

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

Bruna Xavier

**AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA/TEOR DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A
POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOENSAIOS**

Santa Maria, RS
2018

Bruna Xavier

**AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA/TEOR DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A POR
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOENSAIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS
2018

Bruna Xavier

**AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA/TEOR DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A POR
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOENSAIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 24 de julho de 2018:

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

Letícia Beatriz Matter, Pós doutorado (URI)

Fernanda Pavani Stamm Maldaner, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Deus, pela vida, força, coragem e proteção, por propiciar-me esta oportunidade e colocar em meu caminho pessoas tão especiais.

Ao Professor Sérgio, pela orientação, amizade, confiança, auxílio e ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Mario e Lara, e minha irmã Caroline, pelo amor, apoio e incentivo, pois, mesmo distantes, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao Felipe, meu namorado, pelo amor, companheirismo, apoio, compreensão e por estar ao meu lado em mais uma etapa importante da minha vida.

Aos colegas e amigos do Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos (CTEFAR), pela amizade, parceria, cooperação e contribuição na realização deste trabalho.

À minha família e amigos, pelo apoio, incentivo e palavras de carinho.

Aos professores do Departamento de Farmácia Industrial e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Tecnologia e Ciência (FATEC), pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por viabilizar a execução deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse se tornar realidade, expresso a minha sincera gratidão.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA/TEOR DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOENSAIOS

AUTORA: Bruna Xavier
ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

A toxina botulínica tipo A (BoNTA) é um dos 7 diferentes sorotipos de toxinas, produzidas através de processo de fermentação com *Clostridium botulinum*, sob condições anaeróbicas. O produto biotecnológico tem sido utilizado nas áreas terapêutica e cosmética, para inibir a hipercontração muscular e hipersecreção glandular. No presente trabalho foi desenvolvido e validado método por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) para a avaliação de BoNTA em formulações de produtos biofarmacêuticos. Foi utilizada coluna TSKgel® G3000 SW_{XL} (300 mm x 7,8 mm d.i.) mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, eluída em vazão isocrática de 1,0 mL min⁻¹ e com detecção por arranjo de diodos (DAD) em 220 nm. O tempo de retenção da BoNTA foi de 13,5 min. A curva de calibração foi linear na faixa de concentração de 0,29 – 100 U mL⁻¹ ($r^2 = 0,9998$) e os limites de detecção e quantificação foram de 0,08 e 0,29 U mL⁻¹, respectivamente. A especificidade foi verificada e confirmada por estudos de degradação forçada, avaliação da interferência dos excipientes da formulação e pureza dos picos. A média da exatidão foi de 100,41%, com erro relativo inferior a 0,93. O método por CL-EM foi aplicado para determinação de teor/potência e das proteínas de alta massa molecular de BoNTA e os resultados foram comparados com os obtidos por cromatografia líquida em fase reversa, previamente validado, com o ensaio por cultura de células T-47D *in vitro* e o bioensaio da DL₅₀ *in vivo* observando-se diferenças das médias de teor/potência 0,87% superior, 0,36% inferior e 0,71% superior, respectivamente. As formas agregadas apresentaram redução significativa da atividade biológica e efeitos de citotoxicidade *in vitro* ($p < 0,05$). Neste contexto, é infatizada a pesquisa de métodos alternativos de acordo com os 3 Rs e contribuiu-se para estabelecer procedimentos para avaliar a qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biotecnológico.

Palavras-chave: Toxina botulínica tipo A (BoNTA). Ensaio da DL₅₀. Cultura de células T-47D. Cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM). Cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR). Validação.

ABSTRACT

CONTENT/POTENCY ASSESSMENT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A BY CHROMATOGRAPHIC METHODS AND BIOASSAYS

AUTHOR: Bruna Xavier
ADVISER: Sérgio Luiz Dalmora

The botulinum toxin type A is one of the seven different serotypes of toxins produced by fermentation process with *Clostridium botulinum*, under anaerobic conditions. Biotechnological product has been used in therapeutic and cosmetic areas to inhibit the muscle hypercontraction and glandular hypersecretion. In the present study, it was developed and validated a size exclusion liquid chromatography (HPSEC) method to evaluate BoNTA in formulations of biopharmaceutical products. The analyses were performed on a TSKgel® G3000 SW_{XL} column (300 mm x 7.8 mm i.d.) maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 50 mM potassium phosphate, pH 7.0, run isocratically at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ with photodiode array detection (PDA) set at 220 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time of 13.5 min. The calibration curve was linear over the concentration range of 0.29 – 100 U mL⁻¹ ($r^2 = 0.9998$) and the limits of detection and quantitation were 0.08 and 0.29 U mL⁻¹, respectively. The specificity was confirmed by forced degradation studies, interference of the excipients and peaks purity. The mean of accuracy was 100.41%, with bias lower than 0.93. The SE-LC method was applied to assess the content/potency and high-molecular-weight-proteins of BoNTA, and the results were compared with those of the reversed phase liquid chromatography (RP-LC) method previously validated, the T-47D cell culture *in vitro* bioassay and the mouse LD₅₀ *in vivo* bioassay, giving mean values of content/potency of 0.87% higher, 0.36% lower and 0.71% higher, respectively. Aggregated forms showed significant decrease of the bioactivity and significant effects on the cytotoxicity ($p < 0.05$). In this context, the research of alternative methods according to the 3 Rs is emphasized and this study contributes to establish procedures to evaluate the quality, assuring the safety and therapeutic efficacy of biotechnological product.

Keywords: Botulinum toxin type A (BoNTA). LD₅₀ assay. T-47D cell culture. Size exclusion liquid chromatography (SE-LC). Reversed phase liquid chromatography (RP-LC) Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

- FIGURA 1 – Estrutura tridimensional da BoNTA..... 17
FIGURA 2 – Mecanismo de ação da BoNTA..... 18

ARTIGO CIENTÍFICO

- FIGURA 1 – SE-LC chromatograms showing peak 1 = HSA; peak 2 = BoNTA; peaks 3 and 4 = HMW proteins. (a) Biological reference substance, (b) sample of a biopharmaceutical formulation, (c) after neutral hydrolysis, (d) placebo..... 48
FIGURA 2 – Cytotoxicity evaluation using the NCTC Clone 929 and CHO-K1 cell lines..... 49

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

TABELA 1 – Accuracy of SE–LC for determining BoNTA in biopharmaceutical formulations.....	45
TABELA 2 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing using the one-variable-at-a-time procedure for the SE–LC method.....	46
TABELA 3 – Comparative content/potency assessment of BoNTA in biopharmaceutical formulations, using the LD ₅₀ bioassay, T–47D cell bioassay and LC methods.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
API	Substância farmacêutica ativa
BoNT	Toxina botulínica
BoNTA	Toxina botulínica tipo A
d.i.	Diâmetro interno
DE ₅₀	Dose efetiva 50
DL ₅₀	Dose letal 50
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CV	Coefficiente de variação
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
ELISA	Enzimaimunoensaio
EP	Farmacopeia Europeia
FDA	Food and Drug Administration
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MALDI-TOF	Espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo
MS	Espectrometria de massas
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetil tiazolil-2)-2,5-difenil tetrazol
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Coefficiente de correlação
r ²	Coefficiente de determinação
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SNARE	Fator solúvel N-etil maleimida sensível anexo aos receptores de proteína
U	Unidades
USP	Farmacopeia Americana
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 ORIGEM, ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A	16
2.2 PRODUTOS, FORMULAÇÕES, USOS TERAPÊUTICOS E COSMÉTICO.....	19
2.3 IMUNOGENICIDADE E FATORES DE RISCO.....	21
2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	21
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	24
3 ARTIGO CIENTÍFICO	27
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	59
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	66

APRESENTAÇÃO

A presente Dissertação de Mestrado segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) do ano de 2015. O estudo compreende o desenvolvimento e validação de método físico-químico por cromatografia líquida por exclusão molecular para a avaliação de teor/potência de toxina botulínica tipo A e quantificação de proteínas de alta massa molecular, otimização do ensaio biológico por cultura de células *in vitro* para avaliação da atividade biológica e correlação com ensaio biológico *in vivo*. Os resultados obtidos geraram um artigo científico que será submetido para publicação. As seções **MATERIAL E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** encontram-se no **ARTIGO CIENTÍFICO**, que apresenta a íntegra da pesquisa realizada. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações nos capítulos **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** da Dissertação, pois as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no mesmo.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas na área de biotecnologia viabilizaram a produção de biomoléculas importantes para as áreas farmacêutica e cosmética, entre as quais destaca-se a toxina botulínica tipo A, conhecida como BoNTA (botulinum toxin type A).

A BoNTA é um dos sete diferentes sorotipos de toxinas produzidas através de processo de fermentação com *Clostridium botulinum* sob condições anaeróbicas. Estruturalmente, é um polipeptídeo constituído por 1296 aminoácidos que formam duas cadeias, a cadeia leve com massa molecular de 50 kDa e a pesada com 100 kDa, unidas por uma ponte dissulfeto (DAS GUPTA; SUGIYAMA, 1972).

A BoNTA foi a primeira toxina botulínica a ser estudada como potente agente paralisante da musculatura. Exerce efeito na junção neuromuscular inibindo a liberação de acetilcolina e é eficaz no tratamento de alterações associadas a contrações musculares espontâneas ou involuntárias. Recentemente, sua aplicação tem evoluído para tratamento de movimentos involuntários excessivos, espasmo muscular, dor, enxaqueca, estrabismo, hiperhidrose, mas especialmente, tem sido utilizada na área de cosmetologia (PIRAZZINI et al., 2017).

A avaliação de potência de BoNTA tem sido realizada através do ensaio biológico *in vivo*, baseado na determinação da dose letal 50 (DL₅₀) em camundongos (E.P., 2017). Atualmente, avança-se no estudo de métodos alternativos no contexto dos 3 Rs, em especial de bioensaios por cultura de células para avaliação da atividade biológica *in vitro* e para detecção de modificações estruturais, que poderiam alterar a eficácia clínica do produto (SESARDIC et al., 2012).

Convém destacar que não existe substância biológica de referência disponível a nível internacional para a avaliação de potência de BoNTA, o que representa o atual “estado da arte”. Neste contexto, os produtos disponíveis comercialmente apresentam diferentes composições e potência/teor expressos em unidades (U), específicas de acordo com o procedimento adotado por laboratório fabricante.

As toxinas botulínicas (BoNTs) apresentam estrutura molecular complexa e heterogênea e requerem alta especificidade estrutural para interagir com seus sítios de ação. Por esta razão, destaca-se a necessidade da completa caracterização por métodos que sejam capazes de determinar as propriedades físico-químicas, biológicas e imunológicas e demonstrar estruturas correspondentes às formas

biologicamente ativas. Além disso, os produtos biotecnológicos podem conter, mesmo após sua purificação, impurezas do processo de fermentação, bem como produtos de degradação que se formam durante o armazenamento, que podem causar resposta imunogênica e perda de atividade biológica (PINEDA et al., 2016).

Os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) viabilizam a separação, identificação e avaliação de teor/potência de substâncias biológicas e têm sido estudados como procedimentos alternativos. As instabilidades das proteínas têm sido investigadas por diferentes técnicas analíticas físico-químicas, biológicas e imunológicas. Essas tecnologias possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, bem como avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos (CHRINO, MIRE-SLUIS et al., 2004; FDA, 2015).

Além do desenvolvimento de métodos analíticos, a validação é necessária para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Além disso, é fundamental demonstrar com dados experimentais que são adequados para a finalidade pretendida (ROZET, et al., 2007; SHABIR, 2003; SHABIR, et al., 2007).

Portanto, a avaliação de biomoléculas produzidas por processos biotecnológicos deve ser realizada por métodos eficientes e validados para assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos, durante o processo de registro. Além disso, são importantes para viabilizar possíveis estudos de comparabilidade de macromoléculas biologicamente ativas (BRASIL, 2010; EMA, 2014).

