methods has been successfully applied in correlation studies

between physicochemical and biological assays, in attempts to find methods for characterization and for monitoring the stability of different biotherapeutics [17-19]. At the moment, rhIL-11 is not included in any Pharmacopoeia and there are no validated methods for quality control analysis.

The aim of this article was to develop and validate a specific, sensitive and stability-indicating gradient RP-LC method for the content/potency assessment of rhIL-11; to correlate the results to the bioassay, and to evaluate the bioactivity and the cytotoxicity of the related proteins, thus contributing to the development of methods to monitor stability during the biotechnology steps, improve quality control, and thereby assure the therapeutic efficacy of the biological medicine.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

The Reference Reagent Interleukin-11, human rDNA derived, WHO 92/788, was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control-NIBSC (Herts, UK). The Biological Reference substance of rhIL-11 (*BRS-rhIL-11*), for physicochemical assays was supplied by Amoytop Biotech Co., Ltd (Xiamen, Fujian, China). A total of six batches of Plaquemax[®] (Bergamo, São Paulo, Brazil), containing 5 mg/vial of rhIL-11 were identified by numbers from 1 to 6 and two batches of Neumega[®] (Wyeth, São Paulo, Brazil), containing 5 mg/vial of rhIL-11 were identified by numbers from 7 to 8. The samples were obtained from commercial sources within their shelf life period. Hydrogen peroxide 30% in aqueous solution, potassium phosphate monobasic, polyssorbate 80, acetonitrile and trifluoroacetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was obtained using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system Millipore (Bedford, MA,

USA). All solutions were degassed by ultrasonication Tecnal (São Paulo, SP, Brazil) and filtered through a 0.22 μm Millex filter Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Apparatus

The LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, a LC-10 AD_{VP} pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD_{VP} autosampler, and a SPD-M10A_{VP} PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program.

2.3. Samples and Standard Solutions

Working standard and sample solutions were prepared daily by diluting the *BRS-rhIL-11* and the samples of pharmaceutical formulations in 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 containing 0.5 mg/mL of polysorbate 80, to a final concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$.

2.4. Procedures

2.4.1. Reversed-phase Liquid Chromatography (RP-LC)

The experiments were performed on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d., with a pore size of 300 Å) maintained at 25°C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The elution was performed using a gradient linear at a constant flow rate of 1 mL/min, with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. Mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B was acetonitrile, with 0.1% TFA, run as follows: time 0 to 0.1 min 40% of B; from 0.1 to 30 min linear up to 65% of B; from 30.01 to 31 min linear down to 40% of B, maintained up to 40 min. The mobile phases were filtered through a 0.22 μm membrane filter Millipore (Bedford, MA, USA). The injection volume was 50 μL of a solution containing 50 $\mu\text{g/ml}$ for both the reference standard and the samples.

2.4.2. *In vitro* TF-1 Cell Proliferation Bioassay

The assay was performed as described elsewhere [7, 20], and the growth-promoting activity of rhIL-11 assessed on TF-1 cell line (ATCC number CRL-2003). The cells were maintained in culture medium RPMI 1640 containing 10% (v/v) fetal bovine serum Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), adding concentrations of GM-CSF (1-20 ng/mL) for cell proliferation in 75 cm² flasks for 24 h, seeding at approximately $2.0 - 6.0 \times 10^5$ cells/mL. The assay was performed in triplicate, the cells were seeded in 96-well microplates BD Biosciences (San Jose, CA, USA) at a density 4×10^5 cells/mL (2×10^4 cells/well) and dosed on seeding with two fold dilution series range starting with 65 IU/mL (250 µg/mL) of rhIL-11. The WHO reference reagent rhIL-11 (92/788) was used as standard and the negative control was RPMI 1640 culture medium. Briefly, the plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for a minimum of 24 h. Then 25 µL/well of MTT solution (5 mg/mL) was added and the plates were incubated for a further 5 h. Following the addition of 100 µL/well of sodium dodecyl sulphate (240 mg/mL) overnight, the absorbance was assessed at 595 nm, using microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

2.4.3. *In vivo* Thrombocytopenic Bioassay

Female 7 to 8 weeks-old Balb/c mice weighing between 18–23 g were housed in air-conditioned, controlled conditions (room temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity of 50–60%, and artificial illumination, 12 h per day). They were given free access to food and water. All of the assays were conducted in accordance with the National Protection Laws on Animal Welfare.

The bioassay was performed as described elsewhere [9], and modified accordingly. The animals were allocated to sample, standard, and control groups in a fully randomized order and identified by colour code for the assay, usually with 6 mice per treatment group. Standard and test samples were diluted to the concentrations of 350 and 700 µg/mL with

phosphate-buffered saline, pH 7.2, containing 0.1% bovine serum albumin. Mice were given a dose of 40 µg of mytomycin C/20 g/0.25 mL subcutaneously on days 0 and 1 to induce myelo-suppression, severe thrombocytopenia without any animal death. Multiple injections of 0.25 mL rhIL-11 per mouse were administered in to the mytomycin C treated mice, from day 2 to day 19. Twenty four hours after the last rhIL-11 injection, the mice were anaesthetized, and peripheral blood was collected from the inferior vena cava. Blood cell count analysis of platelets was performed using a Cell-Dyn[®] 3200 (Abbott Laboratories, Saint-Laurent, Québec, Canada). The smears for the May-Grünwald-Giemsa method were prepared on glass slides, stained and the white cells counted and expressed as percentage of the total number of neutrophils.

2.4.4. *In vitro* Cytotoxicity Test

The *in vitro* cytotoxicity method was performed as described elsewhere [21], based on a neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) to the degraded samples of rhIL-11. The pH of the samples was adjusted to 7.0, and positive and diluents controls, together with *BRS-rhIL-11* solution were included in the assay. The NRU assay was performed on 96-well microplates, maintained at 37°C in a CO₂ incubator for 24 h, with a cell suspension density approximately 2×10^5 cells/mL. Neutral red release was evaluated by the addition of an extractant solution, and the absorbance measured at 540 nm.

2.5. *Validation of Reversed-phase Liquid Chromatography Method*

The method was validated using samples of a biopharmaceutical formulation of rhIL-11 with a label claim of 5 mg/vial by determinations of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, stability, and system suitability test, following the ICH guidelines [16].

2.5.1. Specificity

Specificity of the method for the biomolecule was assessed by determination of the peak purity of reference solutions and samples of biopharmaceutical formulation of rhIL-11 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) previously degraded by hydrogen peroxide. In addition, the interference of excipients in the biopharmaceutical formulations was determined by injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of formulation excipients). Additionally the *BRS-rhIL-11* and the degraded samples were subjected to the *in vitro* cytotoxicity test.

