

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

Vanessa Grigoletto Schramm

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE TEOR/POTÊNCIA DE
INSULINA GLARGINA**

Santa Maria, RS, Brasil.

2016

Vanessa Grigoletto Schramm

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS
PARA AVALIAÇÃO DE TEOR/POTÊNCIA DE INSULINA GLARGINA**

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.

2016

Vanessa Grigoletto Schramm

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS
PARA AVALIAÇÃO DE TEOR/POTÊNCIA DE INSULINA GLARGINA**

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**.

Aprovado em 30 de março de 2016:

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

Rui Oliveira Macedo, Dr. (UFPB)

Cristiane Franco Codevilla, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

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

- ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, por sua dedicação, competência, orientação e revisão crítica, fatores fundamentais na conclusão desse trabalho;

- aos meus pais, Gilson Derli de Freitas Schramm e Nedi Grigoletto Schramm pelo amor, educação, incentivo e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa;

- ao meu irmão Alexandre Grigoletto Schramm pelo amor, amizade e companheirismo durante toda a minha vida;

- ao meu noivo Guilherme Weber de Freitas, que esteve ao meu lado em momentos cruciais na elaboração dessa dissertação, pelo amor, cumplicidade e dedicação;

- a todos os meus amigos do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência, pelo enorme aprendizado, apoio e carinho;

- 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.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende
o que ensina." Cora Coralina

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE TEOR/POTÊNCIA DE INSULINA GLARGINA

AUTORA: Vanessa Grigoletto Schramm

ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

A insulina humana é um hormônio secretado pelas células β , das ilhotas de Langerhans, e regula os níveis sanguíneos de glicose. A insulina glargina é produzida pela tecnologia do DNA recombinante, expressa em *Escherichia coli*, e difere da insulina humana pela modificação da asparagina na posição 21 da cadeia A por uma glicina, além da adição de dois resíduos de arginina C-terminais na cadeia B. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM) para a avaliação de insulina glargina em formulações biofarmacêuticas. No método por CL-FR, foi utilizada coluna Júpiter C_4 (250 mm x 4,6 mm d.i.), mantida a 30 °C. A fase móvel A foi constituída por tampão sulfato de sódio 0,05 M, pH 2,5, e a fase móvel B por acetonitrila, eluídas com fluxo constante de 0,5 mL/min. No método por CL-EM foi utilizada coluna BioSep-SEC-S 2000 (300 mm x 7,8 mm d.i.), mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída de tampão MES 0,03 M, pH 2,5, eluída em vazão isocrática de 0,6 mL/min. Para ambos os métodos utilizou-se detector de arranjo de diodos (DAD) com detecções em 214 nm e 200 nm para CL-FR e CL-EM, respectivamente. A separação cromatográfica foi obtida nos tempos de 7,5 e 9,9 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,05 - 200 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9998$) e 0,02 - 180 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9999$), respectivamente, para os métodos por CL-FR e CL-EM. Os limites de detecção e quantificação foram 0,018 e 0,054 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para o método por CL-FR e 0,009 e 0,027 $\mu\text{g/mL}$ por CL-EM. A especificidade foi avaliada em estudos de degradação, que também demonstraram que não houve interferência dos excipientes. A exatidão foi 100,13 e 99,38%, com bias inferior a 0,85 e 0,86%, respectivamente, para os métodos por CL-FR e CL-EM. Os métodos propostos foram aplicados para avaliação da potência de insulina glargina, de proteínas relacionadas agregados de alta massa molecular em formulações biofarmacêuticas, e os resultados foram comparados com o bioensaio por cultura de células *in vitro*, observando-se diferenças das médias de teor/potência 0,21% e 0,16% inferiores para os métodos por CL-FR e CL-EM. Concluí-se que representa contribuição para estabelecer procedimentos para monitorar a estabilidade, o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biotecnológico.

Palavras-chave: Insulina Glargina. Cromatografia Líquida. Validação. Bioensaio. Correlação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR THE CONTENT/POTENCY EVALUATION OF INSULIN GLARGINE

AUTHOR: Vanessa Grigoletto Schramm

ADVISER: Sérgio Luiz Dalmora

Human insulin, a pancreatic hormone, is synthesized from β -cell of the islets of Langerhans, and is secreted into the bloodstream. It plays an important role in regulating the metabolic activities of the body, particularly the homeostasis of the blood glucose. Insulin glargine is a recombinant human insulin analogue produced by DNA technology using a strain of *Escherichia coli* and the insulin glargine differ only by three amino acids from human insulin. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and size exclusion liquid chromatography (SE-LC) methods were developed and validated for the assessment of insulin glargine in biopharmaceutical formulations. A RP-LC method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at 30 °C. The mobile phase A consisted of 0.05 M sodium sulphate buffer, pH 2.5, and the mobile phase B was acetonitrile. The SE-LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.), maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 0.03 M MES acid buffer, pH 2.5, run isocratically at a flow rate of 0.6 mL/min. Chromatographic separation was obtained with retention times of 7.5 min, and 9.9 min, and was linear over the concentration range of 0.05 - 200 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9998$) and 0.02 - 180 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9999$), respectively, for RP-LC and SE-LC, with photodiode array (PDA) detection at 214 nm and 200 nm for RP-LC and SE-LC methods, respectively. The limits of detection and quantitation were 0.018 and 0.054 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for the RP-LC and 0.009 and 0.027 $\mu\text{g/mL}$, for the SE-LC. Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. Equally, the accuracy was 100.13% and 99.38%, with bias lower than 0.85% and than 0.86%. The validated methods were applied for the determination of insulin glargine and related proteins and high molecular mass, in biotechnology-derived products, giving lower mean differences of the estimated content/potencies of 0.21% and 0.16% for the RP-LC and SE-LC related, compared to the *in vitro* cell culture assay. It is concluded that represents a contribution to establish alternatives to monitor stability, quality control and thereby assure therapeutic efficacy of the biotechnology-derived medicine.

Keywords: Insulin Glargine. Liquid chromatography methods. Validation. Bioassay. Correlation.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Estrutura primária da insulina glargina, destacando diferenças em relação à humana (CAMPBELL et al., 2001). 15
- FIGURA 2 - Estudo farmacocinético dos análogos da insulina humana em função do tempo, adaptada (LEPORE et al., 2010). 17

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

- FIGURE 1 - Representative RP-LC chromatograms showing: Peak 1= insulin glargine; peak 2 = meta-cresol; peak 3 = deamidated; peak 4 = sulphoxides. (a) Reference substance insulin glargine; (b) sample of biopharmaceutical formulation, and (c) after degradation by hydrogen peroxide; (d) after photodegradation; (e) placebo.....47
- FIGURE 2 - Representative SE-LC chromatograms showing: Peak 1 = insulin glargine; peak 2 = meta-cresol; peak 3 = aggregate; peak 4 = dimmer. (a) Reference substance insulin glargine; (b) sample of biopharmaceutical formulation, and (c) after thermal degradation for 2 h and 30 min at 80 °C and shaken for 20 min; (d) placebo.....47

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

TABLE 1 - Accuracy of RP-LC and SE-LC for insulin glargine in the formulations.....	43
TABLE 2 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure RP-LC method.....	44
TABLE 3 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure SE-LC method.....	45
TABLE 4 - Comparative content/potencies evaluation of insulin glargine in biopharmaceutical formulations, by the RP-LC method, SE-LC method and MCF-7 cell bioassay.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMA	European Medicines Agency
EP	Farmacopeia Européia
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
Kg	Kilograma
KDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M1	(21- A- Gli-insulina)
M2	(21 -A- Gli- des30B-Treo- insulina)
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
PH	Potencial hidrogeniônico
R ²	Coefficiente de determinação
SC	Subcutâneo
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
USP	Farmacopeia Americana
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	22
4 DISCUSSÃO	48
5 CONCLUSÕES.....	52
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A insulina humana é hormônio secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. A principal função fisiológica é a manutenção dos níveis sanguíneos de glicose. Clinicamente é indicada para o tratamento do diabetes mellitus tipo I e II, que se caracteriza pela hiperglicemia.

A estrutura da insulina humana é constituída por 51 aminoácidos que formam 2 cadeias polipeptídicas (A e B), formadas, respectivamente, por 21 e 30 aminoácidos, ligadas por duas pontes dissulfeto. Por sua vez a estrutura polipeptídica da insulina glargina difere da humana pela substituição da aspargina na posição 21 por uma glicina, além da adição de dois resíduos de arginina C-terminais na cadeia B. Assim, a insulina glargina é análoga solúvel da insulina humana, que se precipita após injeção subcutânea. Diferencia-se das demais por ser absorvida de forma estável a partir do local de aplicação, o que permite a liberação prolongada, reduzindo o número de injeções e mimetizando a insulina basal produzida pelo organismo.

