

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

Fernanda Pavani Stamm Maldaner

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE
HUMANO RECOMBINANTE POR BIOENSAIO, MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICO**

Santa Maria, RS

2017

Fernanda Pavani Stamm Maldaner

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE HUMANO
RECOMBINANTE POR BIOENSAIO, MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E
ELETROFORÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Maldaner, Fernanda Pavani Stamm

Avaliação da potência do hormônio da paratireóide humano recombinante por bioensaio, métodos cromatográficos e eletroforético / Fernanda Pavani Stamm Maldaner.- 2017.

90 f.; 30 cm

Orientador: Sérgio Luiz Dalmora

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. Hormônio da paratireóide humano recombinante 2. Eletroforese capilar de zona 3. Cromatografia líquida por exclusão molecular 4. Cromatografia líquida em fase reversa. Bioensaio 5. Linhagem celular UMR-106. Validação I. Dalmora, Sérgio Luiz II. Título.

Fernanda Pavani Stamm Maldaner

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE HUMANO
RECOMBINANTE POR BIOENSAIO, MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E
ELETROFORÉTICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 24 de maio de 2017:



Sérgio Luiz Dalmora, Dr. (UFSM)

(Presidente/Orientador)



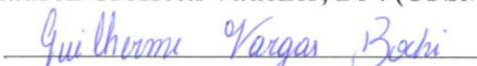
Maximiliano da Silva Sangoi, Dr. (UFRJ)



Lucélia Magalhães da Silva, Dr^a. (IFPR-Campus Palmas)



Lauren Crossetti Vaucher, Dr^a. (UFSM)



Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Miriam Elizabeth e José Jarbas, e ao meu esposo, Ivan Carlos, com carinho,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

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

- ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, amizade, confiança, orientação e revisão crítica durante a minha formação acadêmica, dedicados desde a iniciação científica até a conclusão do doutorado;

- aos meus pais, José Jarbas e Miriam Elizabeth, pela educação, amor, carinho, incentivo e por terem sido minha base e me ensinado valores que levo de suporte para a vida;

- ao meu esposo, Ivan Carlos, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão, incentivo e apoio incondicional;

- à minha família e amigos pela parceria, compreensão e altruísmo;

- aos colegas e bolsistas do CTEFAR e CEBIFAR pelo apoio, auxílio e amizade;

- aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial pelos ensinamentos, auxílio e incentivo;

- à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

- à FAPERGS e FATEC, pelo apoio financeiro;

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

"Tudo é possível àquele que crê."

(Marcos 9:23)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE HUMANO RECOMBINANTE POR BIOENSAIO, MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICO

AUTORA: Fernanda Pavani Stamm Maldaner

ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

O hormônio da paratireóide humano (hPTH) é um polipeptídeo produzido e secretado pelas glândulas paratireóides, e é fundamental para a manutenção da homeostase dos íons cálcio no sangue. A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a expressão do gene do hPTH em *Escherichia coli*, e a produção em grande escala do hormônio da paratireóide humano recombinante (rhPTH 1-34), também denominado Teriparatida, o qual apresenta a sequência de aminoácidos responsável pela porção biologicamente ativa do paratormônio natural. O rhPTH é clinicamente indicado para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa, de homens com osteoporose primária ou hipogonadal, e da osteoporose associada à terapia sistêmica com glicocorticóides. Neste trabalho foi desenvolvido e validado método por eletroforese capilar de zona (ECZ) para a avaliação de rhPTH em produtos biofarmacêuticos. No método por ECZ, utilizou-se capilar de sílica fundida (40 cm de comprimento efetivo x 50 µm d.i.) e solução eletrolítica composta de fosfato de sódio dihidrogenado 50 mM, pH 3,0. O capilar foi mantido a temperatura de 25°C, e a tensão aplicada foi de 20 kV. O tempo de injeção foi de 45 s, com pressão de 50 mBar, e detecção por arranjo de diodos (DAD), em 200 nm. A separação eletroforética foi obtida com tempo de migração de 5,3 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,25-250 µg/mL ($r^2 = 0,9992$). Os limites de detecção e quantificação foram de 0,12 e 0,40 µg/mL, respectivamente. A especificidade foi avaliada através de análises com os excipientes da formulação biofarmacêutica e estudos de degradação, demonstrando a seletividade do método. A exatidão foi 100,28% com bias inferior a 0,85%. Além disso, realizou-se o teste de citotoxicidade *in vitro* das formas degradadas, apresentando, para as amostras submetidas às condições ácida, fotolítica e térmica, diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à molécula íntegra. Os bioensaios de proliferação celular e da atividade da fosfatase alcalina em células UMR-106 foram desenvolvidos e aplicados para avaliação da atividade biológica de rhPTH em formulações biofarmacêuticas. Os resultados de teor/potência foram correlacionados com os métodos já validados por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR), cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) e ECZ, apresentando correlação significativa ($p > 0,05$). Assim, sugere-se que os métodos físico-químicos validados sejam aplicados paralelamente aos bioensaios *in vitro* para aprimorar o controle da qualidade do produto biotecnológico de rhPTH, e para avaliação da bioequivalência de rhPTH.

Palavras-chave: Hormônio da paratireóide humano recombinante. Eletroforese capilar de zona. Cromatografia líquida por exclusão molecular. Cromatografia líquida em fase reversa. Bioensaio. Linhagem celular UMR-106. Validação.

ABSTRACT

RECOMBINANT HUMAN PARATHYROID HORMONE POTENCY EVALUATION BY BIOASSAY, CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC METHODS

AUTHOR: Fernanda Pavani Stamm Maldaner

ADVISER: Sérgio Luiz Dalmora

The human parathyroid hormone (hPTH) is a polypeptide secreted by the parathyroid glands that is essential for the maintenance of the calcium ion homeostasis in the blood. The recombinant DNA technology has enabled the expression of hPTH gene in *Escherichia coli*, and thus the large-scale production of recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34), teriparatide, which contain the active amino-terminal fragment of the full length hPTH. The rhPTH is clinically used to treat osteoporosis at high risk of fractures in postmenopausal women, men with osteoporosis primary or hypogonadal and adults with glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO). Capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed and validated for the assessment of rhPTH in biopharmaceutical formulations. The analysis for CZE method was performed on a fused-silica capillary (effective length, 40 cm; 50 μm i.d.), using electrolyte solution consisted of 50 mM dihydrogen phosphate solution at pH 3.0. The capillary was maintained at 25° C, the applied voltage was 20 kV. Injections were performed using a pressure mode at 50 mbar for 45 s, with detection by photodiode array detector set at 200 nm. Separation was obtained with a migration time of 5.3 min, and was linear over the concentration range of 0.25-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9992$). The limits of detection and quantitation were 0.12 and 0.40 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Specificity and stability-indicating capability were established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.28% with bias lower than 0.85%. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of acidic, photolytic and thermal degraded forms showed significant differences ($p < 0.05$) compared to intact molecule. The cell proliferation and alkaline phosphatase activity bioassays in UMR-106 cells were developed and applied to assess the biological activity of rhPTH in biopharmaceutical formulations. The results of content/potency were correlated to those of the validated reversed-phase liquid chromatography (RP-LC), size-exclusion liquid chromatography (SE-LC) and CZE methods, showing significant correlation ($p > 0.05$). Thus, the application of the validated physico-chemical methods together with *in vitro* bioassays, was suggested to improve quality control of rhPTH biotechnology-derived product and to support studies of biosimilars.

Keywords: Recombinant human parathuroid hormone. Capillary zone electrophoresis. Size exclusion liquid chromatography. Reversed-phase liquid chromatography. Bioassay. UMR-106 cell line. Validation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 -	Estrutura primária do rhPTH (1-34).	23
Figura 2 -	Mecanismo de ação do hPTH na regulação e diferenciação osteoclástica	25
Figura 3 -	Mecanismo de ação do hPTH no processo de formação óssea.....	26
Figura 4 -	Mecanismo de ação do hPTH na regulação do metabolismo do íons cálcio e fosfato.....	27

ARTIGO 1

Figure 1 -	Representative CZE electropherograms showing peak 1 = rhPTH; peak 2 = internal standard (IS); peak 3, 4 and 5 = degraded forms; peak 6 = hydrogen peroxide. (a) <i>R-rhPTH</i> ; (b) Sample of biopharmaceutical formulation. <i>R-rhPTH</i> following degradation under conditions of: (c) basic hydrolysis, (d) acid hydrolysis, (e) photolytic, (f) oxidative, and (g) thermal hydrolysis.....	56
------------	---	----

ARTIGO 2

Figure 1 -	Analysis of rhPTH (1-34) in biopharmaceutical formulations by CZE, RP-LC and SE-LC methods, showing peak 1= rhPTH; peak 2= internal standard; peak 3= excipient. (a) CZE electropherogram, (b) RP-LC chromatogram and (c) SE-LC chromatogram.....	71
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 – Inter-days and between-analysts precision data of CZE for rhPTH in biopharmaceutical formulations	57
Table 2 – Accuracy of CZE for rhPTH in the formulations	58
Table 3 – CZE conditions and range investigated during robustness test by the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure	59
Table 4 – Comparative content/potency evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations by the CZE, RP-LC and SE-LC methods and the bioassay	61

ARTIGO 2

Table 1 – Potency evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations by UMR-106 cell culture assays	69
Table 2– Comparative content/potency evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations by CZE, RP-LC and SE-LC methods	70

ISTA DE ABREVIATURAS

A _C	Adenilato ciclase
ALP	Fosfatase alcalina
AMP _C	Monofosfato cíclico de adenosina
BGE	Background electrolyte solution
BMP	Proteína morfogenética óssea
rhBMP-2	Proteína morfogenética óssea humana recombinante
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de díodos
DAG	Diacilglicerol
DMO	Densidade mineral óssea
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECZ	Eletroforese capilar de zona
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMA	European Medicines Agency
EOF	Fluxo Eletrosmótico
FDA	Food and Drug Administration
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
hPTH	Hormônio da paratireóide humano
ICH	International Conference on Harmonisation
IP ₃	1,4,5- trifosfato inositol
kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação

MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
Met	Metionina
MS	Espectrometria de massas
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
OPG	Osteoprotegerina
RNA	Ácido ribonucleico
pH	Potencial hidrogeniônico
PK-A	Proteína quinase A
PK-C	Proteína quinase C
PRPI	Receptor do hormônio da paratireóide humano tipo I
R	Coefficiente de correlação
RANK	Receptor ativador de fator nuclear kappa-B
R-rhPTH	Reference reagent parathyroid hormone, human rDNA derived
rhPTH	Hormônio da paratireóide humano recombinante
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TOF	Tempo de voo
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 GERAL.....	18
2.2 ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 METABOLISMO ÓSSEO, OSTEOPOROSE E IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA	20
3.2 TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE.....	21
3.3 ESTRUTURA E USOS TERAPÊUTICOS DA TERIPARATIDA	22
3.4 MECANISMO DE AÇÃO DO hPTH	24
3.5 METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DO PTH.....	27
3.5.1 Bioensaios	27
3.5.2 Métodos analíticos e bioanalíticos	30
4 ARTIGO 1.....	35
5 ARTIGO 2.....	63
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÕES.....	79
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença caracterizada pela perda da massa óssea e deterioração da microarquitetura óssea, aumentando a fragilidade óssea e o risco de fraturas. A terapêutica medicamentosa da osteoporose inclui o uso de fármacos que atuam inibindo a reabsorção óssea, agentes anabólicos de formação óssea, moduladores seletivos do receptor de estrogênio e reposição hormonal, além da complementação com cálcio e vitamina D (GIROTRA et al., 2006). Atualmente, o hormônio da paratireóide humano recombinante, rhPTH (1-34), é o único agente anabólico de formação óssea aprovado para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas, sendo observado o aumento da densidade mineral óssea (DMO) após a administração diária e de baixas doses do produto biofarmacêutico (COSMAN et al., 2014). É clinicamente indicado para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa; de homens com osteoporose primária ou hipogonadal; de homens e mulheres com osteoporose associada à terapia sistêmica com glicocorticóides (HAMANN; LANE, 2006; MEIER et al., 2014).

O rhPTH (1-34), também denominado teriparatida, é produzido pela tecnologia do DNA recombinante, expresso em *Escherichia coli* (*E. coli*), apresenta massa molecular de 4,1 kDa e é constituído pela sequência de 34 aminoácidos, a qual se atribui a atividade biológica do hormônio da paratireóide humano (hPTH) (CHUNXIAO et al., 2011).

A potência do rhPTH (1-34) foi inicialmente avaliada através do ensaio biológico da hipercalcemia em frangos. Posteriormente, foram introduzidos bioensaios *in vitro*, baseados na atividade da adenilato ciclase na linhagem de células osteoblásticas, UMR-106, e células embrionárias renais geneticamente modificadas, HEK293. O bioensaio baseado na atividade proliferativa das células UMR-106, foi também aplicado para avaliação de potência de rhPTH em produtos biotecnológicos, com respostas espectrofotométricas determinadas com MTT (REIDHAAR-OLSON et al., 2000, STAMM et al., 2013a, HOHENSTEIN et al., 2014). Pesquisas têm demonstrado o aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP), como biomarcador de formação óssea, após tratamento de camundongos e de células osteoblásticas com PTH, fundamentando ensaio baseado na determinação da atividade da ALP para avaliação da potência do biofármaco (ISHIZUYA et al., 1997).

As proteínas recombinantes de uso terapêutico apresentam estrutura complexa e requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com o sítio de ação. Por essa razão, é enfatizada a caracterização através de tecnologias analíticas físico-químicas para demonstrar estruturas correspondentes às suas formas biologicamente ativas.

Os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) viabilizam a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas e suas formas degradadas, e também tem sido estudados para uso em combinação com os bioensaios, ou como técnicas alternativas (XINDU; LILI, 2008). A aplicação desses métodos, especialmente por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM), para avaliação de teor/potência e determinação de formas alteradas de rhPTH tem sido recomendada pela literatura e compêndios oficiais no controle de qualidade de produtos biofarmacêuticos e da solução concentrada (FEKETE et al., 2012; CARDOSO JR et al., 2017). Por sua vez, a EC tem sido utilizada de modo crescente para caracterização, identificação, detecção de variantes de carga e isoformas, e quantificação de biomoléculas, com vantagens em relação a CLAE, tais como: baixo consumo de reagentes e solventes e necessidade de pequena quantidade de amostra para análise (HEMPE, 2008; SOUTO et al., 2014, MALDANER et al., 2017). A estabilidade das proteínas recombinantes também tem sido estudada por essas técnicas analíticas que, empregadas junto com os ensaios biológicos, possibilitam monitorar e caracterizar as formas alteradas, que podem apresentar bioatividade reduzida e efeitos imunogênicos (WANG, 1999; WEISE et al., 2014).

A aplicação das tecnologias analíticas para a área farmacêutica depende de sua validação, que deve demonstrar a adequabilidade dos procedimentos para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ROZET et al., 2007; FDA, 2015a). Até o presente momento, as farmacopéias não descrevem bioensaios e métodos físico-químicos para a caracterização e avaliação de rhPTH em produtos biofarmacêuticos acabados, demonstrando a importância dos estudos realizados no presente trabalho.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Desenvolver e validar métodos físico-químicos para avaliação da identidade, pureza, potência/teor e estabilidade do hormônio da paratireóide humano recombinante. Realizar estudos de correlação com o bioensaio *in vitro*, demonstrando parâmetros de qualidade, segurança e eficácia. Contribuir para o domínio de tecnologias que viabilizem avaliações de comparabilidade e aprimorem a área farmacêutica e de saúde pública do País.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Realizar análises pelo método validado por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para identificação e determinação de teor/potência da forma não alterada e proteínas relacionadas de rhPTH.
- b) Aplicar método validado por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) para identificação e determinação de teor/potência do monômero, dímeros e proteínas de alta massa molecular de rhPTH.
- c) Validar método por eletroforese capilar de zona (ECZ) para avaliação de teor/potência e variantes de carga de rhPTH.
- d) Desenvolver bioensaio baseado na proliferação celular e na atividade da fosfatase alcalina em células UMR-106 para avaliação de potência de rhPTH em produtos biofarmacêuticos.
- e) Avaliar correlações entre métodos físico-químicos e ensaio biológico *in vitro*.
- f) Avaliar a citotoxicidade da molécula íntegra e das formas degradadas.
- g) Quantificar impurezas da célula hospedeira em produtos biofarmacêuticos por ELISA.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 METABOLISMO ÓSSEO, OSTEOPOROSE E IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo constituído por células heterogêneas, em diferentes estágios de diferenciação celular, e por uma matriz extracelular calcificada denominada matriz óssea. Suas principais funções são proteger e sustentar os órgãos, alojar e proteger a medula óssea e apoiar os músculos, potencializando o movimento e as forças geradas durante a contração muscular. A matriz óssea representa também, o maior depósito de íons minerais utilizados no metabolismo, particularmente de cálcio e fósforo, participando ativamente na manutenção da homeostase do cálcio no sangue e, conseqüentemente, em todos os fluídos tissulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A remodelação óssea desenvolve-se com base em dois processos simultâneos e antagônicos: a formação e a reabsorção ósseas, que decorrem principalmente da atividade dos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. Este processo é responsável pela manutenção da microarquitetura óssea e é mantido por um sistema, que inclui hormônios, fatores físicos e humorais locais. Em condições fisiológicas, os processos de formação e reabsorção ósseas estão em equilíbrio estável, porém, com a idade, doenças ósteo-metabólicas, sedentarismo, ação de fármacos e alteração hormonal, como no caso de mulheres em pós-menopausa, pode-se alterar, causando enfermidades ósseas (HENRIKSEN et al., 2009).

A osteoporose é a doença óssea mais comum e é caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração da integridade anatômica e estrutural do tecido devido a um desequilíbrio no processo fisiológico de remodelação óssea. Suas principais conseqüências são o aumento da fragilidade óssea e do risco de fraturas, sendo considerada um problema de saúde pública (GIROTRA et al., 2006; SOBIESZCZAŃSKA et al., 2013).

Em todo o mundo, a osteoporose causa mais de 8,9 milhões de fraturas por ano (JOHNELL; KANIS, 2006). Em 2050, a incidência mundial de fratura de quadril nos homens deverá aumentar em 310% e 240% nas mulheres, em comparação com as taxas de 1990 (GULLBERG et al., 1997). Estima-se, também, que esta doença afete 200 milhões de mulheres em todo o mundo, sendo aproximadamente um décimo das mulheres com 60 anos, uma vez que a incidência de fraturas vertebrais e do colo do fêmur aumenta exponencialmente com o avançar da idade (KANIS, 2007).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a osteoporose é diagnosticada quando a densidade mineral óssea (DMO) do quadril ou da coluna lombar for

2,5 desvios-padrão inferior à média de DMO de uma população de referência de jovens adultos (COSMAN et al., 2014).