2.5.2. Linearity

The linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each one with nine concentrations of the *BRS-rhIL-11*, over the range of 1-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Three replicates 50 μL injections of the reference solutions were prepared to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of rhIL-11 to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and the determination coefficient.

2.5.3. Precision and Accuracy

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-days). Repeatability was examined by six evaluations of sample of rhIL-11, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulations on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was assessed applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the biomolecule, to obtain solutions at concentrations of 40, 50 and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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 the added concentrations.

2.5.4. Limits of Detection and Quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH, [16] by using the mean values of the 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 of the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

2.5.5. 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 (50 µg/mL) under a variety of conditions of the method parameters, such as: injection volume, percent of acetonitrile, flow rate, temperature and the wavelength. To assess the stability of sample solutions of rhIL-11, the samples were tested after being maintained at 2-8°C for 48 h and also placed into the auto sampler, at room temperature, for 24 h. The stability of these solutions was studied by observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

2.5.6. System Suitability Test

To ensure the validity of the analytical procedure, data from five injections of 50 µL of the working *BRS-rhIL-11* solution containing 50 µg/mL were used for evaluation of the system

suitability parameters, such as asymmetry, number of theoretical plates, retention time, and peak area, through the CLASS-VP® V 6.12 software.

2.5.7. Analysis of rhIL-11 in Biopharmaceutical Formulations

The biopharmaceutical samples were previously identified by SDS-PAGE followed by transference to a nitrocellulose membrane and immunodetection with a rhIL-11-specific antiserum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). For the quantitation of rhIL-11 by the proposed method, the respective solutions were diluted to appropriate concentration with phosphate buffer containing 0.5 mg/mL of polysorbate 80, injected in triplicate and the percentage recoveries of the biopharmaceutical calculated against the *BRS-rhIL-11*.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of Chromatographic Conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide appropriate selectivity and sensitivity. Phosphate buffered saline resulted in higher sensitivity compared to phosphate buffer and phosphoric acid solution. The use of a gradient flow-rate resulted in better sensitivity, improving the peak symmetry with the retention time also suitable for the separation of deamidated and sulphoxides, as previously suggested [10]. The optimum wavelength was selected using the PDA detector. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations and correlation studies.

3.2. Method Validation

3.2.1. Specificity

Specificity of the method for the biological was evaluated under oxidative conditions by adding 50 µL of hydrogen peroxide 3% for 3 min, generating the main peak at 27.6 min and additional peaks of related proteins at retention times 24.2 min and 26.5, respectively, as

shown in the typical chromatograms in Fig. 1. Moreover, the interference of the excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only a placebo (in-house mixture of the formulation excipients), giving no additional peak. Then the specificity of the method was established by determining the peak purity in the samples using a PDA detector. It is possible that other physical or chemical factors may affect the stability of the protein and might produce degraded products which are not detected by the RP-LC method. Additionally the *BRS-rhIL-11* and the degraded samples were subjected to the *in vitro* cytotoxicity test.

3.2.2. Linearity

The analytical curves constructed for rhIL-11 were found to be linear in the 1-200 µg/mL range. The value of the determination coefficient calculated [$r^2 = 0.9995$, $y = (42507 \pm 178.242) x + (38447 \pm 4767.489)$, where, x is concentration and y is the peak absolute area] indicated linearity of the analytical curve for the method.

3.2.3. Precision

The precision of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) for six analyses at a concentration of 50 µg/mL, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD value was 0.91%. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-days), giving RSD values of 1.67 and 1.78%, respectively. The between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples of the biopharmaceutical formulations by three analysts; the values were found to be 1.32 and 1.63%, respectively, as given in Table 1.

3.2.4. Accuracy

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 40, 50 and 60 µg/mL, respectively. The absolute means obtained with a mean value of 100.22% and a bias lower than 1.25% (Table 2), show that the method is accurate within the desired range.

3.2.5. Limits of Detection and Quantitation

The LOD and LOQ were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression model, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 0.34 and 1.12 µg/mL, respectively. The evaluated experimental LOQ with a precision lower than 5% and accuracy within ± 5%, [22] was found to be 1 µg/mL, and therefore, suitable for quality control analysis.

3.2.6. Robustness

The results and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 3, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when modifications were introduced into 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 for 24 h in an auto sampler and for 48 h when maintained at 2-8°C.

3.2.7. System Suitability

The system suitability test was carried out to evaluate the resolution and repeatability of the system for the analysis to be performed. The obtained RSD values for the retention time, peak symmetry and peak area were 1.19, 0.73 and 0.56%, respectively. The number of theoretical plates was about 35673, with RSD of 0.57%. The parameters tested were within an acceptable range (RSD < 2.0%).

3.3. Method Application

The validated RP-LC method was applied for the determination of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations, giving content/potencies within 96.95% and 103.83% of the stated potency, with calculated RSD lower than 0.87%, as shown in Table 4. The results demonstrated the stability-indicating capability and the application of the method.

3.4. Biological Potency Assessment

The potency of rhIL-11 was assessed by the TF-1 cell proliferation bioassay based on the dose-dependent growth curve of the cells, measuring the responses with MTT. The statistical analysis of the assay data was performed by parallel line method, using PLA 2.0 Software (Stegmann System-beratung, Rodgau, Germany), which gave the values shown in Table 4. In addition, the biological activity of three biopharmaceutical samples was assessed by the *in vivo* thrombocytopenic bioassay analyzing the results of peripheral platelet counts and of neutrophils number, respectively, giving difference lower than 3.82%, compared to the *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay. The biological model was previously used to evaluate the effects on the peripheral platelet counts of rhIL-11 chemically modified with hyaluronic acid and polyethylene glycol after injections in rats and in mice [23, 24].

Samples were also artificially degraded, analyzed by the RP-LC, and subjected to the *in vitro* and to the *in vivo* bioassays to evaluate the bioactivity of the sulphoxides/deamidated forms, non-detecting significant changes related of the intact rhIL-11. Previous studies by site-directed and deletion mutagenesis showed 3-fold to 25-fold decrease of the *in vitro* biological activity [4].

3.5. Cytotoxicity Evaluation

The cytotoxicity test was performed on degraded forms versus the intact molecule, in order to detect possible effects resulting from the instability of the samples during storage. However this showed non-significant differences ($p>0.05$).

4. Conclusion

The results of the validation studies show that the RP-LC method is specific, sensitive with a LOQ of 1.0 $\mu\text{g/mL}$, accurate and possesses significant linearity and precision characteristics. Separation of rhIL-11 was achieved with a retention time of 27.6 min, and the method was successfully used for the analysis of biopharmaceutical formulations, showing a higher mean difference of the estimated content/potencies of 2.60% compared to the *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay, but with non-significant difference, as calculated by the Student's *t*-test ($p>0.05$). The RP-LC method represents an improvement to current methods which can be applied in combination with the *in vitro* TF-1 cell proliferation bioassay, and with the expected development of a size-exclusion chromatographic method, to the characterization of rhIL-11 by monitoring its stability during the biotechnology process and, through subsequent purification steps, and to assure the batch-to-batch consistency of the bulk and finished biological products.

Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Project 304860/2008-5, for financial support.

References

- [1] M. Ellis, U. Hedstrom, C. Frampton, H. Alizadeh, J. Kristensen, F. V. Shammam and B. K. al-Ramadi. "Modulation of the systemic inflammatory response by recombinant human interleukin-11: a prospective randomized placebo controlled clinical study in patients with hematological malignancy," *Clinical Immunology*, vol. 120, no. 2, pp. 129–137, 2006.
- [2] K. Usuki, A. Urabe, Y. Ikeda, Y. Ohashi, H. Mizoguchi and F. Takaku. "A multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled late-phase II/III study of recombinant human interleukin 11 in acute myelogenous leukemia," *International Journal Hematology*, vol. 85, no. 1, pp. 159–169, 2007.
- [3] S. Yanaka, E. Sano, N. Naruse, K. Miura, M. Futatsumori-Sugai, J. M. M. Caaveiro and K. Tsumoto. "Non-core region modulates interleukin-11 signaling activity: generation of agonist and antagonist variants," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 10, pp. 532–555, 2010.
- [4] M. Czupryn, F. Bennett, J. Dube, K. Grant, H. Scoble and J. M. McCoy. "Alanine-scanning mutagenesis of human interleukin-11: identification of regions important for biological activity," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 762, no. 21, pp. 152–164, 1995.
- [5] H. Yokota, M. Kishimoto, H. Saito, T. Sakao, S. Yokota and S. Kojima. "Quantitative *in vitro* bioassay for recombinant human interleukin-11," *Journal of AOAC International*, vol. 83, no. 5, pp. 1053–1057, 2000A.
- [6] W. Zhang, M. J. Czupry, P. T. Boyle and J. Amari. "Characterization of asparagine deamidation and aspartate isomerization in recombinant human interleukin-11," *Pharmaceutical Research*, vol. 19, no. 8, pp. 1223–1231, 2002.
- [7] T. Yin, T. Taga, M. L. Tsang, K. Yasukawa, T. Kishimoto and Y. Yang. "Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction," *Journal of Immunology*, vol. 151, no. 5, pp. 2555–2561, 1993.
- [8] H. Tan, G. Dan, H. Gong and L. Cao. "Purification and characterization of recombinant truncated human interleukin-11 expressed as fusion protein in *Escherichia coli*," *Biotechnology Letters*, vol. 27, no. 13, pp. 905–910, 2005.
- [9] M. Saitoh, K. Taguchi, K. Momose, K. Suga, Y. Ogawa, S. Yasuda and K. Miyata. "Kinetic analysis of megakaryopoiesis induced by recombinant human interleukin 11 in myelosuppressed mice," *Cytokine*, vol. 13, no. 5, pp. 287–294, 2001.
- [10] W. Wang. "Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 185, no. 2, pp. 129–188, 1999.
- [11] P. Lara-Quintanar, I. Lacunza, J. Sanz, J. C. Diez-Masa and M. de Frutos. "Immuno-chromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography A*, vol. 1153, no. 1-2, pp. 227–234, 2007.

- [12] R. A. Kenley and W. W. Nicolas. "Acid-Catalyzed peptide bond hydrolysis of recombinant human interleukin 11," *Pharmaceutical Research*, vol. 11, no. 1, pp. 72–74, 1994.
- [13] J. V. Amari and I. Mazsaroff. "Analysis of recombinant human interleukin-11 fusion protein derived from *Escherichia coli* lysate by combined size-exclusion and reversed-phase liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 728, no. 1-2, pp. 113–124, 1996.
- [14] H. Yokota, H. Saito, K. Masuoka, H. Kaniwa and T. Shibamura. "Reversed phase HPLC of Met⁵⁸ oxidized rhIL-11: oxidation enhanced by plastic tubes," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 24, no. 2, pp. 317–324, 2000B.
- [15] W. Garzon-Rodriguez, R. L. Koval, S. Chongprasert, S. Krishnan, T. W. Randolph, N. W. Warne and J. F. Carpenter. "Optimizing storage stability of lyophilized recombinant human interleukin-11 with disaccharide/hydroxyethyl starch mixtures," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 93, no. 3, pp. 684–696, 2004.
- [16] 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.
- [17] A. F. Bristow and S. L. Jeffcoate. "Analysis of therapeutic growth hormone preparations: report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies," *Biologicals*, vol. 20, no. 3, pp. 221–231, 1992.
- [18] S. L. Dalmora, F. B. D'Avila, L. M. da Silva, A. C. Bergamo and E. S. Zimmermann. "Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and correlation with liquid chromatography methods and bioassay," *Journal of Chromatography B*, vol. 877, no. 24, pp. 2471–2476, 2009.
- [19] B. E. Almeida, J. E. Oliveira, R. Damiani, S. L. Dalmora, P. Bartolini and M. T. C. P. Ribela. "A pilot study on potency determination of human follicle-stimulating hormone: A comparison between reversed-phase high-performance liquid chromatography method and the *in vivo* bioassay," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 54, no. 4, pp. 681–686, 2011.
- [20] British Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2010.
- [21] D. R. Nogueira, M. S. Sangoi, L. M. Silva, V. Todeschini and S. L. Dalmora. "Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method," *Journal of Separation Science*, vol. 31, no. 16-17, pp. 3098–3105, 2008.
- [22] G. A. Shabir, W. L. Lough, S. A. Arain and T. K. Bradshaw. "Evaluation and application of best practice in analytical method validation," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 30, no. 3, pp. 311–333, 2007.
- [23] A. Takagi, N. Yamashita, T. Yoshioka, Y. Takaishi, K. Nakanishi, S. Takemura, A. Maeda, K. Saito, Y. Takamura and M. Hashida. "Incorporation into a biodegradable hyaluronic acid matrix enhances *in vivo* efficacy of recombinant human interleukin 11 (rhIL11)," *Journal of Controlled Release*, vol. 115, no. 2, pp. 134–139, 2006.

[24] A. Takagi, N. Yamashita, T. Yoshioka, Y. Takaishi, K. Sano, H. Yamaguchi, A. Maeda, K. Saito, Y. Takakura and M. Hashida. “Enhanced pharmacological activity of recombinant human interleukin-11 (rhIL11) by chemical modification with polyethylene glycol,” *Journal of Controlled Release*, vol. 119, no. 3, pp. 271–278, 2007.