A insulina glargina é produzida pela tecnologia do DNA recombinante, através da clonagem e expressão do gene humano da insulina, após mutação, em *Escherichia coli*. A biomolécula é um produto biológico que apresenta estrutura molecular complexa, e pode apresentar alterações da sua integridade com a formação de proteínas relacionadas, dímeros e substâncias de alta massa molecular, que por sua vez podem afetar sua bioatividade e causar imunogenicidade e toxicidade.

O bioensaio baseado na atividade proliferativa de células MCF-7, tem sido usado para avaliação biológica de potência, e as respostas espectrofotométricas determinadas com corantes vitais como MTT (TENG et al., 2011). Na literatura encontram-se diversas pesquisas relacionadas, como métodos biológicos *in vitro* e físico-químicos, dentre os quais destacam-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (ANAND et al., 2012).

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 ativas dos produtos biotecnológicos. Os métodos por CLAE viabilizam a separação, identificação e avaliação de teor/potência das substâncias biológicas, e neste contexto, têm sido estudados como procedimentos alternativos. As instabilidades químicas e físicas das proteínas também têm sido investigadas por essas técnicas analíticas que, juntamente com os ensaios da atividade biológica e enzima-

imunoensaio (ELISA), possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, bem como avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos. Além disso, são importantes para viabilizar possíveis estudos de similaridade de macromoléculas biologicamente ativas (WANG, 1999; ICH 2005; WEISE et al., 2014).

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; FDA, 2015a). A avaliação de biomoléculas produzidas por expressão em sistemas celulares diversos, 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. Por sua vez, as especificações preconizadas para os produtos biológicos visam garantir a eficácia e segurança clínica (BRASIL, 2010; EMA, 2014). Observa-se que recentemente a monografia foi incluída na Farmacopeia Americana (USP 39, 2016).

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 insulina glargina em produtos biofarmacêuticos; b) desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular para avaliação de potência e determinação de dímeros e agregados; c) executar ensaio biológico por cultura de células MCF-7 *in vitro*; d) avaliar correlação entre os métodos cromatográficos e o bioensaio. 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.

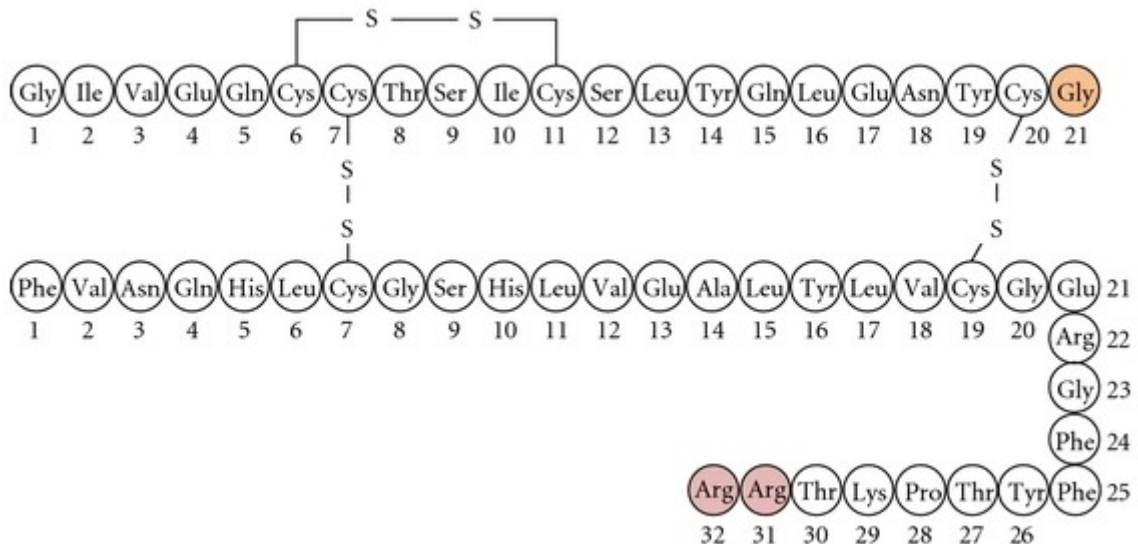
REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Diabetes mellitus é uma disfunção caracterizada por hiperglicemia resultante de deficiência relativa ou absoluta do hormônio insulina. Esta disfunção é tratada desde 1922 pela administração de insulinas com objetivo de controlar o nível glicêmico e assim diminuir os riscos de retinopatia, nefropatia, neuropatia e complicações cardiovasculares. As injeções de insulina de origem animal, incluindo a suína e bovina passaram a ser usadas no tratamento do diabetes, sendo posteriormente preparada a insulina humana a partir da biossíntese da bovina. No final da década de 1980, com os avanços da engenharia genética foi expressa a insulina humana recombinante que então passou a ser produzida e amplamente usada nas formulações biofarmacêuticas (REINHART e PANNING, 2002; OWENS et al., 2013).

A insulina glargina, produzida pela tecnologia do DNA recombinante é expressa em *E. coli*, apresenta massa molecular de 6.063 kDa, é composta por 53 aminoácidos subdivididos em duas cadeias, denominadas de cadeia A e B, com 21 e 32 aminoácidos, respectivamente. Difere da insulina humana pela substituição da aspargina na posição 21 por glicina, além da adição de dois resíduos de arginina C-terminais na cadeia B, que induz a mudança do seu ponto isoelétrico de pH 5,4 para 6,7, e permite a formação da insulina solúvel em meio de injeção levemente ácido (pH 4,0-5,0). Em pH fisiológico ocorre a produção de microprecipitados de insulina, com a finalidade de retardar a absorção e prolongar a duração da ação. A estrutura com as modificações em relação a insulina humana estão representadas na Figura 1 (CAMPBELL et al., 2001; MCKEAGE e GOA, 2001; LUIS e ROMERO, 2013).

Figura 1 – Estrutura primária da insulina glargina, destacando as diferenças em relação à humana.



Fonte: (CAMPBELL et al., 2001).

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a clonagem e expressão do gene da insulina em *Escherichia coli* (*E. coli*), com produção da insulina recombinante que foi usada nas preparações das formulações biofarmacêuticas de insulina, visando liberação constante, e efeito prolongado com efeitos imunológicos reduzidos. Entretanto, a variabilidade da absorção, início da ação e os picos obtidos de insulina dificultam o controle adequado da glicemia (VAJO et al., 2001; BHOPALE et al., 2005).

A insulina glargina foi o primeiro análogo de insulina de longa ação aprovada para uso clínico e recebeu a aprovação do US Food and Drug Administration (FDA) em junho de 2000 para o tratamento de diabetes melittus tipos I e II. No mesmo ano o medicamento foi aprovado também pela Agência Europeia de avaliação dos medicamentos (EMA) (VAJO et al., 2001; LUIS e ROMERO, 2013). No Brasil, através da Resolução N° 281, de 28 de março de 2001, a insulina glargina foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Deste modo encontra-se disponível no Brasil como produto biofarmacêutico denominado Lantus SoloStar® do laboratório Sanofi Aventis, sob a forma de solução injetável, contendo 100UI/mL. Pode ser administrada, diariamente, por injeção subcutânea em dose de 1UI a 80UI, atingindo a fase estacionária 2 – 4 dias após a primeira dose.

A insulina glargina atua no controle da glicemia basal semelhante ao hormônio endógeno, exercendo atividades regulatórias responsáveis pela manutenção dos níveis glicêmicos, tais como, estimula glicólise e glicogenese, inibe a glicogenólise, ativa a síntese de triacilgliceróis estimulando a produção de acetil-coenzima A (CoA) e a síntese de ácidos graxos a partir da acetil -CoA (MCKEAGE e GOA, 2001; HOME e ASHWELL, 2002).