A prevenção da doença inclui exercícios físicos, medidas para prevenção de quedas, dieta e complementação com cálcio e vitamina D. A opção do emprego terapêutico de fármacos deve ser reservada aos pacientes com osteoporose confirmada e de alto risco para fraturas (BRATS, 2013).

3.2 TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE

Atualmente, diversos fármacos estão disponíveis para o tratamento da osteoporose, incluindo anti-reabsortivos, agonistas e antagonistas estrogênicos, calcitonina, anticorpos monoclonais e agentes anabólicos (COSMAN et al., 2014; NOF, 2014).

Os bisfosfanatos são análogos sintéticos do pirofosfato inorgânico, regulador endógeno da mineralização óssea. Diminuem a reabsorção óssea porque inibem os osteoclastos maduros e o recrutamento de seus precursores. Representam a primeira escolha para a prevenção secundária e tratamento da osteoporose, sendo bastante utilizados com suplementação de cálcio e de vitamina D (SANTOS et al., 2011).

Os moduladores seletivos do receptor de estrogênio são considerados agentes anti-catabólicos, pois inibem a atividade osteoclástica e reduzem a remodelação óssea devido à ação agonista do estrogênio nos ossos. A terapia de reposição hormonal constitui tratamento à base de estrogênio isolado ou associado à progesterona (STYGAR et al., 2003; SOWIŃSKA-PRZEPIERA et al., 2011; ROZENBERG et al., 2013).

A calcitonina é um hormônio produzido pelas células C parafoliculares da tireóide. Preparações farmacêuticas têm sido muito utilizadas na terapêutica pela sua propriedade anti-reabsorção, efetuada pela inibição da atividade dos osteoclastos, que aumenta a fixação de cálcio nos ossos e diminui seu nível no sangue (KITTUR et al., 1985; BINKLEY et al., 2014).

O anticorpo monoclonal denosumabe representa a primeira e única terapia aprovada pelo US Food and Drug Administration (FDA) em 2011, para o tratamento de perda óssea em pacientes submetidos a ablação hormonal contra câncer de próstata ou de mama. Seu mecanismo de ação baseia-se na redução da reabsorção óssea e aumento da DMO por bloquear a ligação do RANK ligante (RANKL) ao receptor RANK na superfície de osteoclastos, inibindo sua atividade. Também é clinicamente indicado para o tratamento de osteoporose em mulheres na fase de pós-menopausa. (SCOTLAND et al., 2011).

Entretanto, as opções terapêuticas acima citadas não restauram a massa óssea através do estímulo da atividade osteoblástica, cujo efeito é atribuído somente aos agentes anabólicos de formação óssea. Nesse contexto, os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a clonagem e expressão do gene do hormônio da paratireóide humano, hPTH, em *Escherichia coli* (*E.coli*), com produção do hormônio da paratireóide humano recombinante, rhPTH. A teriparatida, rhPTH (1-34), foi o primeiro agente anabólico a receber a aprovação do FDA em 2003, com indicação clínica para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa e de homens com osteoporose primária ou hipogonadal (QUATTROCCHI; KOURLAS, 2004).

O produto biofarmacêutico Preotact[®], rhPTH (1-84), fabricado pelo laboratório Takeda foi aprovado para uso clínico, na Europa, pela European Medicinal Agency (EMA), para o tratamento da osteoporose de mulheres pós-menopausa com alto risco de fraturas. No entanto, teve sua comercialização descontinuada pela venda dos direitos do produto para outra empresa. Após aprovação do produto Natpara[®] pelo FDA em janeiro de 2015, a NPS Pharmaceuticals[®] lançou novamente o biofármaco no mercado farmacêutico, porém, com indicação de uso clínico para o tratamento da hipocalcemia em pacientes com hipoparatiroidismo, e é comercializado apenas nos Estados Unidos (NATPARA, 2014).

A abaloparatida é análoga à proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP) e apresenta sequência dos vinte primeiros aminoácidos idêntica a PTHrP. A biomolécula foi desenvolvida para tratamento da osteoporose e encontra-se em fase final de estudos clínicos. Diferencia-se da teriparatida por apresentar maior afinidade e seletividade para o receptor PTHR1, além de maior atividade anabólica (GONNELLI; CAFFARELLI, 2016; COSMAN et al., 2017).

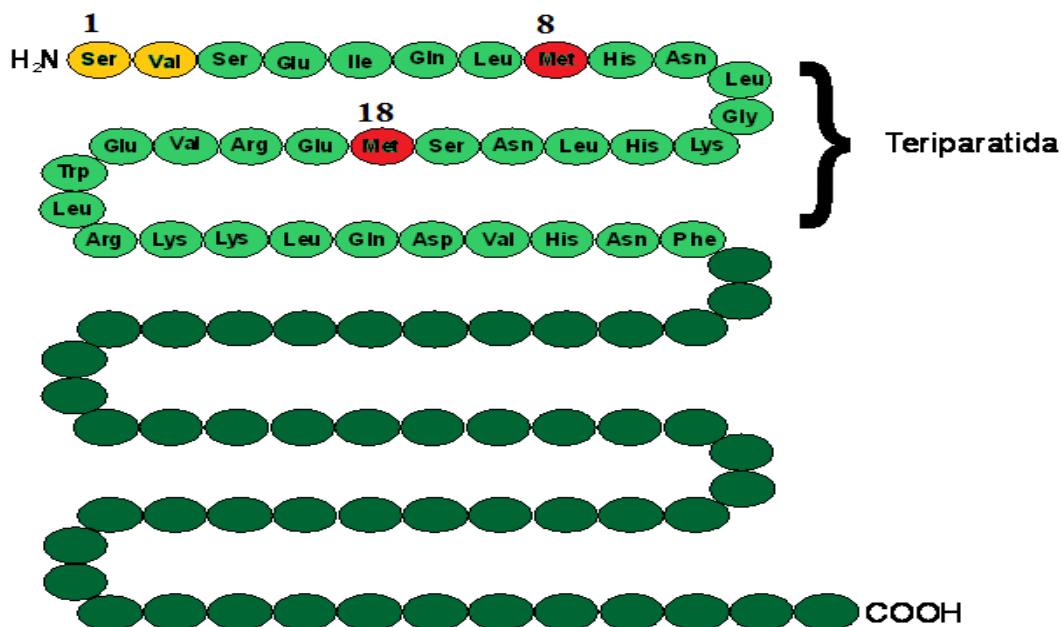
3.3. ESTRUTURA E USOS TERAPÊUTICOS DA TERIPARATIDA

A Teriparatida encontra-se disponível como produto biofarmacêutico denominado Fortéo[®] Colter Pen, sendo fabricado pelo laboratório francês Lilly France e distribuído no Brasil pelo laboratório Eli Lilly do Brasil, sob forma de solução injetável estéril, isotônica, transparente e incolor, na concentração de 250 µg/mL de rhPTH (1-34). O produto também é comercializado com o mesmo nome nos Estados Unidos e como Forsteo[®] na Europa. É apresentado em embalagem composta por caneta injetora e cartucho de 2,4 mL, contendo 28 doses diárias de 20 µg de teriparatida que devem ser administradas por via subcutânea. Os

excipientes que compõem a formulação do produto são: ácido acético glacial, acetato de sódio anidro, manitol, metacresol e água para injeção (FÓRTEO® COLTER PEN, 2014).

O rhPTH (1-34) apresenta sequência de 34 aminoácidos idêntica à região N-terminal do hPTH, que corresponde à estrutura biologicamente ativa. Apresenta massa molecular de 4,1 kDa e sua fórmula química é $C_{181}H_{291}N_{55}O_{51}S_2$. A estrutura primária está representada na Figura 1, que destaca as metioninas das posições 8 e 18, que são suscetíveis à oxidação, e os dois aminoácidos amino-terminais, serina e valina, essenciais para a atividade biológica (GUYTON; HALL, 2002; GRACITELLI et al. 2002; SILBERNAGEL; DESPOPOULOS, 2003; QUATTROCCHI; KOURLAS, 2004; LIN; LIN, 2011).

Figura 1 - Estrutura primária do rhPTH (1-34).



Fonte: (LIN; LIN, 2011, adaptada).

Atualmente, a teriparatida é indicada clinicamente para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa; de homens com osteoporose primária ou hipogonadal; de homens e mulheres com osteoporose associada à terapia sistêmica com glicocorticóides. O alto risco para fraturas inclui histórico de fratura osteoporótica, presença de múltiplos fatores de risco para fraturas e/ou falha ao tratamento prévio para osteoporose, conforme decisão médica. Estudos recentes têm pesquisado a aplicação clínica da teriparatida como terapia regenerativa periodontal (GROVER et al., 2013; AGARWAL et al., 2014; MEIER et al., 2014).

A administração do Fortéo[®] Colter Pen pode ocasionar aumento da concentração de íons cálcio no sangue e na urina, causando náusea, vômito, constipação, baixa energia e dores musculares. Pacientes com doenças osteometabólicas diferentes da osteoporose, hipercalcemia, concentração inexplicavelmente elevada de fosfatase alcalina sérica, malignidades esqueléticas ou metástases ósseas, submetidos a radioterapia externa e crianças não devem fazer uso deste medicamento. O prazo de validade do produto quando mantido sob refrigeração (2 a 8°C) é de 24 meses. Após a primeira injeção, o produto deve ser usado em até 28 dias (FORTÉO[®] COLTER PEN, 2014).

3.4. MECANISMO DE AÇÃO DO hPTH

O hPTH, também denominado paratormônio, é sintetizado na forma de pré-pró-PTH pelas glândulas paratireóides, localizadas nas porções posteriores dos lobos laterais da tireóide. Essa forma é rapidamente clivada, produzindo pró-PTH e subsequentemente, a forma madura do hPTH, que consiste de 84 aminoácidos (MOLINA, 2014).

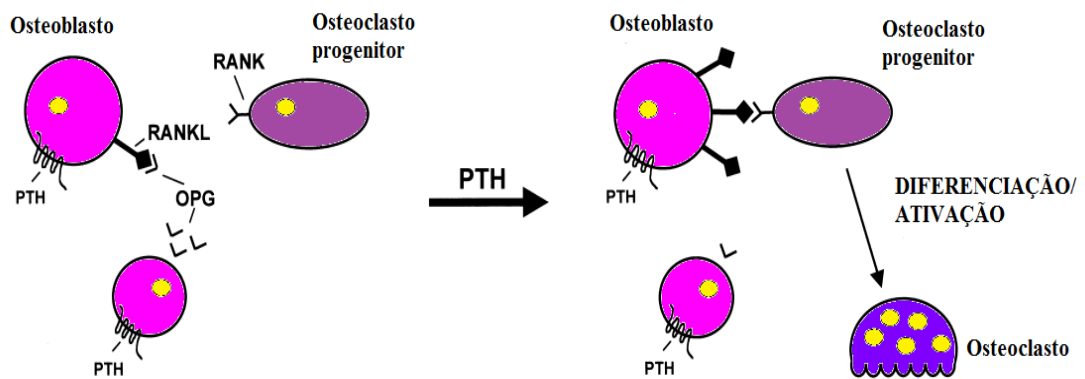
A principal função fisiológica do hPTH é a manutenção da homeostasia do cálcio ionizado no sangue. O cálcio circulante permanece em equilíbrio dinâmico sob várias formas, sendo aproximadamente 45% a 50% na forma iônica; 40% correspondem à fração ligada às proteínas, principalmente à albumina; e os restantes 10% a 15% complexada a ânions, como bicarbonato, citrato, fosfato e lactato. As proporções são determinadas pelo pH, temperatura, força iônica e concentração de outros íons, especialmente o magnésio. O cálcio ionizado é o componente fisiologicamente ativo e sua concentração sérica é responsável pela regulação de funções, como: contratilidade muscular, ritmo cardíaco, neurotransmissão, coagulação sanguínea e secreção de paratormônio. Os valores de referência em adultos são 4,5 a 5,6 mg/dL (1,05 a 1,30 mmol/L) (NISSENSON, 2001; ANDRIOLO et al., 2004).

A nível molecular, o hPTH exerce seus efeitos diretos através da ligação ao receptor de membrana PTHR1, acoplado à proteína G. Essa ligação provoca mudanças conformacionais e estruturais no meio citoplasmático, que permite a ativação da proteína G do tipo G_S ou G_Q. A proteína G_S ativada aumenta a atividade da enzima adenilato ciclase (Ac), elevando os níveis celulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMP_C). A proteína quinase A (PK-A) é então ativada pelo AMP_C, que atua como segundo mensageiro, induzindo a fosforilação dos seus substratos em resposta a ativação do receptor PTHR1. Por sua vez, a proteína G_Q ativada aumenta a atividade da fosfolipase C, enzima que hidrolisa o fosfolípido 4,5-bisfosfato fosfatidilinositol para produzir diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trifosfato inositol

(IP₃). A proteína quinase C (PK-C) é então ativada pela DAG, que atua como segundo mensageiro, e o IP₃ promove abertura dos canais de cálcio presentes na membrana do retículo endoplasmático e no aumento de cálcio livre no citosol (GOLTZMAN, 1999; ULLOA-AGUIRRE et al., 1999; GRACITELLI et al., 2002).

A secreção do hPTH ocorre em resposta à hipocalcemia e é inibida pela hipercalcemia. Nos ossos, a resposta fisiológica do paratormônio determina a ativação e recrutamento dos osteoclastos, o que resulta em reabsorção óssea e aumento do fluxo de íons cálcio para o sangue. Os osteoclastos maduros não tem receptores para o hPTH, e sua atividade é estimulada indiretamente pela liberação de fatores parácrinos dos osteoblastos ativados, que são os principais alvos do hPTH por apresentarem grande quantidade de receptores PTHR1. A ligação do hPTH aos seus receptores reduz a secreção de osteoprotegerina (OPG) e induz o aumento da expressão do ligante da OPG (RANKL) na superfície dos osteoblastos, que se liga ao receptor RANK. O RANK ativado, juntamente com a ação do fator estimulador da colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), estimula a diferenciação de osteoclastos precursores e promove a ativação de osteoclastos maduros, conforme a Figura 2 (NISSENSON, 2001).

Figura 2 – Mecanismo de ação do hPTH na regulação e diferenciação osteoclástica.

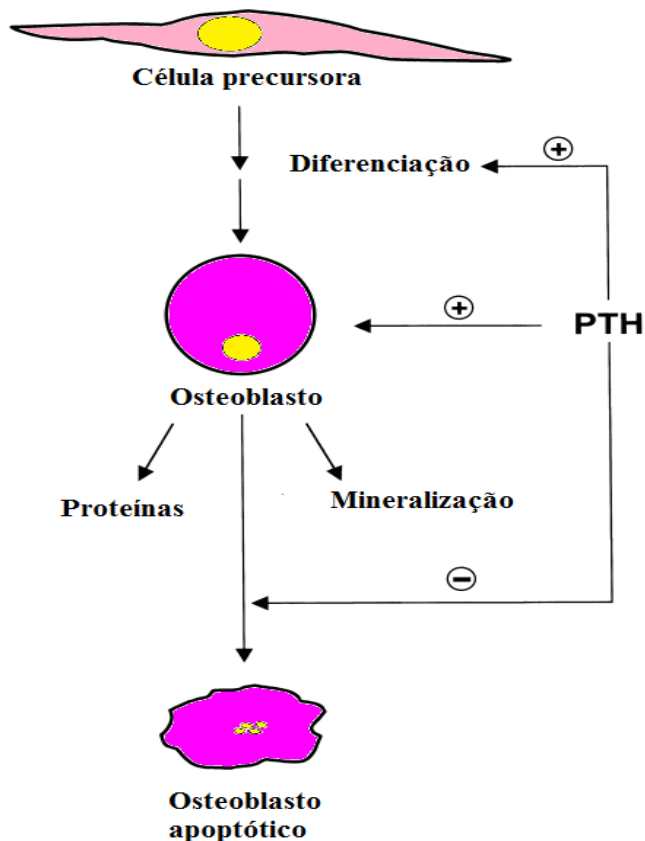


Fonte: (NISSENSON, 2001, adaptada).

A formação óssea é observada pela ação direta do hPTH sobre os osteoblastos pela administração intermitente intercalada e de baixas doses. A Figura 3 ilustra os possíveis mecanismos que contribuem para o efeito anabólico do hPTH, que pode atuar sobre: células precursoras estromais da medula óssea, promovendo a sua diferenciação em osteoblastos funcionais; osteoblastos, de forma direta, aumentando o número de células e a sua atividade

funcional; osteoblastos maduros, aumentando a sua vida útil através da inibição da apoptose. Esse mecanismo fundamentou a pesquisa e desenvolvimento do produto biofarmacêutico Fortéo[®]. A administração diária de baixas doses de rhPTH (1-34) previne a perda óssea e preserva ou aumenta a DMO, a massa e força óssea em humanos e várias outras espécies animais (LINDSAY et al., 1997; NEER et al., 2001, NISSENSON, 2001).

Figura 3 – Mecanismo de ação do hPTH no processo de formação óssea.

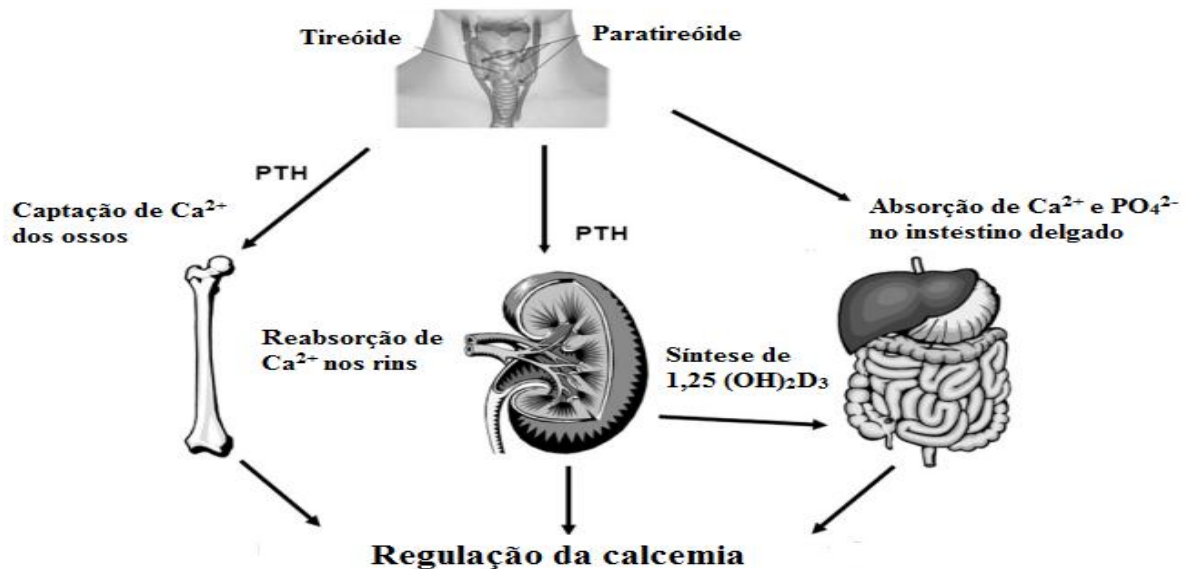


Fonte: (NISSENSON, 2001, adaptada).