Table 1. Inter-days and between-analysts precision data of RP-LC for rhIL-11 in biopharmaceutical formulations.

Sample	Day	Inter-days		Between-analysts		
		Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)	Analysts	Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)
1	1	102.81		A	100.85	
	2	100.41	1.78	B	103.42	1.32
	3	99.29		C	101.41	
2	1	100.51		A	98.76	
	2	102.63	1.67	B	100.71	1.63
	3	99.31		C	102.01	

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

Table 2. Accuracy of RP-LC for rhIL-11 in the formulations.

Nominal concentration (µg/mL)	Mean concentration measured ^a (µg/mL)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
40	40.06	1.34	100.15	0.15
50	50.62	0.59	101.25	1.25
60	59.56	0.56	99.26	0.74

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

^cBias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

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

Variable	Range investigated	rhIL-11 ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
Flow rate (mL/min)	0.9	101.59	0.50	1
	1	100.58	0.34	
	1.1	99.91	0.43	
Injection volume (μL)	40	103.21	0.92	50
	50	99.39	0.38	
	60	101.58	0.53	
	25	99.03	0.32	
Temperature (°C)	30	100.78	0.58	25
	35	98.43	0.69	
	38	100.76	0.68	
Acetonitrile (%)	40	100.43	0.41	40
	42	102.39	0.76	
	Autosampler 24 h	98.00	0.18	
Solution stability	2-8°C 24 h	98.58	1.47	-
	2-8°C 48 h	97.14	0.40	-
Wavelength (nm)	210-320	-	-	214

^aMean of three replicates.^bRSD. = Relative standard deviation.

Table 4. Comparative content/potencies evaluation of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations, by RP-LC method and TF-1 proliferation bioassay.

Sample	RP-LC ^a		<i>In vitro</i> bioassay	
	Main peak (%)	Deamidated/Sulphoxides (%)	Potency (%)	Confidence intervals (<i>P</i> = 0.95)
1	97.69	0.25	95.04	88.15 – 107.12
2	101.17	1.16	97.89	94.11 – 106.07
3	98.09	0.88	100.14	95.66 – 109.31
4	97.60	0.56	93.23	85.74 – 102.21
5	102.40	1.63	103.30	96.14 – 110.98
6	101.36	1.57	96.45	92.15 – 105.92
7	96.95	0.79	93.26	85.16 – 101.17
8	103.83	0.34	98.92	93.67 – 111.43
Mean	99.88	0.77	97.28	–
SD ^b	2.60	0.43	3.68	–

^aMean of three replicates.

^bSD = Standard Deviation.

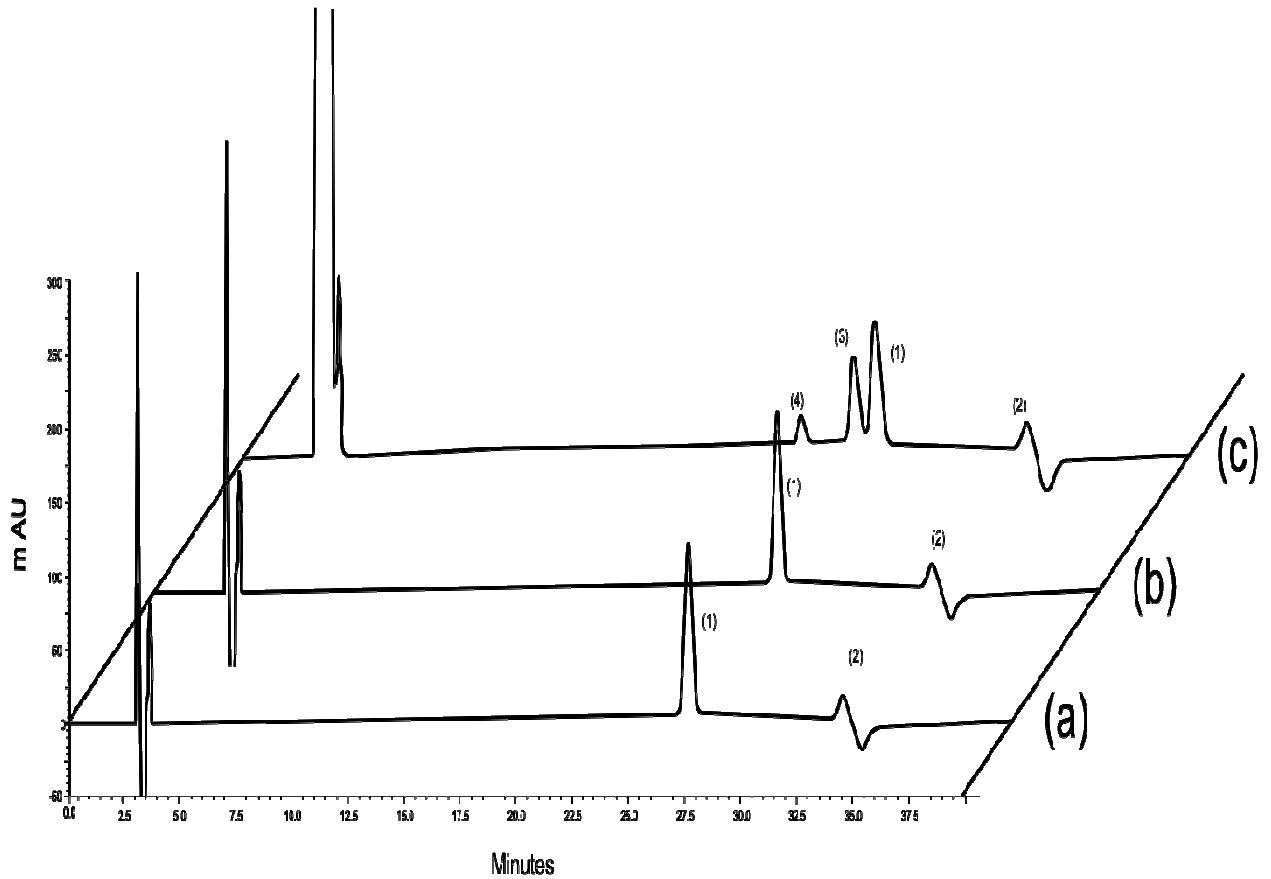


Figure 1. RP-LC chromatograms of rhIL-11 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (a) BRS-rhIL-11: peak 1 = rhIL-11, peak 2 = excipients. (b) Biopharmaceutical formulations: peak 1 = rhIL-11, peak 2 = excipients. (c) After degradation by oxidative conditions: peak 1 = rhIL-11, peak 2 = excipients, peak 3 = sulphoxides, peak 4 = deamidated.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A tecnologia do DNA recombinante viabilizou aumento importante na produção de proteínas de interesse terapêutico. 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 biofármacos de uso clínico.