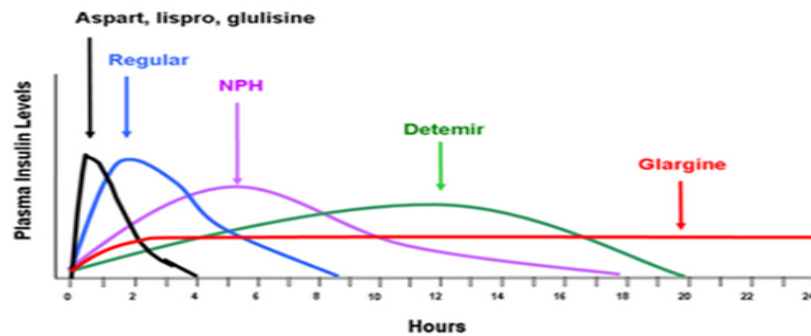
Após a injeção subcutânea, a solução ácida de glargina nas condições fisiológicas do organismo é neutralizada formando micro precipitados que são lentamente absorvidos. A insulina glargina, primeiramente, sofre remoção enzimática da cadeia B do par de bases arginina nas posições carboxílicas terminais 30B e 31B, para produzir seu principal metabólito, a insulina M1(21- A- Gli-insulina) equivalente a 97% da insulina circulante no plasma humano. Posteriormente, ocorre perda adicional da treonina formando o metabólito secundário M2 (21 -A- Gli- des30B-Treo- insulina). Estudos revelam que o metabólito M1 é o responsável pelo seu perfil de longa duração, bem como por sua concentração máxima no plasma de 129 pmol/L e de seu maior tempo de absorção. O metabólito M2 tem baixos níveis no organismo humano. Demonstrou-se que os metabólitos M1 e M2 produzidos no local da injeção e no plasma contribuem para a atividade sistêmica de longa duração com um perfil de ação sem picos de ação e duração superior a 24 horas (LEPORE et al., 2000; BOLLI et al., 2012; LUCIDI et al., 2012).

Os metabólitos juntamente com a insulina glargina atuam no receptor específico para insulina pertencente a família de receptores de fatores de crescimento, que têm atividade tirosina quinase intrínseca. Após a ligação o receptor sofre autofosforilação dos múltiplos resíduos de tirosina, que resulta na ativação da quinase do receptor. Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina induz fosforilação e interações proteína-proteína, para transmitir os sinais celulares, tais como, translocação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUT4) intracelulares para a membrana plasmática, ativação da síntese de glicogênio e de proteínas, e transcrição de genes específicos (HEINEMANN, 2002; LUCIDI et al., 2012).

A insulina glargina constituiu-se em avanço inovador por apresentar afinidade 5-8 vezes maior que a endógena, com o receptor da insulina IGF-1, e os seus metabólitos possuem afinidade ligeiramente menor. Os estudos também constataram que Lantus SoloStar® apresenta maior redução nos níveis de hemoglobina glicada (WITTAUS et al., 2001; LUZIO et al., 2006; VARDI et al., 2008).

Lepore e colaboradores (2000) realizaram estudos comparativos da farmacocinética e farmacodinâmica após injeção subcutânea dos análogos de longa duração, insulina glargina e NPH, bem como de insulinas humana ultra lentas, em pacientes com diabetes tipo I, conforme figura 2. O estudo demonstrou que a injeção subcutânea de insulina glargina não apresentou picos de ação, possui duração de 24 horas e assemelha-se a infusão contínua de Lispro, considerada padrão de referência e menor inter-variabilidade em relação à NPH. Assim, este estudo sugere que uma injeção subcutânea diária de insulina glargina satisfaz as necessidades de um paciente com diabetes tipo I.

Figura 2 – Estudo farmacocinético dos análogos da insulina humana em função do tempo, adaptada.



Fonte: (LEPORE et al., 2010).

Lucidi e colaboradores (2012) estudaram a metabolização *in vivo* em nove indivíduos diabéticos tipo II, após tratamento diário com injeção subcutânea de 0,4 unidades/kg de insulina glargina demonstrando nível constante de glicose plasmática de 101 mg/dL em todos os pacientes. O hormônio íntegro foi detectado em apenas cinco dos nove indivíduos e sua última concentração mensurável foi em 13 horas. O metabólito M1 foi detectado em todos os indivíduos até 31 horas após a injeção subcutânea e representou 97% da quantidade total da insulina circulante no organismo, e o M2 não foi detectado em nenhum dos indivíduos.

Porcellati e colaboradores (2014) realizaram estudo *in vivo* utilizando 10 pacientes tratados com insulina glargina para observar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico conforme os horários de injeção subcutânea. Não foi detectada alteração na ação, demonstrando um perfil farmacocinético estável independente do horário da administração. No entanto, quando o biofármaco foi administrado no turno da manhã o perfil farmacodinâmico mostrou maior atividade nas primeiras 12 horas, diferente da noite cuja

atividade foi maior no período 12-24 horas após a dosagem, apresentando maior eficácia na supressão da lipólise.

Ciaraldi e colaboradores (2001) avaliaram a atividade biológica e citotoxicidade da insulina glargina em células da musculatura esquelética humana isoladas e cultivadas de indivíduos diabéticos tipo II e saudáveis. Demonstraram respostas metabólicas equivalentes à insulina humana na afinidade com os receptores, sem aumento de efeitos mitogênicos e mesma sensibilidade, sugerindo então que a insulina glargina e a insulina humana atuam através do mesmo mecanismo de ação.

Wada e colaboradores (2008) estudaram a mitogenicidade e atividade das insulinas glargina, humana e detemir (também análoga de insulina humana com um perfil sem picos de ação) por cultura de células em adipócitos (3T3-L1), células do músculo esquelético (L6), hepatócitos, e células do músculo liso vascular (VSMC). Demonstraram que a insulina glargina apresenta propriedades equivalentes à humana, em todas as linhagens estudadas, enquanto que a insulina detemir possui atividade reduzida na comparação com as insulinas humana e glargina.

Weinstein e colaboradores (2009) investigaram a proliferação das linhagens celulares HCT-116 (câncer colorretal), PC-3 (câncer de próstata) e MCF-7 (adenocarcinoma) tratadas com insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, aspártico e insulina regular. A proliferação e proteção de apoptose celular foram determinadas por análise de fluorescência e contagem celular. As células foram coradas com azul de tripano e contadas a cada 24 h em citômetro de fluxo. Demonstraram proliferação celular induzida por todos biofármacos na linhagem celular HCT-116 após 96 horas. No entanto, nas linhagens PC-3 e MCF-7 houve proliferação após 72 horas com as insulinas detemir e glargina.

Shukla e colaboradores (2009) realizaram análise comparativa da proliferação celular da insulina regular e quatro análogos de insulina, atualmente aprovados para utilização terapêutica, além de caracterizar as vias de sinalização ativadas por estes fármacos em linhagens de células mamárias epiteliais. Demonstraram que entre as 7 linhagens celulares estudadas, as linhagens MCF10A e MCF-7 apresentaram maior proliferação celular. No entanto a insulina glargina demonstrou maior potência proliferativa na linhagem celular MCF-7, confirmando a afinidade pelo receptor IGF-1 presente em níveis elevados nesta linhagem.

Sommerfeld e colaboradores (2010) pesquisaram a atividade metabólica e mitogênica da insulina glargina e de seus metabolitos por cultura celular *in vitro*. As atividades de autofosforilação do receptor foram estudadas em células CHO e células MEF. A resposta metabólica foi demonstrada com a estimulação da síntese de lipídios utilizando

adipócitos primários de ratos. A atividade mitogênica foi avaliada, demonstrando que a insulina glargina possui maior estimulação da incorporação de timidina em células SaoS-2 em relação a humana. Em contraste, os metabolitos M1 e M2 foram significativamente menos ativos na ligação com o receptor IGF-1 e sua mitogenicidade expressa em células SaoS-2 foi equivalente à humana.

Teng e colaboradores (2011) investigaram a influência da insulina glargina e humana regular na proliferação de linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 cultivadas em meio RPMI - 1640, com coloração com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Demonstraram que a insulina glargina, ao contrário de insulina regular, possui significativa atividade anti-apoptótica e estimula a proliferação das células MCF-7.

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 reprodutível, com custo e duração de análise adequada (ZARRIN et al., 2006; STAMM et al., 2013). As técnicas por CL-FR e por CL-EM baseadas na hidrofobicidade e tamanho das moléculas, respectivamente, são frequentemente empregadas no controle de qualidade de proteínas. Possibilitam avaliar alterações físico-químicas e modificações pós-traducionais na estrutura, que incluem oxidação de resíduos de metionina, sulfatação, desamidação e agregação, que podem ocorrer devido a fatores como processo de produção, escolha do sistema de expressão, formulação e condições de armazenamento. As modificações podem reduzir a bioatividade do biofármaco e causar reações imunogênicas. (MANNING et al., 2010; LEAL et al., 2011; SOUTO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2014). Neste contexto, A Farmacopéia Americana (USP 39, 2016), introduziu métodos cromatográficos para a análise de insulina glargina. O tempo de corrida por cromatografia por fase reversa é de 40 minutos, e por exclusão molecular, 70 minutos.

Anand e colaboradores (2012) investigaram efeitos biológicos após a administração subcutânea de dose única de 10 UI/Kg de gel biodegradável com partículas de insulina glargina purificada, em ratos Zucker com diabetes tipo II. A pureza da insulina glargina foi confirmada por CL-FR que mostrou um único pico, correspondente a insulina glargina. O método utilizou duas colunas Altech Macrosphere, fase móvel A composta por ácido trifluoracético (TFA) 0,15% em água pura e fase móvel B ácido trifluoracético (TFA), 0,13%, acetonitrila 95% em água ultra pura, sob condições de gradiente e fluxo de 1 mL/min. Demonstraram redução da glicose sanguínea de 400 mg/dL para 100 mg/dL no período de 6 horas após a injeção, e se manteve durante 10 dias.

Li e colaboradores (2013) desenvolveram em modelo toxicocinético, método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para quantificar insulina glargina e seus metabólitos M1 e M2 em plasma de cachorros, após injeção de diferentes concentrações. Os resultados demonstraram que foi rapidamente metabolizada para M1(21- A- Gli-insulina), sugerindo que o metabólito é o principal responsável pelo perfil de longa ação. Observaram também que o metabólito M2 (21 -A- Gly- des30B-Treo- insulina) não pode ser detectado no organismo.

Lamalle e colaboradores (2015) desenvolveram método por eletroforese electrocinética micelar para determinar simultaneamente insulina humana e cinco análogos. Com um tempo de corrida de 15 minutos conseguiram separar os principais produtos de degradação e os excipientes presentes nas formulações. Demonstraram a seletividade em relação aos principais produtos de degradação, e o método poderia ser usado para estudos de estabilidade.

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005; FDA, 2015a; USP 39, 2016). Os principais parâmetros a serem avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. Desse modo, esses parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (SHABIR, 2003; SHABIR 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 biossimilaridade conforme preconizam os guias internacionais, com os avanços sucessivos na área de bioterapêuticos (CHMP, 2005; EMA, 2014). 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 (KRESSE, 2009; WEISE et al., 2014; EMA, 2015; FDA, 2015b).

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 – Vanessa Grigoletto Schramm, Maurício Elesbão Walter, Bruna Xavier, Franciele Santos da Silva, Fernanda Pavani Stamm Maldaner and Sérgio Luiz Dalmora. Validation Of The RP-LC and SE-LC Methods for the Content/Potency Assessment of Insulin Glargine And Correlation with Bioassay.

**VALIDATION OF THE RP-LC AND SE-LC METHODS FOR
THE CONTENT/POTENCY ASSESSMENT OF INSULIN
GLARGINE AND CORRELATION WITH BIOASSAY**

Vanessa Grigoletto Schramm^a; Maurício Elesbão Walter^a; Bruna
Xavier^b; Franciele Santos da Silva^a; Fernanda Pavani Stamm
Maldaner^a and Sérgio Luiz Dalmora^b

*^aPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, and ^bDepartment of Industrial Pharmacy, Federal
University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil*

*Corresponding author. Phone./Fax: +55 55 3220 8952

E-mail address: sdalmora@terra.com.br (S.L. Dalmora).

Abstract

A stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and size exclusion liquid chromatography (SE-LC) methods were validated to determine content/potency of insulin glargine in biotechnology-derived products. The RP-LC method was carried out on a Júpiter-C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 300 Å), maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of 0.05 M sodium sulphate buffer solution, pH 2.5, and acetonitrile, run isocratically at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹, and using a photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The SE-LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.), maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 0.03 M MES acid buffer, pH 2.5, run isocratically at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ and using a photodiode array (PDA) detection at 200 nm. Separation was obtained with retention times of 7.5 min, and 9.9 min, and was linear over the concentration range of 0.05 - 200 µg mL⁻¹ ($R^2 = 0.9998$) and 0.02 - 180 µg mL⁻¹ ($R^2 = 0.9999$), respectively, for RP-LC and SE-LC. Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.13% and 99.38%, with bias lower than 0.85% and 0.86% respectively. The methods were applied to the content assessment, demonstrating potential to improve the characterization and quality consistency of the products.

Keywords: Insulin Glargine; Reversed-phase liquid chromatography; Size Exclusion Liquid Chromatography; Biotechnology-product; Validation.

1. Introduction

Human insulin is a hormone secreted by Langerhan's β -cells of pancreas, regulating principally glucose metabolism. The insulin glargine is a long-acting recombinant insulin analogue produced in *Escherichia coli* by DNA technology. It is currently being used worldwide to treat diabetes mellitus, a chronic metabolic disorder characterized by hyperglycemia (VAJO et al., 2001; WILCOX, 2005; LUCIDI et al., 2012).

The structure of insulin glargine, consists of 2 linked polypeptide chains with 21 and 32 aminoacids, respectively for the A and B chains. It differs structurally from human insulin by the replacement of asparagine with glycine at position 21 of the A-chain and addition of two arginine groups to the carboxi terminus (position B-30) of the B-chain. These modifications led to a shift of the isoelectric point from pH 5.4 of human insulin to a near-neutral pH of 6.7, which makes insulin glargine molecule less soluble at a physiologic pH (CAMPBELL et al., 2001; REINHART e PANNING, 2002; SOMMERFELD et al., 2010).

Currently, biological assay has been used for the potency assessment of biotechnology-derived medicines. A cell culture assay based on human skeletal muscle cells was used to demonstrate that insulin glargine is equivalent to human insulin for metabolic responses and does not display augmented mitogenic effects (CIARALDI et al., 2001). Cell culture-based bioassays were developed using adipocytes, skeletal muscle cells, hepatocytes and vascular smooth muscle cells as target cells for insulin and were used showing comparable properties to human insulin in metabolic and mitogenic signaling and action (WADA et al., 2008). A cell proliferation assay based on the human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7) was used to investigated the effects and signaling pathways stimulated by insulin and analogs including glargine (SHUKLA et al., 2009; TENG et al., 2011).

Physicochemical techniques cannot predict the biological activity yet, but can produce information about structure and composition of biopharmaceutical proteins obtained

through recombinant DNA technology (SOUTO et al., 2014). A LC-MS/MS method with solid-phase extraction and C₁₈ column was validated for the quantitation of insulin glargine and its two metabolites in plasma samples over a concentration range of 0.2-20 ng/mL (LI et al., 2013). A LC-MS/MS was also applied to determine human insulin and its analogues in human blood with the limit of quantitation of 0.5 ng/mL (THOMAS et al., 2014). A micellar electrokinetic chromatography very fast method was developed using uncoated fused silica capillaries with 50 µm i.d. and 48.5 cm total length, BGE solution containing 50 mM ammonium acetate pH 9.0, 20 mM SDS and 13% ACN, and was applied for the analysis of six insulins formulation and the two major excipients of pharmaceutical formulations with the analysis time of 15 minutes (LAMELLE et al., 2015).

The aim of the present article was to develop and validate specific, sensitive and stability-indicating RP-LC and SE-LC methods for the content/potency assessment of insulin glargine in biopharmaceutical formulations; evaluate correlations with the proliferation bioassay in MCF-7 cell line; thus contributing to the study of alternative methods to monitor stability, improve quality control, and thereby assure the therapeutic efficacy of the biotechnology derived product.

2. Experimental

Chemicals and reagents

The Reference substance Insulin Glargine, human rDNA derived, Y0001542, was obtained from the European Directorate for the Quality of Medicine and HealthCare (Ph. Eur. CRS 15 mg/vial). Batches of Lantus[®] Sanofi Aventis (São Paulo, SP, Brazil) containing 100 IU/mL of insulin glargine was acquired from commercial sources within their shelf life period. Hydrogen peroxide (30%) in aqueous solution, acetonitrile, trifluoroacetic acid (TFA),

sodium sulphate anhydrous, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), meta-cresol, acetic acid and phosphoric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Fetal bovine serum, RPMI-1640 medium and thiazolyl blue formazan (MTT) were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was purified 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 mm Millex filter Millipore (Bedford, MA, USA).

Apparatus

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

Samples and standard solutions

Working standard and sample solutions of insulin glargine were prepared daily by diluting the insulin glargine standard and the samples of biopharmaceutical formulations in ultra-pure water to a final concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, for RP-LC and SE-LC; and to final concentrations between 50 and 200 nmol of insulin glargine in RPMI-1640 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) medium containing 2% (v/v) fetal bovine serum Sigma-Aldrich, for MCF-7 cell culture bioassay.

Procedures

Reversed-phase liquid chromatography method (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 particle size of 5 μm and pore size of 300 °Å) maintained at 30 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 0.05 M sodium sulphate buffer, pH 2.5, and acetonitrile (65:35, v/v), run isocratically at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Photodiode array (PDA) detection at 214 nm was used. The injection volume was 20 μL for both the reference substance and sample.

Size-exclusion liquid chromatography method (SE-LC)

The experiments were performed on a size-exclusion Phenomenex[®] (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm X 7.8 mm i.d.) maintained at 25 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 0.03 M MES acid, pH 2.5, run isocratically at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ with PDA detection at 200 nm. The injection volume was 20 μL for both the reference substance and sample.