Nos rins, o hPTH atua principalmente no túbulo contorcido distal renal e ramo ascendente da alça de Henle, inibindo a reabsorção renal de fosfato, estimulando a reabsorção de cálcio e aumentando a produção de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (calcitriol) pela ativação da 1α -hidroxilase renal. No intestino, aumenta a absorção ativa de cálcio e fósforo através do estímulo da produção renal do calcitriol, cuja síntese eleva-se diretamente na hipofosfatemia e indiretamente na hipocalcemia, pela secreção do hPTH (COLE et al., 2007). A Figura 4 ilustra o mecanismo de ação do hPTH na regulação do metabolismo do íons cálcio e fosfato (LIN; LIN, 2011).

A hipercalcemia, por sua vez, inibe a secreção do hPTH e estimula a glândula tireóide a secretar o hormônio calcitonina, que promove a deposição de cálcio nos ossos e a eliminação de cálcio na urina, além de inibir a sua absorção pelo intestino, reduzindo os níveis de cálcio no sangue (HOFF et al., 2001).

Figura 4- Mecanismo de ação do hPTH na regulação do metabolismo do íons cálcio e fosfato.



Fonte: (LIN; LIN, 2011, adaptada).

3.5. METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DO PTH

3.5.1 Bioensaios

Os ensaios biológicos *in vivo* e/ou *in vitro* são essenciais para assegurar a eficácia terapêutica de produtos biológicos. Os bioensaios *in vivo*, baseados em modelos animais, têm sido recomendados pelas farmacopeias para avaliação de potência de produtos biofarmacêuticos, quando não existem métodos alternativos. Porém, estes ensaios são dispendiosos, demandam tempo e pessoal capacitado, além de serem menos precisos quando comparados aos métodos analíticos físico-químicos. Assim, houve avanço importante no contexto dos métodos alternativos *in vitro* (E.P, 2014; USP 39, 2016).

Parsons et al. (1973) validaram ensaio biológico baseado na hipercalcemia em frangos. A concentração sérica de cálcio foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica 60 minutos após a administração intravenosa de formulações farmacêuticas de PTH, nas doses de 6, 18 e 54 µg/mL.

O bioensaio de hipercalcemia em frangos foi aplicado por Yamamoto et al. (1994) para estudo comparativo da atividade biológica do hPTH (1-84) e hPTH (1-34). Concluíram que a potência biológica demonstrada para o hPTH (1-84) era superior e poderia estar associada a maior afinidade da região C-terminal pelo receptor do PTH.

Mohan et al. (2000) estudaram os efeitos *in vivo* do PTH (1-34) e seus análogos, PTH (2-34) e PTH (1-31) através da avaliação da DMO e dos ensaios bioquímicos da determinação da osteocalcina no soro, e da fosfatase alcalina e fosfatase ácida tartarato resistente no extrato ósseo de camundongos.

Chunxiao et al. (2007) caracterizaram e avaliaram a atividade farmacológica de análogo do rhPTH por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), pelo bioensaio de Parsons em frangos e pela determinação da DMO em ratas, respectivamente. Posteriormente, Chunxiao et al. (2011) prepararam derivados com substituição da arginina por leucina e adição de prolinas na carboxila terminal, cuja atividade biológica também foi avaliada pelo bioensaio de Parsons.

Os aspectos éticos e políticos sobre o uso de animais de experimentação, o reconhecimento do princípio dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição) pelos órgãos reguladores e a sua incorporação em normas internacionais, incentivaram a pesquisa e o desenvolvimento de métodos alternativos. Entre eles, destacam-se os bioensaios *in vitro* por cultura de células que têm sido empregados de modo crescente pela indústria farmacêutica e instituições de pesquisa, no controle de qualidade de proteínas terapêuticas derivadas da tecnologia do DNA recombinante, tanto na solução concentrada como no produto acabado (CASTLE et al., 2007; OBORA; KUROSAWA, 2009; MACHADO et al., 2016).

Ishizuya et al. (1997) estudaram o efeito do tempo de exposição contínua e intermitente ao rhPTH em ciclos de 48 horas durante 21 dias na diferenciação de células osteoblásticas de rato. Após exposição intermitente durante 6 h em cada ciclo, os resultados demonstraram aumento significativo do número de nódulos mineralizados, do teor de cálcio e da atividade da fosfatase alcalina nas células, concluindo que a diferenciação osteoblástica é dependente deste modo de exposição e é inibida pela exposição contínua.

Reidhaar-Olson et al. (2000) avaliaram a atividade biológica de variantes ativas de rhPTH (1-34) pelo ensaio da determinação da atividade da adenilato ciclase em células UMR-

106, de osteosarcoma de rato, e Saos-2, de osteosarcoma humana. Observaram que a potência do rhPTH (1-34) depende da presença dos resíduos de metionina das posições 8 e 18 e que algumas mutações nos resíduos Lis¹³, Glu¹⁹, Val²¹, Glu²², Lis²⁷ e Asp³⁰ podem contribuir para o aumento da sua bioatividade.

Chen; Wong (2006) estudaram o efeito modulador do pré-tratamento com a isoflavona Genisteína, fitoestrogênio encontrado em produtos alimentícios a base de soja, nas células humanas osteoblásticas Saos-2 expostas à ação do PTH. Observaram aumento da atividade da fosfatase alcalina, e da expressão do receptor RANKL, mas redução da expressão de OPG. Sugerem dieta rica no fitoestrogênio para a prevenção da perda óssea e da osteoporose em mulheres pós menopausa com níveis sanguíneos elevados de PTH.

A linhagem MC3T3-E1, de células osteoblásticas de camundongos, foi utilizada por Nakao et al. (2009) para estudar a relação entre a sinalização da proteína morfogenética óssea (BMP) e a concentração de AMPc após exposição ao PTH. A atividade das enzimas fosfatase alcalina e luciferase também foi determinada após tratamento com hPTH (1-34) e rhBMP-2. Demonstraram que o tratamento cíclico com PTH mantém a concentração intracelular de AMPc elevada, promovendo aceleração da diferenciação osteoblástica induzida pela BMP.

Liu et al. (2015) também utilizaram as células MC3T3-E1 para investigar os efeitos do PTH de origem bovina pelo ensaio de proliferação celular. Após exposição contínua de altas doses, observaram redução da proliferação celular, da atividade da fosfatase alcalina e do número de nódulos de cálcio mineralizados.

Mok et al. (2010) demonstraram a atividade farmacológica do Icariin, flavonóide glicosilado da *Herba Epimedii*, na prevenção da perda óssea durante a osteoporose, que foi confirmada após avaliação da sua bioatividade pelo bioensaio da atividade proliferativa de células UMR-106, com MTS e detecção a 490 nm em leitor de microplacas.

Hamedifar et al. (2013) avaliaram a atividade biológica de rhPTH expresso em *E.coli* através da determinação de AMPc em células UMR-106, obtendo potência de 99,70% e resultados comparáveis com o produto biofarmacêutico Fortéo[®].

Patel et al. (2013) estudaram o efeito do extrato metanólico da *Moringa oliefera* (MO) na prevenção da osteoporose através do bioensaio *in vitro* em células de osteosarcoma humana Saos-2. O tratamento com o extrato das flores de MO induziu aumento da atividade proliferativa das células, enquanto que o dos frutos, aumentou a atividade da fosfatase alcalina e os teores de cálcio e hidroxiprolina.

Wolf et al. (2013) avaliaram a atividade da fosfatase alcalina após administração contínua de PTH durante 48 horas em células humanas do ligamento periodontal (PDL). Os

resultados indicaram a expressão do receptor PTHR1 nas células PDL e estímulo da atividade da fosfatase alcalina e diferenciação celular. Os autores recomendaram protocolos de administração local de PTH na terapia periodontal.

Hohenstein et al. (2014) desenvolveram e validaram bioensaio por cultura de células HEK293 para avaliação de potência de rhPTH em formulações biofarmacêuticas, em relação ao Padrão Internacional de rhPTH (1-34) WHO (04/200). O AMPc foi determinado com o Kit LANCE Ultra cAMP por espectroscopia de fluorescência. Paralelamente, sugeriram a aplicação do bioensaio para a determinação de anticorpos neutralizantes anti-PTH em soro humano nos estudos de imunogenicidade de formulações.

Chen et al. (2016) estudaram o mecanismo molecular da administração intermitente de PTH na regulação da proliferação e diferenciação de células estromais osteogênicas da medula óssea (BMSC). A cada ciclo de 48 horas, as células foram expostas ao PTH por 6 horas durante 3, 7, 10 e 14 dias, promovendo proliferação celular via AMPc/PKA e estimulando a atividade da fosfatase alcalina nas células. Concluíram que a administração intermitente de PTH regula proteínas envolvidas na via de sinalização AMPc/PKA, em especial, a proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (p-CREB), para induzir a proliferação, diferenciação e mineralização das células BMSC.

Seibel et al. (1996) desenvolveram e validaram ensaio imunoradiométrico para determinação de hPTH (1-34) em plasma de cão. O ensaio foi validado para determinação de hPTH (1-34) com limites de detecção e quantificação de 5,8 pg/mL e 15,8 pg/mL, respectivamente. O imunoensaio foi aplicado para estudo de farmacocinética em cães Beagle após administração por via subcutânea e intravenosa da dose de 5 µg/Kg.

Frelinger et al. (1984) separaram os sulfóxidos da metionina, Met⁸ e Met¹⁸, do hPTH sintético de origem bovina por CL-FR e avaliaram a sua atividade biológica pelo bioensaio da adenilato ciclase da membrana renal. Os resultados demonstraram bioatividade reduzida para os produtos de oxidação.

Os resíduos oxidados de metionina também foram estudados por Nabuchi et al. (1995), após tratamento do rhPTH com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e análise por espectrometria de massas. Demonstraram atividade biológica reduzida pelo ensaio da adenilato ciclase em células de osteosarcoma de rato ROS 17/2,8-5.

3.5.2 Métodos analíticos e bioanalíticos

Os métodos analíticos físico-químicos são importantes para completa caracterização e avaliação de biomoléculas recombinantes, e podem ser aplicados em combinação ou como

alternativa aos bioensaios *in vitro* e *in vivo*, com vantagens de apresentar, em geral, maior exatidão, precisão e facilidade de execução. Os guias nacionais e internacionais também tem preconizado o uso destes métodos durante as etapas pré-clínicas e em estudos de comparabilidade/biossimilaridade de produtos biológicos (BRASIL, 2010; EMA, 2015; FDA, 2015b).

Pichette et al. (2000) estudaram método por CL-FR para determinação da pureza de hPTH (1-84) em preparações sintéticas, utilizando coluna C₁₈ mantida a 50°C e aplicação de gradiente, com a fase móvel A composta de cloreto de sódio 0,155 M e de pentanosulfonato de sódio 0,037 M, pH 5,6, e a fase móvel B de acetonitrila. Realizaram análise com separação de impurezas em níveis semelhantes aos detectados pelo método por eletroforese capilar.

Os efeitos e mecanismos antioxidantes do ácido ascórbico sobre o hormônio da paratireóide humano (13-34) foram estudados por Yin et al. (2004), que quantificaram a oxidação do resíduo de metionina (Met¹⁸) do hPTH (13-34) por CL-FR com coluna C₄ e gradiente de eluição. Observaram que o ácido ascórbico atua como pró-oxidante, em baixas concentrações e na presença de íons metálicos de ferro e cobre, e que a adição de EDTA como agente quelante na formulação preveniu a degradação do hPTH (13-34).

Kamberi et al. (2004) desenvolveram método por CL-EM para determinação de agregados de hPTH (1-34) e pesquisaram os efeitos da adição de sal e solventes orgânicos na supressão de interações hidrofóbicas/eletrostáticas entre o hPTH e a coluna, bem como no aumento da precisão do método. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de retenção de aproximadamente 20 minutos com coluna TSK-G2000-SW, e com a fase móvel A composta por ácido trifluoracético 0,1% em solução de cloreto de sódio 0,2 M e a fase móvel B de acetonitrila (80/20, v/v), eluídas em vazão de 0,5 mL/min e detecção a 215 nm.

O hPTH (1-34) peguilado foi caracterizado por eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas MALDI-TOF-MS. O método foi aplicado para otimizar o processo de peguilação, determinando a extensão e os sítios modificados de cada isômero a partir da sua clivagem enzimática. Os autores sugeriram a aplicação do método para estudos de peguilação de outras biomoléculas (NA; LEE, 2004).

Método por espectrometria de massas com quadrupolo e tempo de voo e ionização por nanoelectrospray (ESI-QTOF-MS) foi aplicado para identificação da estrutura primária e determinação do peso molecular de rhPTH (1-34). A massa molecular determinada foi de 4115,21 Da com erro relativo de 0,06% comparável a massa molecular teórica de 4117,76 Da, comprovando que não houve deleção, mutação ou modificação durante o processo de expressão e purificação do rhPTH (JING et al., 2006).

Hu et al. (2006) estudaram a farmacocinética, distribuição tecidual e perfil de excreção do rhPTH (1-34) em ratos após injeção única por via subcutânea de 5, 10 e 20 µg/kg e intravenosa de 10 µg/kg, demonstrando biodisponibilidade absoluta, rápida absorção e excreção, especialmente urinária. Determinaram a $C_{m\acute{a}x}$ de $16,6\pm 2,8$ ng/mL e o $T_{m\acute{a}x}$ de $0,56\pm 0,14$ horas, respectivamente, para a dose de 20 µg/kg.

A estabilidade *in vitro* do rhPTH (1-34) foi avaliada em homogeneizados de tecido hepático, renal e pulmonar de ratos. Os principais produtos de degradação foram identificados por espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS), destacando-se nos três tecidos o derivado da clivagem da ligação peptídica Leu¹⁵-Asn¹⁶ (LIAO et al., 2010).

Hämmerle et al. (2012) estudaram a farmacocinética de formulação oral do rhPTH (1-34) em mulheres pós menopausa. Determinaram o teor/potência do produto biofarmacêutico através do ensaio da determinação de AMPc em células UMR-106 por ELISA e por CL-FR. O perfil farmacocinético de formulações orais de 2,5 e 5 mg de rhPTH em dose única foram avaliadas em comparação com o produto biofarmacêutico de referência Fortéo[®] por ELISA. A $C_{m\acute{a}x}$ média e o $T_{m\acute{a}x}$ encontrados foram de aproximadamente 561 pg/mL e 0,33 h, respectivamente. Paralelamente, a farmacodinâmica foi avaliada pela determinação de cálcio ionizado no soro e determinação de AMPc em amostras de urina por radioimunoensaio.

Chambers et al. (2013) desenvolveram e validaram método por LC-MS/MS para quantificação de rhPTH (1-34) em plasma humano. O intervalo linear do método foi de 15 – 500 pg/mL e o limite de quantificação foi de 15 pg/mL, adequado para estudos de farmacocinética e ensaios clínicos.

Stamm et al. (2013a) validaram métodos por CL-FR e CL-EM para avaliação de teor/potência, determinação de proteínas relacionadas e compostos de alta massa molecular de rhPTH em produtos biofarmacêuticos. No método por CL-FR foi empregada coluna C₁₈ Zorbax 300 SB (150 mm x 4,6 mm d.i.), fase móvel composta por tampão sulfato de sódio 0,1 M pH 2,3 e acetonitrila eluída em gradiente e detecção a 214 nm. No método por CL-EM utilizou-se coluna BioSep SEC-S2000 (300 mm x 7,8 mm d.i.), tampão ácido fosfórico 0,1 M pH 2,5 eluída em fluxo isocrático de 0,7 mL/min e com detecção a 214 nm. Os métodos foram comparados com o bioensaio *in vitro* por cultura de células UMR-106, demonstrando correlação significativa. Adicionalmente foi avaliada a citotoxicidade dos sulfóxidos e compostos de alta massa molecular em relação a molécula íntegra, observando-se diferenças significativas ($p < 0,05$).

A farmacopeia americana introduziu recentemente a monografia para solução concentrada de teriparatida, apresentando métodos para identificação, determinação de teor e impurezas. Os métodos por CL-FR empregam gradiente de fase móvel composta por tampão sulfato de sódio 0,2 M pH 2,3 e acetonitrila, eluída em coluna C₁₈ e com detecção a 214 nm. A especificação para teor/potência é de 95 a 105% em base anidra (USP 39, 2016).

Entre as tecnologias analíticas disponíveis para avaliação de produtos biofarmacêuticos destacam-se os métodos por CL-FR e CL-EM, que têm sido utilizados, respectivamente, para identificação e avaliação de teor/potência, pureza e alterações físico-químicas, que inclusive podem se originar durante os processos de expressão, purificação, formulação e armazenamento (GUNTURI et al., 2007; ALMEIDA et al., 2014). Além disso, a EC é uma técnica analítica utilizada para a identificação, determinação de cargas, isoformas, pureza e quantificação de proteínas e tem sido cada vez mais aplicada no controle de qualidade de medicamentos devido ao menor consumo de solventes e de amostra (HEMPE, 2008; SOUTO et al., 2014; USP 39, 2016). A determinação das formas alteradas é uma das principais características dos métodos cromatográficos em relação aos bioensaios e tem sido recomendada em monografias específicas de produtos biotecnológicos, pois estas formas podem apresentar atividade biológica reduzida e induzir reações imunogênicas (GROOT; SCOTT, 2007; ALMEIDA et al., 2010; E.P, 2014; WADHWA et al., 2015; PINEDA et al., 2016).