Os ensaios biológicos expressam a atividade biológica e sua realização é essencial para a avaliação da potência de biomoléculas, para os quais em geral não se dispõem de metodologias analíticas para o controle de qualidade. Especialmente, para a interleucina-11 humana recombinante a potência biológica tem sido determinada por bioensaios *in vitro*, entre os quais destaca-se a avaliação da atividade proliferativa da linhagem de células TF-1 (YIN et al., 1993), adotado no presente trabalho. Estabeleceu-se a transformação de unidades internacionais para massa com base na expressão preconizada no Reference Reagent Interleukin-11 (Human rDNA derived) WHO 92/788, no qual 5.000 UI correspondem a 0,5 microgramas.

Realizou-se teste de identificação por SDS-PAGE não-redutora, obtendo-se perfil eletroforético com banda relativa a rhIL-11 na região de 19 kDa, confirmada também pelos marcadores e pelo padrão de referência, aplicados no mesmo gel (CZUPRYN et al. 1995; ZHANG et al., 2002; TAN et al., 2005). A transferência e detecção imunológica efetuada com anticorpos específicos em membrana de nitrocelulose, apresentou banda única na região de 19 kDa. Esses procedimentos podem ser usados inclusive para identificar e quantificar impurezas protéicas conhecidas da célula hospedeira (USP 33, 2010).

Os métodos cromatográficos têm sido usados para diferentes produtos biológicos recombinantes nas etapas de expressão, purificação e análise qualitativa e quantitativa, e para estudos de correlação com os bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Desse modo, optou-se por pesquisar e validar inicialmente procedimento por cromatografia líquida em fase reversa para a determinação da rhIL-11 e suas proteínas relacionadas em produtos biofarmacêuticos.

A discussão apresentada a seguir está baseada no **ARTIGO 3.1**. A separação por CL-FR foi alcançada com tempo de corrida de 27,6 min (figura 1). A geração de picos adicionais, relativos aos desamidados e sulfóxidos, sob condições oxidativas e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, conforme pureza do pico da rhIL-11 demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O

método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 1 a 200 µg/mL ($r^2 = 0,9995$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária, conforme demonstra a tabela 1, forneceram CV inferiores a 1,78 % o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Na tabela 2 podem ser observados os valores experimentais obtidos, com média de 100,22%, confirmando exatidão significativa. As potências obtidas nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, de acordo com a tabela 3. Por sua vez, os dados da verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, pois os valores de CV% foram inferiores a 2% (ICH, 2005; USP 33, 2010). Conforme descrito em publicações, um inconveniente deste método é a desnaturação ou dissociação das proteínas quando adsorvidas à matriz da coluna. Além disso, as condições típicas da fase reversa podem afetar a conformação da proteína e a resposta obtida não necessariamente representa a atividade da biomolécula (WICAR et al., 1994; DALMORA et al., 1997). Porém, viabiliza a determinação de desamidados e sulfóxidos que é necessária devido às possíveis respostas imunogênicas que podem causar no organismo humano (EMEA, 2007; GROOT & SCOTT, 2007). Demonstrou-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregado para análise da rhIL-11 em produtos farmacêuticos.

Paralelamente, executou-se o bioensaio *in vitro* da atividade proliferativa em células TF-1. Estudou-se então, a correlação entre os resultados fornecidos pelo método cromatográfico e o bioensaio em células TF-1 com as amostras selecionadas, conforme demonstra a tabela 4. Observou-se que o teor/potência por CL-FR foi em média 2,60% superior em relação ao bioensaio em células TF-1 com diferença não significativa, conforme calculado pelo teste t de Student ($p > 0,05$).

Determinaram-se também, as proteínas relacionadas (desamidados e sulfóxidos) nas amostras analisadas por CL-FR através da soma das áreas dos picos com tempo de retenção menor que o principal, em relação à área total, os valores foram expressos em percentagem com valor máximo encontrado de 1,63%. Observa-se que geralmente as farmacopéias preconizam limite máximo de 6% para desamidados e sulfóxidos nas amostras de proteínas recombinantes (BP, 2010; USP, 2010).

Adicionalmente avaliou-se a atividade biológica de três amostras de rhIL-11 pelo bioensaio *in vivo* baseado no aumento do número de plaquetas e neutrófilos em camundongos

com trombocitopenia induzida, obtendo-se média de 3,82% maior do que o bioensaio em células TF-1. As amostras também foram degradadas artificialmente, analisadas por CL-FR, e submetidas aos bioensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar a bioatividade dos sulfóxidos/desamidados, não detectando mudanças significativas em relação à forma intacta da rhIL-11.

Até o presente momento não existe na literatura oficial metodologia para a avaliação de potência da rhIL-11. Além disso, não há métodos cromatográficos validados publicados, o que é necessário no contexto da produção e caracterização de produtos biológicos recombinantes. Sugere-se, portanto, que o método por CL-FR, seja adotado em combinação com o bioensaio em células TF-1 para a avaliação de potência e pureza da rhIL-11 durante as etapas do processo de expressão e purificação para monitorar variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica (KAISER et al., 1997) e para o controle da qualidade do produto farmacêutico acabado.

Tendo em vista possíveis degradações dos produtos biotecnológicos devido à sua estabilidade durante as etapas do processo de produção e/ou armazenamento avaliou-se também a citotoxicidade *in vitro*. As amostras foram analisadas por CL-FR, estabelecendo-se o teor de degradação de cada forma. As amostras foram então preparadas nesta condição e o ensaio realizado comparativamente à molécula íntegra da rhIL-11. Os resultados obtidos não demonstraram citotoxicidade significativa, para desamidados e sulfóxidos.

Neste contexto, os resultados alcançados contribuem para aprimorar o controle da qualidade através da melhor caracterização da biomolécula, ampliando os procedimentos disponíveis para os estudos de comparabilidade, garantindo sua eficácia terapêutica e segurança.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa específico, preciso, exato e robusto para avaliação da interleucina-11 humana recombinante, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e avaliação de desidratados, sulfóxidos e da forma não-alterada.
- ✓ O bioensaio da atividade proliferativa em células TF-1 mostrou a potência dos produtos biotecnológicos selecionados, e foi adotado para viabilizar estudo de correlação.
- ✓ Sugere-se a aplicação do método cromatográfico para avaliação da interleucina-11 humana recombinante em combinação com o bioensaio da atividade proliferativa em células TF-1, pois representa contribuição para análise do produto farmacêutico, devido à determinação de formas relacionadas, especificidade e tempo de execução em relação ao ensaio biológico *in vitro*.
- ✓ O método desenvolvido e validado no presente trabalho estabelece bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, de comparabilidade com biomoléculas da área e procedimentos para aprimorar o controle da qualidade do produto biotecnológico disponível no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRER, K.; JUNGBAUER, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. **Journal of Chromatography B**, v. 841, n. 1-2, p. 110-122, 2006.