MCF-7 cell culture bioassay

The bioassay was performed as described elsewhere and adjusted (TENG et al., 2011). The MCF-7 cells (breast cancer cells, ATCC number HTB-22) were maintained in culture medium RPMI-1640 containing 10% (v/v) fetal bovine serum, seeding at approximately 2.0 - 4.0 x 10⁶ cells mL⁻¹. The assay was performed in triplicate, the cells were seeded in 96-well cell culture plates BD Biosciences (San Jose, CA, USA) at a density 1.0 x 10⁴ cells mL⁻¹ (1.0 x 10³ cells per well) and dosed on seeding by using four concentrations with two fold dilution series of insulin glargine between 50 - 200 nmol. The Reference substance insulin glargine

was used as standard and the negative control was RPMI-1640 culture medium. Briefly, the plates were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 48 h. Then 20 µL of 5 mg mL⁻¹ MTT solution was added per well, and the plates were incubated for a further 4 h. Following the addition of 150 µL per well of dimethyl sulfoxide (DMSO) for a further 15 minutes, the absorbance was assessed at 570 nm, using a microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

Validation of LC methods

The methods were validated using samples of biopharmaceutical formulations of insulin glargine with a label claim of 100 UI/mL (3640 µg/mL) by determination of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, detection limit (DL), quantitation limit (QL), robustness, stability, and system suitability test, following the guidelines (ICH, 2005; FDA, 2015).

Specificity

The specificity of the RP-LC method was assessed by subjecting a standard solution and a sample of insulin glargine biopharmaceutical formulations (50 µg mL⁻¹), to oxidative conditions induced by adding 20 µL of 3% hydrogen peroxide for 25 min. Photodegradation was induced by exposing the samples in a photostability chamber to 200 W h m⁻² of near ultraviolet-light for 4 hours. For the SE-LC a sample solution at 45 µg mL⁻¹, was maintained at 80 °C for 2 hours and 30 minutes and shaken for 20 min. In addition, interference from excipients of the biopharmaceutical formulations was determined by injection of a sample

containing only placebo (in-house mixture of formulation excipients). Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity using PDA detector.

Linearity

The linearity of the RP-LC and SE-LC methods were determined by constructing three independent analytical curves, each one with nine concentrations of the insulin glargine, over the $0.05 - 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.02 - 180 \mu\text{g mL}^{-1}$ range, respectively. Three replicates $20 \mu\text{L}$ 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 insulin glargine 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.

Precision and accuracy

Assay precision was determined by means of repeatability (intra-day) and intermediate precision. Repeatability was examined by eight evaluations of sample of insulin glargine, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by analysis of two samples of the biopharmaceutical formulations on three different days (inter-days) and also by submitting the samples to analysis by other analysts in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was assessed applying the proposed methods 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 $60 \mu\text{g mL}^{-1}$, and $36, 45$ and $54 \mu\text{g mL}^{-1}$ for RP-LC and SE-LC, respectively, equivalent to $80, 100$ and

120% of the nominal analytical concentration, respectively. Accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation; it was expressed as the percentage relative error (bias%) between the measured mean concentrations and the added concentrations.

Limits of detection and quantitation

The detection limit (DL) and the quantitation limit (QL) were calculated, as defined by ICH, by using the mean values of three independent analytical curves determined by a linear-regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio of the standard deviation of the intercept and the slope. The QL was also evaluated in an experimental assay.

Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters; it provides an indication of its reliability for routine analysis. The robustness of the RP-LC and SE-LC methods were determined by analyzing the same samples containing $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $45 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, under a variety of conditions of the method parameters, such as: mobile phase concentration, mobile phase pH, flow rate, column temperature and the wavelength. To assess the stability of the insulin glargine samples, analysis were performed after their storage at $2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h and 48 h, and also placed into the auto sampler, at room temperature, for 24 h. To study the stability of these solutions the experiment was run and any changes in the chromatographic pattern as compared with the freshly prepared solutions were noted.

System suitability test

A system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and repeatability of the RP-LC and SE-LC system. Five replicate injections of insulin glargine $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $45 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, were used. The peak area, retention time, theoretical plates, and tailing factor (peak symmetry) were measured using the LC Solution Version 1.22 SP1 software.

3. Results and discussion

Optimization of chromatographic conditions

Tests on different amounts of 0.05 M sodium sulphate buffer solution, acetonitrile, acetic acid, phosphoric acid and TFA-acetonitrile solution mixed with water were carried out to determine which mobile phase would lead to satisfactory selectivity and sensitivity within a short separation time. Next, evaluation of C_{18} and C_4 columns with lengths of 150, 250 and 300 mm and different pore sizes showed that the Jupiter- C_4 column (250 mm x 4.6 mm i.d.) and BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.) provide shorter retention times, for RP-LC and SE-LC, respectively. For the selection of the best wavelength detection a PDA detector was used. The optimized conditions of the LC methods were validated for the analysis of insulin glargine in biopharmaceutical formulations.

Typical chromatograms obtained by the proposed methods, demonstrating the resolution of the symmetrical peak, corresponding to insulin glargine, with retention time of 7.5 min for RP-LC and 9.9 min for SE-LC, are shown in Fig 1(a,b) and Fig 2 (a,b), respectively.

Methods validation

Specificity

Specificity of the RP-LC method for the biological product was evaluated under oxidative conditions generating the main peak at 7.5 min, and additional peaks of related proteins with retention times at 5.2 min and 6.1 min, as shown in Fig. 1 (c). Photodegradation generating the main peak at 7.5 min, and additional peaks of related proteins with retention times at 5.4 min and 6.6, as shown in the typical chromatogram in Fig. 1 (d). Specificity of the SE-LC method was evaluated by subjecting the degraded samples to the analysis generating the peak of the monomer at 9.9 min, and additional peaks of aggregates and dimmers with retention times at 6.3 min and 7.1 min, respectively, as shown in the typical chromatogram in Fig. 2 (c). Moreover, injection of a sample containing only a placebo, showed a peak of meta-cresol Fig. 1 (e) and Fig. 2 (d). Then the specificity of the methods was established by determining the peak purity in the samples using a PDA detector.

Linearity

For the RP-LC method, the analytical curves constructed for insulin glargine were found to be linear over the range of 0.05–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The value of the determination coefficient was calculated ($R^2 = 0.9998$), $y = (35232.00 \pm 3.85)x - (27382.70 \pm 190.04)$, where, x is the concentration and y is the peak absolute area, indicated the linearity of the analytical curve for the method. Equally, for the SE-LC method, the analytical curves were found to be linear over the range of 0.02–180 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The value of the determination coefficient calculated ($R^2 = 0.9999$), $y = (152865.27 \pm 210.19)x - (28684.10 \pm 415.01)$, indicated the linearity of the analytical curve for the method. The experimental values were

compared statistically by analysis of variance (ANOVA), which showed significant correlation ($p > 0.05$).

Precision

The precision was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) for eight analyses at a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ for RP-LC and $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ for SE-LC performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD values were 0.58% and 0.64%, respectively. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-days), giving RSD values for the content/potencies of 0.72% and 0.98%, respectively for the RP-LC and 0.60% and 1.32%, for the SE-LC methods. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD after analysis of two samples of the same pharmaceutical formulations by two analysts; the values were found to be 1.14% and 0.97%, respectively, for the RP-LC and 0.82% and 1.06% for SE-LC methods.

Accuracy

The accuracy of the RP-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 40, 50 and $60 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. In addition, the accuracy of the SE-LC method was assessed from three solutions containing 36, 45 and $54 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The absolute means were obtained with a mean value of 100.13% and 99.38% and a bias lower than 0.85% and 0.86% (Table 1) respectively, show that the method are accurate within the desired ranges.

Limits of detection and quantitation

The DL and QL were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression line, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 0.018 and 0.054 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for the RP-LC and 0.009 and 0.027 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for the SE-LC, respectively.

Robustness

The robustness of the analytical procedure (DEJAEGHER e HEYDEN, 2007) was determined by analyzing samples of the standard of insulin glargine reference solution containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the RP-LC method and 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the SE-LC method in triplicate by the one-variable-at-a-time (OVAT) approach. The results and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 2 and Table 3, together with the optimized values. Additionally, the robustness was also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach (INJAC et al., 2008) at three levels (1 unit per parameter up or down around optimized values). This procedure gives results for minimum changing of the maximum number of parameters at a time, and is a very useful, rapid and efficient approach for a robustness determination. The results for the OVAT and MVAT procedures were within the acceptable deviation ($\text{RSD} < 2\%$), and an analysis of the variance showed non-significant differences ($p > 0.05$). The analysis performed with a wider level of variations of the solution pH, mobile phase percentage and flow rate showed changes of the retention time related to the optimized conditions. Moreover, the peak symmetry values were also evaluated, showing non-significant differences ($p > 0.05$). The stability of reference and sample solutions was assessed showing non-significant changes ($< 2\%$) of the main peak relative to freshly prepared samples. The system suitability test was performed and RSD

values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.78, 0.86 and 0.91%, respectively for the RP-LC method, and 0.69, 0.73 and 0.98%, for the SE-LC method. The number of theoretical plates was about 26562, with RSD of 1.26% and 52118, with RSD of 0.62% respectively. The experimental results showed that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the system is suitable for the intended analysis.

MCF-7 cell culture bioassay

The potency of insulin glargine was assessed by the MCF-7 cell proliferation bioassay based on the dose-dependent growth curve of the cells, evaluating the response with MTT. The statistical analysis of the assay was performed by a parallel line method, using CombiStats[®]. Biological activity of biopharmaceutical products was assessed by the MCF-7 cell bioassay, which showed mean values 99.08%, and RSD 0.51%, as shown in Table 4, with non-significant difference, as calculated by the ANOVA ($p > 0.05$).

Method Application

The validated methods were applied for the determination of insulin glargine in biopharmaceutical formulations, giving contents/potencies within 97.94 and 99.53% of the stated potency for the RP-LC and 97.98 and 99.76% for the SE-LC, as shown in Table 4, with mean values giving mean differences of the estimated content/potencies of 0.21% and 0.16% lower, compared to the *in vitro* cell culture assay, respectively, as shown in Table 4. The experimental values were compared statistically by analysis of variance (ANOVA), which showed significant correlation ($p > 0.05$). Thus, the agreement between the results of the

bioassay and the RP-LC method may represent an improvement in attempts to develop alternative assays to evaluate the profiles and the consistency of batches in clinical use.

4. Conclusion

The results of the validation studies show that the RP-LC and SE-LC methods are specific, accurate, and sensitive with a QL of $0.054 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.027 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The methods were successfully used for the analysis of biopharmaceutical formulations, showing a lower mean difference of the estimated content/potencies of 0.21% and 0.16% for the RP-LC and SE-LC related to the *in vitro* cell culture bioassay, respectively, with significant correlation, as calculated by ANOVA ($p > 0.05$). The LC methods represent an improvement to current methods which can be applied in combination with the *in vitro* MCF-7 cell culture bioassay, to the characterization of insulin glargine 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 477013/2011 and 306898/2011, for financial support.

References

CAMPBELL, R. K.; WHITE, J. R.; LEVIEN, T.; BAKER, D. Insulin glargine. **Clinical Therapeutics**, v. 23, p.1938–1957, 2001.

CIARALDI, T. P.; CARTER, L.; SEIPKE, G.; MUDALIAR, S.; HENRY, R. R. Effects of the Long-Acting Insulin Analog Insulin Glargine on Cultured Human Skeletal Muscle Cells: Comparisons to Insulin and IGF-I. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 5838 – 5847, 2001.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 138-157, 2007.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics**, July 2015.

ICH – Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology, ICH Steering Committee, 2005, pp. 1–13.

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, p. 150-161, 2008.

LAMALLE, C.; SERVAIS, A.; RADERMECKER, R. P.; CROMMEM, J.; FILLET, M. Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 344-450, 2015.

LI, Y.; KE, Y.; LI, J.; LI, Y.; LI, R.; CHEN, X.; MOLLAH, S.; WANG, X. Quantitation of insulin analogue glargine and its two metabolites M1 and M2 on triple quad 6500 and triple

TOF 5600 LC-MS/MS systems in a dog toxicokinetics study. **Analytical e Bioanalytical**, p. 1-8, 2013

LUCIDI, P.; PORCELLATI, F.; ROSSETTI, P.; CANDELORO, P.; ANDREOLI, A.M.; CIOLI, P.; HAHN, A.; SHIMIDT, R.; BOLLI, G. B.; FANELLI, C.G. Metabolism of Insulin Glargine After Repeated Daily Subcutaneous Injections in Subjects With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 35, p. 2647 – 2649, 2012.

REINHART, L.; PANNING, C. A. Insulin glargine: A new long-acting insulin product. **American Society of Health-System Pharmacists**, v. 59, p. 643 – 649, 2002.

SHUKLA. A.; GRISOUARD. J.; EHEMANN. V.; HERMANI. A.; ENZMANN.H.; MAYER.D. Analysis of signaling pathways related to cell proliferation stimulated by insulin analogs in human mammary epithelial cell lines. **Endocrine-Related Cancer**, v.16, p. 429 – 441, 2009.

SOMMERFELD, R. M.; MULLER, G.; TSCHANK, G.; SEIPKE, G.; HABERMANN, P.; KURRLE, R.; TENNAGELS, N. In vitro metabolic and mitogenic signaling og insulin glargine and its metabolites. **PLoS one**, v. 5, p. 1-9, 2010.

SOUTO, R. B.; STAMM, F. P.; SCHUMACHER, J. B.; CARDOSO, C. D. A.; FREITAS, G. W.; PEROBELLI, R. F.; DALMORA, S. L. Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with reversed-phase liquid chromatography and biossay. **Talanta**, v. 123, p. 179-185, 2014.

TENG, J. A.; HOU, R. L.; LI, D. L.; YANG, R. P.; QIN, J. Glargine Promotes Proliferation of Breast Adenocarcinoma Cell Line MCF-7 via AKT Activation. **Hormone and Metabolic Research**, v. 43, p. 519-523, 2011.

THOMAS, A.; SCHÄNZER,W.; THEVIS, M. Determination of human insulin and its analogues in human blood using liquid chromatography coupled to ion mobility mass spectrometry (LC-IM-MS). **Drug Testing and Analysis**, v.32, p. 1125 – 1132, 2014.

VAJO, Z.; FAWCETT, J.; DUCKWORTH, W. C. Recombinant DNA Technology in the Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 706 – 717, 2001.

WADA, T.; AZEGAMI, M.; SUGIYAMA, M.; TSUNEKI, H.; SASAOKA, T. Characteristics of signalling properties mediated by long-acting insulin analogue glargine and detemir in target cells of insulin. **Diabetes Research and Clinical Practice**, p. 269 – 277, 2008.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The clinical biochemist reviews**, v. 26, p. 21-39, 2005

Table 1 - Accuracy of RP-LC and SE-LC for insulin glargine in the formulations

Method	Nominal concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mean concentration measured ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
RP-LC	40	39.97	1.82	99.94	0.08
	50	49.79	0.90	99.59	0.42
	60	60.51	1.88	100.86	0.85
SE-LC	36	35.69	1.23	99.14	0.86
	45	44.66	0.41	99.25	0.76
	54	53.86	0.73	99.74	0.26

^a Mean of three replicates. ^b RSD = Relative standard deviation. ^c Bias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

Table 2 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure RP-LC method

Variable	Range investigated	Insulin glargine (%)	RSD ^a (%)	Optimized value
Mobile phase pH	2.2	98.35	1.56	2.5
	2.5	99.51	0.31	
	2.8	97.66	1.65	
Sulphate sodium concentration (M)	0.03	99.03	1.04	0.05
	0.05	99.38	0.54	
	0.07	98.97	1.60	
Column temperature (°C)	25	98.77	0.70	30
	30	99.93	0.42	
	35	97.12	0.86	
Solution stability	Autosampler 24h	98.49	1.02	-
	2-8 °C 24 h	98.67	0.48	-
	2-8 °C 48 h	97.12	0.70	-
Wavelength (nm)	210-320	-	-	214

^a RSD = Relative standard deviation.

Table 3 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure SE-LC method

Variable	Range investigated	Insulin glargine (%)	RSD ^a (%)	Optimized value
Mobile phase pH	2.2	100.15	0.62	2.5
	2.5	99.76	0.19	
	2.8	98.12	1.41	
MES acid concentration (M)	0.02	99.41	1.16	0.03
	0.03	99.48	0.46	
	0.04	99.86	0.67	
Flow rate (mL min ⁻¹)	0.4	98.73	0.57	0.6
	0.6	99.51	0.32	
	0.8	98.88	1.01	
Solution stability	Autosampler 24 h	98.37	0.38	-
	2-8 °C 24 h	100.71	0.70	-
	2-8 °C 48 h	99.28	0.82	-
Wavelength (nm)	200-320	-	-	200

^a RSD = Relative standard deviation.

Table 4 - Comparative content/potencies evaluation of insulin glargine in biopharmaceutical formulations, by the RP-LC and SE-LC methods, and MCF-7 cell bioassay

Sample	Theoretical Amount	RP-LC ^a		SE-LC ^a		MCF-7 bioassay ^a	
		Main peak	Deamidated/ sulphoxides	Monomer	Aggregates/ dimer	Potency	Confidence intervals
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(P=0.95)
1	100	99.19	0.39	99.76	0.07	98.97	95.65 - 102.34
2	100	99.43	0.74	98.59	0.13	99.35	96.75 - 101.84
3	100	98.18	0.81	99.02	0.12	98.76	94.33 - 103.15
4	100	97.94	0.73	98.26	0.28	99.03	94.92 - 102.82
5	100	99.53	0.57	99.57	0.26	99.05	95.76 - 105.03
6	100	98.54	0.49	97.98	0.19	98.15	93.95 - 102.15
7	100	99.12	0.51	99.41	0.38	99.83	96.18 - 103.84
8	100	99.04	0.36	98.75	0.19	99.45	97.25 - 105.43
Mean	-	98.87	0.58	98.92	0.20	99.08	-
SD ^b	-	0.58	0.17	0.64	0.10	0.51	-

^a Mean of three replicates. ^b SD, standard deviation.

Figure Captions

Figure 1. Representative RP-LC chromatograms showing: Peak 1= insulin glargine; peak 2 = meta-cresol; peak 3 = deamidated; peak 4 = sulphoxides. (a) Reference substance insulin glargine; (b) sample of biopharmaceutical formulation, and (c) after degradation by hydrogen peroxide; (d) after photodegradation; (e) placebo.

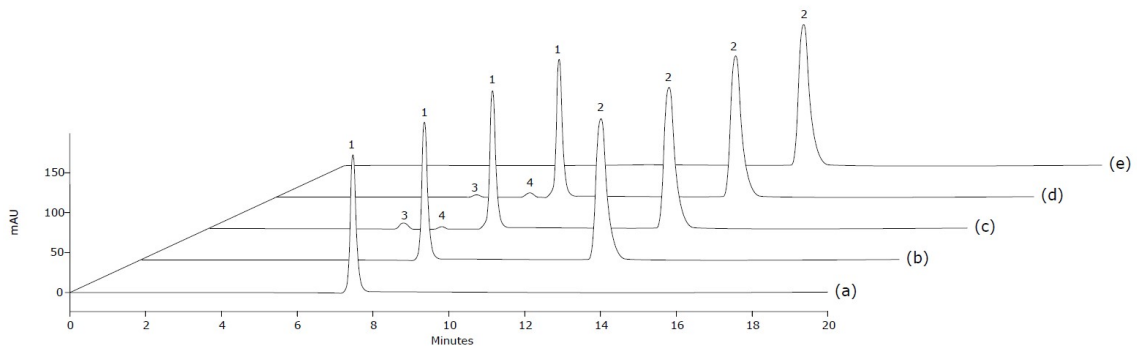
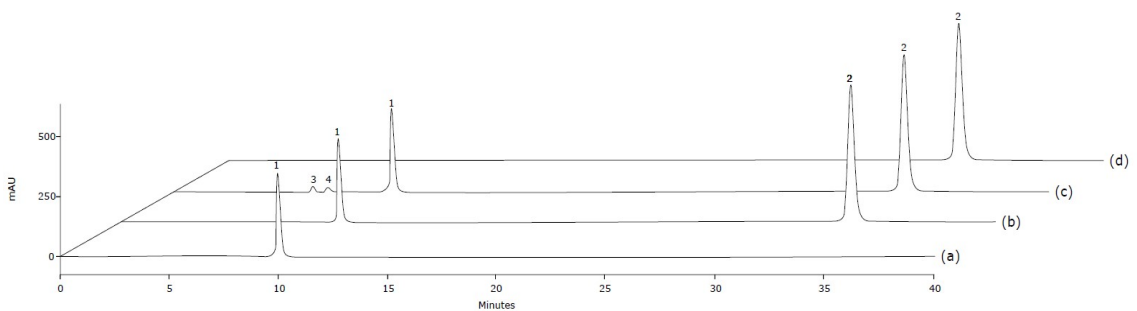


Figure 2. Representative SE-LC chromatograms showing: Peak 1 = insulin glargine; peak 2 = meta-cresol; peak 3 = aggregate; peak 4 = dimmer. (a) Reference substance insulin glargine; (b) sample of biopharmaceutical formulation, and (c) after thermal degradation for 2 h and 30 min at 80 °C and shaken for 20 min; (d) placebo.



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A tecnologia do DNA recombinante viabilizou a produção de proteínas de interesse terapêutico, tais como as insulinas humana e glargina. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a avaliação da identidade, pureza, potência e estabilidade, fundamenta-se na combinação de técnicas biológicas, físico-químicas e imunológicas, necessárias para a completa caracterização do biofármaco 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 insulina glargina, a potência biológica foi determinada por bioensaio *in vitro*, baseado na avaliação da atividade proliferativa na linhagem de células MCF-7 (TENG et al., 2011).

Os métodos cromatográficos têm sido usados para diferentes produtos biológicos 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 procedimentos por cromatografia líquida em fase reversa e por exclusão molecular para a determinação de teor/potência de insulina glargina, suas proteínas relacionadas e formas de alta massa molecular em produtos biofarmacêuticos.

A discussão apresentada a seguir está baseada no **ARTIGO 3.1**.

Avaliou-se a atividade biológica de insulina glargina pelo bioensaio *in vitro* baseado na proliferação da linhagem celular MCF-7, e as amostras apresentaram média de potências de 99,08%, em relação ao teor declarado, correspondente a 3606 µg/ampola de insulina glargina, conforme demonstra a tabela 4.

A separação por CL-FR foi alcançada com tempo de retenção de 7,5 min (figura 1). Os picos adicionais, relativos aos sulfóxidos e desamidados produzidos sob condições oxidativas e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, com a pureza do pico da insulina glargina demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método por CL-FR apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 0,05 a 200 µg/mL ($R^2 = 0,9998$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV inferiores a 1,14%, o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza $CV \leq 2\%$ (SHABIR, 2003). Na tabela 1 podem ser observados os valores experimentais obtidos, com média de 100,13%, confirmando exatidão significativa ($p < 0,05$). As potências obtidas nas análises não

apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, de acordo com a tabela 2. Conforme descrito em publicações, um inconveniente do método por CL-FR 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 (DALMORA et al., 1997). Porém viabiliza a determinação de sulfóxidos e desamidados que é necessária devido às possíveis respostas imunogênicas que podem causar no organismo humano (GROOT e SCOTT, 2007; EMA, 2014).

A separação por CL-EM foi obtida com tempo de retenção de 9,9 min (figura 2). A geração de picos adicionais, relativos aos dímeros e agregados, realizada sob aquecimento e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, com pureza do pico de insulina glargina demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método por CL-EM apresentou regressão linear significativa na faixa de 0,02 a 180 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9999$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária para forneceram CV inferiores a 1,32%, o que mostra a precisão do método. Na tabela 1 podem ser observados os valores experimentais obtidos, com média de 99,38%, 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 dos métodos 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 39, 2016; FDA, 2015a).

Demonstrou-se, portanto, que os métodos propostos cumprem os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregados para análise de insulina glargina em produtos biofarmacêuticos. Estudou-se então, a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e o bioensaio de cultura de células MCF-7 com as amostras selecionadas, conforme demonstra a tabelas 4. Observou-se que o teor/potência por CL-FR e por CL-EM foram em média 0,21% e 0,16% inferiores, em relação ao bioensaio em células MCF-7, respectivamente, com diferença não significativa, conforme calculado por ANOVA ($p > 0,05$).

Determinaram-se também, os sulfóxidos e desamidados nas amostras analisadas por CL-FR e os dímeros e agregados nas amostras analisadas por CL-EM, 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 0,81% para

sulfóxidos e desamidados e 0,38% para dímeros e agregados. Observa-se que são preconizados limites máximos de 2% para os desamidados/sulfóxidos e de 0,3% para os compostos de alta massa molecular nas amostras dos produtos biotecnológicos (USP 39, 2016).

Recentemente a monografia da insulina glargina foi incluída na última edição da Farmacopeia Americana (USP 39, 2016). Porém os métodos estudados demonstram os parâmetros de validação, as aplicações para análise de estabilidade e vantagens em relação aos tempos de separação e consumo de solventes. Em conformidade com as recomendações atuais, sugere-se que os métodos por CL-FR e CL-EM sejam adotados em combinação com o bioensaio em células MCF-7 para a avaliação de potência e pureza da insulina glargina durante as etapas do processo de expressão e purificação para monitorar variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica, e para o controle da qualidade do produto biofarmacêutico acabado.

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 insulina glargina, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação, avaliação de sulfóxidos e desamidados e da forma não-alterada.

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular específico, preciso, exato e robusto para avaliação da insulina glargina, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação, avaliação de dímeros, agregados e monômero.