Os procedimentos e especificações para validação de métodos analíticos encontram-se descritos em guias e compêndios oficiais (ICH, 2005; FDA, 2015a; USP 39, 2016), que apresentam os parâmetros que devem ser avaliados para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados, assegurando que o método é adequado para a sua finalidade (SHABIR, 2003; SHABIR et al., 2007; ROZET et al., 2007; INJAC et al., 2008). Os principais parâmetros de validação são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema e encontram-se detalhadamente descritos em dissertações e tese já desenvolvidas no laboratório de produtos biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (STAMM, 2013b, SOUTO, 2015) e no artigo científico 1 desta tese (CAPÍTULO 1).

As publicações científicas relacionadas aos estudos desenvolvidos no contexto desta tese estão anexadas a seguir (CAPÍTULOS 1 e 2). Observa-se que o material e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos nas mesmas.

ARTIGO 1

4 ARTIGO 1

4.1 – Fernanda Pavani Stamm Maldaner, Rafaela Ferreira Perobelli, Bruna Xavier, Gabriel Lunardi Remuzzi, Maurício Elesbão Walter and Sérgio Luiz Dalmora. Evaluation of recombinant human parathyroid hormone by CZE method and its correlation with *in vitro* bioassay and LC methods. **Talanta**, v. 162, p. 567-573, 2017, doi:10.1016/j.talanta.2016.10.053.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.053>.

Evaluation of recombinant human parathyroid hormone by CZE method and its correlation with *in vitro* bioassay and LC methods

Fernanda Pavani Stamm Maldaner^b, Rafaela Ferreira Perobelli^b, Bruna Xavier^b, Gabriel Lunardi Remuzzi^a, Maurício Elesbão Walter^b, Sérgio Luiz Dalmora^{a,*}

^a*Department of Industrial Pharmacy, ^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
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 capillary zone electrophoresis (CZE) method was validated to assess the content/potency of the recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34), using ranitidine as internal standard (IS). A fused-silica capillary, (i.d. of 50 μm ; effective length of 40 cm) was used at 25°C; the applied voltage was 20 kV. The background electrolyte solution consisted of 50 mmol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate solution at pH 3.0. Injections were performed using a pressure mode at 50 mbar for 45 s, with detection by photodiode array (PDA) detector set at 200 nm. Separation was obtained with a migration time of 5.3 min, and was linear over the concentration range of 0.25-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9992$). Specificity and stability-indicating capability were established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.28% with bias lower than 0.85%. Analyses of the same batches showed mean differences of the estimated content/potencies of 0.61%, 1.31% higher and 0.86% lower as compared to the validated reversed-phase and size exclusion liquid chromatography methods, and to the UMR-106 cell culture bioassay, respectively, with non-significant differences ($p > 0.05$). Degraded forms were also subjected to the *in vitro* cytotoxicity test. The results obtained showed the capabilities of each one of the methods, and constitute an alternative strategy to monitor stability, improve the quality control and ensure the batch-to-batch consistency of bulk and finished biotechnology-derived medicine.

Keywords: Recombinant human parathyroid hormone; Capillary zone electrophoresis; Liquid chromatography; UMR-106 cell culture bioassay; Biotechnology-derived medicine.

1. Introduction

Osteoporosis is a disease characterized by low bone mass and micro-architectural deterioration of the bone tissue, leading to bone fragility and a consequent increased risk of fracture. Recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34) is the only anabolic agent that is available to induce bone formation. It is clinically used to treat postmenopausal women with osteoporosis and at high risk of fractures, men with primary or hypogonadal osteoporosis, and adults with glucocorticoid-induced osteoporosis [1-3].

Teriparatide (rhPTH 1-34) is a recombinant form of a fragment of the human parathyroid hormone, produced in *Escherichia coli* by DNA technology and consists of a 34 amino acids polypeptide chain, with a molecular mass of 4.1 kDa and isoelectric point of 8.2. It contains both the structural determinants of the biological activity and the receptor-binding region of the full length human parathyroid hormone, hPTH (1-84) [4].

Biological assays are useful to assess the potency of biomolecules. To evaluate PTH variants, cell lines that naturally express PTH receptor 1 (PTH1R), such as MC3T3-E1, UMR-106 and Saos-2, have been employed, resulting in adenylate cyclase activation, with consequent production of cyclic adenosine mono-phosphate (cAMP) [5, 6]. A bioassay based on the HEK293 cell line was validated to evaluate the potency of rhPTH through quantitation of cAMP by fluorescence [7].

Physicochemical techniques cannot predict bioactivity yet, but they can provide information about the structure and composition of biomolecules, and a combination of methods has been successfully applied to monitor content, chemical stability and for correlation studies [8, 9]. The reversed-phase (RP-LC) and size-exclusion (SE-LC) liquid chromatography methods are highly accurate and sensitive for the analysis of closely related protein variants, degradation products, and higher molecular weight forms with reduced or

absent bioactivity and altered immunogenicity [10]. An ion-pairing RP-LC method was developed for the analysis of hPTH (1-84) using a C₁₈ column and a mobile phase composed of sodium chloride and sodium pentanesulfonate [11]. An SE-LC method using a G2000 column with detection at 215 nm was used to quantify non-covalent aggregation of rhPTH (1-34) [12]. An LC-MS/MS method with positive electrospray ionization (ESI+) in the MRM mode was validated to determine of rhPTH (1-34) in human plasma with a quantitation limit of 15 pg mL⁻¹ [13]. Capillary Electrophoresis (CE) has expanded its scope, allowing the determination of biotechnology-derived medicines and their degraded forms, charged variants, and isoforms [14, 15]. A CE method was used to optimize the PEGylation of hPTH ((1-34) and the results were confirmed by MALDI-TOF MS [16]. There is no CE method published for quality control analysis of rhPTH and the validation is essential to show that the procedure is suitable for its intended purpose [17].

This study aimed to develop and validate a stability-indicating CZE method to assess the content/potency of rhPTH (1-34) in biotechnology-derived medicine, to correlate with the results from validated RP-LC and SE-LC methods and the UMR-106 cell culture bioassay, and to evaluate the bioactivity and the cytotoxicity of degraded forms. Thus, contributing to the development of an alternative method to improve the quality control, and thereby ensure therapeutic efficacy.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The Reference Reagent Human rDNA derived Parathyroid Hormone (R-rhPTH WHO 04/200), was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control-NIBSC (Herts, UK). Ranitidine chlorhydrate was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK). A total of ten batches of Fortéo[®] Colter Pen (Eli Lilly, São Paulo, Brazil), containing 250 µg mL⁻¹ of rhPTH were labeled from 1 to 10. The samples were acquired from commercial sources within their shelf life period. Sodium dihydrogen phosphate, acetonitrile, methanol, anhydrous sodium sulphate, phosphoric acid, anhydrous sodium acetate and mannitol were used as reagents or excipients and were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Fetal bovine serum, dimethyl sulfoxide (DMSO), DMEM culture medium and thiazolyl blue formazan (MTT) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the 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 from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Apparatus

The CE experiments were performed on an Agilent ^{3D}CE apparatus from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), consisting of a photodiode array (PDA) detector, a temperature-controlling system (4-60°C) and a power supply that was able to deliver up to 30 kV. The CE ChemStation software was used to control the instrument, to acquire the data, and

to analyze the results. The pH of the solutions was measured with a pH-meter, Thermo Orion Model 420 (Beverly, MA, USA).

RP-LC and SE-LC methods were 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, a SIL-10AD_{VP} autosampler, a CTO-10A_{VP} column oven, and an SPD-M10A_{VP} PDA detector. Peak areas were automatically integrated by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program.

2.3. CZE method

2.3.1. *Samples and Standard Solution*

Working standard and sample solutions of rhPTH were prepared daily by diluting the R-rhPTH and the biopharmaceutical formulation samples in background electrolyte (BGE) solution to a final concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The ranitidine chlorhydrate (IS) stock solution was prepared to a concentration of 1 mg mL^{-1} in methanol, and then diluted to a working concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with BGE solution. The solutions were filtered through a 0.22 μm Millex Millipore filter (Bedford, MA, USA).

2.3.2. *Electrophoretic procedure*

All the experiments were performed on a fused-silica capillary with i.d. of 50 μm and total length of 48.5 cm (effective length of 40 cm), maintained at 25°C, and detection by PDA set at 200 nm. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing

with 1 mol L⁻¹ sodium hydroxide for 5 min, followed by water for 2 min, 1 mol L⁻¹ phosphoric acid for 5 min, water for 2 min, and BGE solution consisting of 50 mmol L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate at pH 3.0, adjusted by addition of 8.5% phosphoric acid, for 5 min. To improve the reproducibility of the migration time between injections, the capillary was conditioned again with water (2 min) and BGE solution (3 min) after each run. Samples were injected using pressure mode at 50 mbar for 45 s. A constant voltage of 20 kV (current about 56.5 μ A) was applied during the analysis. Because electrolysis can change the electroosmotic flow (EOF) and affect the migration time, the efficiency, and the selectivity, the running electrolyte was replaced with a fresh solution after every three injections.

2.4. LC methods

The chromatographic methods were performed as described elsewhere [18]. The validated RP-LC method was carried out on a reversed-phase Agilent (Santa Clara, CA, USA) Zorbax 300 SB C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a pore size of 300 Å) maintained at 40°C. The elution was performed using a gradient at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹ with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. Mobile phase A consisted of 0.1 mol L⁻¹ sodium sulphate buffer, pH 2.3, and mobile phase B was acetonitrile. The injection volume was 20 μ L of a solution containing 50 μ g mL⁻¹ for both the standard and samples.

The SE-LC 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. The mobile phase consisted of 0.1 mol L⁻¹ phosphoric acid, pH 2.5; the analyses were run in the isocratic mode at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹ with PDA detection at 214 nm. The injection volume was 30 μ L of a solution containing 40 μ g mL⁻¹.

2.5. UMR-106 cell culture assay

The assay was carried out by adjusting the procedure described elsewhere [18, 19]. The growth-promoting activity of rhPTH was assessed on the rat osteoblast-type cell line, UMR-106 (ATCC number CRL-1661). The absorbance was measured at 595 nm by using a microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland). The biological potency was calculated by the parallel line statistical method using the CombiStats software (EDQM, Council of Europe), against R-rhPTH (WHO 04/200).

2.6. *In vitro* cytotoxicity test

The test was conducted as described elsewhere [20], and was based on a neutral red uptake (NRU) assay, with the NCTC Clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) exposed to the degraded forms of rhPTH. The absorbance was measured at 540 nm.

2.7. Host-cell DNA and host-cell protein impurities

Residual *E.Coli* host-cell DNA was determined by the DNA dye binding assay, and the *E.Coli* host-cell proteins in biopharmaceutical formulations were assessed by the two-site-immunoenzymatic assay (ELISA) by using the Kits from Cygnus Technologies (Southport, USA). The intensity of the fluorescent excitation and emission signals at 485 and 525 nm, respectively, and the absorbance at 450 nm were measured on the microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

2.8. Validation of the capillary zone electrophoresis method

The method was validated by using samples of an rhPTH biopharmaceutical formulation with a label claim of $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. The following parameters were determined: specificity, linearity, range, precision, accuracy, detection limit (DL), quantitation limit (QL), robustness and system suitability test, following the guideline [17]. Ranitidine chlorhydrate was selected as internal standard to compensate for any injection errors and minor fluctuations in migration time, thus improving the reproducibility of the CZE method.

2.8.1. Forced degradation studies

The stability-indicating capability of the CZE method was assessed by subjecting an *R-rhPTH* solution and a sample of the biopharmaceutical formulation ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) to accelerated degradation in different acidic, basic, oxidative, photolytic and temperature conditions [17, 21]. Working solutions prepared in 1 mol L^{-1} sodium hydroxide and in 1 mol L^{-1} hydrochloric acid were used to assess basic and acid hydrolysis, respectively. The solutions were maintained at room temperature for 40 min and 10 min, respectively, refluxed at 100°C for 45 min, cooled, and neutralized with base or acid, as necessary. Photodegradation was induced by exposing the sample to 200 W h m^{-2} near ultraviolet light in a photostability chamber for 7 h. Oxidative degradation was induced by maintaining the solutions in 3% hydrogen peroxide at ambient temperature for 45 min, protected from light. For the study that tested thermal condition, sample solutions were diluted in water and heated at 80°C for 2 h. The solutions were diluted with BGE solution to final concentrations of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Interference of the excipients from the biopharmaceutical formulation was determined by analyzing a sample that contained placebo (in-house mixture of all formulation excipients) only. The specificity of the method was established by determining the peak purity using

PDA detector. Additionally, the degraded forms were evaluated by the *in vitro* cytotoxicity test and by the UMR-106 cell culture bioassay.

2.9. Analysis of rhPTH in biopharmaceutical formulations

To quantitate rhPTH in biopharmaceutical formulations, standard and sample solutions were diluted to $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ with BGE solution for the CZE, and to 50 and $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ with the mobile phases for the RP-LC and SE-LC methods, respectively. The samples were injected in triplicate, and the percentage recoveries were calculated against R-rhPTH.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the electrophoretic conditions

To develop the CZE method, the experimental conditions were optimized. First, electrolyte solutions containing 25 mmol L^{-1} of di-sodium tetraborate, sodium acetate, potassium phosphate, tris (hydroxymethyl) aminomethane, sodium dihydrogen phosphate or 0.1 mol L^{-1} formic acid were tested for the analysis of rhPTH in biopharmaceutical formulations at a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sodium dihydrogen phosphate proved to be the best electrolyte. Next, the sodium dihydrogen phosphate was evaluated at concentrations of 25, 50, 75 and 100 mmol L^{-1} , which demonstrated a significant effect on the separation performance through its influence on the EOF and the current produced in the capillary. A 50 mmol L^{-1} solution was selected due to its low effect on current and non-significant increase on the migration time. Then, BGE solutions containing 50 mmol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate at pH between 2 and 4 were assayed to establish the optimum pH value. Higher

pHs resulted in peak tailing and increased migration time. A pH value of 3.0 provided better peak symmetry (about 1.26). The effect of the temperature on the separation was investigated at 20, 25, 30 and 35°C, and a temperature of 25°C was chosen due to short run time and acceptable current. The effect of voltage was assessed at 10, 20 and 30 kV, and a potential of 20 kV yielded short analysis time and acceptable current (about 56.5 μ A). The sample solutions were injected using a pressure mode at 50 mbar for 45 s. Electrophoretic buffers usually have a minimum background in the whole UV region, allowing the use of capillary electrophoresis techniques with detection at 190-215 nm, where many organic analytes absorb significantly, which limits the application of the chromatographic methods. Finally, the detection wavelength was examined from 190 to 400 nm, and a wavelength of 200 nm provided better sensitivity and signal-to-noise ratio. Typical electropherograms obtained by the proposed method with a migration time about 5.3 min are shown in Figs.1a; 1b.

Fig.1

3.2. CZE method validation

3.2.1. Specificity

The stability-indicating capability of the method for biopharmaceutical formulations was tested under basic conditions, which showed decrease of the area, and two additional peaks were detected at 5.1 and 5.9 min (Fig. 1c). Under the acidic condition, decrease of the area was observed, without any additional peak (Fig. 1d), indicating that UV was not able to detect the degradation products. The forced photolytic condition showed decrease of the area with three additional peaks at 4.8, 5.0 and 6.2 (Fig. 1e). The forced oxidative degradation studies exhibited one peak related to hydrogen peroxide at 7.2 min and three additional peaks

at 4.3, 4.9 and 6.5 min (Fig. 1f). The thermal hydrolysis condition resulted in a decrease of the area with one additional peak at 6.4 min (Fig. 1g). The specificity of the method was established by determining the peak purity of the analyte in the working R-rhPTH solution spiked with the IS, by overlaying the spectra captured at the apex, upslope and downslope using a PDA detector. Together with the peak purity index in the range of 0.9999-1, the data showed that the peak was free of any co-migrating peak, with no interference of excipients, thus confirming that the proposed method is specific for the analysis of rhPTH.

3.2.2. Linearity

Linearity was determined by constructing three calibration curves. For each calibration curve, nine concentrations of *R-rhPTH* solution ranging from 0.25-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and spiked with IS at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were employed. The value of the determination coefficient calculated by least-squares regression analysis ($r^2 = 0.9992$, $n=9$, $y = (0.0105 \pm 0.0001) x - (0.0222 \pm 0.0004)$), where, x is concentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$ and, y is the peak/area ratio between *R-rhPTH* and IS, indicated the linearity of the calibration curve for the method.

3.2.3. Precision

The precision was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) of the migration time and the peak/area ratio, for eight determinations at a concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD values obtained were 0.65 and 1.24% for the migration time and the peak/area ratio, respectively. To assess the intermediate precision two samples of the biopharmaceutical formulation were analyzed on three different days (inter-days) giving for the content/potency RSD values of 0.97 and 1.01%, respectively. The between-analysts precision was determined

by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples by three analysts; the mean values were 100.41 and 100.98% and the RSD values were 0.42 and 0.50%, respectively, as given in Table 1.

Table 1

3.2.4. Accuracy

Accuracy was assessed from three replicate determinations of three solutions of in-house mixtures of the excipients with known amounts of the biomolecule, containing 40, 50, and 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The absolute means obtained with a mean value of 100.28% and a bias lower than 0.85% (Table 2), proved that the method was accurate within the desired range.

Table 2

3.2.5. Detection and quantitation limits

The DL and the QL 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 0.12 and 0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The evaluated experimental QL with a precision lower than 5% and an accuracy within $\pm 5\%$ [21], was determined as 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, which is suitable as an alternative to the LC methods for quality control analysis.

3.2.6. Robustness

The robustness of the analytical procedure was determined by analyzing samples of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ R-rhPTH solution by the one-variable-at-a-time (OVAT) approach, in triplicate.

Table 3 show the results and the experimental range of the selected variables together with the optimized values. Additionally, robustness was evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach [22] at three levels (one unit per parameter up or down around optimized values). This procedure provided results for a minimum change in the maximum number of parameters at a time and constitutes a very useful, rapid, and efficient approach to determine robustness. The results obtained with the OVAT and MVAT procedures were within the acceptable deviation ($RSD < 2\%$), and an analysis of the variance showed non-significant differences ($p > 0.05$). When the analysis was performed with a wider level of variations for the solution pH, temperature, and voltage, the migration time changed as compared to optimized conditions. The peak symmetry values were also evaluated, but the differences were not significant ($p > 0.05$). The electropherogram pattern was not altered and different capillary batches also indicated robustness under the conditions tested. The stability of rhPTH in BGE was assessed after storage of the samples at 2-8°C for 48 h or placed in an auto sampler at room temperature for 24 h, showing non-significant changes ($< 2\%$) relative to freshly prepared samples, as indicated previously [23].