ALAVI, K.; PRASAD, R.; LUNDGREN, K.; SCHWARTZ, M. Z. Interleukin-11 enhances small intestine absorptive function and mucosal mass after intestinal adaptation. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 35, n. 2, p. 371-374, 2000.

ALMEIDA, B. E.; OLIVEIRA J. E.; CARVALHO, C. M.; DAMOLRA, S. L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 90-97, 2010.

AMARI, J. V.; MAZSAROFF, I. Analysis of recombinant human interleukin-11 fusion protein derived from *Escherichia coli* lysate by combined size-exclusion and reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 728, n. 1-2, p. 113-124, 1996.

AOYAMA, K.; UCHIDA, T.; TAKANUKI, F.; USUI, T.; WATANABE, T.; HIGUCHI, S.; TOYOKI, T.; MIZOGUCHI, H. Pharmacokinetics of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in healthy male subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 571-578, 1997.

ARDUINI, R. M.; LI, Z.; RAPOZA, A.; GRONKE, R.; HESS, D. M.; WEN, D.; MIATKOWSKI, K.; COOTS, C.; KAFFASHAN, A.; VISEUX, N.; DELANEY, J.; DOMON, 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- β and preparation of an N-terminally PEGylated form with improved pharmacokinetic parameters. **Protein Expression and Purification**, v. 34, n. 2, p. 229-242, 2004.

BARTH, T. **Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para avaliação de potência de eritropoietina humana recombinante. Correlação com o ensaio biológico.** 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BAZAN, J. F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 18, p. 6934-6938, 1990.

BELLIDO, T.; STAHL, N.; FARRUGGELLA, T. J.; BORBA, V.; YANCOPOULOS, G. D.; MANOLAGAS, S. C. Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. **Journal Clinical Investigation**, v. 97, n. 2, p. 431-437, 1996.

BERGER, L. C.; HAWLEY, T. S.; LUST, J. A.; GOLDMAN, S. J.; HAWLEY, R. G. Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202, n. 1, p. 596-605, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 55, de 16 de Dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Publicada no D.O.U. de 16 de dezembro de 2010.

BRITISH Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2010, p. 1448-1451.

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

BUSSEL, J. B.; MUKHERJEE, R.; STONE, A. J. A pilot study of rhuIL-11 treatment of refractory ITP. **American Journal of Hematology**, v. 66, n. 3, p.172-177, 2001.

CHAHADE, W. H. A reação inflamatória autoimune e possibilidades de seu controle (Parte 1). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 10, n. 2, p. 60-61, 2009.

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

CZUPRYN, M.; BENNETT, F.; DUBE, J.; GRANT, K.; SCOBLE, H.; MCCOY J.M. Alanine-scanning mutagenesis of human interleukin-11: identification of regions important for biological activity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 762, n. 2, p. 152-164, 1995.

DALMORA, S. L., MASIERO, S. M. K.; OLIVEIRA, P. R.; SANGOI, M. S.; BRUM, L. 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, n. 12, p. 1753-1767, 2006.

DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, J. E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M. T.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 782, n. 2, p. 199-210, 1997.

DENIS, C. V.; KWACK, K.; SAFFARIPOUR, S.; MAGANTI, S.; ANDRÉ, P.; SCHAUB, R. G.; WAGNER, D. D.; Interleukin 11 significantly increases plasma von Willebrand factor and factor VIII in wild type and von Willebrand disease mouse models. **Blood Journal**, v. 97, n. 2, p. 465-472, 2001.

DIRESS, A.; LORBETSKIE, B.; LAROCQUE, L.; LI, X.; ALTEEN, M.; ISBRUCKER, R.; GIRARD, M. Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, n. 19, p. 3297-3306, 2010.

DRUG BANK, 2011. Disponível em: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00038>>. Acesso em: 04 mar. 2011.

DU X.; WILLIAMS D. A. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. **Blood**, v. 89, n. 11, p. 3897-3908, 1997.

ELLIS, M.; HEDSTROM, U.; FRAMPTON, C.; ALIZADEH, H.; KRISTENSEN, J.; SHAMMAS, F. V.; AL-RAMADI, B. K. Modulation of the systemic inflammatory response by recombinant human interleukin-11: a prospective randomized placebo controlled clinical study in patients with hematological malignancy. **Clinical Immunology**, v. 120, n. 2, p. 129-137, 2006.

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.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins**”. London, July 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia 7th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2011.

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

FOSE, S.; SCHACHER, A.; WEYER, K. A.; BRUGGER, D.; DIETEL, E.; MARTI, S.; SCHREITMÜLLER, T. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of

positional isomers of monopegylated interferon α -2a (PEGASYS). **Protein Expression and Purification**, v. 30, n. 1, p. 78-87, 2003.

FOURCIN, M.; CHEVALIER, S.; LEBRUN, J. J.; KELLY, P.; POUPLARD, A.; WIJDENES, J.; GASCAN, H. Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 277-280, 1994.

GARZON-RODRIGUEZ, W.; KOVAL, R. L.; CHONGPRASERT, S.; KRISHNAN, S.; RANDOLPH, T. W.; WARNE, N. W.; CARPENTER, J. F. Optimizing storage stability of lyophilized recombinant human interleukin-11 with disaccharide/hydroxyethyl starch mixtures, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 3, p. 684-696, 2004.

GIANNINI, E. G. Review article: thrombocytopenia in chronic liver disease and pharmacologic treatment options. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, n. 8, p. 1055-1065, 2006.

GIRASOLE, G.; PASSERI, G.; JILKA, R. L.; MANOLAGAS, S. C. Interleukin-11: A new cytokine critical for osteoclast development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 4, p. 1516-1524, 1994.

GROOT, A. S.; SCOTT, D. W. Immunogenicity of protein therapeutics. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 11, p. 482-490, 2007.

HARMEGNIES, D.; WANG, X. M.; VANDENBUSSCHE, P.; LEON, A.; VUSIO, P.; GROTZINGER, J.; JACQUES, Y.; GOORMAGHTIGH, E.; DEVREESE, B.; CONTENT, J. Characterization of a potent human interleukin-11 agonist. **Biochemical Journal**, v. 375, n. 1 p. 23-32, 2003.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 214-221, 2003.

HERMANN, J. A.; HALL, M. A.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M. Important immunoregulatory role of interleukin-11 in the inflammatory process in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 41, n. 8, p. 1388-1397, 1998.

HILTON, D. J.; HILTON, A. A.; RAICEVIC, A.; RAKAR, S.; HARRISON-SMITH, M.; GOUGH, N.M.; BEGLEY, C. G.; METCALF, D.; NICOLA, N. A.; WILLSON, T. A. Cloning of a murine IL-11 receptor α -chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 20, p. 4765-4775, 1994.