O presente trabalho teve por objetivos: a) desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) para avaliação de proteínas de alta massa molecular e de teor/potência de BoNTA; b) otimizar ensaio biológico por cultura de células T-47D para avaliação de atividade da biomolécula íntegra e das formas alteradas; c) executar bioensaio da DL₅₀; d) realizar análise pelo método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) validado; e) estudar correlações entre métodos físico-químicos e biológicos e aplicá-los para a avaliação de potência dos produtos biotecnológicos disponíveis no País.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

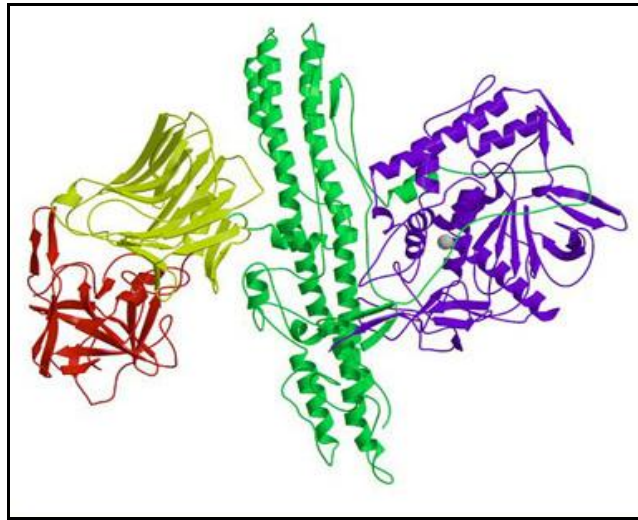
2.1 ORIGEM, ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A

O gênero *Clostridium* é formado por bactérias gram-positivas esporuladas, anaeróbias, em forma de bastonete e inclui mais de 150 espécies, entre elas o *Clostridium botulinum*, que produz toxinas altamente potentes. Existem sete sorotipos de toxinas botulínicas (BoNT) (A, B, C, D, E, F e G) e mais de 40 subtipos. Todas as neurotoxinas contêm a mesma estrutura terciária de proteína, mas a composição, peso molecular, mecanismo de ação e potência são específicos de acordo com a espécie. O sorotipo A é o mais utilizado com finalidade terapêutica, porém, progressivos estudos estão sendo realizados sobre os efeitos dos demais sorotipos, especialmente o B (ALSTYNE et al., 1966; PECK et al., 2017).

A estrutura polipeptídica da BoNTA é constituída por 1296 aminoácidos e por duas cadeias com atividades específicas, com peso molecular de 150 kDa. A cadeia leve é constituída por 448 aminoácidos e 50 kDa, e a cadeia pesada com 848 aminoácidos e 100 kDa. As duas são unidas por uma ponte dissulfeto entre os aminoácidos Cis_{430} da cadeia leve e Cis_{454} da cadeia pesada. A integridade desta ponte dissulfeto é fundamental para a atividade biológica (BINZ et al., 1990; DASGUPTA; SUGIYAMA, 1972; DASGUPTA; SATHYAMOORTHY, 1984).

A cadeia leve tem ação proteolítica e atua impedindo a liberação de neurotransmissores através do bloqueio das vesículas de fusão pré-sinápticas. A cadeia pesada apresenta duas porções: a metade C-terminal, que é o domínio de ligação ao neurônio pré-sináptico, responsável pela endocitose de BoNTA; e a metade N-terminal, que é o domínio necessário para a translocação da cadeia leve através da membrana das vesículas endocíticas para o citosol neuronal (JANKOVIC, 2017; SCHANTZ; JOHNSON, 1992). A figura 1 demonstra a estrutura tridimensional da BoNTA.

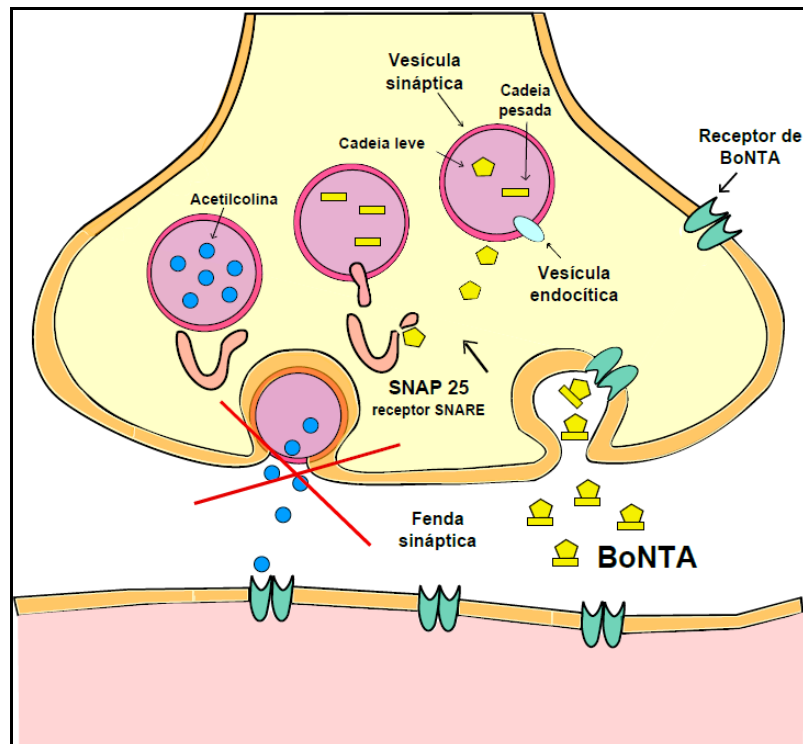
Figura 1 – Estrutura tridimensional da BoNTA



Fonte: Adaptação de SESARDIC; GAINES DAS et al. (2003, p. 6).

Após administração por via intramuscular, a BoNTA se difunde nas fendas sinápticas das junções neuromusculares, depositando-se nas terminações nervosas motoras dos músculos esqueléticos. Em condições fisiológicas, devido ao pH ácido, sua estrutura é dissociada pelas proteases presentes na placa neuromuscular, etapa necessária para sua ativação, pois a molécula íntegra de 150 kDa, apresenta baixa atividade farmacológica. Conforme pode ser observado na Figura 2, a cadeia leve é translocada através da membrana da vesícula endocítica para o interior do citosol e se liga ao complexo SNARE (fator solúvel N-etil maleimida sensível anexo aos receptores de proteína), especificamente na proteína de 25 kDa, chamada de SNAP-25. Na falta do SNAP-25 ativo, a vesícula contendo acetilcolina não se liga na membrana celular e não ocorre a liberação exocítica do neurotransmissor, resultando na inibição da contração muscular (FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2012; GIRLANDA et al., 1992; WALKER; DAYAN, 2014).

Figura 2 – Mecanismo de ação da BoNTA



Fonte: Adaptação de MATAK; LACKOVIC (2014, p. 43)

A BoNTA possui alta afinidade pelas sinapses colinérgicas, bloqueia a liberação de acetilcolina, sem alterar a condução neural de sinais elétricos e/ou sua síntese e armazenamento. A injeção intramuscular, dependendo da dose e local, pode provocar desnervação parcial e diminuição da contração, sem ocasionar paralisia completa. No tecido glandular ocorre bloqueio de secreção. A BoNTA não atravessa a barreira hematoencefálica e não há evidências de que seja tóxica quando injetada diretamente no cérebro (MATAK; LACKOVIC, 2014; MEHLAN et al., 2016).

As BoNTs são as mais potentes toxinas biológicas, com dose letal de aproximadamente, 0,09 a 0,15 μg por via intramuscular, 0,70 a 0,90 μg por inalação e 70 μg por via oral. A BoNTA apresenta dose letal de 0,4 a 2,5 ng/kg para ratos e de aproximadamente 0,2 ng/kg para humanos (CHENG et al., 2008; JANKOVIC, 2017).

Embora o principal efeito esteja associado aos neurônios motores alfa, também ocorre inibição da liberação de neurotransmissores nos neurônios motores gama. Estes estão relacionados à manutenção de contrações musculares

hiperativas, explicando o uso de BoNTA para espasticidade e distonias (ROSALES et. al., 1996).

As proteínas SNARE parecem desempenhar função nos neurônios nociceptivos de fibra C, conhecidos por liberarem os neurotransmissores glutamato e substância P, que induzem vasodilatação e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, histamina e serotonina. Estudos sugerem que a BoNTA atua na inibição destas substâncias, o que poderia explicar a sua aplicação no tratamento da dor crônica, tais como enxaqueca e nevralgias (WALKER; DAYAN, 2014).

2.2 PRODUTOS, FORMULAÇÕES, USOS TERAPÊUTICOS E COSMÉTICO

As aplicações da BoNTA têm se expandido nos últimos anos, demonstrando-se segura e eficaz no tratamento de estrabismo, blefaroespasma, espasmo hemifacial, distonia cervical, distonia oromandibular, bruxismo, doença de Parkinson, sialorreia, bexiga hiperativa e outros distúrbios do movimento ou condições relacionadas. Em baixas doses, também tem sido estudada para alívio da dor, depressão, crises de enxaqueca e alguns tipos de câncer. Apesar destes avanços na área clínica, o maior uso tem sido com finalidade cosmética, para prevenir e reduzir rugas, linhas de expressão e sinais da idade. Algumas destas indicações estão aprovadas pelas agências reguladoras, porém, outras estão sendo testadas sem normatização. Os produtos de BoNTA podem conter diferentes indicações e dosagens, que são descritas nas bulas dos laboratórios produtores (CHEN, 2012; PIRAZZINI et al., 2017).

O início da ação da toxina no músculo estriado pode ser observado em 2 a 3 dias e a duração do efeito diminui gradativamente após 2 – 3 meses. A recuperação da atividade neuronal foi atribuída a dois fenômenos: brotamento neural onde ocorre a reinervação muscular temporária ou regeneração dos receptores SNARE (DRESSLER; SABERI, 2005).

Segundo o último relatório da Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética publicado no ano de 2016, a aplicação de BoNTA foi o procedimento não cirúrgico mais realizado no mundo, com 4.931.577 aplicações. Neste mesmo ano, o Brasil apareceu em segundo lugar, após os Estados Unidos, com 772.860 aplicações, o que representa 9% do total (ISAPS, 2016).

Atualmente são comercializados no Brasil seis produtos biotecnológicos: Botox[®] (50,100 e 200 U/frasco, Allergan), Botulift[®] (100 e 200 U/frasco, Bergamo), Dysport[®] (500 U/frasco, Aché), Prosigne[®] (100 U/frasco, Cristália), Xeomin[®] (100 U/frasco, Biolab), Botulim[®] (100 U/frasco, Blau). Todos os produtos possuem apresentação sob a forma farmacêutica de pó líofilo para injeção, exceto o Botox[®] que é constituído por pó secado à vácuo.

O Botox[®] foi o primeiro produto aprovado nos Estados Unidos pelo FDA, no ano de 1989, inicialmente indicado para o tratamento de estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial em pacientes maiores de 12 anos de idade. Em um tratamento de blefaroespasma foram observados efeitos adicionais, como a diminuição de linhas de expressão faciais, originando estudos para aplicação cosmética. Em 2000, foi aprovado para distonias e linhas faciais hipercinéticas (linhas de expressão) (FREVERT, 2015).

Os produtos devem ser armazenados em temperaturas entre 2–8° C, exceto o Xeomin[®] que pode ser armazenado a ≤ 25 °C e o prazo de validade varia de 24-36 meses. Os laboratórios farmacêuticos recomendam o uso da solução reconstituída em até 4 h para Botulim[®] e Prosigne[®], 8 h para Dysport[®], 24 h para Xeomin[®], 72 h para Botox[®] e 7 dias para Botulift[®].

Os produtos comercializados internacionalmente podem apresentar diferenças na sua composição e formulação. Os produtos Botox[®], Botulift[®] e Botulim[®] possuem albumina humana e cloreto de sódio como excipientes. O Dysport[®] contém solução de albumina humana 20% e lactose, o Prosigne[®] possui gelatina, dextrana 20 e sacarose e o Xeomin[®], albumina humana e sacarose. Cada empresa farmacêutica tem seu processo de produção, purificação e determinação da atividade específica da proteína com expressão da potência em unidades de BoNTA. Desde 1989, há relatos de que os produtos fabricados no Reino Unido (Dysport[®]) e nos EUA (Botox[®]) não são equivalentes, uma vez que são necessárias diferentes doses de toxina para produzir o mesmo efeito clínico (SESARDIC et al., 2009). Neste contexto, observa-se que não existe substância biológica de referência/Padrão biológico estabelecido a nível internacional, para padronizar a expressão de potência dos produtos disponíveis comercialmente. As especificidades de cada produto podem resultar em alteração da ação terapêutica, dose, início de ação, eficácia, duração do efeito e possíveis efeitos colaterais. Portanto, é recomendável reconhecer a dosagem e performance dos produtos, pois não são

intercambiáveis e devem ser usados de acordo com as recomendações do fabricante (BRIN et al., 2014).