Table 3

3.2.7. System suitability

The suitability of the system was tested to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the intended analysis to be performed, using five replicate injections of R-rhPTH solution containing $50\ \mu\text{g mL}^{-1}$. The RSD values obtained for the migration time, peak area, peak symmetry and peak width were 0.59%, 1.12%, 1.48%, and 1.25%, respectively, as calculated by the standard deviation of the Gaussian function. The number of theoretical plates was approximately 65,935, with RSD of 1.07%. The experimental results showed that the parameters tested here were within the acceptable range ($RSD < 2\%$), indicating that the system is suitable for the intended analysis.

3.3. Application of the method

The validated CZE method was applied to assess the potency of rhPTH in biopharmaceutical formulations with the label claim of 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ calculated as 100%, and the results compared to those obtained using validated RP-LC and SE-LC methods, and an *in vitro* bioassay, giving mean differences of the estimated content/potencies of 0.61% and 1.31% higher and 0.86% lower, respectively, as shown in Table 4. The experimental values were statistically compared by analysis of the variance (ANOVA), which showed non-significant differences ($p>0.05$). Samples diluted and/or spiked to obtain concentrations of 50% and 150%, were also analyzed (Table 4), to demonstrate the capability of the CZE method. The potential demonstrated by the proposed method will be useful to evaluate rhPTH without prior separation of the excipients of the formulation, with the added advantages of small sample volumes, without the consumption of organic solvents, and a short analysis time.

Table 4

3.4. Determination of host-cell impurities

The mean concentrations of residual *E. Coli* host-cell DNA and proteins were assessed in the biopharmaceutical formulations giving values of 5.46 and 12.50 ng mL^{-1} , respectively. These process-related impurities may increase the potential risk of immunogenicity, and their determination is recommended, but the values for the acceptance criteria remain to be defined [24].

3.5. Assessment of biological potency

The potency of rhPTH was assessed by the UMR-106 cell culture assay based on the dose-dependent growth curve of the cells. The results were analyzed by the parallel line method, by using the CombiStats[®] software- EDQM (Strasbourg, France), showing mean values 0.86% higher as compared to the CZE method, as shown in Table 4, with non-significant difference, as calculated by the Student's t-test ($p > 0.05$).

Biopharmaceutical samples degraded as described under the specificity and analyzed by the CZE and LC methods, were subjected to the *in vitro* bioassay, which revealed significant ($p < 0.05$) effects on the potencies (Table 4). The agreement between the results of the different methods may represent an improvement, in attempts to develop alternative assays and to support biosimilarity studies [25].

3.6. Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity test was performed on the degraded forms giving mean $IC_{50} = 47.45 \pm 0.51 \mu\text{g mL}^{-1}$, $IC_{50} = 43.72 \pm 0.90 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $IC_{50} = 47.83 \pm 0.62 \mu\text{g mL}^{-1}$ for acidic, photolytic, and thermal conditions, respectively. Differences calculated by the Student's t test ($p < 0.05$) were significant as compared to the intact molecule, which gave IC_{50} of $65.64 \pm 1.35 \mu\text{g mL}^{-1}$. Such evaluations are now necessary, mainly due to the recent concerns about possible human undesirable effects resulting from the instability of the samples during storage [26].

4. Conclusions

The results of the validation studies show that the CZE method is sensitive with a QL of $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$, accurate with a mean value of 100.28%, linear ($r^2 = 0.9992$) and precise. The migration time for separation of rhPTH was 5.3 min. The method was successfully used for the analysis of biotechnology derived-products, showing mean differences of estimated content/potencies of 0.61%, 1.31% higher and 0.86% lower as compared to the RP-LC, SE-LC and to the *in vitro* bioassay, respectively, with significant correlation, as calculated by ANOVA ($p > 0.05$). The proposed method can be applied in combination with the UMR-106 cell culture bioassay, to monitor the stability, to improve the quality control, and to ensure the batch-to-batch consistency of bulk and finished biotechnology-derived medicine.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Brazilian National Research Council (CNPq) Projects 477013/2011 and 306898/2011-0, for financial support.

References

- [1] E. Quattrocchi, H. Kourlas, Teriparatide: A review, *Clin. Ther.* 26 (2004) 841-854.
- [2] M. Notelovitz, Osteoporosis: prevention, diagnosis and management, *Caddo: Professional Communications Inc.* 3 (1999) 1-255.
- [3] C. Meier, O. Lamy, M-A. Krieg, H-U. Mellinshoff, M. Felder, S. Ferrari, R. Rizzoli, The role of teriparatide in sequential and combination therapy of osteoporosis, *Swiss Med. Wkly.* (2014) 144:w13952.
- [4] W. Chunxiao, L. Jingjing, X. Yire, L. Jingning, K. Kai, S. Liang, L. Yi, B. Rasco, Biosynthesis of a novel recombinant peptide derived from hPTH (1-34), *Protein Expr. Purif.* 79 (2011) 156-163.
- [5] J. F. Reidhaar-olson, R. M. Davis, J. A. de Souza-Hart, H. E. Selick, Active variants of human parathyroid hormone (1-34) with multiple amino acid substitutions, *Mol. Cell. Endocrinol.* 160 (2000) 135-147.
- [6] Y. Nakao, T. Koike, Y. Ohta, T. Manaka, Y. Imai, K. Takaoka, Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 3',5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Bone* 44 (2009) 872-877.
- [7] A. Hohenstein, M. Hebell, H. Zikry, M. E. Ghazaly, F. Mueller, J. Rohde, Development and validation of a novel cell-based assay for potency determination of human parathyroid hormone (PTH), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98 (2014) 345-350.
- [8] A. Diress, B. Lorbetskie, L. Larocque, X. Li, M. Alteen, R. Isbrucker, M. Girard, Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3297-3306.
- [9] B. E. Almeida, R. Damiani, J. E. Oliveira, S. L. Dalmora, P. Torjesen, P. Bartolini, M. T. C. P. Ribela, Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination, *Anal. Methods* 6 (2014) 6688-6694.

- [10] S. Fekete, A. Beck, J. L. Veuthey, D. Guillarme, Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 161-173.
- [11] A. Pichette, N. Drouin, M. Girard, Analysis of human parathyroid hormone (1-84) products separation of a major impurity on synthetic products by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 890 (2000) 127-133.
- [12] M. Kamberi, P. Chung, R. Devas, L. Li, Z. Li, X. Ma, S. Fields, C. M. Riley, Analysis of non-covalent aggregation of synthetic hPTH (1-34) by size-exclusion chromatography and the importance of suppression of non-specific interactions for a precise quantitation, *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 151-155.
- [13] E. E. Chambers, M. E. Lame, J. Bardsley, S. Hannam, C. Legido-Quigley, N. Smith, K. J. Fountaind, E. Collins, E. Thomas, High sensitivity LC-MS/MS method for direct quantification of human parathyroid 1-34 (teriparatide) in human plasma, *J. Chromatogr. B* 938 (2013) 96-104.
- [14] J.P. Landers, *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3, Taylor & Francis Group, New York, Boca Raton, USA (2007) 80-83.
- [15] S. El Deeb, H. Wätzig, D. A. El-Hady, C. S. Griend, G. K. E Scriba, Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis (2013-2015), *Electrophoresis* 37 (2016) 1591-1608.
- [16] D. H. Na, K. C. Lee, Capillary electrophoretic characterization of PEGylated human parathyroid hormone with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 331 (2004) 322-328.
- [17] U.S. Department of Health and Human Services, *Guidance for industry, Analytical Procedures and Methods Validation for Drug and Biologics*, Food and Drug Administration, 2015.
- [18] F. P. Stamm, G. Z. Calegari, G. W. Freitas, R. B. Souto, L. P. Porto, C. D. A. Cardoso, S. L. Dalmora, Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays, *Analyst* 138 (2013) 1419-1426.
- [19] H. F. Wang, W. F. Jin, J. J. Gao, H. Sheng, Changes of biological functions of bone cells and effects of anti-osteoporosis agents on bone cells. In: L. Qin, H. K. Genant, J. F. Griffith, K. S. Leung (eds.), *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bones and Scaffold Materials*, Springer, Berlin (2007) 205-222.
- [20] G. W. Freitas, R. F. Perobelli, F. P. Stamm-Maldaner, B. Xavier, D. A. Dalmora, V. G. Schramm, S. L. Dalmora, Evaluation of botulinum toxin type A by bioassays and a validated reversed-phase liquid chromatography method, *Anal. Methods* 8 (2016) 587-592.

- [21] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2), 6.2., 2003.
- [22] R. Injac, M. Boskovic, N. Kocevar, T. Vovk, 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, *Anal. Chim. Acta* 620 (2008) 150-161.
- [23] G.A. Shabir, W.L. Lough, S.A. Arain, T.K. Bradshaw, Evaluation and application of best practice in analytical method validation, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 311–333.
- [24] The United States Pharmacopeia (USP 39), 2016, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.
- [25] M. Weise, P. Kurki, E. Wolff-Holz, M-C. Bielsky, C. K. Schneider, Biosimilars: The science of extrapolation, *Blood* 124 (2014) 3191-3196.
- [26] C. Pineda, G. C. Hernández, I. A. Jacobs, D. F. Alvarez, C. Carini, Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals, *BioDrugs* 30 (2016) 195-206.

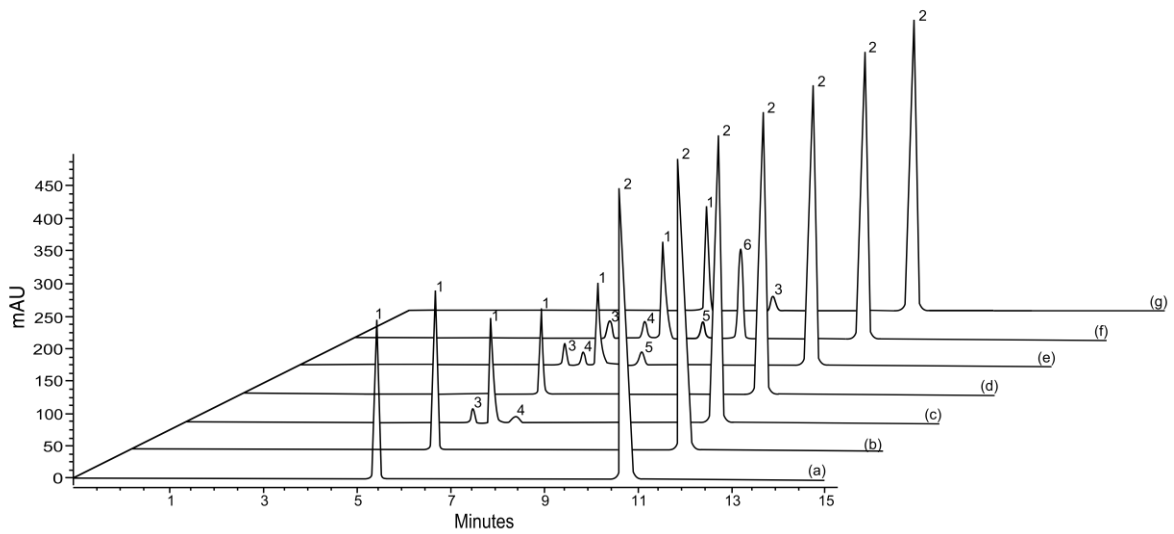


Fig. 1. Representative CZE electropherograms showing peak 1 = rhPTH; peak 2 = internal standard (IS); peaks 3, 4, and 5 = degraded forms; peak 6 = hydrogen peroxide. (a) *R-rhPTH*; (b) Sample of biopharmaceutical formulation. *R-rhPTH* following degradation under conditions of: (c) basic hydrolysis, (d) acid hydrolysis, (e) photolytic, (f) oxidative, and (g) thermal hydrolysis.

Table 1. Inter-days and between-analysts precision data of CZE for rhPTH (1-34) in biopharmaceutical formulations

Sample	Inter-days			Between-analysts		
	Days	Concentration found ^a (%)	RSD ^b (%)	Analysts	Concentration found ^a (%)	RSD ^b (%)
1	1	100.91	0.97	A	99.92	0.42
	2	99.30		B	100.63	
	3	99.16		C	100.68	
2	1	101.26	1.01	A	100.41	0.50
	2	99.81		B	101.35	
	3	101.79		C	101.19	

^aMean of three replicates.

^bRSD = relative standard deviation.

Table 2. Accuracy of CZE for determination of rhPTH (1-34) in the formulations.

Nominal concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mean measured concentration ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
40	40.34	0.49	100.85	0.85
50	50.23	1.26	100.46	0.46
60	59.72	0.14	99.53	-0.47

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

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

Table 3. CZE conditions and range investigated during the robustness test by the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure

Variable	Values	rhPTH ^a (%)	RSD ^b (%)	Migration time (min)	RSD ^b (%)	Symmetry	RSD ^b (%)	Optimized condition
BGE solution pH	2.6	100.35	0.95	5.23	1.15	1.43	0.91	3.0
	2.8	100.31	0.89	5.40	0.99	1.52	1.23	
	3.0	100.55	0.21	5.27	0.36	1.18	0.54	
	3.2	99.86	1.24	5.52	0.72	1.39	0.85	
	3.4	99.80	1.36	5.34	0.81	1.27	1.36	
BGE (mM)	46	100.36	1.50	5.24	1.08	1.71	1.18	50
	48	100.74	0.91	5.56	0.74	1.68	0.62	
	50	100.15	0.37	5.33	0.52	1.29	0.23	
	52	100.25	0.88	5.41	0.96	1.52	0.48	
	54	99.97	0.92	5.37	1.37	1.54	0.75	
Temperature (°C)	21	98.85	0.32	5.49	0.91	1.45	0.84	25
	23	99.39	0.33	5.42	0.85	1.30	1.36	
	25	99.24	0.28	5.21	0.20	1.12	0.42	
	27	100.32	0.45	5.58	0.69	1.18	1.17	
	29	100.10	0.56	5.38	0.94	1.29	1.03	
Voltage (kV)	16	100.71	1.54	5.44	1.26	1.86	0.78	20
	18	101.13	0.92	5.08	1.02	1.74	0.66	
	20	100.78	0.30	5.31	0.67	1.23	0.36	
	22	99.43	1.09	5.43	0.90	1.59	0.84	
	24	100.52	0.88	5.54	1.35	1.90	0.99	

Injection time (s)	41	101.39	1.82	5.56	0.65	1.25	1.82	45
	43	100.41	1.41	5.41	0.44	1.52	0.94	
	45	99.97	0.64	5.26	0.16	1.18	0.69	
	47	100.86	1.03	5.31	0.57	1.44	1.31	
	49	101.14	1.50	5.44	0.93	1.92	1.74	
Wavelength (nm)	196	99.82	1.13	5.35	0.74	1.68	1.39	200
	198	100.66	0.94	5.33	0.57	1.55	1.12	
	200	100.23	0.59	5.24	0.45	1.34	0.70	
	202	99.71	1.09	5.53	0.96	1.52	1.26	
	204	100.50	0.85	5.51	1.18	1.47	0.80	

^aMean of three replicates.

^bRSD = relative standard deviation.

Table 4. Comparative content/potency evaluation of rhPTH (1-34) in biopharmaceutical formulations by the CZE, RP-LC, and SE-LC methods and the bioassay.

Sample	Theoretical Amount (µg)	CZE ^a		RP-LC ^a		SE-LC ^a		<i>In vitro</i> bioassay ^b	
		Found (%)	Charged-variant forms (%)	Main peak (%)	Sulfoxides (%)	Monomer (%)	Aggregates/dimer (%)	Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)
1	250	101.83	0.58	101.58	0.45	102.06	0.12	103.34	94.30-112.20
2	250	99.45	0.84	100.39	0.73	99.24	0.35	101.57	93.80-110.70
3	250	99.64	2.15	97.42	1.94	98.42	0.97	100.15	92.60-107.50
4	250	102.31	0.39	103.26	0.27	101.39	0.08	102.88	93.30-111.80
5	250	96.57	5.27	94.14	4.86	92.85	3.74	96.25	87.20-104.40
6	250	101.78	0.96	99.75	1.12	100.12	0.49	100.94	91.60-110.60
7	250	107.66	0.29	106.91	0.33	104.66	0.16	108.56	98.10-118.30
8	250	99.19	2.54	98.64	2.29	98.27	1.28	100.21	92.70-109.70
9	250	100.42	0.48	100.15	0.54	99.53	0.53	101.72	91.30-109.20
10	250	98.80	1.63	99.23	1.39	97.95	2.04	100.63	91.50-109.60
Mean	-	100.76	1.51	100.15	1.39	99.45	0.98	101.62	-
SD ^b	-	2.96	1.53	3.40	1.40	3.10	1.15	3.11	-
							ANOVA		F calculated
							Between-methods		0.86
11 ^c	-	51.36	25.57	50.84	19.86	49.93	16.24	54.80	41.90-71.30
11 ^d	-	151.74	0.53	150.19	0.31	148.42	0.19	155.00	122.90-196.20
11 ^e	-	89.42	4.12	90.68	5.09	88.34	3.21	76.60	56.20-103.90
11 ^f	-	92.55	4.24	91.57	3.85	91.28	2.96	80.10	60.70-105.40
11 ^g	-	72.56	12.62	71.23	10.28	69.33	8.45	75.30	60.30-93.70
11 ^h	-	84.27	5.37	82.91	7.16	82.79	3.54	81.10	57.00-115.00

^aMean of three replicates.^bSD = Standard deviation.^c50%.^d150%.^eBasic hydrolysis.^fAcid hydrolysis.^gPhotolytic condition.^hThermal condition.

ARTIGO 2

5 ARTIGO 2

5.1 –Fernanda P. S. Maldaner, Bruna Xavier, Rafaela F. Perobelli, Gabriel L. Remuzzi, Luís G. J. Motta and Sérgio L. Dalmora. Analysis of Recombinant Human Parathyroid Hormone by *In Vitro* Bioassay and Chromatographic Methods. (Artigo submetido em 27/03/2017, para a revista **Latin American Journal of Pharmacy**).