HUDSON, K. R.; VERNALLIS, A. B.; HEATH, J. K. Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 20, p. 11971-11978, 1996.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products**, 1999.

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.

INJAC, R.; BOSKOVIC, M.; KOCEVAR, N.; VOVK, T. Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, n. 1-2, p. 150-161, 2008.

JUNG, Y.; AHN, H.; KIM, D.; HWANG, Y. R., HO, S.; KIM J.; KIM, S.; MA, S.; KIM, S. Improvement of biological and pharmacokinetic features of human interleukin-11 by site-directed mutagenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, n. 3, p. 399-404, 2011.

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.

KAYE, J. A. FDA licensure of NEUMEGA to prevent severe chemotherapy-induced thrombocytopenia. **Stem Cells**, v. 16, n. 2, p. 207-223, 1998.

KELLER, D. C.; DU, X. X.; SROUR, E. F.; HOFFMAN, R.; WILLIAMS, D. A. Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. **Blood Journal**, v. 82, n. 5, p. 1428-1435, 1993.

KENLEY, R. A.; WARNE, N. W. Acid-catalyzed peptide bond hydrolysis of recombinant human interleukin 11. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 1, p. 72-76, 1994.

KIMURA, R.; MAEDA, M.; ARITA, A.; OSHIMA, Y.; OBANA, M.; ITO, T.; YAMAMOTO, Y.; MOHRI, T.; KISHIMOTO, T.; KAWASE, I.; FUJIO, Y.; AZUMA, J. Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine. **Cytokine**, v. 38, n. 2, p. 107-115, 2007.

KRESSE, G. B. Biosimilars-science, status, and strategic perspective. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 479-486, 2009.

LAWITZ, E. J.; HEPBURN, M. J.; CASEY, T. J. A pilot study of interleukin-11 in subjects with chronic hepatitis C and advanced liver disease nonresponsive to antiviral therapy. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 12, p. 2359-2364, 2004.

LONGSTAFF, C.; WHITTON, C. M.; STEBBINGS, R.; GRAY, E. How do we assure the quality of biological medicines? **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 1-2, p. 50-55, 2009.

MEERVELD, B. G. V.; VENKOVA, K.; KEITH, JR., J. C. Recombinant human interleukin-11 restores smooth muscle function in the jejunum and colon of human leukocyte antigen-b27 rats with intestinal inflammation. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 1, p. 58-66, 2001.

MORELAND, L.; GUGLIOTTI, R.; KING, K.; CHASE, W.; WIESMAN, M.; GRECO, T.; FIFE, R.; KORN, J.; SIMMS, R.; TESSER, J.; HILLSON, J.; CALDWELL, J.; SCHNITZER, T.; LYONS, D.; SCHWERTSCHLAG, U. Results of a phase-I/II randomized, masked, placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in the treatment of subjects with active rheumatoid arthritis. **Arthritis Research**, v. 3, n. 4, p. 247-252, 2001.

NEUMEGA[®]: Pó líofilo injetável. Responsável técnico Edina S. M. Nakamura. Itapevi, São Paulo – Brasil. Wyeth Indústria Farmacêutica, 2004. Bula de remédio.

NICHOLS, T. C.; DILLOW, A. M.; FRANCK, H. W. G.; MERRICKS, E. P.; RAYMER, R. A.; BELLINGER, D. A.; ARRUDA, V. R.; HIGH, K. A. Protein replacement therapy and gene transfer in canine models of hemophilia a, hemophilia b, von willebrand disease, and factor vii deficiency. **National Institutes of Health**, v. 50, n. 2, p. 144-167, 2009.

OBANA, M.; MAEDA, M.; TAKEDA, K.; HAYAMA, A.; MOHRI, T.; YAMASHITA, T.; NAKAOKA, Y.; KOMURO, I.; TAKEDA, K.; MATSUMIYA, G.; AZUMA, J.; FUJIO, Y. Therapeutic Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Interleukin-11 Ameliorates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 121, n. 5, p. 684-691, 2010.

OLIVEIRA, J. E.; DAMIANI, R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography method for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1-2, p. 206-211, 2007.

PANAYOTATOS, N.; RADZIEJEWSKA, E.; ACHESON, A.; SOMOGYI, R.; THADANI, A.; HENDRICKSON, W. A.; MCDONALD, N. Q. Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related epitope topography among helical cytokines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 23, p. 14007-14014, 1995.

PARNHAM, M. J.; SCHINDLER-HORVAT, J.; KOZLOVIC, M. Non-Clinical safety studies on biosimilar recombinant human erythropoietin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 73-83, 2007.

PAUL, S. R.; BENNETT, F.; CALVETTI, J. A.; KELLEHER K.; WOOD, C. R.; O'HARA, JR., R. M.; LEARY, A. C.; SIBLEY, B.; CLARK, S. C.; WILLIAMS, D. A.; YANG, Y. C. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n 19, p. 7512-7516, 1990.

PAUL, S. R.; YANG, Y. C.; DONAHUE, R. E.; GOLDRING, S.; WILLIAMS, D. A. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. **Blood Journal**, v. 77, n. 8, p. 1723-1733, 1991.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBELA, M. T. C. P.; GOUT, P. W.; OLIVEIRA, J. E.; BARTOLINI, P. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 103-126, 2006.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111-125, 2007.

SAITOH, M.; TAGUCHI, K.; MOMOSE, K.; SUGA, K.; OGAWA, Y.; YASUDA, S.; MIYATA K. Kinetic analysis of megakaryopoiesis induced by recombinant human interleukin 11 in myelosuppressed mice. **Cytokine**, v. 13, n. 5, p. 287-294, 2001.

SANDS, B. E.; BANK, S.; SNINSKY, C. A.; ROBINSON, M.; KATZ, S.; SINGLETON, J. W.; MINER, JR., P. B.; SAFDI, M. A.; GALANDIUK, S.; HANAUER, S. B.; VARILEK, G. W.; BUCHMAN, A. L.; RODGERS, V. D.; SALZBERG, B.; CAI, B.; LOEWY, J.; DEBRUIN, M. F.; ROGGE, H.; SHAPIRO, M.; SCHWERTSCHLAG, U. S. Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 117, n. 1, p. 58-64, 1999.

SCHELLEKENS, H. Biosimilar therapeutics - what do we need to consider?. **Nephrology Dialysis Transplantation Plus**, v. 2, n. 1, p. 27-36, 2009.

SCHELLEKENS, H.; MOORS, E. Clinical comparability and European biosimilar regulations. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 28-31, 2010.