O uso clínico da BoNTA é seguro. Porém, podem surgir complicações decorrentes de difusão indesejada nos músculos adjacentes. São raros os registros de efeitos adversos sistêmicos, como reações alérgicas, fraqueza generalizada ou sintomas semelhantes à gripe (HALLETT et al., 2015; RAMIREZ-CASTANEDA et al., 2013).

2.3 IMUNOGENICIDADE E FATORES DE RISCO

Naumann (2013) descreve que, após o processo de produção das BoNTs, formam-se estruturas complexas contendo o núcleo da neurotoxina e proteínas associadas não tóxicas. Estas compreendem a hemaglutinina e proteínas não-hemaglutinina, que contribuem para estabilizar e proteger a neurotoxina dos efeitos da temperatura, pH e degradação enzimática. A BoNTA tem sido utilizada no tratamento de condições crônicas nas quais é necessário realizar repetição de administrações por longos períodos. Nestas condições, pode ocorrer a formação de anticorpos neutralizantes pelo sistema imune, que podem ou não afetar a atividade biológica da toxina e são detectáveis por diferentes testes. A imunogenicidade pode ser induzida por fatores relacionados ao produto como o processo de produção, núcleo da toxina e proteínas não-tóxicas. Além disso, por fatores relacionados ao tratamento, como a dose, frequência de injeções e vacinação ou exposição prévia (BENECKE, 2012).

A literatura destaca que a antigenidade tem sido especialmente observada nos casos de aplicação de doses elevadas, mas também há relatos em pacientes sob tratamento estético. Acrescenta também que os anticorpos formados contra as proteínas não tóxicas (não-neutralizantes) não interferem na atividade biológica (DRESSLER, 2010; DRESSLER; BIGALKE, 2017).

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

A atividade biológica tem sido avaliada pelo bioensaio baseado na determinação da DL₅₀ em camundongos, preconizado pela Farmacopeia Europeia. As doses do Padrão e da amostra são administradas por via intraperitoneal e as

respostas de mortalidade registradas durante 72 h são usadas para o cálculo de retas paralelas por probitos. Calcula-se a potência que é preconizada entre 80–125% do valor do teor declarado, com intervalos de confiança entre 80–125% (SESARDIC, 2012, E.P., 2017).

O bioensaio da DL_{50} em camundongos com cinco doses em progressão geométrica e as típicas curvas dose-resposta, está descrito como o primeiro procedimento para avaliação de preparações terapêuticas de toxinas. Os autores citam ensaio alternativo baseado na dose eficaz 50 (DE_{50}), com injeção de doses abaixo da DL_{50} em camundongos e observação dos efeitos em 24–48 h (SESARDIC, 2012).

Evans e colaboradores (2009) desenvolveram ensaio *in vitro* para avaliar a atividade biológica dos sorotipos A, B e F, com capacidade para diferenciar a neurotoxina ativa. O ensaio baseia-se nas atividades específicas das duas cadeias, da endopeptidase e de ligação ao receptor. Utilizando sinaptossomas cerebrais, a toxina foi capturada, incubada com seu substrato em placa de ELISA e a clivagem detectada usando anticorpos específicos produzidos contra o fragmento de cada sorotipo de BoNT.

Wildner-Kofie e colaboradores (2011) desenvolveram modelo alternativo para avaliação de potência de BoNTA, diminuindo o número de animais, com base nas respostas de contração muscular de camundongos em relação à concentração da toxina aplicada. O ensaio baseou-se no uso de cinco concentrações de BoNTA fornecendo respostas adequadas para método quantitativo.

Em 2011, a empresa Allergan (produtora do Botox[®]) anunciou que o FDA aprovou, pela primeira vez, ensaio baseado em cultura de células para avaliação de potência e estabilidade. No entanto, somente a empresa possui o método, que é aplicado apenas ao Botox[®], e os detalhes sobre este ensaio não foram divulgados (PELLET, 2013).

Os ensaios biológicos *in vitro* têm sido estudados como alternativa ao bioensaio *in vivo* e avaliam uma função específica (por exemplo a clivagem de SNAP-25 ou detecção de BoNTA), mas não são capazes de detectar os domínios funcionais ou alguma modificação estrutural da molécula. Pesquisas recentes incorporaram receptores específicos da toxina, avaliando também a atividade enzimática. Porém, os métodos alternativos necessitam cumprir os parâmetros de validação (SESARDIC, 2012).

Fernández-Salas e colaboradores (2012) desenvolveram método *in vitro* utilizando a linhagem celular SiMa (ACC 164). A toxina atua na clivagem da proteína SNAP₂₀₆ da célula, formando a proteína SNAP₁₉₇, que é quantificada pelo método de ELISA com anticorpo monoclonal específico. Os níveis de SNAP₁₉₇ obtidos foram proporcionais às concentrações de BoNTA utilizadas no ensaio.

A linhagem celular T-47D (ATCC HTB-133), de câncer de mama foi utilizada para avaliar o efeito apoptótico e antiproliferativo de BoNTA em relação à linhagem de células normais MCF10A (ATCC CRL-10317). As linhagens foram incubadas com diferentes concentrações de BoNTA e a viabilidade celular foi determinada através de leitura espectrofotométrica utilizando o corante brometo de 3-(4,5-dimetil tiazolil-2)-2,5-difenil tetrazol (MTT). Os pesquisadores demonstraram que a linhagem tumoral é sensível ao aumento da concentração de BoNTA em comparação com a linhagem de células normais MCF10A (BANDALA et al., 2013).

Ensaio baseado em chip utilizando ressonância de superfície plasmônica foi estudado e demonstrou ser mais sensível do que o bioensaio *in vivo*, para quantificação de BoNTA em preparações farmacêuticas. O procedimento foi adotado para avaliação da atividade de diferentes lotes, incluindo a cinética da clivagem do substrato, com múltiplas avaliações num único chip. A detecção com biosensor de produtos proteolíticos específicos tem o potencial de determinar com exatidão a atividade de BoNTA. Porém, o ensaio pode ser usado em combinação com outro método *in vitro* que avalie as propriedades da cadeia pesada, contribuindo para a redução do número de animais usados no controle de qualidade de preparações farmacêuticas de BoNTA (LÉVÊQUE et al., 2013, LÉVÊQUE et al., 2015).

As BoNTs são as mais potentes toxinas conhecidas. A intoxicação das células neuronais é um processo de múltiplas etapas que inclui ligação celular específica, endocitose, mudanças conformacionais no endossoma, translocação da cadeia leve, atividade enzimática no citosol e clivagem do alvo SNARE. A determinação quantitativa e confiável da potência funcional das BoNTs, produzidas como substância farmacêutica ativa (API), necessita de ensaio baseado em todas as fases das vias de intoxicação. Ensaio por cultura de células constituem-se em alternativa capaz de quantificar os produtos com sensibilidade semelhante ou maior, em relação ao bioensaio *in vivo*. A revisão publicada destaca os progressos realizados no estudo de métodos baseados na cultura celular (PELLETT, 2013).

A integridade e atividade das duas cadeias de BoNTA foram avaliadas por ensaio *in vitro* empregando receptores de membrana SV2C, específicos para sua ligação e após incubação com SNAP-25, para avaliação do efeito proteolítico. O método demonstrou-se reprodutível e específico para BoNTA e os resultados foram correlacionados aos obtidos pelo bioensaio da DL₅₀ (GREGORY et al., 2014).

Ensaio de neutralização *in vitro* sensível e específico para sorotipos A e E foi pesquisado utilizando linhagem de células SiMa de neuroblastoma. As BoNTs clivam sequências no SNAP-25 das células e o ponto final baseia-se na imunodeteção da porção clivada, com anticorpos que detectam somente a nova sequência exposta do SNAP-25. Os autores observaram sensibilidade superior em relação ao bioensaio *in vivo* (BAK et al., 2017).

Dressler; Bigalke (2017) confirmaram a estabilidade do produto Xeomin® após reconstituição e armazenamento em temperatura de 4–8 °C, por 52 semanas. A potência foi avaliada pelo ensaio da contração do diafragma de camundongo, proposto por Göschel e colaboradores (1997), baseado na medição contínua da força de contração muscular do diafragma, induzido por estimulação elétrica de seu nervo frênico. Os autores determinaram o tempo entre a aplicação de BoNTA e a diminuição de 50% da força de contração (tempo de paralisia).

O ensaio biológico em camundongos continua sendo o método de escolha, pois avalia as três funções necessárias para a toxicidade (ligação, translocação e atividade de endoprotease). A limitação intrínseca dos ensaios de endopeptidase para BoNTA é que eles se baseiam na atividade da cadeia leve e alterações da cadeia pesada podem não ser detectadas. Por esta razão, a atividade enzimática nem sempre pode estar correlacionada com os dados da DL₅₀, pois a ligação e translocação, que são essenciais para toxicidade, se devem à domínios específicos da cadeia pesada (LEVEQUE et al., 2015).

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS FÍSICO-QUÍMICOS

Tecnologias analíticas por CLAE, eletroforese capilar (EC) e espectrometria de massas (MS) têm sido estudadas e aplicadas para análise de produtos biotecnológicos, por viabilizarem a separação, identificação, caracterização e quantificação, utilizadas em combinação ou como alternativa aos bioensaios (ALMEIDA et al., 2014; MALDANER et al., 2017). A CL-EM é uma técnica analítica

adequada para avaliar proteínas de alta massa molecular, cujas variantes podem conter ligações covalentes ou não-covalentes, reduzindo a atividade biológica e causando reações imunogênicas (FEKETE et al., 2014).

O método por CL-FR foi estudado para determinar a estrutura molecular da BoNTA através da clivagem da molécula com brometo cianogênico e tripsina. Foi utilizada coluna C₁₈ e fase móvel composta por ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e acetonitrila, sob condições de gradiente, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e detecção a 206 nm, que possibilitou detectar fragmentos da molécula (KRIEGSTEIN et al., 1994).

Freitas e colaboradores (2016) desenvolveram e validaram método por CL-FR, utilizando coluna C₁₈, fase móvel constituída de fosfato de sódio 0,05 M e acetonitrila (80:20, v/v), com eluição isocrática a 0,3 mL min⁻¹ e detecção no ultravioleta a 214 nm. O método foi aplicado para avaliação de substâncias relacionadas e do pico não alterado em amostras de BoNTA e os resultados correlacionados com o bioensaio por cultura de células T-47D.

A EC foi utilizada para caracterização e identificação dos fragmentos obtidos após clivagem da BoNTA, em comparação com a CLAE. Foram observadas as vantagens da MS para a identificação da biomolécula (LAING et al., 2006; PURCELL; HOARD-FRUCHEY, 2007).

A estabilidade da BoNTA foi estudada em função do tempo, monitorando os principais produtos de degradação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e por espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF-MS) (SETO; KANAMORI-KATAOKA, 2005).

Até o momento, só a Farmacopeia Europeia apresenta monografia, mas não descreve métodos cromatográficos e na literatura, conforme descrito, encontram-se poucas referências sobre a determinação de potência por métodos físico-químicos (E.P., 2017). Assim, além da variabilidade dos ensaios *in vivo*, observa-se a necessidade da pesquisa de métodos alternativos visando a substituição, redução do uso ou aprimoramento dos ensaios (CHELUVAPPA et al., 2017). Especialmente, devido às diferenças na produção, composição e determinação de unidades da BoNTA, associada ao potencial toxicológico e de imunogenicidade inerente à

molécula, é importante o estudo de tecnologias analíticas e análises de correlação de resultados, para avaliar a qualidade integral dos produtos biotecnológicos.

ARTIGO CIENTÍFICO

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Content/potency Assessment of Botulinum Toxin Type A by Validated Liquid Chromatography Methods and Bioassays

Bruna Xavier, Rafaela Ferreira Perobelli, Maurício Elesbão Walter, Francielle Santos da Silva, Sérgio Luiz Dalmora.

Artigo a ser submetido para publicação.