Analysis of Recombinant Human Parathyroid Hormone by *In Vitro* Bioassay and Chromatographic Methods

Fernanda P. S. MALDANER², Bruna XAVIER², Rafaela F. PEROBELLI², Gabriel L. REMUZZI¹, Luís G. J. MOTTA¹ & Sérgio L. DALMORA^{1*}

¹ *Department of Industrial Pharmacy &*

² *Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences,
Federal University of Santa Maria
97.105-900 – Santa Maria-RS, Brazil*

SUMMARY. Recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34) is an anabolic agent that induces bone formation, and it is clinically used to treat osteoporosis at high risk of fractures. The *in vitro* UMR-106 cell culture assay, based on the cell proliferation, or on the ALP activity, was applied in conjunction with validated RP-LC, SE-LC and CZE methods to evaluate altered proteins and for the content/potency assessment, showing non-significant differences ($p > 0.05$). These methods combination represents an advance toward the establishment of alternative approaches, to improve quality control ensuring the therapeutic efficacy of rhPTH biotechnology-derived medicines.

INTRODUCTION

Human parathyroid hormone (hPTH) is a polypeptide of 84 amino acids that maintains serum calcium and phosphate ion homeostasis by binding and activating the type 1 PTH receptor (PTHr1) through direct effects on bone and kidney^{1,2}.

Teriparatide, recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34), is expressed in *Escherichia Coli* and is recommended clinically to treat osteoporosis at high risk of fractures in postmenopausal women, primary or hypogonadal osteoporosis in men and osteoporosis glucocorticoid-induced in adults. It is established that daily subcutaneous injection of rhPTH stimulates bone formation, improving bone micro architecture and fracture healing³⁻⁵. Recently, studies have investigated the role of clinical application of teriparatide in the treatment of periodontal disease^{6,7}.

The polypeptide structure of rhPTH consists of 34 amino acids with a molecular mass of 4.1 kDa, and isoelectric point of 8.2. It contains both the structural determinants of the biological activity and the receptor-binding region of the full length hPTH (1-84)⁸.

Biological activity of variants and fusion form of soluble rhPTH were evaluated by *in vitro* cell culture bioassay based on the stimulation of adenylate cyclase activity in rat UMR-106 cells^{9,10}. UMR-106 cell line was also employed in the biological characterization of the WHO standard for PTH 1-34, and to assess rhPTH potency in biopharmaceutical formulations, showing significant reduced bioactivity for dimers/aggregates and sulphoxides forms^{11,12}. To assess the bioactivity of oxidized products of rhPTH, cyclic adenosine mono-phosphate (cAMP) was determined in ROS 17/2.8-5 rat osteosarcoma cells by immunoassay¹³. Another *in vitro* cell culture bioassay that employs MC3T3-E1 cells was

used to evaluate cAMP levels following the addition of PTH¹⁴. A bioassay based on the HEK293 cell line was described for the potency assessment of rhPTH to measure a neutralizing antibody against rhPTH¹⁵. Alkaline phosphatase (ALP), a biochemical marker of bone formation, has been investigated showing increase of the activity in bone cell lines, such as Saos-2, PDL and MC3T3-E1, in response to PTH¹⁶⁻¹⁹.

Currently, a variety of analytical techniques, mostly based on physicochemical properties, have been recommended for the assessment of identity, purity, and content/potency of proteins obtained through recombinant DNA technology. Besides it is crucial to evaluate the physicochemical and biological properties that can be regarded as critical quality attributes throughout the whole product lifecycle, which includes characterization and formulation studies, manufacturing process and shelf life²⁰. Among these techniques, liquid chromatography (LC) has proven to be particularly useful for the analysis of therapeutic proteins and peptides, and a combination of physicochemical, immunological, and biological methods has been applied also to correlation studies²¹⁻²⁵.

This study aimed to carry out *in vitro* UMR-106 cell culture assay to assess the potency of rhPTH (1-34), to correlate the results with those of validated reversed-phase (RP-LC) and size-exclusion (SE-LC) liquid chromatography and capillary zone electrophoresis (CZE) methods. Thus, contribute to the development of alternative assays to improve the quality control of biotechnology-derived products.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

The Reference Reagent Parathyroid Hormone, human rDNA derived, (R-rhPTH WHO 04/200), was obtained from the National Institute

for Biological Standards and Control-NIBSC (Herts, UK). A total of six batches of Fortéo® Colter Pen (Eli Lilly, São Paulo, Brazil), containing 250 µg mL⁻¹ of rhPTH were identified by numbers from 1 to 6. The samples were acquired from commercial sources within their shelf life period. Fetal bovine serum, dimethyl sulfoxide (DMSO), DMEM medium, McCoy's 5A modified medium and thiazolyl blue formazan (MTT), were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Colorimetric Alkaline Phosphatase Kit was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Sodium dihydrogenphosphate, acetonitrile, methanol, sodium sulphate anhydrous, phosphoric acid, sodium acetate anhydrous and mannitol, used as reagents or excipients were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All 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 from Millipore (Bedford, MA, USA).

Apparatus

LC methods were carried out on a Shimadzu LC system (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, CTO-10A_{VP} column oven and a SPD-M10A_{VP} PDA detector. Peak areas were automatically integrated by computer using a Shimadzu Class VP® V 6.14 software program.

CE experiments were performed on an Agilent ^{3D}CE apparatus Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) consisting of a photodiode array (PDA) detector, a temperature-controlling system (4-60°C) and a power supply able to deliver up to 30 kV. The CE ChemStation software was used for instrument control, data acquisition and analysis. The pH of the solutions was measured using a pH-meter, Thermo Orion Model 420 (Beverly, MA, USA).

Samples and standard solutions

Working standard and sample solutions of rhPTH were prepared daily by diluting the R-rhPTH and the samples of biopharmaceutical formulations (250 µg mL⁻¹) to 50 µg mL⁻¹ with BGE solution for the CZE, and to 50 and 40 µg mL⁻¹ with the mobile phases for the RP-LC and SE-LC methods, respectively; and to final concentrations between 0.01025 µg mL⁻¹ and 0.082 µg mL⁻¹ of rhPTH in DMEM culture medium Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), for UMR-106 cell culture assays.

UMR-106 cell culture assay

Cell proliferation assay

The assay was based on the growth-promoting activity of the rat osteoblast-type cell line, UMR-106 (ATCC number CRL-1661), with a

modification of the method described elsewhere^{12,26}. The cells were maintained in DMEM culture medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), in 75cm² flasks. The cells were seeded in 96-well cell culture plates (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at a density of 1.0×10^5 cells mL⁻¹ (total of 3×10^4 cells well⁻¹) and dosed upon seeding with four concentrations (two-fold dilutions series) of rhPTH between 0.01025 µg mL⁻¹ and 0.082 µg mL⁻¹, in triplicate, as a parallel line assay. The R-rhPTH was used as the standard and the control was DMEM medium. Briefly, the plates were incubated at 37°C, 5% v/v CO₂, for 48 hours. Then, 50 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 100 µL per well of dimethyl sulfoxide (DMSO) for a further 3 h, the absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader, Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland). The biological potency was calculated by the parallel line statistical method using the CombiStats software (EDQM, Council of Europe), against the R-rhPTH (WHO 04/200).

ALP activity

The assay was performed as described elsewhere²⁷ and adjusted, based on the alkaline phosphatase (ALP) activity determined on the UMR-106 cell line. The cells were maintained as described above and were seeded in 24-well cell culture plates BD Biosciences (San Jose, CA, USA) at a density of approximately 1.0×10^4 cells mL⁻¹ well⁻¹ for 16h and dosed on seeding by using four concentrations (two fold dilutions series) of rhPTH (1-34), between 0.01025 and 0.082 µg mL⁻¹ during 6h, as a parallel line assay. The R-rhPTH was used as the standard and the control was DMEM medium. Then the medium was changed and the cells were incubated at 37°C, under 5% CO₂, for up to 48h without rhPTH. The same cycle was repeated 3 times during nine consecutive days. Then the cells were trypsinized and transferred in triplicate to the 96-well plate. The ALP activity was determined based on the hydrolysis of p-nitrophenylphosphate to p-nitrophenol using an Alkaline Phosphatase Colorimetric Assay Kit Abcam (Cambridge, UK). The absorbance was assessed at 405 nm, as described above.

LC methods

Chromatographic methods were performed as described elsewhere¹². The validated RP-LC method was carried out on a reversed-phase Agilent (Santa Clara, CA, USA) Zorbax 300 SB C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a pore size of 300 Å) maintained at 40°C. The elution was performed using a gradient at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹ with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. Mobile phase A consisted of 0.1 M sodium sulphate

buffer, pH 2.3, and mobile phase B was acetonitrile. The injection volume was 20 μL of a solution containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for both the standard and samples.

The experiments by SE-LC method 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. The mobile phase consisted of 0.1 M phosphoric acid, pH 2.5, run isocratically at a flow rate of 0.7 mL min^{-1} with PDA detection at 214 nm. The injection volume was 30 μL of a solution containing 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

CZE method

The validated CZE method was performed as described elsewhere²⁸. A fused-silica capillary (i.d. of 50 μm ; effective length of 40 cm) was used at 25°C; the applied voltage was 20 kV. The Background electrolyte solution consisted of 50 mmol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate solution at pH 3.0. Solution containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for both standard R-rhPTH and samples were injected using the pressure mode at 50 mbar for 45 s and detection, with PDA set at 200 nm.

Analyzes of rhPTH in biopharmaceutical formulations

To determine the content/potency and altered forms of rhPTH by CZE, RP-LC and SE-LC methods, the samples of biopharmaceutical formulations were injected in triplicate, and the percentage recoveries calculated against R-rhPTH.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of *in vitro* bioassay

The cell proliferation and the ALP activity were assessed on UMR-106 (rat osteoblast-type cells, ATCC number CRL-1661), showing high proliferation of cells and ALP activity expression in a dose-dependent manner. The assays were optimized under a variety of bioassay parameters, such as: fetal bovine serum concentration, cell concentration and time of exposure to rhPTH.

The results indicated that low concentrations of rhPTH stimulate cell proliferation and ALP activity in UMR-106 cells. Previous studies have demonstrated that PTH treatment for 6h resulted in significant increase of mRNA ALP expression, compared to non-stimulated controls¹⁸. Besides, it was observed that intermittent PTH (1-34) treatment promoted proliferation of bone mesenchymal stromal cells²⁹. In addition, treatment with high doses affected the responses, as also demonstrated by continuous exposure to bovine PTH (bPTH), that resulted in reduction of cell proliferation, alkaline phosphatase activity and the number of mineralized calcium nodules¹⁹.

The dose-response curves were constructed plotting the experimental values of absorbances and ALP activity (nmolwell^{-1}) versus the concentrations of rhPTH in triplicate, respectively, for the cell proliferation and ALP activity assays. The analytical curves of the assay with different endpoint were found to be linear over the range 0.01025 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - 0.082 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The determination coefficient of UMR-106 cell proliferation assay calculated from $y = -3.8823x + 0.9898$, was $r^2 = 0.9967$, and the determination coefficient of ALP activity assay calculated from $y = -18.5680x + 2.2760$, was $r^2 = 0.9875$, which confirmed the linearity of the dose-response curves of the assays.

Biological potency assessment

The potency of rhPTH was assessed by the UMR-106 cell culture assay showing mean difference of the estimated potencies 2.47% lower for the cell proliferation assay as compared to the ALP activity endpoint assay (Table 1), with non-significant differences, as calculated by the Student's *t*-test ($p > 0.05$).

Table 1

Physicochemical analyzes

A typical eletropherogram and chromatograms obtained by the applied CZE, RP-LC and SE-LC methods were demonstrated in Figure 1.

Figure 1

The CZE, RP-LC and SE-LC methods were applied for the determination of rhPTH in the same batches of biotechnology-derived products, giving mean differences of the estimated content/potencies of 0.56% and 0.20% higher, and 0.12% lower compared to a mean value obtained by the combination of the two endpoints of the cell culture bioassay (Table 2), respectively, with significant correlation ($p > 0.05$), as calculated by analysis of variance (ANOVA).

The results obtained for charged variants forms, sulphoxides and aggregates/dimmer were lower than 7.58%, 5.86% and 2.73%, as determined by CZE, RP-LC and SE-LC methods, respectively (Table 2). Thus, the agreement between the results of the methods may represent an improvement in attempts to develop alternative assays, to evaluate the profiles and the consistency of batches in clinical use, and to support biosimilarity studies of the biomolecule³⁰.

Table 2**CONCLUSIONS**

The *in vitro* UMR-106 cell culture assay was successfully applied for the analysis of rhPTH in biopharmaceutical formulations. In addition, the results were compared to those obtained by CZE, RP-LC and SE-LC methods used to evaluate also the presence of altered proteins, which can cause possible human undesirable effects and lower biological activity³¹. The combination of *in vitro* bioassay and physicochemical methods are suggested to the characterization and to monitor the stability of rhPTH in biopharmaceutical formulations; thus contributing to improve quality control, and thereby assure the therapeutic efficacy of the biotherapeutic.

Acknowledgments. The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Project 477013/2011 and 306898/2011, for the support.

REFERENCES

- Habener, J. F., M. Rosenblatt & J.T. Potts Jr (1984) Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol. Rev.* **64**: 985-1053.
- Gardella, T.J. & H. Juppner (2000) Interaction of PTH and PTHrP with their receptors. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **1**: 317-329.
- M. Notelovitz (1999), Osteoporosis: prevention, diagnosis and management, Caddo: Professional Communications Inc. **3**: 1-255.
- Quattrocchi, E. & H. Kourlas (2004) Teriparatide: a review. *Clin. Ther.* **26**: 841-854.
- Meier, C., O. Lamy, M-A. Krieg, H-U. Mellinghoff, M. Felder, S. Ferrari, *et al.* (2014) The role of teriparatide in sequential and combination therapy of osteoporosis, *Swiss Med. Wkly.* **144**:w13952.
- Grover, H. S., S.Luthra & S. Maroo (2013) Teriparatide: a novel means to ultimately achieve true regeneration!!! *J. Clin. Diagn. Res.*, **7**:1820-1823.
- Agarwal, S. K., V.Gupta, R. Jhingran, V. K. Bains, R. Madan & I.Rizvi (2014). Role of Novel Adjunct Teriparatide in Periodontal Regeneration: A Current Update. *Asian J. of Oral Health Allied Sci.*, **4**:7-10.
- Chunxiao, W., L. Jingjing, X. Yire, L. Jingning, K. Kai, S. Liang, *et al.* (2011) Biosynthesis of a novel recombinant peptide derived from hPTH(1-34), *Protein Expr. Purif.* **79**: 156-163.
- Reidhaar-olson, J. F., R. M. Davis, J. A. de Souza-Hart & H. E. Selick (2000) Active variants of human parathyroid hormone (1-34) with multiple amino acid substitutions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **160**:135-147.
- Hamedifar, H., F. Salamat, M. Saffarion, M. Ghiasi, A. Hosseini, H. Lahiji, *et al.* (2013) A Novel Approach for High Level Expression of Soluble Recombinant Human Parathyroid Hormone (rhPTH 1-34) in *Escherichia coli*. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **5**:193-201.
- Rafferty, B. & R.E. Gains-Das (2007) "WHO international collaboration study of the proposed 1st international standard for parathyroid hormone 1-34, recombinant human". Available at (WHO/BS/07.2063).
- Stamm, F.P., G.Z. Calegari, G.W. Freitas, R.B. Souto, L.P. Porto, Cardoso Jr, *et al.* (2013) Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays, *Analyst* **138**: 1419 –26.
- Nabuchi, Y., E. Fujiwara, K. Ueno, H. Kuboniwa, Y. Asoh & H. Ushio (1995) Oxidation of recombinant human parathyroid hormone: Effect of oxidized position on the biological activity, *Pharmaceut. Res.* **12**:2049-2052.
- Nakao, Y., T. Koike, Y. Ohta, T. Manaka, Y. Imai & K. Takaoka (2009) Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone*, **44**:872-877.
- Hohenstein, A., M. Hebell, H. Zikry, M. E. Ghazaly, F. Mueller & J. Rohde (2014) Development and validation of a novel cell-based assay for potency determination of human parathyroid hormone (PTH) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **98**: 345-350.
- Chen, W.F. & M.S. Wong (2006) Genistein modulates the effects of parathyroid hormone in human osteoblastic SaOS-2 cells, *Br. J. Nutr.* **95**: 1039-1047.
- Eastell, R. & R.A. Hannon (2008) Biomarkers of bone health and osteoporosis risk, *Proc Nutr Soc.* **67**: 157-162.

18. Wolf, M., A. Jager, N. Abuduwali, W. Gotz & S. Lossdorfer (2013) Continuous PTH modulates alkaline phosphatase activity in human PDL cells via protein kinase C dependent pathways in vitro, *Ann. Anat.* **195**:455-460.
19. Liu, S., W. Zhu, S. Li, T. Cui, Z. Li, B. Zhang, et al. (2015) The effect of bovine parathyroid hormone withdrawal on MC3T3-E1 cell proliferation and phosphorus metabolism, *PLOS ONE***10**: e0120402
20. Espinosa-de La Garza, C.E., M.P. Miranda-Hernández, L. Acosta-Flores, N.O. Pérez, L.F. Flores-Ortiz & E. Medina-Rivero (2015), Analysis of therapeutic proteins and peptides using multiangle light scattering coupled to ultra high performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* **38**:1537-1543.
21. Almeida, B.E., R. Damiani, J.E. Oliveira, S.L. Dalmora, P. Torjesen, P. Bartolini, et al. (2014) Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. *Anal. Methods* **6**: 6688 – 6694.
22. Souto, R.B., F.P. Stamm, J.B. Schumacher, C.D.A. Cardoso Jr, G.W. Freitas, R.F. Perobelli et al. (2014) 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***123**: 179-185.
23. The United States Pharmacopeia, USP 39 (2016) Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.
24. Cardoso Jr, C. D. A., R. F. Perobelli, B. Xavier, F. P. S. Maldaner, F. S. Silva & S. L. Dalmora (2017) Analysis of streptokinase by validated liquid chromatography methods and correlation with an in vitro bioassay. *J. Sep. Sci.*,**40**: 407-414.
25. Schramm, V.G., B. Xavier, M. E. Walter, V.G. Perlin, L.G.J. Motta, L.C. Cardoso & S. L. Dalmora (2017) Analysis of Insulin Glargine in Biopharmaceutical Formulations by Validated RP-LC and SE-LC Methods. *Lat. Am. J. Pharm.*,**36**:332-339.
26. Wang, W.F, W. F. Jin, J. J. Gao, H. Sheng, Changes of biological functions of bone cells and effects of anti-osteoporosis agents on bone cells. In: L. Qin, H. K. Genant, J. F. Griffith, K. S. Leung (eds.), *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bones and Scaffold Materials*, Springer, Berlin (2007) 205-222.
27. Ishizuya, T., S. Yokose, M. Hori; T. Noda, T. Suda, S. Yoshikiet al. (1997) Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J. Clin. Invest.* **99**: 2961-2970.
28. Maldaner, F.P.S., R.F. Perobelli, B. Xavier, G.L. Remuzzi, M.E. Walter & S.L. Dalmora (2017) Evaluation of recombinant human parathyroid hormone by CZE method and its correlation with in vitro bioassay and LC methods. *Talanta***162**:567-573.
29. Chen, B., T. Lin, X. Yang, Y. Li, D. Xie & H. Cui (2016) Intermittent parathyroid hormone (1-34) application regulates cAMP-response element binding protein activity to promote the proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stromal cells, via the cAMP/PKA signaling pathway. *Exp. Ther. Med.***11**: 2399-2406.
30. Weise, M., P. Kurki, E. Wolff-Holz, M.C. Bielsky & C.K. Schneider (2014) Biosimilars: The science of extrapolation. *Blood* **124**: 3191–3196.
31. Pineda, C., G.C. Hernández, I.A. Jacobs, D.F. Alvarez & C. Carini (2016) Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *BioDrugs***30**:195-206.