SCHLERMAN, F. J.; BREE, A. G.; KAVIANI, M. D.; NAGLE, S. L.; DONNELLY, L. H.; MASON, L. E.; SCHAUB, R. G.; GRUPP, S. A.; GOLDMAN, S. J. Thrombopoietic activity of recombinant human interleukin 11 (rhIL-11) in normal and myelosuppressed nonhuman primates. **Stem Cells**, v. 14, n. 5, p. 517-532, 1996.

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, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. L.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311-333, 2007.

SIDDIQUI R, A.; YANG, Y. C. Interleukin-11 induces phosphatidic acid formation and activates MAP kinase in mouse 3T3-L1 cells. **Cellular Signalling**, v. 7, n. 3, 247-259, 1995.

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- α 2a in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, n. 6, p. 370-382, 2009a.

SILVA, L. M. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para avaliação de interferon-alfa 2a em formulações farmacêuticas**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009b.

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

TAKAGI, A.; YAMASHITA, N.; YOSHIOKA, T.; TAKAISHI, Y.; SANO, K.; YAMAGUCHI, H.; MAEDA, A.; SAITO, K.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA M. Enhanced pharmacological activity of recombinant human interleukin-11 (rhIL11) by chemical modification with polyethylene glycol. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 3, p. 271-278, 2007.

TAKAGI, A.; YAMASHITA, N.; YOSHIOKA, N.; TAKAISHI, Y.; NAKANISHI, K.; TAKEMURA, S.; MAEDA, A.; SAITO, K.; TAKAMURA Y.; HASHIDA M. Incorporation into a biodegradable hyaluronic acid matrix enhances *in vivo* efficacy of recombinant human interleukin 11 (rhIL11). **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 2, p. 134-139, 2006.

TAKAGI, A.; MASUDA, H.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Disposition characteristics of recombinant human interleukin-11 after a bolus intravenous administration in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 2, p. 537-543, 1995.

TAKAGI, A.; YABE, Y.; OKA, Y.; SAWAI, K.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Renal disposition of recombinant human interleukin-11 in the isolated perfused rat kidney. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 1, p. 86-90, 1997.

TAKAGI, A.; YABE, Y.; YOSHIDA, M.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Hepatic disposition characteristics of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in the perfused rat liver. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 12, p. 1364-1366, 1998.

TAN, H.; DAN, G.; GONG H.; CAO, L. Purification and characterization of recombinant truncated human interleukin-11 expressed as fusion protein in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 13, p. 905-910, 2005.

THE UNITED States Pharmacopeia. 33. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2010.

TREPICCHIO, W. L.; BOZZA, M.; PEDNEAULT, G.; DORNER, A. J. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 8, p. 3627-3634, 1996.

TREPICCHIO, W. L.; WANG, L.; BOZZA M., DORNER, A. J. IL-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-kappaB. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 11, p. 5661-5670, 1997.

TSENG, C. M. L.; ALBERT, L.; PETERSON, R. L.; BOUCHARD, P.; DORNER, A. J.; KEITH, JR., J.; KHOR, S. P.; *In vivo* absorption properties of orally administered recombinant human interleukin-11. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4, p. 482-485, 2000.

UCHIDA, T.; AOYAMA, K.; MORI, K.; USUI, T.; WATANABE, T.; TAKARIKI, Y.; ASAHARA, N.; HIROSE, M.; KIMURA, T.; TATEISHI, M.; HIGUCHI, S. Pharmacokinetics of [125I]-recombinant human interleukin-11: 2. Placental transfer and

excretion into milk after subcutaneous administration to rats. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 23, n. 3, p. 411-416, 1998.

UNDERHILL-DAY, N.; McGOVERN, L. A.; KARPOVICH, N.; MARDON, H. J.; BARTON, V. A.; HEATH, J. K. Functional characterization of W147A: a high-affinity interleukin-11 antagonist. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3406-3414, 2003.

USUKI, K.; URABE, A.; IKEDA, Y.; OHASHI, Y.; MIZOGUCHI, H.; TAKAKU, F.; JAPAN IL-11 STUDY GROUP. A multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled late-phase II/III study of recombinant human interleukin 11 in acute myelogenous leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 59-69, 2007.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 185, n. 2, p. 129-188, 1999.

WANG, X. Y.; FUHRER, D. K.; MARSHALL, M. S.; YANG, Y. C. Interleukin-11 induces complex formation of Grb2, Fyn, and JAK2 in 3T3L1 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 47, p. 27999-28002, 1995.

WICAR, S.; MULKERRIN, M. G.; BATHORY, G.; KHUNDKAR, L. H.; KARGER, B. L. Conformational changes in the reversed phase liquid chromatography of recombinant human growth hormone as a function of organic solvent: the molten globule state. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 22, p. 3908-3915, 1994.

YANAKA, S.; SANO, E.; NARUSE, N.; MIURA, K.; FUTATSUMORI-SUGAI, M.; CAAVEIRO, J. M.; TSUMOTO, K. Non-core region modulates interleukin-11 signaling activity: generation of agonist and antagonist variants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8085-8093, 2011.

YIN, T.; MIYAZAWA, K.; YANG, Y. C. Characterization of interleukin-11 receptor and protein tyrosine phosphorylation induced by interleukin-11 in mouse 3T3-L1 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 12, p. 8347-8351, 1992.

YIN, T.; TAGA, T.; TSANG, M. L.; YASUKAWA, K.; KISHIMOTO, T.; YANG, Y. "Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction," **Journal of Immunology**, v. 151, n. 5, p. 2555-2561, 1993.

YIN, T.; YASUKAWA, K.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.; YANG, Y. C. Identification of a 130-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein induced by interleukin-11 as JAK2 tyrosine kinase, which associates with gp130 signal transducer. **Experimental Hematology**, v. 22, n. 5, p. 467-472, 1994.

YOKOTA, H.; SAITO, H.; MASUOKA, K.; KANIWA, H.; SHIBANUMA, T. Reversed phase HPLC of Met⁵⁸ oxidized rhIL-11: oxidation enhanced by plastic tubes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 2, p. 317-324, 2000a.

YOKOTA, H.; KISHIMOTO, M.; SAITO, H.; SAKAI, T.; YOKOTA, S.; KOJIMA, S. Quantitative *in vitro* bioassay for recombinant human interleukin-11. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 5, p. 1053-1057, 2000b.

ZARRIN, A.; FOROOZESH, M.; HAMIDI, M.; MOHAMMADI-SAMANI, S. A simple and rapid HPLC method for quantification of interferon- α 2b in dosage forms and delivery systems. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 2, p. 199-203, 2006.

ZHANG, W.; CZUPRYN, M. J.; BOYLE, P. T.; AMARI, J. Characterization of asparagines deamidation and aspartate isomerization in recombinant human interleukin-11. **Pharmaceutical Research**, v.19, n. 8, p. 1223-1231, 2002.