Content/potency Assessment of Botulinum Toxin Type A by Validated Liquid Chromatography Methods and Bioassays

Bruna Xavier², Rafaela Ferreira Perobelli², Maurício Elesbão Walter², Francielle Santos da Silva², Sérgio Luiz Dalmora^{1*}.

¹Department of Industrial Pharmacy and ²Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105–900 Santa Maria – RS, Brazil.

*Corresponding Author

Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 97105–900, Brazil

E-mail: sdalmora@terra.com.br

Fax: +55 55 3220 8952

Abstract

Botulinum toxin type A (BoNTA) is one of the seven different serotypes (A to G) produced by *Clostridium botulinum*. A stability-indicating size exclusion liquid chromatography (SE-LC) method was developed and validated to determine the content/potency of this biotechnology-derived medicine. The SE-LC method was carried out on a TSKgel® G3000 SW_{XL} column (300 mm × 7.8 mm i.d.) maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 50 mM potassium phosphate buffer with a pH 7.0, and the method was run isocratically at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, with photodiode array (PDA) detection at 220 nm. Separation was obtained with a retention time of 15 min, and the calibration curve was linear over the concentration range 0.29–100 U mL⁻¹ ($r^2 = 0.9998$). The specificity was confirmed by forced degradation studies, interference of the excipients and peaks purity. The accuracy was 100.41%, with a bias lower than 0.93%. The method was applied to assess the content/potency and high-molecular-weight (HMW) proteins in biopharmaceutical products, and the results were compared with those of the mouse LD₅₀ bioassay (MBA), the T-47D cell culture assay and the reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method, giving mean values of 0.71% higher, 0.36% lower, and 0.87% higher, respectively. Aggregated forms showed significant effects on cytotoxicity as well as a decrease in the bioactivity ($p < 0.05$). The capabilities demonstrated for these methods allow a great improvement to ensure batch-to-batch consistency, to monitor its stability, and thereby assuring the safety and therapeutic efficacy.

Keywords: BoNTA, size exclusion liquid chromatography, reversed-phase liquid chromatography, T-47D cell culture, LD₅₀ bioassay.

1. Introduction

The type A toxin is one of the seven different serotypes (A to G) currently known to be produced by *Clostridium botulinum*, and it is the first to receive attention clinically. Botulinum toxin A (BoNTA) acts by blocking the release of acetylcholine at the neuromuscular junction, which inhibits muscle contraction. Due to its specificity for pre-synaptic nerve terminals, BoNTA is most widely used to treat both cosmetic and a variety of medical conditions, such as cervical dystonia, blepharospasm, spastic conditions, pain, hyperhidrosis and migraines (FREVERT, 2015; CHEN, 2012; PIRAZZINI et al., 2017).

BoNTA is a polypeptide that contains 1296 amino acids and has a molecular mass of 150 kDa; it is cleaved to generate the active di-chain form of the toxin. The light chain, which is 50 kDa, and the heavy chain, which contains two functional domains, each 50 kDa, are linked by a single disulfide bond at the positions (C₄₃₀-C₄₅₄) (BINZ et al., 1990; JANKOVIC, 2017). BoNTs consist of three primary domains: two of these enable binding to nerve terminals and translocation of the toxin into the neuronal cytosol, and the third domain comprises a metalloprotease that inhibits the release of neurotransmitters by the peripheral nerve terminals (ROSSETTO et al., 2014).

Bioassays play a central role in the evaluation of biological products, and those derived from bacterial toxins often rely exclusively on *in vivo* models for the assurance of safety and potency. Bioassays are required due to the complex and multiple mechanisms of action to an extent that physicochemical tests alone are insufficient to predict biological activity. The mouse LD₅₀ bioassay is currently the most reliable procedure to estimate the potency of BoNTA, as it evaluates all three functions necessary for toxicity (binding, translocation, and endopeptidase activity) (SESARDIC et al., 2003; SESARDIC, 2012; E.P., 2017). This approach uses a large number of animals and is time consuming and expensive. Thus, substantial effort has been spent to find alternative methods following the 3 Rs (JONES et al., 2008; BASAVANNA et al., 2013; CHELUVAPPA et al., 2017).

The pharmaceutical production of BoNTA requires precise determination of the biological potency, and the enzymatic activity of the light chain is a crucial index that can be measured *in vitro* (LÉVÊQUE et al., 2015). *In vitro* assays have been developed based on the binding of BoNTA to antibodies or on the proteolytic activity in endopeptidase assays (GAINES et al., 1999). A bioassay based on the effect of

BoNTA that induces caspase-3 and 7-dependent apoptotic processes, with significant inhibitory effects on the proliferation of the cell line T-47D, was developed assessing the responses with MTT (BANDALA et al., 2013; FREITAS et al., 2016). A neutralization cell-based assay serotype, specific for BoNTA, which cleaves unique sequences on SNAP-25 within neuroblastoma SIMA cells with immunodetection of cleaved SNAP-25 from cell lysates as the end point, was reported (PELLETT, 2013; BAK et al., 2017). A SNAP-25 chip-based assay using surface plasmon resonance with the detection of specific proteolytic products was studied (LÉVÊQUE et al., 2013; LÉVÊQUE et al., 2015). A functional dual-coated microtiter plate with SNAP-25 substrate and a monoclonal antibody was developed as an immunobiochemical assay (LIU et al., 2012). However, currently, there is no international biological reference standard for BoNTA; therefore, each manufacturer uses a unique product reference for the evaluation of bioactivity as specific units, and the products are not interchangeable (BRIN et al., 2014).

Therapeutic proteins, such as BoNTA, are potentially affected by one or more forms of heterogeneity. Thus, because of the inherent complexity and for safety reasons, there exists a need to develop powerful analytical methods that provide its detailed characterization (CHIRINO; MIRE-SLUIS, 2004). Liquid chromatography (LC) methods have been successfully applied to monitor the content, purity, identity and chemical stability of biologicals (USP 39, 2016). Given the macromolecular nature, size-exclusion liquid chromatography (SE-LC) has also been used to determine the native size and reveal possible aggregates that can form during fermentation, purification, processing, and storage, which can cause unwanted immune responses and a loss of biological activity (HONG et al., 2012). The SE-LC method was used to determine the molecular mass of the subunit stoichiometry of BoNTA complex (LIETZOW et al., 2008). Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) methods were applied to assess related proteins and the main peak in biopharmaceutical formulations, and, when combined with mass spectrometry for detection of SNARE cleavage products generated from formulated BoNTA (FREITAS et al., 2016; HUNT et al., 2010; BOYER et al., 2011).

This research aimed to develop and validate a specific SE-LC method to evaluate the content/potency of BoNTA in biotechnology-derived medicines, assess the bioactivity of their high-molecular-weight (HMW) forms, and correlate the results with the LD₅₀ bioassay, the T-47D cell culture assay and the RP-LC method. Thus,

this work will contribute to the development of methods to monitor stability and to improve quality control, thereby helping to ensure the efficacy of this biotherapeutic.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Batches of Botox[®] Allergan (São Paulo, Brazil), Botulift[®] Bergamo (São Paulo, Brazil) and Botulin[®] Blau Farmacêutica (São Paulo, Brazil) containing 100 U vial⁻¹ were acquired from commercial sources within their shelf-life period. The biological reference substance of botulinum toxin type A (R-BoNTA) was obtained from Medytox Inc. (Seocho-Gu, Seoul City, South Korea) and was supplied by BSG Pharma Co., Ltd. (Dohwa-Dong, Seoul City, South Korea). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), dimethyl sulfoxide (DMSO), neutral red and the alamarBlue[™] cell viability reagent were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Human serum albumin (HSA), sodium acetate, sodium chloride, phosphoric acid, sodium phosphate, potassium phosphate monobasic, acetonitrile, methanol and isopropanol were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade. For all analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system from Millipore (Bedford, MA, USA). All solutions were degassed with a Tecnal ultrasonicator (São Paulo, Brazil) and were filtered through a 0.22- μ m Millex filter (Millipore).

2.2 Apparatus

The absorbances of the cell culture assays were measured on a Thermo Scientific Varioskan[®] Flash microplate reader (Vantaa, Finland). SE-LC and RP-LC analyses were carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, an LC-20 AD pump, a DGU-20As degasser, an SIL-20AC_{HT} autosampler, a CTO-20A column oven and an SPD-M20A photodiode array (PDA) detector. Peak areas were automatically integrated using the LC Solution Version 1.22 SP1 software.

2.3 Standard and sample solutions

Solutions of R-BoNTA and the samples of biopharmaceutical formulations were prepared by reconstitution with ultrapure water to final concentrations of 100 U mL⁻¹. For SE-LC and RP-LC, the working solutions were diluted with ultrapure water to final concentrations of 50 and 25 U mL⁻¹, respectively. For the MBA and T-47D bioassays, the solutions were diluted with 0.9% (v/v) sodium chloride to final concentrations between 6.90 and 12.10 U mL⁻¹, and the RPMI 1640 culture medium to final concentrations between 3 and 81 U mL⁻¹, respectively.

2.4 Procedures

2.4.1 SE-LC

Analyses were performed on a Tosoh Bioscience (Tokyo, Japan) TSKgel® G3000 SW_{XL} column (300 × 7.8 mm i.d., with a particle size of 5 µm and a pore size of 250 Å) that was maintained at 25 °C and was protected with a guard column. The mobile phase consisted of a 50 mM L⁻¹ potassium phosphate solution with pH 7.0. The analyses were run in the isocratic mode at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, with detection by PDA set at 220 nm. The injection volume was 50 µL.

2.4.2 RP-LC

The RP-LC experiments were performed as described elsewhere (FREITAS et al., 2016). The validated method was carried out on an Agilent (Santa Clara, CA, USA) Zorbax 300 SB C₁₈ analytical column (150 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 300 Å) maintained at 45 °C and protected with a guard column. The mobile phase A consisted of 50 mM sodium phosphate buffer with pH 2.8, and mobile phase B consisted of acetonitrile (80:20, v/v), run isocratically at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹, with detection by PDA set at 214 nm. The injection volume was 50 µL.

2.4.3 T-47D cell culture bioassay

The *in vitro* cell culture bioassay was performed as described elsewhere (BANDALA, et al., 2013; FREITAS et al., 2016) and with some adjustments. The T-47D cells (ATCC HTB-133) were maintained in an RPMI culture medium supplemented with 10% v/v FBS in 75 cm² flasks. The cells were seeded in Corning® Costar® 96-well microplates (Corning, NY, USA) at a density of 3 × 10⁵ cells mL⁻¹ and

were dosed upon seeding with four concentration ranges starting with 3 U mL⁻¹ of BoNTA, in triplicate, as a parallel-line assay. R-BoNTA was used as the standard, and RPMI was used as the control. The plates were incubated at 37 °C, 5% v/v CO₂ for 24 h. Then, 10 µL of alamarBlue™ was added per well, and the plates were incubated for an additional 4 h. The response was calculated as the difference between the absorbances measured at 570 and 600 nm. The biological activity was calculated by the parallel-line statistical method using the CombiStats™ software developed by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) of the Council of Europe (Strasbourg, France).

2.4.4 Mouse LD₅₀ bioassay

Female Swiss mice weighing between 23 and 27 g were housed in air-conditioned, controlled conditions (room temperature 22 ± 2 °C, with a relative humidity of 50 – 60%, under artificial illumination, 12 h per day). The mice were given free access to food and water. The bioassay was performed as described previously, (E.P., 2017) and was modified accordingly. Briefly, the animals were allocated to the sample, R-BoNTA and the control groups in a fully randomized order with 10 mice per treatment group. The reference and samples were diluted to concentrations between 6.90 – 12.10 U mL⁻¹ with 0.9% (v/v) sodium chloride solution, and a single dose of 0.1 mL was injected intraperitoneally. The mortality observed per treatment group during 72 h was used as a probit transformed response and was analysed by using the parallel-line assay method. All of the assays were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria, protocol number 8227050716.

2.4.5 *In vitro* cytotoxicity test

The *in vitro* cytotoxicity method was performed as described elsewhere (CARDOSO et al., 2017), based on a neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC Clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) and CHO-K1 cell line (ovary epithelial cells, ATCC number CCL-61) to degraded samples. A negative control was included in the assay together with the R-BoNTA solution. The NRU assay was performed on 96-well microplates, maintained at 37 °C, 5% v/v CO₂ for 24 h, with a cell suspension density of approximately 3 x 10⁵ cells

mL⁻¹. Neutral red release was evaluated by the addition of an extracting solution, and the absorbances were measured at 540 nm.