Sample	Theoretical amount ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ALP activity assay ^a		Cell proliferation assay ^a	
		Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)	Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)
1	250	101.13	87.20-113.50	98.82	93.50-103.80
2	250	109.47	97.70-120.30	106.75	99.80-111.60
3	250	99.65	87.40-110.70	101.51	94.20-106.30
4	250	95.82	83.90-106.20	91.27	86.70-97.90
5	250	103.38	90.10-113.80	97.36	91.30-102.60
6	250	100.55	89.60-111.50	99.49	95.70-105.50
Mean	-	101.67	-	99.20	-
SD ^b	-	4.55	-	5.08	-

Table 1. Potency evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations by UMR-106 cell culture assays. ^aMean of three replicates. ^bSD, Standard deviation.

Sample	Theoretical	CZE ^a		RP-LC ^a		SE-LC ^a	
	amount (µg)	Main peak (%)	Charged-variants Forms (%)	Main peak (%)	Sulphoxides (%)	Monomer (%)	Aggregates/Dimmer (%)
1	250	100.82	0.75	99.81	0.53	101.96	0.12
2	250	108.25	0.12	107.62	0.16	107.28	0.04
3	250	99.84	1.23	100.29	0.32	98.34	0.84
4	250	93.61	7.58	93.67	5.86	91.72	2.73
5	250	102.65	0.38	101.93	0.29	102.61	0.02
6	250	100.77	1.15	100.47	0.64	99.97	0.37
Mean	-	100.99	1.87	100.63	1.30	100.31	0.69
SD ^b	-	4.72	2.83	4.47	2.24	5.18	1.05

Table 2. Comparative content/potency evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations by CZE, RP-LC and SE-LC methods. ^aMean of three replicates. ^bSD, Standard deviation.

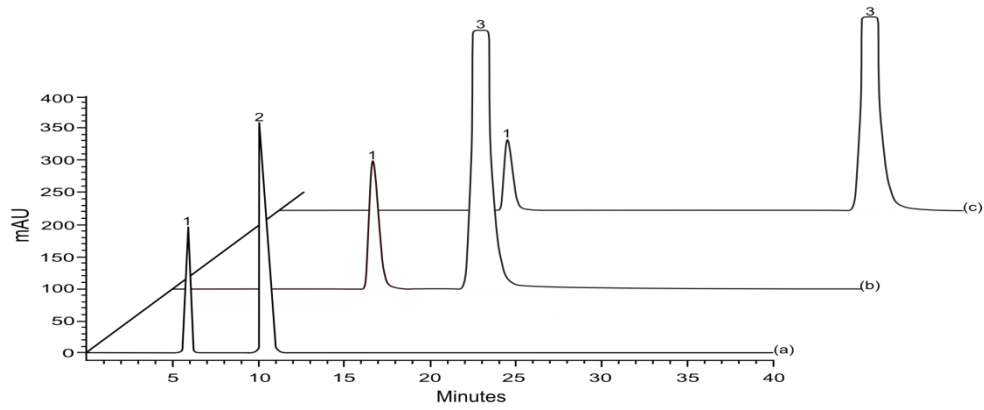
Figure 1**Figure Captions**

Figure 1. Analysis of rhPTH (1-34) in biopharmaceutical formulations by CZE, RP-LC and SE-LC methods, showing peak 1= rhPTH; peak 2= internal standard; peak 3= excipient. **(a)** CZE electropherogram, **(b)** RP-LC chromatogram and **(c)** SE-LC chromatogram.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os produtos biológicos produzidos pela tecnologia do DNA recombinante têm viabilizado avanços importantes na área da saúde pública. Entretanto, devido à sua origem e estrutura complexa necessitam da combinação de métodos físico-químicos, biológicos e imunológicos para avaliar sua identidade, pureza, teor/potência e estabilidade. Assim, destaca-se a importância da pesquisa e validação de métodos analíticos para o controle da qualidade dos produtos acabados, para garantir a sua segurança e eficácia terapêutica, bem como viabilizar estudos de comparabilidade de biofármacos.

A avaliação da potência dos produtos biotecnológicos é realizada através de bioensaios, que expressam sua atividade biológica. Para o hormônio da paratireóide humano recombinante a potência biológica tem sido determinada por bioensaios *in vitro*, entre os quais se destacam o da avaliação da atividade proliferativa em células UMR-106 e o da determinação de AMPc em linhagens de células osteoblásticas UMR-106, Saos-2 e HEK293 (PARSONS et al., 1973; REIDHAR-OLSON et al., 2000; STAMM et al., 2013b; HOHENSTEIN et al., 2014).

A avaliação de teor/potência, determinação de proteínas relacionadas e compostos de alta massa molecular de rhPTH (1-34) em formulações biofarmacêuticas foi realizada previamente pelos métodos por CL-FR e CL-EM, que demonstraram correlação significativa com o bioensaio *in vitro* da atividade proliferativa em células UMR-106 (STAMM et al., 2013b).

Recentemente, foi introduzida na farmacopeia americana a monografia para solução concentrada de teriparatida, que descreve métodos por CL-FR para avaliação de teor/potência e determinação de proteínas relacionadas de rhPTH, respectivamente. A monografia não apresenta métodos para determinação de dímeros e agregados e variantes de carga de rhPTH. A quantificação dessas formas alteradas tem sido recomendada para outros produtos biotecnológicos, tais como somatropina, insulina glargina e filgrastima. Deste modo, os métodos por CL-EM e ECZ validados por este grupo de pesquisa para avaliação de rhPTH em produtos biofarmacêuticos são os únicos disponíveis atualmente na literatura (STAMM et al., 2013b; USP 39, 2016, MALDANER et al., 2017).

O método por CL-FR previamente validado apresenta vantagens, entre as principais, pode-se citar: determinação simultânea do teor/potência e das proteínas relacionadas de rhPTH em produto biofarmacêutico e menor tempo de retenção do pico principal referente ao

rhPTH ($T_R = 12,8$ minutos) se comparado aos métodos farmacopeicos preconizados para solução concentrada, cujos tempos de retenção do pico principal da teriparatida variam entre 7,5 e 11,7 minutos no método para determinação de proteínas relacionadas e entre 19,8 e 24,8 minutos para determinação de teor/potência. Destaca-se também que o tampão sulfato de sódio é utilizado em menor concentração, o que evita a precipitação de sais no equipamento e consequentemente, o entupimento de válvulas e oscilações da pressão.

A discussão apresentada a seguir está baseada no **ARTIGO 1**, publicado na revista *Talanta* e no **ARTIGO 2**, submetido para a revista *Latin American Journal of Pharmacy*.

No **ARTIGO 1** desenvolveu-se e validou-se método por ECZ para caracterização e avaliação de rhPTH em produtos biofarmacêuticos. A separação eletroforética foi obtida no tempo de migração 5,3 min (Figura 1). A geração de picos adicionais, relativos a formas degradadas, realizada sob condições de estresse e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmam a especificidade do método, conforme pureza do pico do rhPTH demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 0,25 a 250 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 = 0,9992$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária, demonstrados na Tabela 1, forneceram CV inferiores a 1,24% 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 para determinação da exatidão do método, com média de 100,28%, confirmando exatidão significativa. Os teores/potências obtidos nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstra a Tabela 3. Por sua vez, parâmetros de adequabilidade do sistema foram avaliados, observando-se que os resultados obtidos cumpriram especificações preconizadas além de CV inferiores a 2%, garantindo, assim, que as condições do método foram adequadas para assegurar a confiabilidade dos resultados (ICH, 2005; USP 39, 2016). O método desenvolvido e validado por ECZ cumpre os requisitos preconizados pelos compêndios oficiais, podendo ser empregado para caracterização e determinação de teor/potência da rhPTH em produtos biofarmacêuticos.

Para o estudo de correlação entre os métodos, dez lotes de produtos biofarmacêuticos com teor declarado de rhPTH de 250 $\mu\text{g/mL}$ e com data de validade vigente foram analisados pelos métodos validados por ECZ, CL-FR, CL-EM e pelo bioensaio em células UMR-106 (Tabela 4). Observou-se que os teores/potências de rhPTH determinados nos produtos biofarmacêuticos pelo método por ECZ foram em média 0,61% e 1,31% superiores, em relação aos métodos por CL-FR e CL-EM, e 0,86% inferiores quando comparados ao

bioensaio em células UMR-106, respectivamente, com diferenças não significativas, conforme calculado estatisticamente por ANOVA ($p > 0,05$).

Adicionalmente, executou-se o ensaio de citotoxicidade *in vitro*, com a linhagem de células NCTC, no qual foram utilizadas amostras de rhPTH submetidas previamente a condições de estresse e amostras íntegras, a fim de avaliar a toxicidade comparativa. Os resultados obtidos demonstraram médias de $CI_{50} = 47,45 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$, $CI_{50} = 43,72 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} = 47,83 \pm 0,62 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, para as degradações formadas sob às condições de estresse ácida, fotolítica e térmica, com diferenças significativas comparadas à forma intacta de rhPTH, que apresentou $CI_{50} = 65,64 \pm 1,35 \mu\text{g/mL}$, conforme calculado pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

Também realizou-se a determinação de impurezas da célula hospedeira em produtos biofarmacêuticos de rhPTH (1-34) por ELISA. As concentrações médias determinadas de DNA e proteínas de *E.coli* em produtos biofarmacêuticos de rhPTH (1-34) foram de 5,46 e 12,50 ng/mL, respectivamente. Até o momento não existem especificações para o teor de impurezas da célula hospedeira em produtos biofarmacêuticos de rhPTH em compêndios oficiais, apenas recomendação para sua determinação nos produtos. Além disso, é importante para demonstrar a pureza em estudos de comparabilidade de biossimilares.

No **ARTIGO 2** avançou-se no estudo de bioensaio *in vitro* em células UMR-106 para avaliação de potência de rhPTH (1-34) em produtos biofarmacêuticos com base na avaliação de respostas de proliferação celular e no aumento da atividade da ALP.

Os ensaios por cultura de células para avaliação de rhPTH têm sido executados com base no mecanismo de ação do hormônio, que ao se ligar ao receptor PTHR1 ativa a adenilato ciclase, enzima intracelular que resulta no aumento da concentração de AMPc. Desse modo, a resposta do ensaio é baseada na determinação de AMPc por ELISA ou com detecção por fluorescência (DIETRICH et al., 1976; LJUNGGREN et al., 1992; REIDHAAR-OLSON et al., 2000; HOHENSTEIN et al., 2014).

O ensaio de proliferação celular com corante MTT foi otimizado, e os resultados de potência foram avaliados pelos coeficientes de variação calculados após modificações na concentração celular, tempo de incubação com rhPTH e concentração de soro fetal bovino. Paralelamente foi desenvolvido o bioensaio *in vitro* da atividade da ALP em células UMR-106, baseado na resposta clínica de formação óssea após tratamento intermitente de baixas doses de rhPTH. Estudos prévios demonstraram que a ALP é um biomarcador de formação óssea que aumenta a sua atividade em células osteoblásticas após tratamento com PTH (CHEN; WONG, 2006; EASTELL; HANNON, 2008; WOLF et al., 2013; LIU et al., 2015).

As respostas obtidas pelos ensaios de proliferação celular e da atividade da ALP após exposição ao rhPTH em células UMR-106 apresentaram regressão linear significativa na faixa de concentração de 0,01025 – 0,082 µg/mL, com coeficientes de determinação de $r^2 = 0,9967$ e $r^2 = 0,9875$, respectivamente. Os bioensaios de proliferação celular e da atividade da ALP em células UMR-106 foram aplicados para avaliação de potência de rhPTH em seis lotes de produtos biofarmacêuticos, conforme pode ser observado na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre as médias de teor/potência obtidas através dos bioensaios com diferentes respostas biológicas, conforme calculado pelo teste t de Student ($p > 0,05$).

Os mesmos lotes foram avaliados pelos métodos previamente validados por CZE, CL-FR e CL-EM, que forneceram os resultados apresentados na Tabela 2. Os perfis de separação eletroforética e cromatográficas das amostras biofarmacêuticas estão demonstrados na Figura 1. Nos estudos de correlação com o bioensaio *in vitro*, observou-se que os teores/potências foram em média 1,79%, 1,43% e 1,11% superiores, em relação ao ensaio de proliferação, e 0,68%, 1,04% e 1,36% inferiores, em relação ao ensaio da atividade da ALP, respectivamente, com diferença não significativa, conforme calculado estatisticamente por ANOVA ($p > 0,05$). No artigo submetido, optou-se por comparar os resultados do bioensaio *in vitro*, expressos como a média das potências determinadas pela avaliação da proliferação celular e da atividade da ALP, com os métodos físico-químicos.

Os métodos por CZE, RP-LC e SE-LC também foram aplicados para determinação de variantes de carga, sulfóxidos e dímeros e agregados de rhPTH em produtos biofarmacêuticos, apresentando resultados inferiores a 7,58%, 5,86% e 2,73%, respectivamente. Ainda não existem especificações farmacopeicas que estabeleçam os limites aceitáveis para variantes de carga, sulfóxidos e dímeros e agregados de rhPTH em produtos biofarmacêuticos. No entanto, sua determinação é importante na rotina de controle de qualidade lote-a-lote dos produtos bioterapêuticos acabados uma vez que estas formas alteradas podem apresentar atividade biológica reduzida, conforme demonstrado inclusive em estudos de degradação com a biomolécula do PTH, e efeitos imunogênicos (FRELINGER et al., 1984; NABUCHI et al., 1995; WADHWA et al., 2015; PINEDA et al., 2016).

Os produtos biofarmacêuticos podem apresentar heterogeneidade lote-a-lote uma vez que apresentam alta massa molecular e estruturas moleculares complexas devido ao seu processo de produção por meio de sistemas de expressão heteróloga, bactérias, leveduras ou células de mamíferos. Assim, os métodos analíticos usuais são incapazes de isoladamente avaliar estas moléculas suficientemente para confirmar a sua equivalência estrutural com o fármaco de referência. Desse modo, justifica-se o uso em conjunto dos ensaios biológicos e

métodos físico-químicos a fim de representar a tecnologia do estado-da-arte para caracterização e estudos de comparabilidade, bem como para aprimorar o controle de qualidade dos produtos biofarmacêuticos, assegurando a sua segurança e eficácia terapêutica (SCHELLEKENS; MOORS, 2010; KÁLMÁN-SZEKERES et al., 2012; WHO, 2013; EMA, 2014; WEISE et al., 2014).

Sugere-se, portanto, que o método desenvolvido e validado por ECZ e o bioensaio *in vitro* em células UMR-106 sejam adotados em combinação com os métodos por CL-FR e CL-EM para a avaliação de teor/potência e pureza do rhPTH (1-34), durante as etapas do processo de expressão e purificação, para o controle da qualidade do produto biofarmacêutico acabado e para viabilizar estudos de biossimilares (EMA, 2014; FDA, 2015b).

Neste contexto, os resultados alcançados contribuem para aprimorar o controle da qualidade através da melhor caracterização da biomolécula, ampliando os procedimentos disponíveis e contribuindo para garantir a eficácia terapêutica e segurança do produto biotecnológico de rhPTH disponível no país.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- ✓ Executaram-se métodos por cromatografia líquida em fase reversa e por exclusão molecular, previamente validados, para avaliação de teor/potência e formas alteradas dos produtos biotecnológicos de rhPTH, viabilizando também estudos de correlação.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por eletroforese capilar de zona específico, preciso, exato e robusto para avaliação do hormônio da paratireóide humano recombinante, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para avaliação de teor/potência e variantes de carga.
- ✓ Estudou-se a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos físico-químicos validados por ECZ, CL-FR e CL-EM para as amostras selecionadas, observando-se diferença não significativa entre os resultados dos métodos ($p > 0,05$).
- ✓ Realizaram-se estudos de citotoxicidade *in vitro* nas células da linhagem NCTC através da avaliação dos efeitos das amostras submetidas à degradação fotolítica, ácida e térmica, em relação à molécula íntegra, demonstrando-se aumento do efeito citotóxico.
- ✓ Avaliou-se a presença de impurezas de *E.coli* por ELISA nos produtos biofarmacêuticos. Demonstraram-se parâmetros de qualidade e segurança, contribuindo para o domínio de tecnologias que viabilizem avaliações de bioequivalentes.
- ✓ Estudou-se o bioensaio da proliferação celular e da atividade da fosfatase alcalina em células UMR-106 para avaliação de potência rhPTH em produtos biofarmacêuticos. Os resultados dos bioensaios foram correlacionados com os métodos validados por ECZ, CL-FR e CL-EM, observando-se correlação significativa ($p > 0,05$).

- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, e de comparabilidade da biomolécula, contribuindo assim para aprimorar o controle da qualidade e avanços na área de produtos biotecnológicos disponíveis e em pesquisa no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S. K., GUPTA, V., JHINGRAN, R., BAINS, V. K., MADAN, R., RIZVI, I. Role of novel adjunct Teriparatide in periodontal regeneration: A current update. **Asian Journal of Oral Health and Allied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 7-10, 2014.

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, n. 1, p. 90-97, 2010.

ALMEIDA, B. E.; DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J. E. ; DALMORA, S. L.; TORJESEN, P.; 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, n. 17, p. 6688-6694, 2014.

ANDRIOLO, A.; MOREIRA, S. R.; SILVA, L. A.; CARVALHO, A. B. D.; VIEIRA, J. G. H.; GHIRINGHELLO, M. T.; JULIANO, Y. Cálcio ionizado no soro: estimativa do intervalo de referência e condições de coleta. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 2, p. 85-89, 2004.

BINKLEY, N.; BONE, H.; GILLIGAN, J. P.; KRAUSE, D. S. Efficacy and safety of oral recombinant calcitonin tablets in postmenopausal women with low bone mass and increased fracture risk: a randomized, placebo-controlled trial. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 11, p. 2649-2656, 2014.

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.

BRATS – Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Eficácia e segurança do uso de Bisfosfonatos por longo prazo para prevenção de fraturas osteoporóticas em mulheres na pós-menopausa, v. 7, n. 21, p. 1-14 2013.

CARDOSO JR, C. D. A.; PEROBELLI, R. F.; XAVIER, B.; MALDANER, F. P. S.; DA SILVA, F. S.; DALMORA, S. L. Analysis of streptokinase by validated liquid chromatography methods and correlation with an in vitro bioassay. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 2, p. 407-414, 2017.

CASTLE, P. Replacement, reduction, refinement (3rs) Animal welfare progress in European Pharmacopoeia monographs. **Pharmeuropa**, v. 19, p. 430-440, 2007.

CHAMBERS, E. E.; LAME, M. E.; BARDSLEY, J.; HANNAM, S.; LEGIDO-QUIGLEY, C.; SMITH, N.; FOUNTAIND, K. J.; COLLINS, E.; THOMAS, E. High sensitivity LC-MS/MS method for direct quantification of human parathyroid 1-34 (teriparatide) in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 938, n. 1, p. 96-104, 2013.

CHEN, W. F.; WONG, M. S. Genistein modulates the effects of parathyroid hormone in human osteoblastic SaOS-2 cells. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 6, p. 1039-1047, 2006.

CHEN, B.; LIN, T.; YANG, X.; LI, Y.; XIE, D.; CUI, H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) application regulates cAMP-response element binding protein activity to promote the proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stromal cells, via the cAMP/PKA signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 6, p. 2399-2406, 2016.

CHUNXIAO, W.; JINGJING, L.; YIRE, X.; MIN, D.; ZHAOHUI, W.; GAOFU, Q.; XIANGCHUN, S.; XUEJUN, W.; JIE, W.; TAIMING, L. Study on preparation and activity of a novel recombinant human parathyroid hormone (1-34) analog with N-terminal Pro-Pro extension. **Regulatory Peptides**, v. 141, n. 1-3, p. 35-43, 2007.

CHUNXIAO, W.; JINGJING, L.; YIRE, X.; JINGNING, L.; KAI, K.; LIANG, S.; YI, L.; RASCO, B. Biosynthesis of a novel recombinant peptide derived from hPTH (1-34). **Protein Expression and Purification**, v. 79, n. 1, p. 156-163, 2011.

COLE, D. E. C.; WEBB, S.; CHAN, P. Update on parathyroid hormone: New tests and new challenges for external quality assessment. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 9-10, p. 585-590, 2007.

COSMAN, F.; DE BEUR, S. J.; LEBOFF, M. S.; LEWIECKI, E. M.; TANNER, B.; RANDALL, S.; LINDSAY, R. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359-2381, 2014.

COSMAN, F.; HATTERSLEY, G.; HU, M. Y.; WILLIAMS, G. C.; FITZPATRICK, L. A.; BLACK, D. M. Effects of abaloparatide-SC on fractures and bone mineral density in subgroups of postmenopausal women with osteoporosis and varying baseline risk factors. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 1, p. 17-23, 2017.

DIETRICH, J. W.; CANALIS, E. M.; MAINA, D. M.; RASZ, L. G. Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro: effects of parathyroid hormone and calcitonin. **Endocrinology**, v. 98, n. 4, p. 943-949, 1976.

EASTELL, R.; HANNON, R. A. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 2, p. 157-162, 2008.

EMA – European Medicines Agency. “**Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1)**”. London, December 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.

EUROPEAN Pharmacopoeia 8.0th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2014.

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.

FEKETE, S.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: theory and applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 9-27, 2012.

FÓRTEO[®] COLTER PEN: Solução injetável. Responsável técnico Márcia A. Preda. São Paulo, São Paulo- Brasil. Laboratório Eli Lilly do Brasil, 2014. Bula de remédio.

FRELINGER, A. L.; ZULL, L. G. Oxidized forms of parathyroid hormone with biological activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5507-5513, 1984.

GIROTRA, M., RUBIN, M. R., BILEZIKIAN, J. P. The use of parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 7, n. 1-2, p. 113-121, 2006.

GOLTZMAN, D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 173-177, 1999.

GONNELLI, S; CAFFARELLI, C. Abaloparatide. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 106-109, 2016.

GRACITELLI, M. E. C.; VIDORIS, A. A. C.; LUBA, R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Paratormônio e osteoporose: Encontrando o fio da meada. Bases fisiológicas para utilização do PTH no tratamento da osteoporose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 3, p. 215-220, 2002.

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

GROVER, H. S.; LUTHRA, S.; MAROO, S. Teriparatide: a novel means to ultimately achieve true regeneration!!!. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 8, p. 1820-1823, 2013.

GULLBERG, B.; JOHNELL, O.; KANIS, J. A. World-wide projections for hip fracture. **Osteoporosis International**, v. 7, n. 5, p. 407-413, 1997.

GUNTURI, S. R.; GHOBRIAL, I.; SHARMA, B. Development of a sensitive size exclusion HPLC method with fluorescence detection for the quantitation of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 213-221, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Guanabara Koogan, 2002.

HAMANN, K.; LANE, N. Parathyroid hormone update. **Rheumatic Disease Clinics**, v. 32, n. 4, p. 703-719, 2006.

HAMEDIFAR, H.; SALAMAT, F.; SAFFARION, M.; GHIASI, M.; HOSSEINI, A.; LAHIJI, H.; NOURI, Z.; ARFAE, H.; MAHBOUDI, F. A novel approach for high level expression of soluble recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34) in *Escherichia coli*. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 193-201, 2013.

HÄMMERLE, S. P.; MINDEHOLM, L.; LAUNONEN, A.; KIESE, B.; LOEFFLER, R.; HARFST, E.; AZRIA, M.; ARNOLD, M.; JOHN, M. R. The single dose pharmacokinetic profile of a novel oral human parathyroid hormone formulation in healthy postmenopausal women. **Bone**, v. 50, n. 4, p. 965-973, 2012.

HEMPE, J. M. Protein Analysis by Capillary Electrophoresis. In: LANDERS, J.P. (Coord.). Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques. 3. ed. CRC Press, 2008. cap.2, p. 80-83.

HENRIKSEN, K.; NEUTZSKY-WULFF, A. V.; BONEWALD, L. F.; KARSDAL, M. A. Local communication on and within bone controls bone remodeling. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1026-1033, 2009.

HOFF, A. O.; COTE, G. J.; GAGEL, R. F. Calcitonin. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (Coord.). Osteoporosis. 2. ed. Academic Press, 2001. cap.8, p. 247-255.

HOHENSTEIN, A.; HEBELL, M.; ZIKRY, H.; GHAZALY, M. E.; MUELLER, F.; ROHDE, J. Development and validation of a novel cell-based assay for potency determination of human parathyroid hormone (PTH). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 345-350, 2014.

HU, Z.; NIU, H.; YANG, X.; SANG, G.; LI, B. Recombinant human parathyroid hormone 1-34: pharmacokinetics, tissue distribution and excretion in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, n. 2, p. 144-154, 2006.

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.

ISHIZUYA, T.; YOKOSE, S.; HORI, M.; NODA, T.; SUDA, T.; YOSHIKI, S.; YAMAGUCHI, A. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n.12, p. 2961- 2970, 1997.

JING, C.; HONGYING, S.; SHUQING, C. Identification of recombinant human parathyroid hormone (1-34) by nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of analytical chemistry**, v. 34, n. 5, p. 603-607, 2006.

JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 12, p. 1726-1733, 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto e Atlas*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KÁLMÁN-SZEKERES, Z.; OLAJOS, M.; GANZLER, K. Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 185-195, 2012.

KAMBERI, M.; CHUNG, P.; DEVAS, R.; LI, L.; LI, Z.; MA, X.; FIELDS, S.; RILEY, C. M. Analysis of non-covalent aggregation of synthetic hPTH (1-34) by size-exclusion chromatography and the importance of suppression of non-specific interactions for a precise quantitation. **Journal of chromatography B**, v. 810, n. 1, p. 151-155, 2004.

KANIS, J. A. WHO Technical Report, University of Sheffield, UK: 66, 2007.

KITTUR, S. D.; HOPPENER, J. W.; ANTONARAKIS, S. E.; DANIELS, J. D.; MEYERS, D. A.; MAESTRI, N. E.; JANSEN, M.; KORNELUK, R. G.; NELKIN, B. D.; KAZAZIAN, H. H. Linkage map of the short arm of human chromosome 11: location of the genes for catalase, calcitonin, and insulin-like growth factor II. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 15, p. 5064-5067, 1985.

LIAO, S.; QIE, J-K.; XUE, M.; ZHANG, Z-Q.; LIU, K-L.; RUAN, J-X. Metabolic stability of human parathyroid hormone peptide hPTH (1-34) in rat tissue homogenates: kinetics and products of proteolytic degradation. **Amino Acids**, v. 38, n. 5, p. 1595-1605, 2010.

LIN, W-P.; LIN, J. Parathyroid hormone for osteoporosis treatment. **Formosan Journal of Musculoskeletal Disorders**, v. 2, p. 113-117, 2011.

LINDSAY, R.; NIEVES, J.; FORMICA, C.; HENNEMAN, E.; WOELFERT, L.; SHEN, V.; DEMPSTER, D.; COSMAN, F. Randomized controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. **The Lancet**, v. 350, n. 9077, p. 550-555, 1997.

LJUNGGREN, O.; JOHANSSON, H.; LERNER, U. H.; LINDH, E.; LJUNGHALL, S. Effects of parathyroid hormone on cyclic AMP-formation and cytoplasmic free Ca^{2+} in the osteosarcoma cell line UMR-106-01. **Bioscience Reports**, v. 12, n.3, p. 207-2014, 1992.

LIU, S.; ZHU, W.; LI, S.; CUI, T.; LI, Z.; ZHANG, B.; LI, Z.; WU, J.; LIANG, X.; LIN, Z.; SHI, W. The effect of bovine parathyroid hormone withdrawal on MC3T3-E1 cell proliferation and phosphorus metabolism. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1-12, 2015.

MACHADO, F. T.; MALDANER, F. P. S.; PEROBELLI, R. F.; XAVIER, B.; DA SILVA, F. S.; DE FREITAS, G. W.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.; DALMORA, S. L. Evaluation of

an in vitro cell culture assay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, v. 44, n. 2, p. 113-120, 2016.

MALDANER, F. P. S.; PEROBELLI, R. F.; XAVIER, B.; REMUZZI, G. L.; WALTER, M. E.; DALMORA, S. L. Evaluation of recombinant human parathyroid hormone by CZE method and its correlation with in vitro bioassay and LC methods. **Talanta**, v. 162, n. 1, p. 567-573, 2017.

MEIER, C.; LAMY, O.; KRIEG, M-A.; MELLINGHOFF, H-U.; FELDER, M.; FERRARI, S.; RIZZOLI, R. The role of teriparatide in sequential and combination therapy of osteoporosis. **Swiss Medical Weekly**, 144:w13952, 2014.

MOHAN, S.; KUTILEK, S.; ZHANG, C.; SHEN, H. G.; KODAMA, Y.; SRIVASTAVA, A. K.; WERGEDAL, J. E.; BEAMER, W. G.; BAYLINK, D. J. Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone (1-34), (1-31), and (2-34) in mice. **Bone**, v. 27, n. 4, p. 471-478, 2000.

MOK, S. K.; CHEN, W. F.; LAI, W. P.; LEUNG, P. C.; WANG, X. L.; YAO, X. S.; WONG, M. S. Icariin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR-106. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 4, p. 939-949, 2010.

MOLINA, P.E. *Fisiologia Endócrina-4*. AMGH Editora, 2014.

NA, D. H.; LEE, K. C. Capillary electrophoretic characterization of PEGylated human parathyroid hormone with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, n. 2, p. 322-328, 2004.

NABUCHI, Y.; FUJIWARA, E.; UENO, K.; KUBONIWA, H.; ASOH, Y.; USHIO, H. Oxidation of recombinant human parathyroid hormone: Effect of oxidized position on the biological activity. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 12, p. 2049-2052, 1995.

NAKAO, Y.; KOIKE, T.; OHTA, Y.; MANAKA, T.; IMAI, Y.; TAKAOKA, K. Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 3',5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Bone**, v. 44, n. 5, p. 872-877, 2009.

NATPARA[®] (rhPTH [1-84]) for injection: A replacement for endogenous parathyroid hormone(1-84) for the long term treatment of hypoparathyroidism. NPS Pharma, 2014.

NEER, R. M.; ARNAUD, C. D.; ZANCHETTA, J. R.; PRINCE, R.; GAICH, G. A.; REGINSTER, J. Y.; HODSMAN, A. B.; ERIKSEN, E. F.; ISH-SHALOM, S., GENANT, H. K.; WANG, O.; MITLAK, B. H. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 19, p. 1434-1441, 2001.

NISSENSON, R. A. Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (Coord.). *Osteoporosis*. 2. ed. Academic Press, 2001. cap.7, p. 221-246.

NOF - National Osteoporosis Foundation. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Washington, DC: **National Osteoporosis Foundation**, 2014.

OBORA, S.; KUROSAWA, T. Implementation of the Three Rs in biomedical research – has the turn of the century turned the tide? **ATLA: Alternative Laboratory Animals**, v. 37, n. 2, p. 197-207, 2009.

PARSONS, J. A.; REIT, B.; ROBINSON, C. J. A bioassay for parathyroid hormone using chicks. **Endocrinology**, v. 92, n. 2, p. 454-462, 1973.

PATEL, C.; RANGREZ, A.; PARIKH, P. The anti-osteoporotic effect of *Moringa oliefera* on osteoblastic cells: SaOS 2. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 10-17, 2013.

PICHETTE, A.; DROUIN, N.; GIRARD, M. Analysis of human parathyroid hormone (1-84) products separation of a major impurity on synthetic products by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 890, n. 1, p. 127-133, 2000.

PINEDA, C.; HERNÁNDEZ, G. C.; JACOBS, I. A.; ALVAREZ, D. F.; CARINI, C. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. **BioDrugs**, v. 30, n. 3, p. 195-206, 2016.

QUATTROCCHI, E.; KOURLAS, H. Teriparatide: A review. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 841-854, 2004.

REIDHAAR-OLSON, J. F.; DAVIS, R. M., DE SOUZA-HART, J. A.; SELICK, H. E. Active variants of human parathyroid hormone (1-34) with multiple amino acid substitutions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 160, n. 1-2, p. 135-147, 2000.

ROZENBERG, S.; VANDROMME, J.; ANTOINE, C. Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n.4, p. 216-227, 2013.

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.

SANTOS, P. S.; OLIVEIRA, M. A.; FELIX, V. B. Osteonecrose maxilofacial induzida por bisfosfonatos em indivíduos com osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 5, p. 495-499, 2011.

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

SCOTLAND, M. G.; WAUGH, N.; ROYLE, P.; MCNAMEE, P.; HENDERSON, R.; HOLLICK, R. Denosumab for the prevention of osteoporotic fractures in post-menopausal women. **Pharmacoeconomics**, v. 29, n. 11, p. 951-961, 2011.

SEIBEL, M. W.; LADE, D. A.; HARTKE, J. R.; WEHMEYER, K. R. Validation and application of an immunoradiometric assay for the determination of human parathyroid hormone fragment 1-34 in dog plasma following subcutaneous and intravenous administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1699-1707, 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.

SILBERNAGEL, S; DESPOPOULOS, A. Fisiologia Texto e Atlas. 5. ed. Artes Médicas, 2003.

SOBIESZCZANSKA, M.; JONKISZ, J.; TABIN, M.; LASZKI-SZCZACHOR, K. Osteoporosis: genetic determinants and relationship with cardiovascular disease. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 22, p. 119–124, 2013.

SOUTO, R. B.; STAMM, F. P.; SCHUMACHER, J. B.; CARDOSO JR., 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.

SOUTO, R. **Estudos analíticos para caracterização e avaliação de interleucina-11 humana recombinante**. 2015. 80f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SOWIŃSKA-PRZEPIERA, E.; ANDRYSIK-MAMOS, E.; JARZĄBEK-BIELECKA, G.; FRIEBE, Z.; SYRENICZ, A. Effects of estrogen deficiency on bone mineralization in girls during adolescent crisis. **Endokrynologia Polska**, v. 62, n. 6, p. 538-546, 2011.

STAMM, F. P.; CALEGARI, G. Z.; FREITAS, G. W.; SOUTO, R. B.; PORTO, L. P.; CARDOSO, C. D.; DALMORA, S. L. Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays. **Analyst**, v. 138, n. 5, p. 1419-1426, 2013a.

STAMM, F. P. **Estudo de metodologias para avaliação do hormônio da paratireóide humano recombinante**. 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013b.

STYGAR, D.; MURAVITSKAYA, N.; ERIKSSON, B.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, n.1, p. 40, 2003.

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

ULLOA-AGUIRRE, A.; STANISLAUS, D.; JANOVICK, J. A.; CONN, P. M. Structure-activity relationships of G protein- coupled receptors. **Archives of Medical Research**, v. 30, n. 6, p. 420-435, 1999.

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

WADHWA, M.; KNEZEVIC, I.; KANG, H. N.; THORPE, R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: an overview of assays and their utility. **Biologicals**, v. 43, n. 5, p. 298-306, 2015.

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

WOLF, M.; JÄGER, A.; ABUDUWALI, N.; GOETZ, W.; LOSSDOERFER, S. Continuous PTH modulates alkaline phosphatase activity in human PDL cells via protein kinase C dependent pathways in vitro. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 195, n. 5, p. 455-460, 2013.

WHO – World Health Organization: **Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs) WHO Technical Reports Series No 977**, 2013.

XINDU, G.; LILI, W. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs. **Journal of Chromatography B**, v. 866, n. 1/2, p. 133-153, 2008.

YAMAMOTO, K.; WATANABE, T.; GOCHOU, T.; SAITO, K. Comparative study of human-PTH (1-84) and human-PTH (1-34) in the chick hypercalcemia bioassay. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 12, p. S135-S137, 1994.

YIN, J.; CHU, J-W.; RICCI, M. S.; BREMS, D. N.; WANG, D. I. C.; TROUT, B. L. Effects of antioxidants on the hydrogen peroxide-mediated oxidation of methionine residues in granulocyte colony-stimulating factor and human parathyroid hormone fragment 13-34. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 12, p. 2377-2383, 2004.