- ✓ Estudou-se a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e o bioensaio por cultura de células MCF-7 com as amostras selecionadas. Observou-se que os teores/potências por CL-FR e por CL-EM foram em média 0,21% e 0,16% inferiores, em relação ao bioensaio em células MCF-7, respectivamente.

- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho podem ser aplicados para o controle da qualidade, contribuindo para aprimorar a avaliação de identidade, pureza, teor/potência e estabilidade dos produtos biotecnológicos de uso terapêutico. Além disso, estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, de comparabilidade de biomoléculas disponíveis e sob pesquisa no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, B. E.; DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J. E.; DALMORA, S. L.; TORJESSEN, P. A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. **Analytical Methods**, v. 6, p. 6688-6694, 2014.

ANAND, O.; ALMOAZEN, H.; MEHROTRA, N.; JOHNSON, J.; SHUKLA, A.; Controlled Release of Modified Insulin Glargine from Novel Biodegradable Injectable Gels. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.13, p. 313-322, 2012

BHOPALE, G. M.; NANDA, R. K. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. **Current Science**, v. 89, p. 614 – 622, 2005.

BOLLI, G. B.; HAHN, A. D.; SCHMIDT R.; EISENBLAETTER, T.; DAHMEN, R.; HEISE, T.; BECKER, R. H. A. Plasma Exposure to Insulin Glargine and Its Metabolites M1 and M2 After Subcutaneous Injection of Therapeutic and Supratherapeutic Doses of Glargine in Subjects With Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, V. 35, p. 2626-2630, 2012.

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.

CAMPBELL, R. K.; WHITE, J. R.; LEVIEN T.; BAKER, D. Insulin Glargine. **Clinical Therapeutics**, v. 23, p. 1938-1957, 2001.

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.

CIARALDI, T. P.; CARTER, L.; SEIPKE, G.; MUDALIAR, S.; HENRY, R. R. Effects of the Long-Acting Insulin Analog Insulin Glargine on Cultured Human Skeletal Muscle Cells: Comparisons to Insulin and IGF-I. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 5838 – 5847, 2001.

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.

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 (revision 1)**”. London, 2014.

EMA – European Medicines Agency. “**Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues**”. London, July 2015.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics**, July 2015a.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Quality Consideration in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product**, April 2015b.

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

HEINEMANN, L. Variability of Insulin Absorption and Insulin Action. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 4, p. 673 – 682, 2002.

HOME, P. D.; ASHWELL, S. G. An overview of insulin glargine. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 18, p. 57 – 63, 2002.

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.

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

LAMALLE, C.; SERVAIS, A.; RADERMECKER, R. P.; CROMMEN, J.; FILLET, M. Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 344-350, 2015.

LEAL, D. P.; SOUTO, R. B.; SCHUTKOSKI, R.; BERGAMO, A. C.; DALMORA, S. L. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: Evaluation of biopharmaceutical formulations by stability-indicating RP-LC method and bioassay. **Biologicals**, v. 39, p. 211-216, 2011.

LEPORE, M.; PAMPANELLI, S.; FANELLI, C.; PORCELLATI, F.; BARTOCCI, L.; VICENZO, A.; CORDONI, C.; COSTA, E.; BRUNETTI, P.; BOLLI, G. B. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Subcutaneous Injection of Long-Acting Human Insulin Analog Glargine, NPH Insulin, and Ultralente Human Insulin and Continuous Subcutaneous Infusion of Insulin Lispro. **Diabetes**, v. 49, p. 2142-2148, 2000.

LI, Y. X.; KE, Y.; LI, J.; LI, R.; CHEN, X.; MOLLAH, S.; WANG, X. Quantitation of Insulin Analogue Glargine and Its Two Metabolites M1 and M2 on Triple Quad 6500 and Triple TOF 5600 LC-MS/MS Systems in a Dog Toxicokinetics Study. **Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques**, p. 1-8, 2013.

LUCIDI, P.; PORCELLATI, F.; ROSSETTI, O.; CANDELORO, P.; ANDREOLI, A. M.; CIOLI, P.; HAHN, A.; SCHMIDT, R.; BOLLI, G. B.; FANELLI, C. G. Metabolism of Insulin Glargine After Repeated Daily Subcutaneous Injections in Subjects With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 35, p. 2647 – 2649, 2012.

LUIS, D. A.; ROMERO, E. Análogos de insulina: modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. **Semergen**, v. 39, p. 34-40, 2013.

LUZIO, S.; DUNSEATH, G.; PETER, R.; PAUVADAY, V.; OWENS, D. R. Comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of biphasic insulin aspart and insulin glargine in people with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 49, p. 1163 – 1168, 2006.

MANNING, M. C.; CHOU, D. K.; MURPHY, B. M.; PAYNE, R. W.; KATAYAMA, D. S. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 544-575, 2010.

MCKEAGE, K.; GOA, K. L. Spotlight on Insulin Glargine in Type 1 and 2 Diabetes Mellitus. **Drugs**, v. 61, p. 1599 – 1624, 2001.

OWENS, D. R.; MATFIN, G.; MONNIER, L. Basal insulin analogues in the management of diabetes mellitus: what progress have we made? **Diabetes Metabolism Research And Reviews**, v. 30, p. 104-119, 2013.

PORCELLATI, F.; LUCIDI, P.; CIOLI, P.; CANDELORO, P.; ANDREOLI, A. M.; MARZOTTI, S.; AMBROGI, M.; BOLLI, G. B.; FANELLI, C. G. Pharmacokinetics and

Pharmacodynamics of Insulin Glargine Given Evening as Compared With Morning in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v. 38, p. 203-212, 2014.

REINHART, L.; PANNING, C. A. Insulin glargine: A new long-acting insulin product. *American Society of Health-System Pharmacists*, v. 59, p. 643 – 649, 2002.

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.

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.

SHUKLA, A.; GRISOUARD, J.; EHEMANN, V.; HERMANI, A.; ENZMANN, H.; MAYER, D. Analysis of signaling pathways related to cell proliferation stimulated by insulin analogs in human mammary epithelial cell line. *Endocrine-Related Cancer*, v. 16, p. 429-441, 2009.

SOMMERFELD, M. R.; MÜLLER, G.; TSCHANK, G.; SEIPKE, G.; HABERMANN, P.; KURRLE, R.; TENNAGELS, N. In Vitro Metabolic and Mitogenic Signaling of Insulin Glargine and Its Metabolites. *PLoS one*, v. 5, p. 1-9, 2010.

SOUTO, R. B. **Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida em fase reversa para avaliação de interleucina-11 humana recombinante. Correlação com o bioensaio.** 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SOUTO, R. B.; STAMM, F. P.; SCHUMACHER, J. B.; CARDOSO, C. D. A.; FREITAS, G. W.; PEROBELLI, R. F.; DALMORA, S. L. Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with reversed-phase liquid chromatography and bioassay. *Talanta*, v. 123, p. 179-185, 2014.

STAMM, F. P.; CALEGARI, G. Z.; FREITAS, G. W.; SOUTO, R. B.; PORTO, L. P.; CARDOSO, C. D. A.; DALMORA, S. L. Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays. **Analyst**, v. 138, p. 1419-1426, 2013.

TENG, J. A.; HOU, R. L.; LI, D. L.; YANG, R. P.; QIN, J. Glargine Promotes Proliferation of Breast Adenocarcinoma Cell Line MCF-7 via AKT Activation. **Hormone and Metabolic Research**, v. 43, p. 519-523, 2011.

THE UNITED States Pharmacopeia. 39. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2016.

VAJO, Z.; FAWCETT, J.; DUCKWORTH, W. C. Recombinant DNA Technology in the Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 706 – 717, 2001.

VARDI, M.; JACOBSON, E.; NINI, A.; BITTERMAN, H. Intermediate acting versus long acting insulin for type 1 diabetes mellitus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2008.

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

WADA, T.; AZEGAMI, M.; SUGIYAMA, M.; TSUNEKI, H.; SASAOKA, T. Characteristics of signalling properties mediated by long-acting insulin analogue glargine and detemir in target cells of insulin. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 81, p. 269 – 277, 2008.

WEINSTEIN, D.; SIMON, M.; YEHEZKEL, E.; LARON, Z.; WERNER, H. Insulin Analogues display IGF-I-like mitogenic and anti-apoptotic activities in cultured cancer cells. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 25, p. 41-49, 2009.

WEISE, M.; KURKI, P.; WOLFF-HOLZ, E.; BIELSKY, M-C.; SCHNEIDER, C. K. biosimilares: The science of extrapolation. **Blood**, v.124, n.22, p. 3191-3196, 2014.

WITTHAUS, E.; STEWART, J.; BRADLEY, C. Treatment satisfaction and psychological well-being with insulin glargine compared with NPH in patients with Type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 18, p. 619 – 625, 2001.

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.