2.5 Validation of the SE–LC method

Validation of the method was performed using samples of biopharmaceutical formulations with a label claiming 100 U mL⁻¹, and the parameters were assessed following the guidelines (ICH, 2005; FDA, 2015).

2.5.1 Specificity

The specificity was assessed by subjecting an R-BoNTA solution and a sample of the biopharmaceutical formulation (100 U mL⁻¹) to a neutral hydrolysis (60 °C, for 8 h) and shaking for 1 h. Solutions were then diluted with ultrapure water to final concentrations of 50 U mL⁻¹. In addition, possible interference from the excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by analysing a sample that contained only a placebo (in-house mixture of formulation excipients). The specificity was also established by determining the peaks purity of BoNTA and degraded forms by overlaying the spectra captured at the apex, upslope, and downslope with a PDA detector.

2.5.2 Linearity

The linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each with eight concentrations of the R-BoNTA solution. Reference substance solutions were injected (50 µL) in triplicate to verify the repeatability of the detector response. Peak areas were plotted against the respective concentrations and were subjected to regression analysis by the least-squares method to calculate the calibration equation and the determination coefficient (r^2). The STATGRAPHICS Centurion XVII Version 17.2.05 (Statistical Graphics System, 2017, Warrenton, VA, USA) statistical software package was used to treat the chromatographic data.

2.5.3 Detection and quantitation limit

The detection limit (DL) and the quantitation limit (QL) were calculated as defined by ICH (ICH, 2005) based on the standard deviation of the response and the slope, which were estimated from the three independent analytical curves of the BoNTA and determined by a linear-regression model. The factors 3.3 and 10, for the DL and QL,

respectively, were multiplied by the standard deviation of the y -intercept and then were divided by the slope. The QL was also evaluated in an experimental assay.

2.5.4 Precision and accuracy

Precision was determined by repeatability (intraday) and intermediate precision (inter-days and between-analysts). Repeatability was examined by nine evaluations of samples of BoNTA at three concentrations levels (40, 50 and 60 U mL⁻¹), on the same day and under the same experimental conditions. The inter-day precision was assessed via the analysis of two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days, and the between-analysts precision was assessed by submitting the samples to analysis by different analysts in the same laboratory.

The accuracy was evaluated by analyses of the in-house mixture of excipients, which had been spiked with known amounts of BoNTA; to obtain solutions at concentrations of 40, 50, and 60 U mL⁻¹, which were equivalent to 80, 100 and 120%, respectively, of the working solution concentrations. Accuracy was calculated as the percentage of drug recovered from the formulation, and it was expressed as the percentage relative error (bias %).

2.5.5 Robustness

The robustness was determined by analysing the same samples containing 50 U mL⁻¹, under one-variable-at-a-time (OVAT) conditions, such as: the potassium phosphate concentration, the mobile phase pH, the flow rate and the wavelength. The stability of the BoNTA samples was assessed, and any changes in the chromatographic pattern were determined by comparison with the patterns of freshly prepared solutions.

2.5.6 System suitability test

The system suitability test was carried out using five replicate injections of 50 μ L of R-BoNTA solutions containing 50 U mL⁻¹, followed by analyses of the recommended parameters: peak area, retention time, peak symmetry, number of theoretical plates and peak capacity (k).

2.6 Analysis of BoNTA in biopharmaceutical formulations

To quantitate BoNTA in biopharmaceutical products by the bioassays and LC methods, seven batches labelled from 1 to 7, including Botox[®], Botulim[®] and Botulift[®], which are commercially available for clinical use, were diluted to the appropriate concentrations in the RPMI medium, 0.9% (v/v) sodium chloride or ultrapure water. The analyses were performed in triplicate, and the percentage recoveries were calculated against R-BoNTA.

3. Results and discussion

3.1 Optimization of the *in vitro* bioassay

The *in vitro* bioassay was performed on the T-47D cell line. The assays were optimized by evaluating parameters such as cell concentration (2×10^5 – 4.5×10^5) and incubation time (4, 5 and 6 h), concentration of BoNTA (3 – 81 U mL⁻¹) and time of exposure (18, 24 and 48 h). A dose-response curve was constructed by plotting the experimental values of the absorbances versus the concentrations of BoNTA, in triplicate. The dose-response curve was found to be linear over the concentration range of 3 – 81 U mL⁻¹ of BoNTA.

3.2 Development of the SE-LC method

To develop the method, tests were carried out to determine which mobile phase and column would lead to satisfactory selectivity and sensitivity within a short separation time. Mobile phases containing potassium phosphate, sodium phosphate, sodium acetate, sodium chloride and phosphoric acid were tested at a concentration range of 0.05 M to 0.4 M. The mobile phase pH was investigated from 4 to 7.5, and the best performance was achieved at a pH 7.0. The 50 mM potassium phosphate solution resulted in higher sensitivity and a shorter retention time of BoNTA. Next, evaluation of columns with lengths of 300 and 600 mm and with different pore sizes showed that the TSKgel[®] G3000 SW_{XL} provided higher efficiency and a shorter retention time. The effects of organic modifiers — methanol and isopropanol — were also evaluated in the concentration range from 5 to 10% v/v; however, no improvement in the chromatographic profile was achieved. For the selection of the best detection wavelength, a PDA detector was used, and the 220 nm was selected due to the maximum absorption of BoNTA. The optimized conditions were used to

obtain typical chromatograms, which showed the peak corresponding to BoNTA with a retention time of 15 min, as shown in Figure 1 (a, b).

3.3 Validation of the SE-LC method

The specificity of the method, as evaluated by neutral hydrolysis, showed a reduction of 22% of the monomer peak area detected at 15 min and two additional peaks that appeared with retention times of 12.0 and 12.7 min (Figure 1 c), which were attributed to HMW species of the protein. Moreover, the injection of a sample containing only the in-house mixture of the formulation excipients (HSA and sodium chloride) showed only one peak with a retention time of 9.2 min, which was identified as HSA (Figure 1 d). Together with the peak purity index ranging from 0.9999–1, the data demonstrated that the peaks were free of any co-eluting peaks and that the excipients did not interfere with the analysis, thereby confirming that the SE-LC method was specific for the analysis of BoNTA.

The calibration curve was found to be linear over a concentration range of 0.29 – 100 U mL⁻¹. The determination coefficient was calculated as $r^2 = 0.9998$, $y = (33374 \pm 229.22) x - (13547 \pm 981.96)$, where x is the concentration and y is the peak absolute area. The statistical analysis demonstrated that the y -intercept was non-significant ($p > 0.05$) and the slope was significant ($p < 0.05$). The DL and QL were calculated, and the obtained values were 0.08 and 0.29 U mL⁻¹, respectively. The evaluated experimental QL, with a precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$ (SHABIR et al., 2007), was found to be 0.25 U mL⁻¹, which is suitable for quality control analysis.

The precision was studied by calculating the mean values and the relative standard deviation (RSD, %). For the repeatability, the obtained RSD values were 0.35%, 0.20% and 0.25% for the concentrations tested. The inter-day precision was assessed, giving RSD values of 0.35% and 0.62%. The between-analysts precision was determined, giving RSD values of 0.60% and 0.11%. The accuracy was assessed, and the absolute mean was 100.41%, with a bias lower than 0.93% (Table 1), which demonstrates that the accuracy was within the desired range.

The results and the experimental ranges of the selected variables, which were evaluated using an OVAT approach, together with the optimized values, are given in Table 2, and demonstrate that they were within the acceptable deviation (RSD $\leq 2\%$) with non-significant differences ($p > 0.05$), as calculated by the analysis of variance.

Therefore, the SE-LC method can be considered robust under the conditions tested. The samples were also tested, and the data showed stability for 24 h (98.18%) in the auto-sampler and for 48 h when maintained at 2 – 8 °C (99.80%).

A system suitability test was performed, and the RSD values obtained for the peak area, retention time and peak symmetry were 0.47%, 0.05% and 0.32%, respectively. The number of theoretical plates was approximately 21 120.16, with an RSD of 1.65%. The parameters tested here were within the acceptable range (RSD < 2%). The peak capacity (k) was calculated as 5.49.

3.4 Application of the LC methods and bioassays

The validated SE-LC method was applied to the content/potency assessment of BoNTA in biopharmaceutical formulations, and the results were compared to those obtained from the *in vivo* and *in vitro* bioassays and by the RP-LC method previously studied, giving mean differences of the estimated content/potency of 0.71% higher, 0.36% lower and 0.87% higher, respectively, with non-significant differences ($p > 0.05$) (Table 3). The Pearson's correlation coefficient was calculated, showing significant correlation for the SE-LC ($r = 0.9984$) method, which is related to the *in vivo* bioassay.

In addition, the samples were subjected to neutral hydrolysis, were analysed by the SE-LC method, and showed significant degradation ($p < 0.05$) and generated HMW forms (Table 3). The aggregated samples were subjected to the *in vitro* bioassay, which showed a significant decrease in the bioactivity to 29.10% (Table 3, 4^e). Then, the bioactivity was tested by an *in vivo* bioassay, and no toxic effects or mortality of mice were detected. Thus, the bioactivity of related proteins was analysed by the RP-LC method, and, while previously assessed after 4 h of exposure to UV light (FREITAS et al., 2016), was tested again to evaluate the UV light effects after 8 h which demonstrated a reduction to 95.20% (Table 3, 4^f). The biological activity of a drug is defined as the total pharmacological, physiological and biochemical effects determined by the interaction of the molecule with its target receptor. The results of the *in vitro* cell culture are not well correlated to those of the LD₅₀ data. It is widely believed that the therapeutic or toxic actions of BoNTA are exclusively mediated by SNAP-25 cleavage. On the other hand, the *in vitro* and *in vivo* findings suggest that several BoNTA actions related to neuroexocytosis, cell cycle and apoptosis, neuritogenesis and gene expression are not necessarily

mediated by this widely accepted mechanism of action, as was previously observed (MATAK; LACKOVIC, 2014). Then, the cell culture bioassay was performed based on the on the antiproliferative and cytotoxic effects using the cell line T-47D. To understand the complex mechanisms involved, additional studies are recommended. The potential of each of the methods was demonstrated, and their employment in conjunction represents advancements in terms of developing alternative analytical techniques to characterize the biotechnology-derived medicine.

3.5 Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity test of degraded forms was performed on the NCTC Clone 929 cell line and CHO-K1 cell line, giving means of $IC_{50} = 3.35 \pm 0.86 \text{ U mL}^{-1}$ and $4.23 \pm 0.22 \text{ U mL}^{-1}$, respectively. Differences calculated by the Student's *t*-test ($p < 0.05$) were significant compared to the intact molecule, which gave $IC_{50} = 1.53 \pm 0.11 \text{ U mL}^{-1}$ and $1.32 \pm 0.19 \text{ U mL}^{-1}$ for NCTC and CHO, respectively (Figure 2). The cytotoxicity test showed reduced toxic effects on the cells, and this result could be correlated to the *in vivo* bioassay, which showed that the toxic effects were completely abolished. Such evaluations are now necessary, mainly due to recent concerns about possible undesirable human effects resulting from the instability of the samples during storage (GROOT; SCOOT, 2007, PINEDA, 2016, CARDOSO et al., 2017).

5. Conclusions

The validated SE-LC method and the correlation of the results demonstrated for the methods studied contribute to establishing alternatives in the context of refinement, reduction and replacement (the 3 Rs) of the animals and allow for a substantial improvement that can be applied during the biotechnology process to monitor the stability, improve the quality control, and ensure the batch-to-batch consistency of this biotechnology-derived medicine.

6. Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes) and Brazilian National Research Council (CNPq) for the financial support.

7. References

BAK, N. et al. SiMa cells for a serotype specific and sensitive cell-based neutralization test for botulinum toxin A and E. **Toxins**, v. 9, n. 7, p. 230, 2017.

BANDALA, C. et al. Effect of Botulinum Toxin A on Proliferation and Apoptosis in the T47D Breast Cancer Cell Line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 891-894, 2013.

BASAVANNA, U. et al. Development of a Cell-Based Functional Assay for the Detection of Clostridium botulinum Neurotoxin Types A and E. **International Journal of Microbiology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

BINZ, T. et al. The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 9153-9158, 1990.

BOYER, A. E. et al. Quantitative mass spectrometry for bacterial protein toxins—a sensitive, specific, high-throughput tool for detection and diagnosis. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2391-2413, 2011.

BRIN, M. F.; JAMES, C.; MALTMAN, J. Botulinum toxin type A products are not interchangeable: a review of the evidence. **Biologics**, v. 8, p. 227-241, 2014.

CARDOSO Jr, C. D. A. et al. 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.

CHELUVAPPA, R.; SCOWEN, P.; ERI, R. Ethics of animal research in human disease remediation, its institutional teaching; and alternatives to animal experimentation. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 5, n. 4, p. 1-4 , 2017.

CHEN, S. Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 913-939, 2012.

CHIRINO, A. J.; MIRE-SLUIS, A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1383–1391, 2004.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 9th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2017.

FDA – Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics** (2015).

FREITAS, G. W. et al. Evaluation of botulinum toxin type A by bioassays and a validated reversed-phase liquid chromatography method. **Analytical Methods**, v. 8, n. 3, p. 587-592, 2016.

FREVERT, J. Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products. **Drugs in R&d**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

GAINES, R.E Das et al. Validation of *in vitro* assays for botulinum toxin: a case study. **Developments in biological standardization**, v. 101, p. 267-276, 1999.

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

HONG, P.; KOZA, S.; BOUVIER, E. S.P. A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 35, n. 20, p. 2923-2950, 2012.

HUNT, T. et al. Characterization of SNARE Cleavage Products Generated by Formulated Botulinum Neurotoxin Type-A Drug Products. **Toxins**, v. 2, p. 2198-2212, 2010.

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.

JANKOVIC, J. Botulinum toxin: State of the art. **Movement Disorders**, 2017.

JONES, R. G. A. et al. Development of improved SNAP25 endopeptidase immunoassays for botulinum type A and E toxins. **Journal of immunological methods**, v. 329, n. 1-2, p. 92-101, 2008.

LÉVÊQUE, C. et al. A substrate sensor chip to assay the enzymatic activity of Botulinum neurotoxin A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 276-281, 2013.

LÉVÊQUE, C. et al. A chip-based assay for botulinum neurotoxin A activity in pharmaceutical preparations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4355-4360, 2015.

LIETZOW, M. A. et al. Subunit stoichiometry of the Clostridium botulinum type A neurotoxin complex determined using denaturing capillary electrophoresis. **The protein journal**, v. 27, n. 7-8, p. 420-425, 2008.

LIU, Y. Y. B. et al. A functional dual-coated (FDC) microtiter plate method to replace the botulinum toxin LD50 test. **Analytical biochemistry**, v. 425, n. 1, p. 28-35, 2012.

MATAK, I.; LACKOVIĆ, Z. Botulinum toxin A, brain and pain. **Progress in neurobiology**, v. 119, p. 39-59, 2014.

PELLETT, S. Progress in Cell Based Assays for Botulinum Neurotoxin Detection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 364, p. 257-285, 2013.

PINEDA, C. et al. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. **BioDrugs**, v. 30, n. 3, p. 195-206, 2016.

PIRAZZINI, M. et al. Botulinum neurotoxins: Biology, pharmacology, and toxicology. **Pharmacological reviews**, v. 69, n. 2, p. 200-235, 2017.

ROSSETTO, O.; PIRAZZINI, M.; MONTECUCCO, C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 535, 2014.

SHABIR, G. A. et al. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311–333, 2007.

SESARDIC, D.; LEUNG, T.; GAINES DAS, R. Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. **Biologicals**, v. 31, n. 4, p. 265-276, 2003.

SESARDIC, T. Bioassays for evaluation of medical products derived from bacterial toxins. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 3, p. 310-316, 2012.

UNITED STATES Pharmacopeia, 39 ed., Rockville: **The United States Pharmacopeia Convention**, 2016.

Table 1

Accuracy of SE-LC for determining BoNTA in biopharmaceutical formulations.

Nominal concentration (U mL ⁻¹)	Mean concentration measured ^a (U mL ⁻¹)	RSD ^b (%)	Accuracy ^a (%)	Bias ^c (%)
40	40.02	0.73	100.04	0.05
50	50.13	0.14	100.26	0.26
60	60.56	0.22	100.93	0.93

^a = Mean of three replicates.

^b = RSD, Relative standard deviation.

^c = Bias = [(Measured concentration – Nominal concentration)/Nominal concentration] × 100.

Table 2

Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing using the one-variable-at-a-time procedure for the SE-LC method.

Variable	Range investigated	BoNTA ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
Mobile phase pH	6.5	99.56	0.57	7.0
	7.0	101.12	0.17	
	7.5	100.13	0.86	
Potassium phosphate concentration (mM)	30	99.86	0.54	50
	50	100.19	0.29	
	70	102.40	0.43	
Flow rate (mL min ⁻¹)	0.8	99.90	0.69	1.0
	1.0	100.16	0.19	
	1.2	98.72	0.98	
Wavelength (nm)	210–320	–	–	220
Solution stability	Autosampler, 24 h	98.18	0.76	–
	2–8 °C, 24 h	100.19	0.30	–
	2–8 °C, 48 h	99.80	0.19	–

^a = Mean of three replicates.

^b = RSD, Relative standard deviation.

Table 3

Comparative content/potency assessment of BoNTA in biopharmaceutical formulations by the LD₅₀ bioassay, T-47D cell bioassay and LC methods.

Sample	Theoretical amount (U mL ⁻¹)	LD ₅₀ bioassay ^a		T-47D bioassay ^a		SE-LC ^a		RP-LC ^a	
		Potency (%)	Confidence intervals (<i>p</i> = 0.95)	Potency (%)	Confidence intervals (<i>p</i> = 0.95)	Monomer (%)	HMW proteins (%)	Main peak (%)	Related proteins (%)
1	100	88.70	79.70–98.20	90.50	84.20–97.30	89.10	0.52	87.90	0.41
2	100	94.70	86.60–103.50	95.10	88.80–101.80	95.50	0.50	94.20	0.12
3	100	113.10	102.80–124.90	114.30	108.80–124.50	115.10	0.15	113.56	0.08
4	200	98.70	87.40–111.30	99.90	90.20–110.70	99.02	0.21	100.10	0.05
5	100	94.60	84.50–105.40	95.30	87.70–103.40	94.25	0.72	93.40	0.52
6	100	101.50	90.19–114.65	102.30	92.10–113.70	101.92	0.16	100.66	0.18
7	100	98.40	88.30–109.60	99.30	90.80–108.60	99.31	0.13	98.30	0.07
Mean ^a	–	98.46	–	99.53	–	99.17	0.34	98.30	0.23
SD ^b	–	7.72	–	7.58	–	8.17	0.24	8.07	0.18
							ANOVA		F calculated
							Between-methods		0.02976
4 ^c	–	50.90	42.60–61.20	52.30	43.20–60.80	53.40	14.19	50.70	19.45
4 ^d	–	151.20	143.70–159.10	153.80	145.90–160.20	152.10	0.12	149.80	0.10
4 ^e	–	Inactive	–	29.10	22.10–36.90	77.90	8.62	–	–
4 ^f	–	95.20	87.00–103.00	97.40	89.40–105.30	–	–	80.53	10.26

^a = Mean of three replicates. ^b = SD, Standard deviation. Content of altered samples: ^c = 50%, ^d = 150%, ^e = Neutral hydrolysis and ^f = UV degradation.

Figure captions

Fig. 1. SE-LC chromatograms showing peak 1 = HSA; peak 2 = BoNTA; peaks 3 and 4 = HMW proteins. (a) Biological reference substance, (b) sample of a biopharmaceutical formulation, (c) after neutral hydrolysis, (d) placebo.

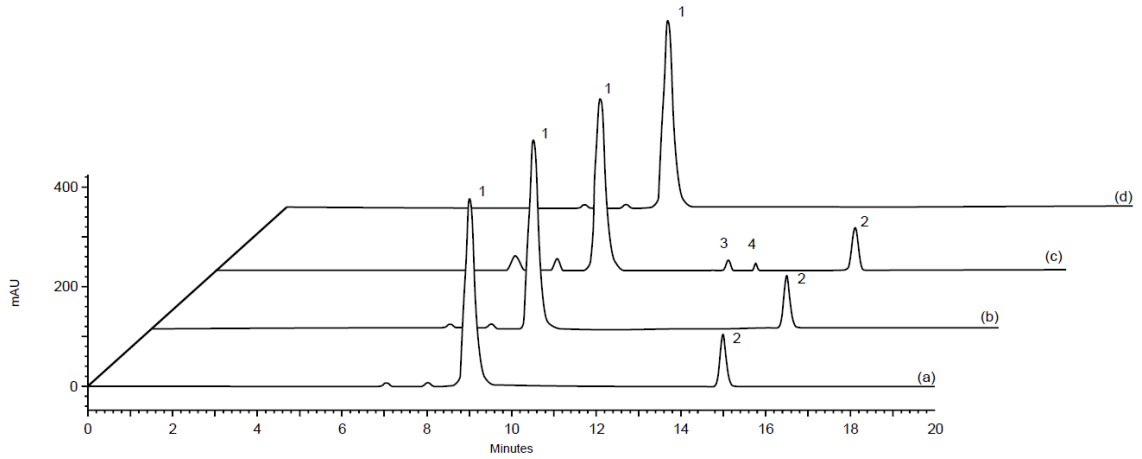
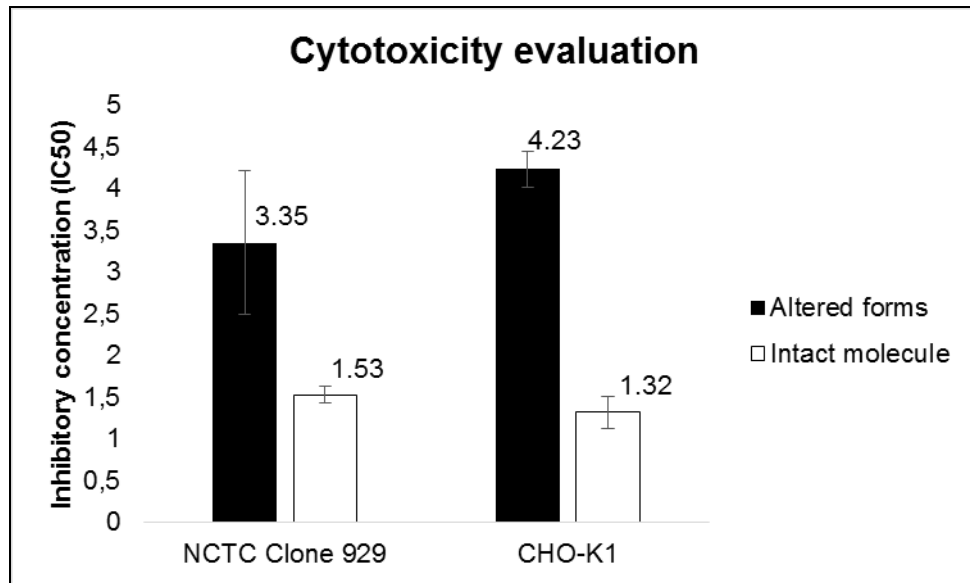


Fig. 2. Cytotoxicity evaluation using the NCTC Clone 929 and CHO-K1 cell lines.



DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A BoNTA é obtida por processos biotecnológicos, que viabilizaram a produção da biomolécula e dos produtos biofarmacêuticos de crescente uso na área farmacêutica. Porém, devido a sua estrutura molecular complexa e presença de proteínas não-tóxicas decorrentes da fermentação bacteriana, necessita-se da combinação de tecnologias analíticas para sua caracterização e avaliação da qualidade nas diferentes etapas de produção da biomolécula.

A atividade dos produtos biológicos é geralmente avaliada por bioensaios. Em especial as toxinas bacterianas necessitam dos modelos *in vivo*, que são fundamentais para a BoNTA, pois o componente ativo tem múltiplos mecanismos de ação e os métodos físico-químicos são insuficientes para determinar sua bioatividade. Além disso, são necessários devido aos complexos processos de produção, purificação e formulação que podem afetar sua eficácia. Neste contexto, foi realizado o bioensaio da DL₅₀ em camundongos, conforme preconizado pela literatura (E.P., 2017), destacando inclusive sua importância para validar procedimento alternativo. Avançou-se então, na otimização do bioensaio por cultura de células T-47D *in vitro*, de acordo com os 3 Rs, visando a substituição ou redução do uso de animais.

Por sua vez, os métodos por CL-FR e por CL-EM têm sido progressivamente adotados para os estudos de biofármacos, tanto nas etapas de expressão como para produtos biofarmacêuticos. Deste modo, com base em trabalho previamente realizado por CL-FR, planejou-se a etapa sucessiva de pesquisa do método por CL-EM, a ser aplicado para os diferentes produtos disponíveis nas áreas farmacêutica e cosmética. Paralelamente, avançou-se também, para estudos de correlação entre os resultados dos métodos biológicos e cromatográficos, conforme demonstrado a seguir.

A presente discussão fundamenta-se no artigo científico incluído no capítulo anterior, no qual estão detalhados os resultados experimentais encontrados.

É importante destacar que não existe Padrão Internacional ou substância biológica de referência certificada para a BoNTA. Assim, podem existir diferenças entre os produtos biofarmacêuticos comercializados, entre as quais o processo de produção, formulações e métodos de ensaio utilizados para determinar unidades de atividade biológica, que também podem justificar a validação de procedimento para

cada produto. Conseqüentemente, os produtos podem apresentar diferenças em seus perfis *in vivo*, devido às interações específicas entre cada produto de BoNTA e o tecido injetado, incluindo curvas dose-resposta pré-clínicas, dosagem, eficácia, duração, segurança e efeitos adversos, nem sempre previsíveis (BRIN et al., 2014). Neste sentido, os estudos foram realizados com o Padrão disponível, fornecido por uma empresa farmacêutica da área e que foi adotado para a determinação de teor/potência dos diferentes produtos biofarmacêuticos. É oportuno observar a necessidade de avançar e planejar o estudo de um padrão de referência.

Inicialmente, desenvolveu-se o método por CL-EM testando fases móveis contendo fosfato de potássio, fosfato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e ácido fosfórico, empregando concentrações de 0,05 M a 0,4 M. O pH da fase móvel também foi estudado na faixa de 4 a 7,5. Selecionou-se o tampão de fosfato de potássio, na concentração de 0,05 M pH 7,0, que apresentou maior sensibilidade e menor tempo de retenção. Avaliou-se também a influência dos modificadores orgânicos metanol e isopropanol (5 a 10% v/v), que não resultou em melhor perfil cromatográfico ou eficiência.

Além disso, foram testadas colunas cromatográficas com diferentes comprimentos, tamanhos de poro e partícula. A coluna TSKgel® G3000 SW_{XL} com capacidade de separação de moléculas de 10 – 500 kDa foi definida devido à melhor simetria e menor tempo de retenção para BoNTA. A separação foi alcançada com tempo de retenção de 15 min e o tempo de corrida foi de 20 min (Figura 1), viabilizando condições adequadas para avançar para a validação.

A especificidade do método foi avaliada por estudos de degradação forçada por hidrólise neutra (aquecimento a 60°C por 8 h e agitação por 1 h), análise dos excipientes da formulação e determinação da pureza dos picos. Após degradação da amostra foram detectados dois picos adicionais nos tempos de 12 e 12,7 min (Figura 1 ^o) que, provavelmente, podem ser atribuídos a proteínas de alta massa molecular. Demonstrou-se que a HSA apresenta um pico com tempo de retenção de 9,2 min e não interfere na identificação e quantificação de BoNTA. A pureza dos picos, referente ao monômero e picos adicionais, foi avaliada com detector de arranjo de diodos (DAD), que demonstrou elevada pureza (> 0,9999) e indicou que não houve co-eluição de produtos de degradação com o pico da BoNTA, nas condições selecionadas. Portanto, os resultados observados confirmam a especificidade do método proposto.

Por sua vez, testou-se a regressão linear do método, que foi significativa na faixa de concentração de 0,29 – 100 U mL⁻¹, com coeficiente de determinação (r^2) = 0,9998, $y = (33374 \pm 229,22)x - (13547 \pm 981,96)$, onde x é a concentração e y a área absoluta do pico. Os limites de detecção e quantificação foram calculados, obtendo-se os valores 0,08 e 0,29 U mL⁻¹, respectivamente. O limite de quantificação experimental, calculado com precisão menor do que 5% e exatidão entre $\pm 5\%$ (26) foi 0,25 U mL⁻¹, que é adequado para o controle de qualidade.

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária (inter-dias e inter-analistas). Os dados obtidos forneceram desvio padrão relativo (DPR) inferiores a 0,62%, confirmando a precisão do método, pois a literatura preconiza para produtos biotecnológicos, valores $\leq 2\%$ (SHABIR, 2003; ICH, 2005; FDA, 2015). A exatidão do método também foi demonstrada, com média de 100,41%, conforme a Tabela 1.

A robustez do método foi estudada através de pequenas modificações independentes na concentração de fosfato de potássio (mM), no pH da fase móvel, na vazão (mL min⁻¹) e no comprimento de onda (nm), observando que não houve influência na quantificação de BoNTA. Os resultados variaram entre 98,72 e 102,40%, conforme consta na Tabela 2 juntamente com os valores otimizados, demonstrando que estão na faixa de aceitação com DPR $\leq 2\%$, com diferenças não significativas ($p > 0,05$), de acordo com a análise de variância. Por esta razão, o método foi considerado robusto nas condições testadas. As amostras foram também submetidas ao teste de estabilidade, demonstrando que são estáveis por 24 h no auto-injetor (98,18%) e por 48 h mantidas de 2 – 8°C (99,80%).

Os parâmetros do teste de adequabilidade do sistema: número de pratos teóricos, área do pico, tempo de retenção e simetria foram avaliados, obtendo valores de acordo com as especificações preconizadas, além de DPR $\leq 2\%$, assegurando a confiabilidade dos resultados (ICH, 2005; FDA, 2015; USP 39, 2016).

Os parâmetros de validação estudados demonstram que o método por CL-EM cumpre com os requisitos preconizados pelos compêndios oficiais (ICH, 2005; FDA, 2015; USP 39, 2016) e pode ser aplicado para quantificação de BoNTA em produtos biotecnológicos acabados.

Os ensaios biológicos *in vitro* têm sido estudados e propostos como alternativa ao bioensaio *in vivo*. Os métodos estudados fundamentam-se na avaliação da função citotóxica e específica da cadeia leve (baseada na clivagem de

SNAP-25), e são denominados ensaios da endopeptidase. Porém, não avaliam as funções específicas de ligação e translocação da cadeia pesada, que também é essencial para toxicidade, que se constitui em limitação importante. Além disso, não são capazes de detectar os domínios funcionais ou alguma modificação estrutural da molécula. Por sua vez, o principal mecanismo de ação descrito para os *efeitos in vivo* de BoNTA, está associado exclusivamente à clivagem do SNAP-25. Porém, pesquisas atuais realizadas com ensaios *in vitro* e *in vivo* sugerem outras ações relacionadas à neuroexocitose, ciclo celular e apoptose, neuritogênese e expressão gênica e não são necessariamente mediadas pelo mecanismo citado (LEVEQUE et al., 2015; MATAK; LACKOVIC, 2014).

O ensaio biológico *in vitro* por cultura de células foi realizado baseado nos efeitos antiproliferativo e citotóxico, em células de câncer de mama T-47D. Após 24 h de exposição, a BoNTA induz processos apoptóticos dependentes de caspase-3 e 7, com efeitos inibitórios significativos na proliferação desta linhagem. A curva dose-resposta foi estudada e o ensaio mostrou-se linear na faixa de 3 – 81 U mL⁻¹. Foram testados parâmetros como concentração de células, volume de suspensão, tempos de incubação e de exposição à BoNTA. A viabilidade celular foi avaliada com os corantes MTT e azul de alamar, com leitura espectrofotométrica e os resultados expressos como resposta antiproliferativa. O azul de alamar foi definido devido ao menor tempo de incubação e melhor reprodutibilidade dos resultados. O bioensaio foi aplicado para análise de atividade biológica de produtos biotecnológicos de BoNTA, obtendo resultados entre 90,50 e 114,30%.

Os resultados obtidos pela aplicação do método validado no presente trabalho por CL-EM na avaliação de teor/potência do produto acabado de BoNTA foram correlacionados com aqueles fornecidos pelos bioensaios, conforme apresentados na Tabela 3. Observa-se que o método por CL-EM apresentou diferenças das médias de teor/potência 0,71% superior em relação ao bioensaio *in vivo* e de 0,36% inferior ao *in vitro*, respectivamente. Paralelamente, os resultados foram também comparados com os fornecidos pela execução do método previamente validado, por CL-FR, observando-se diferenças das médias de teor/potência 0,87% superior. A análise de variância ANOVA demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os teores/potências fornecidos pelos métodos, com nível de significância de 5% ($p = 0,05$). A correlação entre os métodos por CL-EM em relação aos bioensaios *in vivo* e *in vitro*, foi calculada pelo coeficiente de correlação

de Pearson (r), que forneceu resultados $r = 0,9984$ e $0,9979$, respectivamente, demonstrando a significância dos dados.

Determinou-se também o teor de proteínas de alta massa molecular nas amostras, através da soma das áreas dos picos com tempo de retenção menor do que o monômero, em relação à área total, com exceção do pico referente à albumina. Os resultados foram expressos em percentagem, obtendo-se o valor máximo de 0,72%. Não há especificações farmacopeicas em relação ao método cromatográfico para BoNTA, mas, observando monografias de produtos biotecnológicos, é recomendável sugerir limites de até 13%, que é preconizado para produtos cujas formas de alta massa molecular apresentam perda da atividade biológica (USP, 2016). Neste contexto, os resultados obtidos podem ser considerados aceitáveis, destacando-se que as proteínas de alta massa molecular não apresentaram atividade biológica *in vivo* (Tabela 3).

É importante destacar que a análise das amostras submetidas à condição de estresse forçada descrita na especificidade originou degradação significativa ($p < 0,05$) (Tabela 3). A análise é importante para demonstrar possíveis alterações do produto, decorrentes de sua estabilidade. A Tabela 3 apresenta também os resultados da avaliação da amostra degradada contendo proteínas de alta massa molecular (4^e), pelo bioensaio *in vitro* com redução da atividade de aproximadamente, 88,10%. É conveniente destacar que o ensaio *in vivo* demonstrou degradação da biomolécula, com perda total da atividade biológica, não se detectando efeitos tóxicos ou mortalidade em camundongos, após três ensaios independentes. Devido aos resultados fornecidos pelas formas agregadas supracitadas, optou-se por submeter amostra à condição de fotólise por UV durante 8 h e análise pelo método por CL–FR (4^f), observando que os dados publicados foram obtidos após 4 h nestas condições. Os novos experimentos demonstraram diminuição da bioatividade para 95,20%, coerente com os dados previamente encontrados.

Acrescenta-se que as amostras degradadas foram também submetidas ao teste de citotoxicidade *in vitro*, obtendo diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à molécula íntegra. Foram obtidos para as amostras de BoNTA íntegra e degradada valores de: $Cl_{50} = 1,53 \pm 0,11 \text{ U mL}^{-1}$ e $Cl_{50} = 3,35 \pm 0,86 \text{ U mL}^{-1}$ na linhagem NCTC Clone 929 e $Cl_{50} = 1,32 \pm 0,19 \text{ U mL}^{-1}$ e $Cl_{50} = 4,23 \pm 0,22 \text{ U mL}^{-1}$ na linhagem CHO-K1. Os resultados demonstram redução de citotoxicidade da

molécula degradada, o que também se observa no bioensaio *in vitro*. Tais avaliações são atualmente necessárias, principalmente devido aos possíveis efeitos indesejáveis para seres humanos, resultante da instabilidade das amostras durante armazenamento (GROOT; SCOTT, 2007).

Convém destacar que os ensaios na linhagem T-47D também estão fundamentados na atividade antiproliferativa, porém, apresentam resultados reprodutíveis que expressam a potência biológica da biomolécula. As linhagens usadas nos testes de citotoxicidade demonstram os efeitos citotóxicos, porém, não discriminam as respostas com especificidade em diferentes níveis de concentração do produto.

Até o momento, não se encontra na literatura método por CL-EM para análise de BoNTA. Neste contexto, o método desenvolvido e validado contempla todos os parâmetros de validação preconizados pelos guias internacionais (ICH, 2005; FDA, 2015) e representa contribuição importante para a determinação do teor/potência de BoNTA e das proteínas de alta massa molecular. Além disso, pode ser adotado nas etapas de fermentação, purificação e para o produto acabado, em paralelo com os bioensaios *in vivo* e por cultura de células *in vitro*, cuja validação se constitui em etapa sucessiva.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

- Desenvolveu-se e validou-se método por CL–EM específico, preciso, exato e robusto, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação, quantificação e avaliação de proteínas de alta massa molecular da BoNTA.
- Otimizou-se o bioensaio antiproliferativo por cultura de células T–47D *in vitro* que foi adotado para avaliar a atividade biológica da BoNTA, demonstrando também os efeitos das amostras degradadas.
- Executou-se o método por CL–FR, previamente validado, para avaliação da BoNTA e de suas proteínas relacionadas.
- Avaliaram-se os resultados fornecidos pelos métodos validados por CL–EM e CL–FR e pelos bioensaios para as amostras selecionadas, observando-se correlação significativa ($r > 0,9$), conforme calculado pelo coeficiente de correlação de Pearson.
- Recomenda-se a aplicação dos métodos físico-químicos validados para avaliação de BoNTA, em combinação com os bioensaios, pois viabiliza a determinação de proteínas de alta massa molecular e de formas relacionadas e representa contribuição importante para aprimorar a caracterização do produto biofarmacêutico.
- Avaliou-se a citotoxicidade *in vitro* das amostras de BoNTA degradadas demonstrando redução de toxicidade em relação à molécula íntegra.
- Avaliou-se a bioatividade das amostras com proteínas de alta massa molecular, obtidas por hidrólise neutra, demonstrando que não apresentaram efeitos tóxicos e de mortalidade em camundongos.
- Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos de correlação entre métodos físico-químicos e biológicos, contribuindo, assim, para estabelecimento de procedimentos alternativos para aprimorar o controle da qualidade e avanços na área desses produtos biotecnológicos disponíveis no País.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B. E. et al. 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.
- ALSTYNE, D. V.; GERWING, J.; TREMAINE, J. H. Amino Acid Composition of Clostridium botulinum Type A toxin. **Journal of Bacteriology**, v. 92, p. 796-797, 1966.
- BAK, N. et al. SiMa cells for a serotype specific and sensitive cell-based neutralization test for botulinum toxin A and E. **Toxins**, v. 9, n. 7, p. 230, 2017.
- BANDALA, C. et al. Effect of Botulinum Toxin A on Proliferation and Apoptosis in the T47D Breast Cancer Cell Line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 891-894, 2013.
- BENECKE, R. Clinical relevance of botulinum toxin immunogenicity. **BioDrugs**, v. 26, n. 2, p. 1-9, 2012.
- BINZ, T. et al. The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 9153-9158, 1990.
- 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. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de dezembro de 2010.
- BRIN, M. F.; JAMES, C.; MALTMAN, J. Botulinum toxin type A products are not interchangeable: a review of the evidence. **Biologics**, v. 8, p. 227-241, 2014.
- CHELUVAPPA, R.; SCOWEN, P.; ERI, R. Ethics of animal research in human disease remediation, its institutional teaching; and alternatives to animal experimentation. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 5, n. 4, p. 1-4 , 2017.
- CHEN, S. Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 913-939, 2012.
- CHENG, L. W. et al. Effects of purification on the bioavailability of botulinum neurotoxin type A. **Toxicology**, v. 249, n. 2-3, p. 123-129, 2008.
- CHIRINO, A. J.; MIRE-SLUIS, A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1383–1391, 2004.
- DAS GUPTA, B. R.; SATHYAMOORTHY, V. Purification and amino acid composition of type A botulinum neurotoxin. **Toxicon**, v. 22, p. 415-424, 1984.

DASGUPTA, B. R.; SUGIYAMA, H. A common subunit structure in Clostridium botulinum type A, B and E toxins. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 48, n. 1, p. 108-112, 1972.

DRESSLER, D. et al. Antibody-Induced Failure of Botulinum Toxin A Therapy in Cosmetic Indications. **Dermatologic Surgery**, v. 36, n. s4, p. 2182-2187, 2010.

DRESSLER, D.; BIGALKE, H. Immunological aspects of botulinum toxin therapy. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 17, n. 5, p. 487-494, 2017.

DRESSLER, D.; SABERI, F. A. Botulinum Toxin: Mechanisms of Action. **European Neurology**, v. 53, p. 3-9, 2005.

European Medicines Agency. **Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1)**. London, December, 2014.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 9th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2017.

EVANS, E. R.; SKIPPER, P. J. A.; SHONE, C. C. An assay for botulinum toxin types A, B and F that requires both functional binding and catalytic activities within the neurotoxin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1384-1391, 2009.

FDA – Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics** (2015).

FEKETE, S. et al. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 161-173, 2014.

FERNÁNDEZ-SALAS, E. et al. Botulinum Neurotoxin Serotype a Specific Cell-Based Potency Assay to Replace the Mouse Bioassay. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. e49516, 2012.

FREITAS, G. W. et al. Evaluation of botulinum toxin type A by bioassays and a validated reversed-phase liquid chromatography method. **Analytical Methods**, v. 8, n. 3, p. 587-592, 2016.

FREVERT, J. Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products. **Drugs in R&d**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

GIRLANDA, P. et al. Botulinum toxin therapy: distant effects on neuromuscular transmission and autonomic nervous system. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 55, p. 844-845, 1992.

GREGORY, R. W.; WERNER, W. E.; RUEGG, C. A quantitative bifunctional *in vitro* potency assay for botulinum neurotoxin serotype A. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, n. 2, p. 103-107, 2014.

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

HALLETT, M. Explanation of timing of botulinum neurotoxin effects, onset and duration, and clinical ways of influencing them. **Toxicon**, v. 107, p. 64-67, 2015.

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.

ISAPS - The International Study on Aesthetic/Cosmetic Procedures Performed, In 2016.

JANKOVIC, J. Botulinum toxin: State of the art. **Movement Disorders**, 2017.

KRIEGSTEIN, K. G.; DASGUPTA, B. R.; HENSCHEN, A. H. Covalent structure of botulinum neurotoxin type A: location of sulfhydryl groups, and disulfide bridges and identification of C-termini of light and heavy chains. **Journal of Protein Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 49-57, 1994.

LAING, T. D. et al. Capillary electrophoresis laser-induced fluorescence for screening combinatorial peptide libraries in assays of botulinum neurotoxin A. **Journal of Chromatography B**, v. 843, n. 2, p. 240-246, 2006.

LÉVÊQUE, C. et al. A substrate sensor chip to assay the enzymatic activity of Botulinum neurotoxin A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 276-281, 2013.

LÉVÊQUE, C. et al. A chip-based assay for botulinum neurotoxin A activity in pharmaceutical preparations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4355-4360, 2015.

MALDANER, F. P. S. et al. 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.

MATAK, I.; LACKOVIĆ, Z. Botulinum toxin A, brain and pain. **Progress in Neurobiology**, v. 119, p. 39-59, 2014.

MEHLAN, J. et al. Intrastratial injection of botulinum neurotoxin-A is not cytotoxic in rat brain—a histological and stereological analysis. **Brain Research**, v. 1630, p. 18-24, 2016.

NAUMANN, M. Immunogenicity of botulinum toxins. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 2, p. 275-290, 2013.

PECK, M. W. et al. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. **Toxins**, v. 9, n. 1, p. 38, 2017.

PELLETT, S. Progress in Cell Based Assays for Botulinum Neurotoxin Detection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 364, p. 257–285, 2013.

PINEDA, C. et al. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. **BioDrugs**, v. 30, n. 3, p. 195–206, 2016.

PIRAZZINI, M. et al. Botulinum neurotoxins: Biology, pharmacology, and toxicology. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 200-235, 2017.

PURCELL, A. L.; HOARD-FRUCHEY, H. M. A capillary electrophoresis method to assay catalytic activity of botulinum neurotoxin serotypes: implications for substrate specificity. **Analytical Biochemistry**, v. 366, n. 2, p. 207-217, 2007.

RAMIREZ-CASTANEDA, J. et al. Diffusion, spread, and migration of botulinum toxin. **Movement Disorders**, v. 28, n. 13, p. 1775-1783, 2013.

ROSALES R.L., et al. Extrafusal and intrafusal muscle effects in experimental botulinum toxin-A injection. **Muscle Nerve**, v. 19, p. 488–496, 1996.

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111-125, 2007.

SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. **Microbiological reviews**, v. 56, n. 1, p. 80-99, 1992.

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. et al. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311–333, 2007.

SESARDIC, D.; DAS, R. Gaines. Botulinum toxin: applying the 3Rs to product potency testing. **NC3Rs**, p. 1-8, 2009.

SESARDIC, T. Bioassays for evaluation of medical products derived from bacterial toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 310-316, 2012.

SETO, Y.; KANAMORI-KATAOKA, M. Mass spectrometric strategy for the determination of natural and synthetic organic toxins. **Journal of Health Science**, v. 51, n. 5, p. 519-525, 2005.

WALKER, T. J.; DAYAN, S. H. Comparison and overview of currently available neurotoxins. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 7, n. 2, p. 31, 2014.

WILDNER-KOFIE, T. et al. An Alternative *In Vivo* Method to Refine the Mouse Bioassay for Botulinum Toxin Detection. **Comparative Medicine**, v. 61, p. 235-242, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Pesquisa de métodos por cultura de células e por cromatografia líquida para caracterização e avaliação de potência/teor de toxina botulínica tipo A", protocolada sob o CEUA nº 8227050716, sob a responsabilidade de **Sérgio Luiz Dalmora** e equipe; *Bruna Xavier; Fernanda Pavani Stamm Maldaner; Maurício Elesbão Walter; Rafaela Ferreira Perobelli; Rosecler da Rosa Kulmann; Silvana Ferreira Vaccari* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 22/09/2016.

We certify that the proposal "CELL CULTURE AND LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODS FOR THE CHARACTERIZATION, AND CONTENT/POTENCY EVALUATION OF BOTULINUM TOXIN TYPE A.", utilizing 680 isogenics mice (680 females), protocol number CEUA 8227050716, under the responsibility of **Sérgio Luiz Dalmora** and team; *Bruna Xavier; Fernanda Pavani Stamm Maldaner; Maurício Elesbão Walter; Rafaela Ferreira Perobelli; Rosecler da Rosa Kulmann; Silvana Ferreira Vaccari* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 09/22/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2016** a **09/2017**

Área: **Farmácia Industrial**

Origem: **Biotério externo**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **18 a 21 dias**

N: **680**

Linhagem: **Balb/C**

Peso: **10 a 14 g**

Resumo: O presente projeto está inserido no contexto do projeto guarda-chuva denominado "Estudos pré-clínicos e analíticos de substâncias ativas, produtos biotecnológicos e suas formas modificadas. Comparabilidade", aprovado pelo GAP-CCS sob número 031767. A toxina botulínica tipo A (BoNTA) é um polipeptídeo constituído de 1296 aminoácidos, tem sido especialmente utilizada com objetivos cosméticos e sua aplicação tem aumentado para tratamento de hiperhidrose, dor e enxaqueca. A BoNTA é produzida através do processo de fermentação bacteriana e após sucessivas etapas de purificação resulta em proteína com 150 kDa responsável pelo seu efeito biológico. Os principais objetivos deste trabalho são: realizar estudo por cultura de células in vitro e desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) para caracterização e avaliação de teor/potência de BoNTA. Aplicar os métodos para avaliação da potência de BoNTA em formulações de diferentes produtos biofarmacêuticos comercializados no país e realizar estudos de correlação com o bioensaio in vivo, contribuindo para estabelecer procedimentos que aprimoram o controle da qualidade, garantindo a segurança e atividade biológica do produto biotecnológico.

Local do experimento: Laboratório de Biológicos-Departamento de Farmácia Industrial

Santa Maria, 08 de maio de 2017

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria