

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

Francielle Santos da Silva

**ESTUDOS DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOLÓGICO PARA  
ANÁLISE DO ANTICORPO MONOCLONAL RAMUCIRUMABE**

Santa Maria, RS  
2022

**Francielle Santos da Silva**

**ESTUDOS DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOLÓGICO PARA ANÁLISE  
DO ANTICORPO MONOCLONAL RAMUCIRUMABE**

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS  
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

da Silva, Francielle Santos  
ESTUDOS DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOLÓGICO PARA  
ANÁLISE DO ANTICORPO MONOCLONAL RAMUCIRUMABE /  
Francielle Santos da Silva.- 2022.  
107 p.; 30 cm

Orientador: Sérgio Luis Dalmora  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Anticorpo Monoclonal 2. Ramucirumabe 3.  
Cromatografia Líquida em Fase Reversa 4. Cromatografia  
Líquida por Exclusão Molecular 5. Biotensaio I. Dalmora,  
Sérgio Luis II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(s). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patto CRM 10/1728.

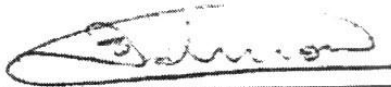
Declaro, FRANCIELLE SANTOS DA SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Francielle Santos da Silva**

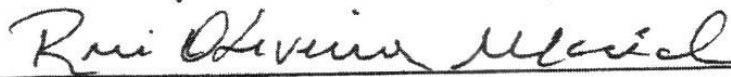
**ESTUDOS DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOLÓGICO PARA ANÁLISE  
DO ANTICORPO MONOCLONAL RAMUCIRUMABE**

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

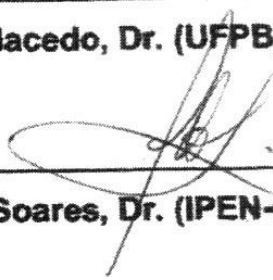
**Aprovado em 28 de janeiro de 2022:**



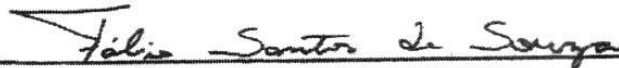
**Sérgio Luiz Dalmora, Dr. (UFSM) - Videoconferência  
(Presidente / Orientador)**



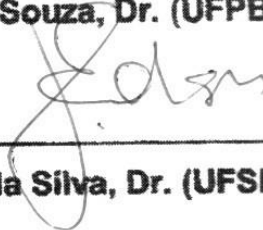
**Rui Oliveira Macedo, Dr. (UFPB) - Videoconferência**



**Carlos Roberto Jorge Soares, Dr. (IPEN-CNEN-SP) - Videoconferência**



**Fábio Santos de Souza, Dr. (UFPB) - Videoconferência**



**José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM) - Videoconferência**

Santa Maria, RS  
2022

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho as pessoas que, de alguma forma, me auxiliaram durante essa trajetória, pois, “Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” (Cora Coralina).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo maravilhoso presente, que é a vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pela oportunidade, aprendizado, paciência e confiança, desde a iniciação científica até a conclusão dessa tese.

Aos meus pais, Isabel Medianeira Santos da Silva e Aléssio Braz da Silva, que me apoiaram e estiveram comigo em todos os momentos. Obrigada por entenderem meus momentos de ausência e por terem feito dos meus sonhos, os seus. Amo vocês!

Ao meu irmão, Leonardo Santos da Silva, pelo apoio e compreensão.

Ao meu noivo, Jonas Perônio do Nascimento, obrigada por viver comigo essa trajetória e incentivar minhas escolhas.

A todos os colegas e amigos do CTEFAR, pela convivência, companheirismo, cumplicidade e apoio. Vocês foram essenciais!

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por oportunizarem esse momento.

“Escuta e serás sábio. O começo da sabedoria é o silêncio”

(Pitágoras)

## RESUMO

### ESTUDOS DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E BIOLÓGICO PARA ANÁLISE DO ANTICORPO MONOCLONAL RAMUCIRUMABE

AUTOR: Francielle Santos da Silva  
ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

O Ramucirumabe (RAM) é um anticorpo monoclonal humano anti-VEGFR-2, que desenvolve sua função antiangiogênica ao diminuir a vascularização para consequente redução do crescimento tumoral. Na clínica, é utilizado para o tratamento de pacientes adultos com câncer gástrico ou da junção gastroesofágica avançado, câncer de pulmão, câncer colorretal e hepático. Estruturalmente é uma imunoglobulina da classe IgG, produzida pela tecnologia do DNA recombinante em células de mieloma murino (NS0). Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) para avaliação de RAM em produtos biofarmacêuticos. Além disso, foi desenvolvido bioensaio por cultura em células A549 *in vitro* para avaliação da potência do produto biotecnológico. No método por CL-FR utilizou-se a coluna ZORBAX 300SB-C18, mantida a 80°C. A fase móvel foi constituída de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% v / v em água e TFA 0,1% v / v em acetonitrila (ACN), com eluição por gradiente, fluxo de 1 mL / min e detecção por arranjo de diodos (DAD) em 214 nm. No método por CL-EM, foi utilizada coluna BioSep-SEC-s2000, mantida a 35 °C, fase móvel composta por fosfato de potássio monobásico (140 mM), fosfato de potássio dibásico (60 mM) e cloreto de potássio (250 mM), pH 7,0, com eluição isocrática de 0,8 mL / min e detecção por DAD em 214 nm. O RAM foi eluído com tempos de retenção de 9,7 e 8,7 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,125 – 10 mg / mL ( $r^2 = 0,9998$ ) e 0,250 – 10 mg / mL ( $r^2 = 0,9994$ ), respectivamente, para CL-FR e por CL-EM. A especificidade dos métodos foi verificada e confirmada por estudos de degradação forçada, interferência dos excipientes da formulação e pureza dos picos. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,03 e 0,08 mg / mL para o método por CL-FR e 0,04 e 0,13 mg / mL, para CL-EM. As médias da exatidão foram de 99,72 e 100,08 com bias de 0,57 e 0,60%, respectivamente. O bioensaio *in vitro* da antiproliferação celular em células A549 foi desenvolvido e aplicado para avaliação da atividade biológica de RAM. A correlação entre os métodos analíticos por CL-FR e CL-EM com o bioensaio por cultura de células, foi calculada pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), que forneceu os valores de  $r = 0,9053$  e  $r = 0,9353$ , respectivamente, demonstrando a significância dos dados. Assim, sugere-se que os métodos desenvolvidos e validados por CL-FR e CL-EM em conjunto com o bioensaio, sejam aplicados para aprimorar o controle de qualidade, contribuindo para garantir a segurança e eficácia terapêutica do produto biotecnológico.

**Palavras-chave:** Anticorpo Monoclonal. Ramucirumabe. Cromatografia Líquida em Fase Reversa. Cromatografia Líquida por Exclusão Molecular. Bioensaio. Validação.



## ABSTRACT

### STUDIES OF CHROMATOGRAPHIC AND BIOLOGICAL METHODS FOR THE ANALYSIS OF THE MONOCLONAL ANTIBODY RAMUCIRUMAB

AUTHOR: Francielle Santos da Silva

ADVISER: Sérgio Luiz Dalmora

Ramucirumab (RAM) is a human anti-VEGFR-2 monoclonal antibody that develops its anti-angiogenic function by decreasing vascularization to reduce tumor growth. . It is clinically used for the treatment of adult patients with gastric or advanced gastroesophageal junction cancer, lung cancer, colorectal cancer and liver cancer. Structurally it is an IgG class immunoglobulin produced by recombinant DNA technology in murine myeloma (NS0) cells. In this work, reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and size exclusion liquid chromatography (SE-LC) methods were developed and validated for the evaluation of RAM in biopharmaceuticals. In addition, *in vitro* A549 cell culture bioassay was developed to evaluate the potency of the biotechnological product. In the RP-LC method the ZORBAX 300SB-C18 column was maintained at 80 °C. The mobile phase consisted of 0.1% v / v trifluoroacetic acid (TFA) in water and 0.1% v / v TFA in acetonitrile (ACN), with gradient elution, flow rate 1 mL / min, and diode array detection (DAD) at 214 nm. For the SE-LC method, a BioSep-SEC-S 2000 column was maintained at 35 °C, mobile phase composed of monobasic potassium phosphate (140 mM), dibasic potassium phosphate (60 mM) and potassium chloride (250 mM), pH 7.0 with isocratic elution of 0.8 mL / min and DAD detection at 214 nm. The RAM was eluted with retention times at 9.7 and 8.7 min, being linear in the concentration range of 0.125 – 10 mg / mL ( $r^2 = 0.9998$ ) and 0.250 – 10 mg / mL ( $r^2 = 0.9994$ ), respectively, for the RP-LC and SE-LC methods. The specificity of the methods was verified and confirmed by studies of forced degradation, interference of formulation excipients and peak purity. The limits of detection and quantification were 0.03 and 0.08 mg / mL for the RP-LC method and 0.04 and 0.13 mg / mL for SE-LC. The mean values for accuracy were 99.72 and 100.08 with bias of 0.57 and 0.60%, respectively. The antiproliferative A549 cells *in vitro* bioassay was developed and applied to evaluate the biology activity of RAM. Correlation between the RP-LC and SE-LC analytical methods with the cell culture bioassay was calculated by Pearson's correlation coefficient ( $r$ ), which gave the values of  $r = 0.9053$  and  $r = 0.9353$ , respectively, demonstrating the significance of the data. Thus, it is suggested that the methods developed and validated by RP-LC and SE-LC could be applied in conjunction with the bioassay to improve quality control, contributing to ensure the safety and therapeutic efficacy of the biotechnological product.

**Keywords:** Monoclonal Antibody. Ramucirumab. Reversed-Phase Liquid Chromatography. Size Exclusion Liquid Chromatography. Bioassay. Validation.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 -	Evolução dos Anticorpos Monoclonais .....	23
Figura 2 -	Estrutura básica do RAM .....	28
Figura 3 -	Mecanismo de ação do RAM .....	29

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

#### ARTIGO 1

Figure 1 -	RP-HPLC chromatograms showing peak 1 = RAM; peak 2 = histidine; peak 3 = hydrogen peroxide; peaks 4, 5, 6 and 7 = fragments from RAM. (a) RAM Biological reference substance (BS-RAM); BS-RAM after: (b) forced oxidative degradation; (c) forced photolytic degradation; (d) acid stress; (e) basic stress; (f) placebo .....	61
Figure 2 -	Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing for the determination of RAM by RP-HPLC method .....	62

#### ARTIGO 2

Figure I -	SE-LC chromatograms showing peak 1 = RAM; peak 2 = histidine; peaks 3, 4 and 5 = high-molecular-weight proteins. (a) RAM Biological reference substance (BS-RAM); BS-RAM after: (b) forced photolytic degradation; (c) neutral hydrolysis; (d) acid stress; (e) basic stress; (f) placebo .....	88
Figure II -	Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing for the determination of RAM by SE-LC method .....	89

## LISTA DE TABELAS

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA ARTIGO 1**

Table 1 – Accuracy and precision of RP–HPLC method for determining RAM in biopharmaceutical formulation .....	56
Table 2 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing using the one–variable–at–a–time for the RP–HPLC method .....	57
Table 3 – Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi–variable–at–a–time procedure for the RP–HPLC method .....	58
Table 4 – Comparative quantitation of RAM in biopharmaceutical formulations, using the cell culture A549 bioassay and the RP–HPLC method .....	59
Table 5 – Comparative quantitation of RAM of the intact sample and after stress condition using bioassay and the RP–HPLC method .....	60

### **ARTIGO 2**

Table I – Accuracy and precision of SE–LC method for determining RAM in biopharmaceutical formulations .....	84
Table II – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the SE–LC method .....	85
Table III – Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi–variable–at–a–time procedure for the SE–LC method .....	86
Table IV – Comparative quantitation of RAM in biopharmaceutical formulations, using the cell culture A549 bioassay and SE–LC method .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BS–RAM	Substância Biológica de Referência Representativa de RAM
CCDA	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
CCR	Câncer colorretal
CDC	Citotoxicidade dependente de anticorpo
CDR	Regiões determinantes de complementariedade
CV	Coeficiente de variação
CL	Cromatografia líquida
CL–FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL–EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CPNPC	Câncer de pulmão de não pequenas células
CL–TI	Cromatografia de troca iônica
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
d.i.	Diâmetro interno
EC	Eletroforese capilar
ELISA	Enzimaimunensaio
EMA	European Medicines Agency
EP	Farmacopéia Européia
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalisável
FCDA	Fagocitose celular dependente de anticorpo
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase móvel
HCC	Hepatocarcinoma
HUVEC	Células endoteliais vasculares umbilicais humanas
ICH	International Conference on Harmonisation
Ig	Imunoglobulina
kDa	Quilodalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mAb	Anticorpo monoclonal
MTT	Tetrazolio brometo (3–(4,5– <u>d</u> imetiltiazol–2–il)–2,5–difeníl tetrazolio
NSO	Células de mieloma murino
pH	Potencial hidrogeniônico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIGF	Fator de crescimento placentário
r	Coeficiente de correlação
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RAM	Ramucirumabe
TFA	Ácido trifluoracético
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF– $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
USP	Farmacopeia Americana
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 GERAIS .....	18
2.2 ESPECIFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
3.1 ANGIOGÊNESE .....	20
3.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	22
3.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS E SUAS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS.....	25
3.4 ANTICORPO MONOCLONAL RAMUCIRUMABE (RAM) .....	27
<b>3.4.1 Mecanismo de ação e atividade farmacológica do RAM</b> .....	28
<b>3.4.2 Usos terapêuticos do RAM</b> .....	30
3.5 METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	31
<b>3.5.1 Bioensaios</b> .....	31
<b>3.5.2 Métodos analíticos</b> .....	34
<b>4 ARTIGO 1</b> .....	39
<b>5 ARTIGO 2</b> .....	64
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	91
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	97
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	99

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de Doutorado encontra-se de acordo com os padrões e normas estabelecidas pelo manual de teses e dissertações (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) do ano de 2015. O estudo compreende o desenvolvimento e validação de métodos físico-químicos por cromatografia líquida para a quantificação do anticorpo monoclonal Ramucirumabe, bem como o desenvolvimento do bioensaio por cultura de células *in vitro* para avaliação da atividade biológica e estudos de correlação. Os resultados obtidos deram origem a dois artigos científicos que serão submetidos a publicação. As seções MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS encontram-se nos ARTIGOS CIENTÍFICOS, que apresentam a íntegra da pesquisa realizada. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se apenas às citações das seções INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO da Tese, pois as referências utilizadas para elaboração dos artigos científicos estão descritas nos mesmos.

## INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

Anticorpos monoclonais (mAbs) são imunoglobulinas (Igs) ou fragmento de Igs produzidos a partir de um único clone de linfócitos B. O sucesso dos mAbs terapêuticos no tratamento do câncer está relacionado à capacidade que eles possuem de interagir especificamente com seu alvo e apresentar efeitos adversos relativamente baixos, quando comparados com a quimioterapia tradicional. A complexidade dos mAbs é atribuída ao seu aspecto estrutural. Essas glicoproteínas tetraméricas são compostas por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas, e duas cadeias leves, dispostas em forma de Y (BASLE et al., 2019; BUSS et al., 2012; NEILL et al., 2015).

O mAb Ramucirumabe (RAM) é um anticorpo recombinante, da subclasse IgG1, com massa molecular de aproximadamente 147 KDa. É produzido pela tecnologia do DNA recombinante por clonagem e expressão em células de mieloma murino (NS0). Fisiologicamente o RAM liga-se ao domínio extracelular do VEGFR-2 e bloqueia sua ligação com os fatores VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, inibindo assim, suas vias de sinalização e a consequente proliferação e migração endotelial. Desta forma, ocorre uma menor vascularização e consequentemente diminuição do crescimento tumoral. Na clínica o RAM é utilizado para o tratamento de pacientes adultos com câncer gástrico, câncer de pulmão de não pequenas células, câncer colorretal e câncer hepatocelular (CYRAMZA® ELI LILLY, 2021; VENNEPUREDD et al., 2017; WADHWA et al., 2013).

Com o crescente aumento no desenvolvimento e comercialização de novos mAbs no mercado, destaca-se a necessidade do monitoramento da qualidade desses produtos. Além do mais, os mAbs recombinantes de uso terapêutico, apresentam estrutura complexa e requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com seus antígenos. Por essa razão, é enfatizada a caracterização desses produtos biotecnológicos através de tecnologias analíticas físico-químicas e biológicas, a fim de garantir sua eficácia terapêutica. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) juntamente com os ensaios de atividade biológica, possibilitam a separação, identificação e quantificação da substância biológica e suas formas degradadas, bem como o avanço para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos (FEKETE et al., 2012; MALDANER et al., 2017; SILVA, et al., 2019).



O RAM encontra-se disponível para uso clínico como produto biofarmacêutico denominado Cyramza<sup>®</sup>, porém na literatura, encontram-se escassas referências relativas à sua caracterização. Por sua vez, acrescenta-se que após o desenvolvimento do método analítico, a validação deve demonstrar através de estudos experimentais, que atende as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Até o presente momento, as farmacopeias não descrevem bioensaios e métodos físico-químicos para a caracterização e avaliação de RAM em produtos biofarmacêuticos acabados, o que demonstra a importância dos estudos planejados no presente trabalho (BRASIL, 2017; ICH, 2005; SHABIR et al., 2007).

Convém destacar que o domínio de tecnologias analíticas validadas, pode contribuir para viabilizar futuros estudos de comparabilidade de Ramucirumabe, pois a patente do produto biotecnológico Cyramza<sup>®</sup> tem o prazo de expiração para o ano de 2023 nos países constituintes da União Europeia, 2025 nos Estados Unidos da América e 2026 no Brasil (BRASIL, 2010; BRASIL, 2016; GOEL; CHANCE, 2017; ICH, 2011).

## **OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 GERAIS

Desenvolver e validar métodos por cromatografia líquida e bioensaio por cultura de células para avaliação de RAM e realizar estudos de correlação entre métodos físico-químicos e biológico para estabelecer parâmetros de qualidade que contribuam para garantir a eficácia e segurança do produto biotecnológico.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para identificação e quantificação da forma não alterada e de seus fragmentos.
- b) Desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) para identificação e quantificação do monômero e de proteínas de alta massa molecular.
- c) Realizar bioensaio *in vitro* com a linhagem de células A549 para avaliação de potência de RAM e suas formas modificadas.
- d) Avaliar correlação entre métodos físico-químicos e biológico, com análise estatística e interpretação dos resultados.
- e) Contribuir para futuros estudos de comparabilidade do anticorpo monoclonal RAM.

## REVISÃO DA LITERATURA

---

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

---

#### 3.1 ANGIOGÊNESE

A angiogênese é um processo natural e dinâmico, através do qual novos vasos sanguíneos são formados. Este processo envolve a degradação da matriz extracelular, ruptura dos contatos intercelulares, migração, proliferação e formação do tubo capilar de células endoteliais. Em adultos, a formação de novos vasos sanguíneos está envolvida em muitas situações fisiológicas e patológicas, como na cicatrização de feridas, remodelação e regeneração de tecidos, ciclo reprodutivo feminino, isquemia, artrite reumatoide e neovascularização tumoral (FOLKMAN, 2006; QUINTERO–FABIÁN et al., 2019).

A angiogênese tumoral é desencadeada em condições de hipóxia, uma vez que os tumores sólidos têm início sem um sistema vascular próprio. Dessa forma, os novos vasos garantem o suporte de oxigênio e nutrientes as células em proliferação, tornando os tumores independentes e com características invasivas. A neovascularização exibe muitas anormalidades estruturais e funcionais. Os novos vasos são dinâmicos e naturalmente sofrem germinação, proliferação, remodelação ou regressão. No entanto, favorecem a progressão e o processo de metástase tumoral (JAIN, 2005; KERBEL, 2008; MOELLER et al., 2004).

Entre os fatores pró-angiogênicos que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos estão as citocinas pró-angiogênicas; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de crescimento de fibroblasto (FGF); angiopoietinas; fator de crescimento transformador ( $TGF-\beta$ ); fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); fator de crescimento epidérmico (EGF); interleucina-8 (IL-8); angiogenina. Alguns desses fatores atuam ligando-se aos seus receptores nas células endoteliais, enquanto outros, atuam nas células estromais locais ou inflamatórias (RUNDHAUG, 2005).

Um dos fatores mais importantes, é o VEGF, uma glicoproteína com capacidade de estimular a proliferação, migração e formação de tubo de células endoteliais. Os membros da família VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E; fator de crescimento placentário (PlGF)) agem interagindo com três receptores tirosina quinases (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3). A maioria dos

efeitos do VEGF são regulados pelo VEGFR-2, o que influencia os mecanismos de controle e progressão do ciclo celular. Em muitos tipos de câncer, a ligação VEGF-A / VEGFR-2 está relacionada com a agressividade tumoral, tornando seu crescimento mais rápido e letal (LOHELA et al., 2009; ROSKOSKI, 2007; SPAGNUOLO et al., 2020).

O VEGF-A tem sido um foco importante para o desenvolvimento de fármacos antitumorais. As seis principais isoformas do VEGF-A são: VEGF<sub>111</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> e VEGF<sub>206</sub>, onde os números subscritos denotam a quantidade de aminoácidos presentes. A secreção do VEGF-A é realizada por diferentes tipos de células, como as células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas, plaquetas, neutrófilos e macrófagos. O VEGF-A é produzido por 60 % dos tumores, portanto, tem sido extensivamente investigado para terapêutica antitumoral (PEACH et al., 2018).

O VEGFR-2 é o principal receptor envolvido na sinalização induzida por VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D. Esse receptor desempenha importante papel na vasculogênese, angiogênese, migração de células endoteliais, sobrevivência, proliferação e no aumento da permeabilidade vascular. Os sinais gerados a partir de diferentes VEGFRs são diversos, apesar da alta homologia no domínio da tirosina quinase. A sinalização complexa, usa múltiplos fatores para determinar as respostas biológicas ao VEGF. Dessa forma, considerando-se que o processo de divisão celular endotelial é muito limitado em adultos, a inibição do VEGF e de seus receptores no tratamento de tumores, representa uma estratégia sólida e em desenvolvimento (ABHINAND et al., 2016; ARJAANS et al., 2016; JELTSCH et al., 2013).

O bloqueio dos fatores envolvidos na formação de novos vasos e de suas vias de sinalização, representam um grande avanço no tratamento do câncer. Sendo assim, os mAbs antiangiogênicos que atuam na inibição da interação VEGF / VEGFR-2, alcançaram amplo uso no tratamento de tumores sólidos. Por exibirem uma atividade altamente específica, os mAbs apresentam benefícios como a diminuição na toxicidade causada pelo uso da quimioterapia convencional. Além do mais, atuam no controle e progressão da doença ao prevenir as metástases, o que possibilita maior chance de cura dos pacientes (PENTO, 2017)

### 3.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos são glicoproteínas pertencentes à família de Igs, secretados em larga escala pelos linfócitos B. Funcionalmente, são caracterizados por sua habilidade de se ligar tanto à antígenos solúveis quanto à antígenos presentes na membrana de células especializadas ou micro-organismos. São responsáveis por detectar, localizar, reconhecer, ligar-se e inativar ou dar início ao processo de eliminação de um antígeno (BUSS et al., 2012).

Com base no tipo de cadeia pesada, os anticorpos podem ser classificados em cinco classes distintas (IgA; IgD; IgE; IgG; IgM), com diferenças estruturais e funcionais. Destas, a IgG é a mais usada em imunoterapia para o tratamento de diversos tipos de câncer. A classe IgG pode ser dividido em subclasses (IgG1; IgG2; IgG3; IgG4). A subclasse IgG1 é a mais abundante no soro humano, o que contribui amplamente para a resposta imune. Além do mais, o IgG1 se liga mais fortemente aos receptores dos componentes efetores do sistema imunológico da célula alvo (BASLE et al., 2019; JIANG et al., 2011; KENNEDY et al., 2017).

Estruturalmente, os anticorpos são formados por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves idênticas, normalmente não glicosiladas e duas cadeias pesadas também idênticas, porém glicosiladas. Estas cadeias ligam-se entre si, de modo a adquirir um formato semelhante a letra “Y” e se dividem em fragmento de ligação ao antígeno (Fab) e fragmento cristalizável (Fc), responsável por recrutar efetores de funções citotóxicas (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

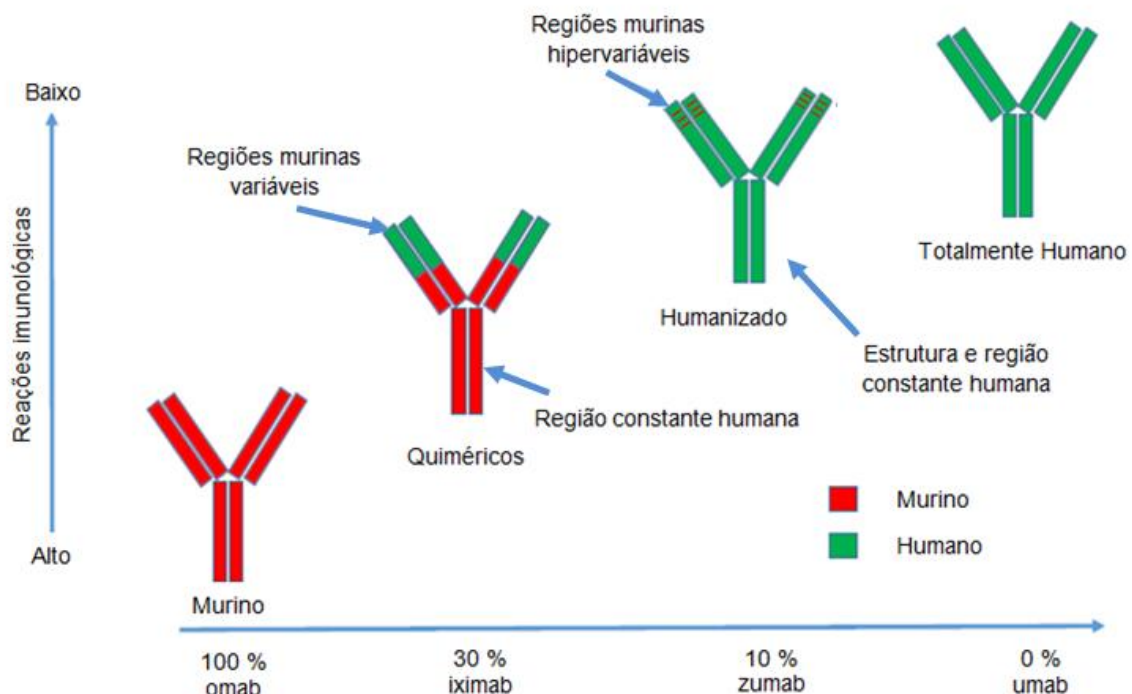
Os domínios N-terminais das cadeias leves e pesadas formam as seis regiões variáveis, designadas determinantes de complementaridade (CDR), responsáveis pelo local de ligação ao antígeno. O antígeno apresenta uma região chamada epítopo, representado por uma sequência de aminoácidos que é reconhecido pelo anticorpo. O epítopo liga-se ao local do anticorpo denominado parátopo, através de ligações não covalentes (NELSON, 2010).

Os mAbs são Igs ou fragmento de Igs produzidos a partir de um único clone de linfócitos B. O sucesso dos mAbs terapêuticos no tratamento do câncer está relacionado à capacidade que eles possuem de interagir especificamente com seu alvo e apresentar efeitos adversos relativamente baixos, quando comparado com a quimioterapia tradicional. Os mAbs são moléculas complexas e sua heterogeneidade resulta na presença de variantes que alteram suas propriedades bioquímicas e

biofísicas, como peso molecular, hidrofobicidade e carga (BASLE et al., 2019; NEILL et al., 2015).

A descoberta dessas moléculas, com introdução da tecnologia do hibridoma em 1975, possibilitou a produção de mAbs com afinidades específicas. Nos estudos, essas biomoléculas demonstraram aptas a serem empregadas como fármacos ou direcionados a qualquer parte do organismo humano, visando atingir um único tecido ou mesmo um determinado tipo celular. No final da década de 1980, surgiram técnicas para humanizar os mAbs a fim de eliminar algumas limitações. Assim, sucessivos avanços levaram à obtenção de mAbs totalmente humanos, usando camundongos transgênicos ou ensaios *in vitro*. Essas inovações na engenharia de anticorpos, contribuíram para redução nos componentes potencialmente imunogênicos, como ilustrado na Figura 1 (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; SHIN; MORRISON, 1989).

FIGURA 1 – Evolução dos Anticorpos Monoclonais



FONTE: adaptação de SINGH et al., (2018, p. 87).



Os mAbs direcionados contra antígenos únicos ou em superexpressão em tumores, podem causar a morte de células tumorais por diversos mecanismos. Um dos principais mecanismos se dá através do bloqueio da sinalização do receptor do fator de crescimento. Ao bloquear a ligação ou sinalização através desses receptores, os mAbs podem normalizar as taxas de crescimento tumoral, induzir apoptose ou ajudar a sensibilizar os tumores para posterior ação de agentes citotóxicos (WEINER et al., 2010).

A atividade biológica dos mAbs é mediada pela ligação específica do fragmento Fab ao epítipo alvo, mas também pode envolver funções efetoras secundárias que são mediadas pelo fragmento Fc. Esses mecanismos efetores são variáveis e podem, em parte, ser modulados durante o processo de desenvolvimento. Os mecanismos mediados pelo fragmento Fc ao se ligar as células alvo incluem a citotoxicidade dependente de complemento (CDC), citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA) e fagocitose celular dependente de anticorpo (FCDA) (ARLOTTA; OWEN, 2019; LUTTEROTTI; MARTIN, 2008).

Características como a elevada especificidade e afinidade dos mAbs, somadas a disponibilidade em larga escala, são primordiais para as diversas aplicações nos ramos das ciências da saúde. A introdução destas proteínas terapêuticas na rotina da medicina possibilitou grande revolução no tratamento de doenças. Atualmente, a imunoterapia vem sendo estabelecida como um componente essencial no tratamento de diversos tipos de câncer, pois as células tumorais expressam uma variedade de proteínas que podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico (HARDING et al., 2010; WEINER et al., 2009).

A fabricação em larga escala de mAbs para fins terapêuticos é uma atividade complexa, porém, deve garantir qualidade e estabilidade do produto final. As tecnologias que impulsionam os avanços na sua produção, fundamentam-se no aumento da eficácia, potência e redução do potencial imunogênico. Todavia, um grande desafio no desenvolvimento de mAbs é impedir ou minimizar a degradação que pode ocorrer pelas vias químicas e físicas, como a desamidação, oxidação, hidrólise / fragmentação, isomerização e agregação (KENNEDY et al., 2017).

A agregação de proteínas compromete a qualidade, aumenta a variabilidade entre os lotes dos anticorpos e pode causar imunogenicidade ao paciente. A agregação pode ocorrer em diferentes etapas do processo de produção, como fermentação, purificação, até o armazenamento e administração. A quantificação dos

agregados no produto biotecnológico é importante para avaliar os atributos de qualidade da molécula, além de garantir sua segurança e eficácia, uma vez que a agregação pode afetar sua atividade biológica (LOWE et al., 2011; VÁZQUEZ–REY; LANG, 2011; WANG et al., 2009).

### 3.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS E SUAS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

O desenvolvimento de mAbs terapêuticos evoluiu para uma posição central nas opções terapêuticas para tratar diversos tipos de doenças como câncer, distúrbios imunológicos e doenças infecciosas. O progresso na engenharia de anticorpos permitiu uma evolução rápida nos anticorpos murinos e quiméricos altamente imunogênicos para mAbs humanizados e totalmente humanizados, com efeitos adversos relativamente baixos. O potencial terapêutico dos mAbs é excepcional no que diz respeito à biodisponibilidade, tolerabilidade, especificidade, versatilidade e adaptabilidade aos mecanismos de combate a doenças (REGAZZI et al., 2020).

Os mAbs são estabelecidos como uma das estratégias terapêuticas mais bem-sucedidas no tratamento do câncer nos últimos 20 anos, tanto para doenças malignas hematológicas quanto para tumores sólidos (SOLOMOU et al., 2020). Os mAbs possuem um conjunto diversificado de mecanismos de ação que levam a morte de células tumorais. O principal mecanismo direto pelo qual muitos anticorpos induzem a morte das células tumorais é o bloqueio da sinalização do receptor do fator de crescimento (ZAHAVI; WEINER, 2020).

Entre as várias intervenções terapêuticas potenciais, os mAbs representam uma das classes mais promissoras no tratamento do coronavírus (COVID–19). Esse fato está relacionado ao seu histórico de longa data de segurança em humanos, sua especificidade excepcional para o vírus, que minimiza o risco de efeitos fora do alvo, e sua capacidade de coordenar a defesa imunológica na luta contra as infecções. Dessa forma, na ausência de um tratamento eficaz para COVID–19, o uso de mAbs ganhou interesse como uma abordagem terapêutica para reduzir o impacto da doença na saúde pública em todo o mundo (CRUZ–TERAN et al., 2021; TORRENTE–LÓPEZ et al., 2021).

Os avanços na produção dos mAbs despertaram interesse também, no desenvolvimento de terapias para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes. Os mAbs antibacterianos são normalmente desenvolvidos para matar

bactérias ou para atenuar a atividade patológica bacteriana por meio da neutralização de toxinas bacterianas e fatores de virulência. Os anticorpos exibem mecanismos farmacológicos distintos dos antimicrobianos tradicionais e, portanto, a resistência cruzada entre antimicrobianos e mAbs antibacterianos é improvável (ZURAWSKI; MCLENDON, 2021).

Os mAbs revolucionaram o tratamento da esclerose múltipla (EM) recorrente e, muito recentemente, o tratamento da EM progressiva. Os mAbs se tornaram um dos tratamentos preferidos para a EM devido à sua alta especificidade e eficácia. Geralmente, os mAbs têm como alvo o sistema imunológico, que desempenha um papel fundamental na patogênese da EM, especialmente durante os estágios inflamatórios iniciais. Na EM o mecanismo de ação dos mAbs se dá por meio da destruição das células B através da CCDA, CDC e apoptose (CHISARI et al., 2021; GRAF et al., 2019; VOGEL; ALVAREZ, 2019).

Diversos mAbs contra o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) provaram ser eficazes no tratamento de pacientes que sofrem de doenças inflamatórias intestinais como a Doença de Crohn. A desregulação imunológica causada por essa doença, resulta em uma superprodução de TNF- $\alpha$  por monócitos, macrófagos e células T. Dessa forma, os mAbs atuam causando a lise de células produtoras de TNF- $\alpha$ , bem como sua ligação específica ao TNF- $\alpha$  humano, com alta afinidade, neutralizando sua atividade biológica ao impedir sua ligação aos receptores (ORDÁS et al., 2012; SLEVIN; EGAN, 2015).

Embora a maioria dos mAbs aprovados para uso clínico seja direcionada a humanos, os avanços na medicina veterinária parecem promissores. A busca contínua por formas alternativas no controle de patógenos influenciou a aplicação dos mAbs em diversos tipos de animais. Na veterinária, o uso dos mAbs concentra-se para fins de diagnóstico, tratamento e imunoprofilaxia. Uma das patologias que possui tratamento com mAbs, é a dermatite atópica. Nessa doença os mAbs desenvolvem seu efeito terapêutico ao se ligar à IL-31 com o objetivo de bloquear seletivamente essa citocina, impedindo-a de se ligar ao seu receptor e desencadear a cascata pruriginosa (BUSTAMANTE-CÓRDOVA et al., 2018; MOYAERT et al., 2017; SANTORO, 2019).

Nesse contexto, é possível perceber que os mAbs apresentam diversas características que os tornam atraentes como agentes de direcionamento terapêutico. Nos últimos 30 anos, foi realizada uma série de melhorias na capacidade de produzir

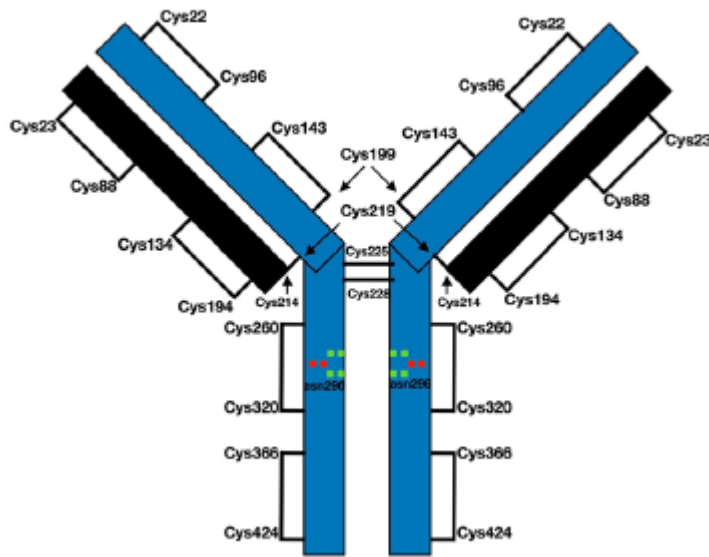
mAbs com menores potenciais imunogênicos. A imunogenicidade apresentou sérios problemas em termos de reações agudas e diminuição da eficácia dos medicamentos tradicionais atribuível à diminuição da duração da resposta. Dessa forma, os mAbs totalmente humanos representam uma nova tecnologia padrão no desenvolvimento de medicamentos biotecnológicos (WEINER, 2006).

### 3.4 ANTICORPO MONOCLONAL RAMUCIRUMABE (RAM)

O desenvolvimento do RAM se deu por meio da identificação de um anticorpo de alta afinidade contra o VEGFR-2 (clone 1121) de uma biblioteca de fragmentos Fab de doadores humanos saudáveis, não imunizados, por meio de um processo altamente rigoroso. Inicialmente, o anticorpo quimérico IMC-1121 foi desenvolvido e, posteriormente, foi totalmente humanizado para se tornar o IMC-1121B (RAM). Dentre os anticorpos utilizados, o clone IMC1121B (RAM), demonstrou a inibição da interação VEGF–VEGFR–2 com IC<sub>50</sub> de 0,8 a 1 nmol / L, em comparação com 3 a 4 nmol / L para os fragmentos Fab originais. Além do mais, o clone IMC1121B se mostrou mais potente na inibição da fosforilação de VEGFR–2 estimulada por VEGF em células endoteliais (LU et al., 2002; LU et al., 2003; SPRATLIN et al., 2010; ZENONI et al., 2020).

O produto biotecnológico RAM é um mAb humano recombinante da subclasse IgG1, produzido a partir da tecnologia do DNA recombinante, por clonagem e expressão em células de mieloma murino (NS0). Sua massa molecular é de aproximadamente 147 KDa, e fórmula química C<sub>6374</sub>H<sub>9864</sub>N<sub>1692</sub>O<sub>1996</sub>S<sub>46</sub>. Estruturalmente é formado por 2 cadeias pesadas de subclasse gamma que consistem em 446 resíduos de aminoácidos cada, e 2 cadeias leves de subclasse kappa que consistem em 214 resíduos de aminoácidos cada, conforme demonstrado na Figura 2. O anticorpo contém um sítio de N–glicosilação altamente conservado para cada cadeia pesada na região Fc. Os dois domínios Fabs se ligam em polos opostos do domínio 3 de VEGFR–2, o que impede a interação com todos os ligantes de VEGF (BREEDVELD, 2000; KRUPITSKAYA; WAKELEE, 2009; SPRATLIN et al., 2010; SPRATLIN 2011; TADA et al., 2018; WADHWA et al., 2013).

FIGURA 2 – Estrutura básica do RAM



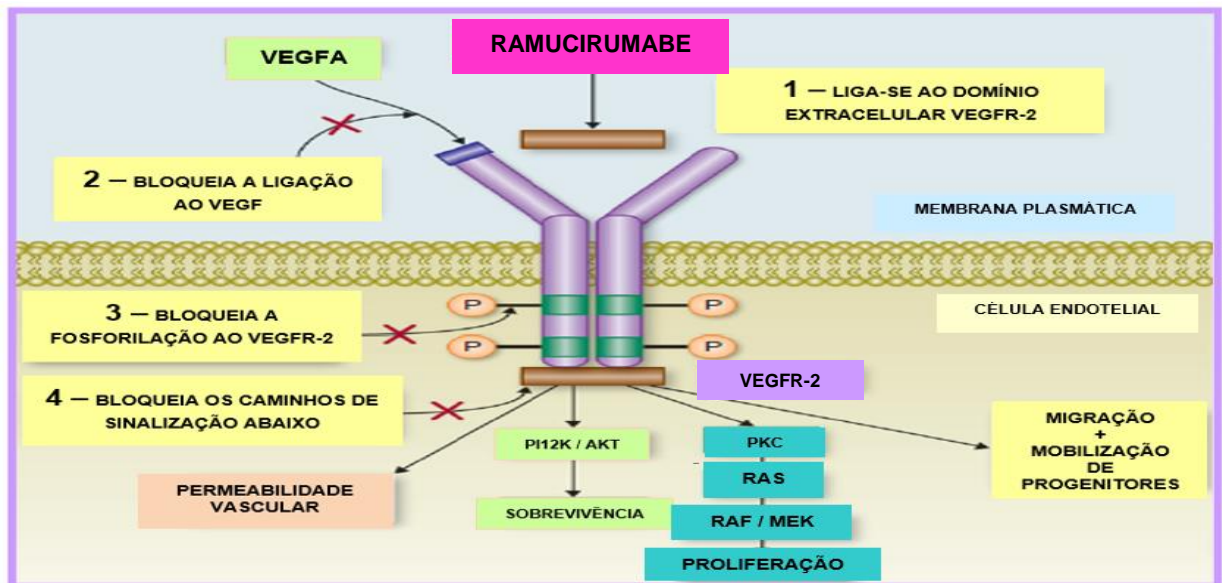
FONTE: adaptação de MORAES NETO et al., (2020, p. 2).

### 3.4.1 Mecanismo de ação e atividade farmacológica do RAM

Embora modulada por vários inibidores e indutores, incluindo metaloproteases da matriz, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e fator de crescimento transformador (TGF), a angiogênese é principalmente impulsionada por interações entre VEGFs e VEGFRs. Para que ocorra o desenvolvimento, crescimento e metástase do câncer, o VEGF deverá se ligar, principalmente, ao receptor de tirosina quinase VEGFR-2. Após a ligação, ocorre dimerização do receptor e autofosforilação, seguidas por uma cascata de eventos de sinalização, eventualmente levando à ativação de proteínas e moléculas efetoras (ZWICK et al., 2002).

Neste contexto, o RAM irá desempenhar seu mecanismo antiangiogênico ao ligar-se especificamente ao domínio extracelular do VEGFR-2. Ao ligar-se ao VEGFR-2, o RAM bloqueia a ligação sequencial com os fatores VEGF-A, VEGF-C e VEGFD, inibindo assim, suas vias de sinalização e a consequente proliferação e migração endotelial, conforme mostrado na Figura 3. Desta forma, ocorre uma menor vascularização e conseqüentemente diminuição do crescimento tumoral (VENNEPUREDD et al., 2017).

FIGURA 3 – Mecanismo de ação do RAM



FONTE: adaptação de JAVLE et al. (2014, p. 5877).

Quanto a farmacocinética, o RAM exibe um perfil típico de um mAb IgG, com baixo volume de distribuição (5,4 L) e tempo de meia-vida longo (média de 14 dias). A administração deve ser feita como uma infusão intravenosa de uma hora, garantindo a biodisponibilidade completa. O RAM apresenta uma eliminação dependente da dose e uma exposição não linear consistente com depuração saturável, com clearance médio de 0,015 L / h. Sua depuração diminui desproporcionalmente conforme as doses aumentam de 8 a 16 mg / kg, sugerindo saturação do mecanismo de depuração. A concentração mínima para ação terapêutica desejada é de 20 µg / mL e as doses aproximadas de RAM que poderiam manter esses níveis mínimos são observados em 6 mg / kg a cada semana, 8 mg / kg a cada 2 semanas e 10 mg / kg administrado a cada 3 semanas (CYRAMZA® ELI LILLY, 2021; DE LUCA et al., 2020; SPRATLIN et al., 2010; WADHWA et al., 2013).

Em relação a farmacodinâmica, estudos demonstram que as análises realizadas pós-tratamento com biomarcadores séricos mostraram aumento das concentrações de VEGF-A, bem como diminuição das concentrações de VEGFR-1 e VEGFR-2 quase imediatamente após o tratamento. Esses efeitos se mantêm ao longo de ciclos e são independentes da dose. Nos estudos, a avaliação pós-

tratamento com ressonância magnética, mostrou diminuição da perfusão e vascularização do tumor (SINGH et al., 2015).

No geral, a administração de RAM é segura e tolerável, com pouca necessidade de modificações de dose. Os eventos adversos são de grau 3, que inclui hipertensão, risco aumentado de eventos hemorrágicos, proteinúria, trombose venosa profunda, dor de cabeça, anorexia, vômito, dispneia e um aumento na fosfatase alcalina (CYRAMZA® ELI LILLY, 2021).

### **3.4.2 Usos terapêuticos do RAM**

O RAM encontra-se disponível como produto biofarmacêutico denominado Cyramza®, sendo fabricado pelo laboratório norte-americano Eli Lilly, que também distribui no Brasil. O Cyramza® está disponível como solução injetável para uso intravenoso, em frasco-ampola de vidro transparente tipo I. A solução é estéril, límpida a ligeiramente opalescente e incolor a levemente amarela. Cada frasco contém 100 mg de RAM em 10 mL ou 500 mg de RAM em 50 mL, ambos com concentração final de 10 mg / mL. Os excipientes que compõem sua formulação são: histidina, cloreto de sódio, glicina, polissorbato 80 e água para injetáveis (CYRAMZA® ELI LILLY, 2021).

O produto biotecnológico Cyramza® teve seu registro aprovado nos Estados Unidos pela Agência de alimentos e medicamentos (FDA) em abril de 2014 para pacientes com câncer gástrico ou da junção gastroesofágica e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em dezembro de 2014. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) concedeu o registro em 2016. Ainda em 2014, o RAM teve seu uso aprovado pelo FDA para câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) metastático ou localmente avançado. No ano de 2015, seu uso foi estendido ao tratamento de câncer colorretal (CCR) metastático e por último, no ano de 2019, para hepatocarcinoma (HCC) (CYRAMZA® ELI LILLY, 2021; GABI, 2016).

Na clínica o Cyramza® em combinação com Paclitaxel, é indicado para o tratamento de pacientes adultos com câncer gástrico ou da junção gastroesofágica avançado, que tenham apresentado progressão da doença após quimioterapia com platina ou Fluoropirimidina. Como agente isolado, é indicado para o tratamento de pacientes adultos com câncer gástrico ou da junção gastroesofágica avançado, que tenham apresentado progressão da doença após quimioterapia com platina ou

Fluoropirimidina, nos quais o tratamento com Paclitaxel não é apropriado. Em combinação com Docetaxel, o Cyramza® é indicado para o tratamento de pacientes adultos com CPNPC metastático ou localmente avançado que tenham apresentado progressão da doença, e que já tenham apresentado falha com quimioterapia prévia baseada em platina. Já em combinação com FOLFIRI (Irinotecano, ácido folínico e 5-Fluoruracil), o Cyramza® é indicado para o tratamento de pacientes adultos com CCR metastático que tenham apresentado progressão da doença após terapia prévia com Bevacizumabe, Oxaliplatina e Fluoropirimidina. Por fim, o Cyramza® como agente isolado, é indicado no tratamento de pacientes com HCC que apresentem alfa-fetoproteína (AFP)  $\geq 400$  ng / mL, após terapia prévia com Sorafenibe (CYRAMZA® ELI LILLY, 2021).

### 3.5 METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

#### 3.5.1 Bioensaios

A atividade biológica dos mAbs tem sido avaliada através de ensaios biológicos *in vitro* e / ou *in vivo*, baseado no mecanismo de ação de cada produto. Os mAbs terapêuticos foram projetados para ligar-se a receptores de fatores de crescimento ou moléculas de sinalização da superfície celular, portanto, são capazes de inibir a proliferação ou induzir a morte celular direta nos bioensaios *in vitro* por cultura de células. Levando-se em consideração a ligação antígeno-anticorpo, frequentemente se utilizam os métodos imunoenzimáticos (ELISA) para quantificação dos mAbs. Já os ensaios *in vivo*, baseados em modelos animais, são particularmente difíceis para avaliação dos mAbs, pois os anticorpos são frequentemente específicos para o alvo humano e podem não reconhecer o antígeno em animais. Porém, uma forma de contornar a falta de reconhecimento é a utilização da técnica de xenoenxerto, ou seja, a inoculação de células tumorais humanas, por via subcutânea para formação de tumor em camundongos imunodeficientes (BRUNS et al., 2000; EMA, 2009; GOLAY; INTRONA, 2012; EP, 2021).

Lu e colaboradores (2002), isolaram vários fragmentos anti-VEGFR-2 totalmente humanos, de alta afinidade, a partir de linfócitos B de doadores humanos saudáveis não imunizados. Eles utilizaram o bioensaio com a linhagem de células



endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVEC) para testar a atividade destes fragmentos *in vitro*. Os fragmentos bloquearam especificamente a interação VEGF / VEGFR-2, além de inibir a mitogênese estimulada por VEGF de células endoteliais humanas.

Baseado no estudo supracitado, Lu e colaboradores (2003) selecionaram os três anticorpos com maior atividade anti-VEGFR-2, para realização de bioensaio *in vitro* com a linhagem de células HUVEC. Como resultado, o anticorpo IMC-1121 (RAM), demonstrou ligar-se mais fortemente ao seu alvo por um período prolongado, impedindo com eficiência a interação de fatores de crescimento com seus receptores. Demonstraram também, que o anticorpo IMC-1121 é mais potente na inibição da interação VEGFR-2 / VEGF e na neutralização da ativação de VEGFR-2 estimulada por VEGF do que os demais anticorpos. Diante dos resultados obtidos, os autores recomendaram o uso do anticorpo como terapia antitumoral.

ZHU e colaboradores (2003) utilizaram a linhagem de células HUVEC para quantificar a atividade anti-VEGFR-2 dos anticorpos IMC-1C1, IMC-2C6 e o IMC-1121 (RAM), além de avaliar a sobrevida em camundongos com xenoenxerto de células de leucemia promielocítica aguda (HL-60). Os resultados demonstraram que o anticorpo IMC-1121 foi capaz de inibir com maior potência a proliferação induzida por VEGF de células de leucemia humana *in vitro* e prolongar a sobrevivência de camundongos. Os resultados reforçaram também que o anticorpo pode ter amplas aplicações no tratamento de tumores sólidos e leucemia.

As linhagens de células endoteliais da aorta suína (PAOEC) e de células HUVEC, foram utilizadas por Miao e colaboradores 2006, para avaliar a capacidade do fragmento de anticorpo 1121B (RAM), de bloquear a interação VEGF / VEGFR-2. Observaram inibição potente de uma série de atividades biológicas do VEGF, incluindo a ativação do receptor e sua via de sinalização, mobilização intracelular de cálcio, migração e proliferação de células endoteliais. Com base nesses dados, os autores recomendaram a avaliação clínica do Fab 1121B como agente antiangiogênico em várias indicações em que a neovascularização patológica está envolvida.

As linhagens de células de câncer de mama T47-D e MCF-7 foram utilizadas para avaliação de anticorpos neutralizantes anti-VEGFR-1 por Wu e colaboradores (2006). No mesmo estudo, camundongos com xenoenxertos foram tratados com os mAbs anti-VEGFR-1. Diante dos resultados obtidos com a inibição do crescimento

dos tumores de mama, os autores acreditam que os receptores VEGF podem não apenas modular a angiogênese, mas também influenciar diretamente o crescimento de tumores que expressam receptores VEGF.

Tian e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antitumoral do anticorpo YN986D1 através do uso da linhagem de células HUVEC e ELISA. A combinação de ensaios demonstrou que a inibição, proliferação, migração e formação de tubos das células endoteliais ocorreram de forma efetiva ao inibir a via de sinalização de VEGF.

Liu e colaboradores (2011) utilizaram a linhagem de células de carcinoma de pulmão (A549) para avaliar uma formulação de nanocápsula contendo combinação de anticorpo anti-VEGFR-2 e quimioterápico tradicional para o tratamento de câncer de pulmão, determinando a citotoxicidade pelo ensaio com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil). A partir do estudo, demonstraram efeitos na redução do tumor, devido à administração do anticorpo antiangiogênico, que pela sua ligação específica via anti-VEGFR-2 conseguiu facilitar a ação do quimioterápico nos vasos sanguíneos tumorais, inibindo seu crescimento.

A linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29), foi utilizada por Yang e colaboradores (2014) para pesquisar a atividade anti-VEGF de um anticorpo. De acordo com os ensaios *in vitro* o anticorpo foi identificado como sendo eficaz na inibição da proliferação, migração e formação de tubos de células endoteliais induzida por VEGF e bloqueio da via de sinalização de VEGF / VEGFR-2.

Kim e colaboradores (2014) realizaram estudos *in vitro* com a linhagem de células HT-29 para avaliar o efeito de um anticorpo no tratamento de carcinoma de cólon, pelo ensaio MTT. Para avaliar a progressão do tumor foi utilizado o ensaio *in vivo*, depois de administrada a injeção subcutânea com xenoenxerto de células tumorais. Os autores observaram que o anticorpo reduziu significativamente o crescimento dos tumores se tornando um alvo para o tratamento do câncer de cólon.

A linhagem de células A549 foi utilizada por Xie e colaboradores (2015) para estudar o efeito antitumoral de um anticorpo na antiproliferação e diminuição da expressão VEGF / VEGFR-2 no tratamento de câncer de pulmão. O estudo mostrou que o mecanismo dos efeitos antitumorais do anticorpo pode estar relacionado à inibição da angiogênese tumoral, como um inibidor da tirosina quinase do VEGFR-2. Os autores sugerem que o anticorpo possa ter efeitos terapêuticos consideráveis na inibição do crescimento tumoral, angiogênese e metástase.

### 3.5.2 Métodos analíticos

Atualmente, os mAbs tem impacto importante na indústria farmacêutica, pois representam a crescente classe de produtos biofarmacêuticos de uso clínico. As determinações das impurezas relacionadas ao produto são consideradas atributos críticos de qualidade em mAb de uso terapêutico e precisam ser monitoradas durante todo o processo de desenvolvimento, produção e armazenamento. A caracterização dos mAbs apresenta um desafio em comparação com a caracterização de medicamentos tradicionais com baixas massas moleculares, devido à sua complexidade inerente à natureza glicoproteica. Portanto, o uso de diversas técnicas analíticas com diferentes princípios, são importantes para completa caracterização dos mAbs (ECKER et al., 2015; WANG et al., 2018).

O desenvolvimento e validação de métodos por CL–FR e CL–EM tem sido amplamente aplicados na área de biotecnologia. Por sua vez a combinação de técnicas analíticas é necessária para caracterizar as moléculas intactas, além de monitorar o processo de produção, identificar variantes de carga e impurezas do produto biotecnológico (REHDER et al., 2006; SANDRA et al., 2014; ZHAO; CHEN, 2014).

O uso das fases estacionárias com poros maiores (300 Å) na CL–FR se tornaram ferramentas promissoras para a análise de proteínas intactas. Dessa forma, Navas e colaboradores (2013) estudaram a quantificação do anticorpo monoclonal Rituximabe (RTX) por CL–FR, em coluna C8 (5 µm, 150 mm x 2,1 mm, 300 Å) mantida a 70 °C. A Fase Móvel (FM) foi composta por ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% v / v em água e uma mistura de Isopropanol, acetonitrila (ACN), água, e TFA, em uma proporção 70:20:9,9:0,1 (v / v / v / v). O método foi aplicado para quantificar o RTX intacto em estudo de estabilidade e para controle de qualidade do mAb.

A cromatografia líquida (CL), tem sido aplicada para estudo de peptídeos e proteínas intactas, incluindo os mAbs. Martínez–Ortega e colaboradores (2016) desenvolveram e validaram método por CL–FR com detecção por DAD, e realizaram quantificação da forma intacta do Cetuximabe. Utilizaram coluna Zorbax 300 SB–C8 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) mantida a 70 °C e FM composta por: água e 0,1% de TFA e Isopropanol, ACN, água e TFA (70:20:9,9:0,1 (v / v / v / v)), com gradiente de fluxo.

A Farmacopeia Americana (USP) descreve método geral para avaliação, identificação e determinação dos mAbs por CL-EM. Recomenda coluna com dimensões de 7,8 mm x 300 mm, tamanho de partículas de 5 µm à temperatura de 25 °C. A fase móvel é constituída por fosfato de potássio monobásico 70 mM, fosfato de potássio dibásico 30 mM e cloreto de potássio 150 mM com pH 6,2, eluição isocrática com fluxo de 0,5 mL / min e detecção no UV a 280 nm (USP, 2016).

Observa-se uso crescente das terapias imunológicas, porém, encontram-se poucas referências na literatura sobre estudos para quantificação de agregados. Por sua vez, Goyon e colaboradores (2017a) desenvolveram método geral por CL-EM para avaliação de 30 mAbs de uso terapêutico. Os autores utilizaram as colunas de separação AdvanceBioSEC (2,7 µm, 150 mm x 4,6 mm, 300 Å) e a coluna mAbPac HIC-10 (5,0 µm, 100 x 4,6 mm, 1000 Å), destacando que a primeira apresentou maior eficiência de separação com menor interação não específica entre as proteínas e fase estacionária.

Goyon e colaboradores (2017b) determinaram também os pontos isoelétricos (PIs) de 23 mAbs aprovados pela Agência Europeia de Medicamentos e Alimentos (FDA) e EMA. Os autores utilizaram a focalização isoelétrica capilar com captura de imagens (icIEF) e cromatografia de troca catiônica (CTC). O PI experimental obtido pelo icIEF para o RAM foi de 9,1 e para os demais mAbs variou entre 6,1 e 9,4.

Prashanthi e colaboradores (2018) identificaram e quantificaram o anticorpo Ramucirumab em comprimidos por CL-FR. Os autores utilizaram coluna YMC C18 (4,6 x 150 mm) mantida a 25°C, fase móvel composta por metanol e água (80:20 v/v) com fluxo de 0,6 mL / min e detecção por DAD no comprimento de onda de 320 nm.

A CL-FR aplicada para mAbs terapêuticos é frequentemente realizada em temperaturas elevadas (80 – 90 °C) e na presença de concentrações relativamente altas de TFA. Sob tais condições, é possível obter um desempenho adequado em termos de formas e recuperações de pico. Sendo assim, Bobály e colaboradores (2018) caracterizaram 23 mAbs por CL-FR. As separações foram realizadas com diferentes temperaturas (60 a 90 °C) e diferentes proporções de TFA (0,1% a 0,01% TFA), observando que a diminuição da temperatura e redução das concentrações de TFA viabilizaram separação cromatográfica adequada.

A pesquisa sobre estresse e estabilidade é essencial durante o desenvolvimento de mAbs para garantir a qualidade do produto final. Um maior conhecimento dos efeitos do estresse na agregação pode ajudar a evitar

instabilidades conformacionais e coloidais indesejáveis. Desta forma, Hernández–Jiménez e colaboradores (2018) estudaram por CL–FR e CL–EM a agregação em 5 mAbs terapêuticos submetidos a testes de estresse e estabilidade a longo prazo. Os resultados indicaram que, embora todos compartilhem estrutura IgG1 semelhante, a tendência a agregar depende das condições particulares de estresse e da concentração e natureza de cada mAb.

Embora a CL–EM e a cromatografia de troca iônica (CL–TI) sejam técnicas bem estabelecidas para o estudo da proteína intacta, fases estacionárias com poros maiores (300 Å) utilizadas na CL–FR tornam essa técnica eficaz para a análise de proteínas intactas por sistemas convencionais de CL. Desta maneira, Martínez–Ortega e colaboradores (2018) validaram método cromatográfico por CL–FR para quantificação de Bevacizumabe, Infliximabe e Trastuzumabe intactos para estudo de estabilidade a longo prazo. Como resultado os autores avaliaram que, apesar das diferenças químicas, os mAbs mostram comportamento cromatográfico semelhante, e que o método validado pode ser usado para fins de quantificação dos mAbs no processo de controle de qualidade ao fabricá–los, além de estudos de estabilidade a longo prazo.

Métodos por CL–FR e CL–EM foram desenvolvidos e validados por Perobelli e colaboradores (2018) para quantificação do anticorpo monoclonal humano Denosumabe (DmAb). No mesmo estudo, os autores avaliaram a atividade biológica do DmAb com linhagem de células de macrófagos (RAW 264,7) além da citotoxicidade das formas alteradas do produto, produzidas por degradação forçada, em linhagem de células de fibroblastos de mamíferos (NCTC clone 929). Os autores concluíram que os bioensaios *in vitro* em conjunto com os métodos cromatográficos validados são importantes para quantificar o DmAb nas etapas do processo de produção, produto acabado e para monitorar a estabilidade, garantindo a consistência lote a lote deste produto biotecnológico.

Sotomatsu e colaboradores (2019) realizaram a separação e análise de fragmentos de cadeia leve e pesada de 12 mAbs de uso terapêutico por Cromatografia Líquida por Fase Reversa com temperatura alta (HT–RPLC). Utilizaram coluna Aeris™ WIDEPORÉ XB–C8 (3,6 µm 100 x 2.1 mm, 200 Å) com FM A constituída por 98% de água, 2% de isopropanol, e 0,1% de TFA (v / v / v), e FM B composta por 70% de isopropanol, 20% de acetonitrila e 10% da FM A (v / v / v). Os autores concluíram

que a quantificação de fragmentos de cadeia leve leve constitui-se uma abordagem importante para uma análise seletiva, precisa e sensível de mAbs terapêuticos.

O Ramucirumabe está patenteado, mas com a expiração dos prazos pode-se prever sucessivos estudos de biossimilares. Porém, devido à complexidade estrutural do produto biotecnológico há a necessidade de tecnologias analíticas para a sua completa caracterização, avaliação da identidade, pureza, potência e estabilidade. Além disso, para sua comparabilidade, são preconizados estudos pré-clínicos para demonstrar a atividade biológica, toxicidade, imunotoxicidade, toxicocinética, biodisponibilidade e farmacocinética em relação ao produto de referência (JAPELJ et al., 2016; SCHNEIDER; KALINKE, 2008).

Destaca-se que a patente do produto biotecnológico Cyramza® tem o prazo de expiração para o ano de 2023 nos países da União Europeia, 2025 para os Estados Unidos e 2026 no Brasil (BRASIL, 2016; GABI, 2016).

É conveniente ressaltar também, que após o desenvolvimento de novos métodos analíticos, a validação é necessária para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados, assegurando que o método seja adequado para a finalidade pretendida. Procedimentos para validação de métodos analíticos encontram-se disponíveis em guias oficiais, que descrevem os principais parâmetros a serem avaliados (BRASIL, 2017; ICH, 2005; SHABIR et al., 2007).

## **ARTIGO 1**

---

#### 4 ARTIGO 1

---

### **Quantitation of the monoclonal antibody Ramucirumab by Reversed-phase high-performance liquid chromatography method and Bioassay**

Francielle Santos da Silva<sup>a</sup>, Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior, Bruna Xavier, Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel and Sérgio Luiz Dalmora<sup>b\*</sup>

*<sup>a</sup>Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil; <sup>b</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil*

Author for Correspondence: Sérgio Luiz Dalmora. Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria – RS, Brazil.

E-mail: [sdalmora@terra.com.br](mailto:sdalmora@terra.com.br)



## **Quantitation of the monoclonal antibody Ramucirumab by Reversed–phase high–performance liquid chromatography method and Bioassay**

Ramucirumab (RAM) is a fully human IgG1 monoclonal antibody, produced by recombinant DNA in the murine cell line (NSO), and indicated to treat advanced solid malignancies. A reversed–phase high–performance liquid chromatography (RP–HPLC) method was developed and validated for the quantitation of RAM and its degraded forms in biotechnology–derived medicine. Chromatographic separation was carried out on a Phenomenex C<sub>18</sub> analytical column, maintained at 80 °C. The mobile phase gradient consisted of 0.1% (v / v) trifluoroacetic acid (TFA) in water and 0.1% (v / v) TFA in acetonitrile, run at a flow rate of 1.0 mL / min, with detection by a photodiode array detector (PDA) set at 214 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time at 9.7 min, and the calibration curve was linear over the 0.125 – 10 mg / mL, concentration range ( $r^2 = 0.9998$ ). The specificity was confirmed by degradation studies, interference of the excipients and peak purity. Equally, the accuracy was 99.72%, with bias lower than 0.57%. The RP–HPLC method was applied to quantitate RAM, giving content between 96.70 – 99.56%, and fragments lower than 0.43%. Besides, the cell culture in vitro bioassay based on the antiproliferative effect of the A549 cell line, was developed and used for the potency assessment of RAM, showing results between 97.00 – 102.00%. These results were correlated to those of the RP–HPLC method, indicating the capability of the methods to quantify RAM, contributing to improve the quality control, and ensure the efficacy the biotechnology–derived medicine.

Keywords: Ramucirumab; monoclonal antibody; A549 cell culture bioassay; reversed–phase high–performance liquid chromatography; validation.

## Introduction

Recombinant monoclonal antibodies (mAbs) are immunoglobulins or immunoglobulin fragments, produced by a single clone of B cells (Basle et al., 2020). These biopharmaceuticals possess long-term stability, high selectivity and ability to initiate immune recognition of the target that make them attractive molecules for therapeutic development (Vlasak; Ionescu, 2008).

Ramucirumab (RAM) is a fully human monoclonal antibody of the IgG1 class that binds with high affinity to the extracellular binding domain of the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) and blocks the activation of the receptor (Javle et al., 2014). VEGFR-2 binds all VEGF-A isoforms, VEGF-C and VEGF-D decreasing tumor vascularity (Fontanella et al., 2014). Clinically, RAM is indicated for the treatment of gastric cancer, colorectal cancer, non-small cell lung cancer and hepatocellular carcinoma (Casak et al., 2015; Verdaguer et al., 2016; Maione et al., 2017; Syed, 2020).

The biotech product RAM is produced in an NS0 transfected mouse myeloma cell line. Structurally, it is composed of two identical heavy chains consisting of 446 amino acids each, and two identical light chains consisting of 214 amino acids each. The fragment antigen-binding (Fab) region of RAM binds to the end of domain 3 near the N terminus of the VEGFR-2 receptor. The binding affinity of RAM to this portion of VEGFR-2 is approximately eight to nine times higher than that of the natural VEGF ligand (Wadhwa et al., 2013).

Heterogeneity is a major concern with therapeutic proteins, such as mAbs, due to the susceptibility to chemical and enzymatic modifications during product purification, formulation, storage or those changes occurring during antibody production in cell culture. These modifications are particularly caused by glycosylation, oxidation, mutation, N-terminal glutamine cyclization, deamidation and C-terminal lysine truncation and the effect in different domains of the antibody molecule can result in different biological consequences (An et al.,

2014). Heterogeneity must be critically assessed because differences in impurities and / or degradation products can lead to serious health implications (Fekete et al., 2013). Thus, routine characterization and monitoring of domain-specific modifications are essential.

Cell-based potency assays are useful to indicate the biological activity of mAbs, and they could be able to detect the impact of chemical modification on their potency. Functional cell based assay can be carried out under controlled conditions and help define an agent's mechanism of action. Thus, they are recommended for the characterization and batch-to-batch approval (Bocci, et al, 2011; Wang et al., 2018; Silva et al., 2019).

Separation techniques are important tools for the characterization of therapeutic proteins, mainly the mAbs, and to ensure their quality. Thus, among the different alternatives, chromatography methods are providing excellent sensitivity, selectivity, precision and robustness (Grotefend et al., 2012). Reversed-phase liquid chromatography (RP-HPLC) can be used at different levels of analysis and is a reliable and versatile approach for the characterization of mAbs (D'Atri et al., 2020). However, no RP-HPLC method has been validated or described in the official literature, for the characterization and quantification of RAM in biotechnology products (Farjami et al., 2018).

This study aimed to develop and validate a RP-HPLC method for the quantitation of the monoclonal antibody RAM, and its fragments in biopharmaceutical formulations; to carry out the A549 cell culture assay to assess the potency; evaluate correlations of the results. Thus, contribute to improve the quality control, and to assure the safety and efficacy of the biotechnology-derived medicine.

## **Material and Methods**

### ***Chemicals, reagents and solutions***

Batches of Cyramza<sup>®</sup> Eli Lilly (São Paulo, Brazil), containing 100 mg / 10 mL (10 mg / mL) or 500 mg / 50 mL (10 mg / mL), were acquired from commercial sources within their shelf-life period, stored at 2 – 8 °C, protected from light. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and the alamarBlue™ cell viability reagent were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Histidine, glycine, sodium acetate, polysorbate 80, sodium hydroxide, acetonitrile (ACN), trifluoroacetic acid (TFA) and 30% (v / v) hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were purchased from 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 filtered through a 0.22 µm Millex filter (Millipore).

### ***Instrumentation and Software***

The chromatography technique was developed with a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a CBM– 20A system controller, an LC–20 AD pump, a DGU–20As degasser, an SIL–20ACHT autosampler, a CTO–20A column oven and an SPD–M20A diode array detector. Peak areas were automatically integrated using the LC Solution Version 1.22 SP1 software. The absorbances of the cell culture bioassay were measured on a Thermo Scientific Varioskan<sup>®</sup> Flash microplate reader (Vantaa, Finland).

### ***Samples and standard preparation***

Three vials of commercial batch of Cyramza<sup>®</sup> were pooled, to quantitate a sample during the method development, and it was established as the representative RAM Biological reference

substance (BS–RAM). Then, intermediate solutions were daily prepared by diluting fresh vials of the BS–RAM, and of the samples of biopharmaceutical products (Cynamza<sup>®</sup>) in sodium chloride 0.9% solution, to final concentrations of 1.0 mg / mL. Then, they were diluted with DMEM culture medium containing 2% (v / v), fetal bovine serum to final concentration between 0.03 and 0.81 mg / mL, for bioassay, or with ultrapure water to working concentrations of 1.0 mg / mL for RP–HPLC.

### ***Procedures***

#### *A549 Antiproliferative cell culture Bioassay*

The bioassay was performed as described elsewhere (Bocci, et al, 2011) with some adjustments. Briefly, the A549 cell line of human alveolar adenocarcinoma (ATCC<sup>®</sup> No. CCL–185<sup>TM</sup>) was grown as monolayer in DMEM culture medium supplemented with 10% (v / v) FBS and 1% (v / v) of Penicillin–Streptomycin mixture in 75 cm<sup>2</sup> flasks. The cells were seeded in Corning<sup>®</sup> Costar<sup>®</sup> 96–well microplates (Corning, NY, USA) at a density of  $1 \times 10^4$  cells / mL and were incubated in the CO<sub>2</sub> incubator and cultured overnight until occurrence of cell adherence. Based on the preliminary test results, the anti–proliferative activity of RAM was determined with concentrations starting concentrations with 0.03 mg / mL, in triplicate, as a parallel line assay. BS–RAM was used as the standard and the control was DMEM. The culture plates were incubated for 3 days in a 37 °C, in humidified atmosphere containing air and 5% (v / v) CO<sub>2</sub>. Then, 20 µL of AlamarBlue<sup>TM</sup> was added per well, and the plates were incubated for a further 4 h. The absorbance was measured at 570 and 600 nm. Values measured at 570 nm were subtracted for background correction at 600 nm. The biological activity was calculated with the parallel line statistical method by using CombiStats<sup>TM</sup> software developed by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM, Council of Europe, Strasbourg, France).

### *Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)*

The experiments were performed on a reversed-phase Phenomenex (Santa Clara, USA) ZORBAX 300SB-C18 column (150 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 3.5 μm and pore size of 300 Å) maintained at 80 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase A consisted of 0.1% (v / v) TFA in water and the mobile phase B was 0.1% (v / v) TFA in acetonitrile and was run as follows: time 0 to 10.0 min 20% of B; from 10.0 to 14.0 min linear up to 70% of B; to 15 min linear down to 20% of B. The flow rate was 1 mL / min, with PDA detection at 214 nm. The injection volume was 5 μL.

### ***Validation of the RP-HPLC method***

Validation was performed using samples of biopharmaceutical products with a label claiming 100 mg / 10mL, and the parameters were assessed according to the guidelines (FDA, 2015; ICH, 2005).

### *Specificity and forced degradation study*

The specificity of the RP-HPLC method was assessed by subjecting a BS-RAM solution and a sample of the biopharmaceutical formulation (4.0 mg / mL) to oxidative condition with 3% (v / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> final, for 20 h. In addition, a photodegradation by exposure to 200 Wh / m<sup>2</sup> near ultraviolet light in a photostability chamber for 24 h was studied. Besides, working solutions prepared in 0.01 mol / L hydrochloric acid and in 0.01 mol / L sodium hydroxide were used for the acid and base stress studies, maintained at room temperature for 20 and 40 min, respectively. Solutions were then diluted with sodium chloride 0.9% solution to final concentrations of 1.0 mg / mL. In addition, possible interference from excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by analyzing a sample that contained only placebo, in-house

mixture of the formulation excipients (histidine, glycine, sodium acetate, polysorbate 80) (EMA, 2021). The specificity of the method was also established by determining the peaks purity (RAM and degraded forms), by overlaying the spectra captured at the apex, upslope, and downslope with a diode array detector, using the LC Solution Version 1.22 SPI software.

#### *Linearity*

The linearity of the method was determined by constructing three independent analytical curves, each with seven concentrations of the RAM solution. Three replicates of 5  $\mu$ L injections of the reference solutions were prepared to verify the repeatability of the detector response. Peak areas with relative standard deviation (RSD) 2% were plotted against the respective concentrations and subjected to regression analysis by a least-squares method to calculate the calibration equation and the determination coefficient ( $r^2$ ) > 0.999. 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.

#### *Precision*

##### *Repeatability*

Repeatability was examined by six analyses of a sample of RAM, at three concentrations levels (0.8, 1.0 and 1.2 mg / mL), on the same day and under the same experimental conditions.

##### *Intermediate precision*

The inter-days precision was assessed by analysis of two samples of the biopharmaceutical formulations on three different days, and the between-analysts precision was assessed by submitting the samples to analysis by different analysts in the same laboratory.

### *Accuracy*

The accuracy was evaluated by analysis of the in-house mixture of excipients with known amounts of the biomolecules to obtain solutions at concentrations of 0.8, 1.0 and 1.2 mg / mL, equivalent to 80, 100 and 120%, respectively, of the working concentration solutions. The accuracy was calculated as the percentage of drug recovered from the formulation.

### *Limits of detection and quantification*

The detection limit (DL) and the quantitation limit (QL) were calculated as defined by (ICH, 2005), using the mean values of the three independent analytical curves determined by a linear-regression model, where the factors 3.3 and 10 for the DL and QL, respectively, were multiplied by the standard deviation of the intercept and the slope. The QL was also evaluated in an experimental assay.

### *Robustness*

The robustness of an analytical procedure provides an indication of its reliability for routine analysis. The RP-HPLC method was tested analyzing the same samples, containing 1.0 mg / mL, under one-variable-at-a-time (OVAT) conditions. Additionally, the robustness parameters were also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) method using an experimental design. The procedure selected was a two-level (i.e.,  $2^4-1$  or eight experiments), fractional factorial design carried out with the selection of four factors: flow rate (mL / min), column temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), wavelength (nm), and either TFA (%). The factors and their high and low levels were evaluated as presented in Table 3. The obtained responses were processed using the Minitab 14 statistical software to assess the significance of the effects, as represented by the Pareto charts, which consist of bars with a length proportional to the absolute value of the estimated effect, divided by the pseudo standard error (PSE), as defined



by Lenth (Lenth et al., 1989). The chart includes a vertical line at the critical t-value ( $\alpha = 0.05$ ), and smaller effects are considered non-significant. The stability of the RAM samples was tested after storage, and any changes in the chromatographic pattern were compared with the freshly prepared samples.

#### *System suitability*

The system suitability test was carried out using five replicate injections of 1.0 mg / mL of BS-RAM. The peak area, retention time, number of theoretical plates and peak symmetry were measured.

#### *Analysis of RAM in biopharmaceutical formulations*

To quantitate RAM in biopharmaceutical products by the bioassay and RP-HPLC method, five batches of Cyramza<sup>®</sup>, labeled from 1 to 5, commercially available for clinical use were diluted to the appropriate concentrations in DMEM medium or sodium chloride 0.9% solution. The analyses were performed in triplicate, and the percentage recoveries were calculated against BS-RAM.

## **Results and discussion**

#### *Optimization of the chromatographic conditions*

To develop the RP-HPLC method, tests were carried out to determine which mobile phase and column would lead to satisfactory selectivity and sensitivity. Mobile phases containing 0.1% (v / v) TFA in water and 0.1% (v / v) TFA in acetonitrile or in a mixture of isopropanol, acetonitrile and water (70 + 20 + 9.9 v / v) were tested. The gradient mobile phase containing isopropanol and acetonitrile was not selected due to the high pressure associated with the viscosity of such solvent mixtures, as also described (Hewitson et al., 2011). Besides, the best peak shapes were

obtained using mobile phases containing 0.1% (v / v) TFA in water and 0.1% (v / v) TFA in acetonitrile. In addition, columns ZORBAX 300SB-C18 (150 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 3.5 μm and pore size of 300 Å), VYDAC 214TP C4 (250 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 μm and pore size of 300 Å) and ZORBAX 300SB-C8 (150 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 μm and pore size of 300 Å) were tested on the basis of their separation compatibilities under high-temperature conditions, and the ZORBAX 300SB-C18 column was selected. For the selection of the best detection wavelength, a diode array detector was used, and the 214 nm was selected due to the maximum absorption of RAM. As the temperature of the column strongly and positively affects the peak elution and symmetry, it was maintained at 80 °C. The optimized conditions of the RP-HPLC method were used to obtain reference chromatograms, which showed peak with retention time at 9.7 min corresponding to RAM, as shown in Figure 1a.

#### ***RP-HPLC method validation***

The specificity of the RP-HPLC method was evaluated by oxidative degradation, which showed a reduction of 25% of the main peak area, with one peak related to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 1.6 min and additional peaks at 10.4, 10.6 and 11.4 min (Figure 1b). Photolytic conditions resulted in 28% reduction of the main peak area and the appearance of additional peaks at 3.9, 10.5, 11.3 and 11.5 min (Figure 1c). For de acidic condition, 14% decrease of the area was observed and two additional peaks were detected at 10.6 and 11.1 min (Figure 1d). Under basic condition, 22% decrease of the area was observed, with three additional peaks at 10.5, 10.9 and 11.1 min (Figure 1e) respectively. Moreover, the injection of a sample containing only the placebo showed one peak at 1.7 min, related to the histidine (Figure 1f). The additional peaks were attributed to fragments from RAM.

The analytical curves constructed for RAM were found to be linear over the range of 0.125–10 mg / mL. The determination coefficient was calculated as  $r^2 = 0.9998$ ,  $y = (27797 \pm 12450.14) x - (1467453 \pm 21634.13)$ , where  $x$  is concentration and  $y$  is the peak absolute area, indicating the linearity of the analytical curve for the method.

The precision was studied by calculating the mean values and relative standard deviation (RSD %). For repeatability, the obtained RSD values were described in Table 1. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-day), giving RSD values for the content of 0.50 and 1.19%. The between-analysts precision was also determined by calculating the mean values and the RSD after analysis of two samples of the same pharmaceutical formulations by two analysts; the mean values were found to be 100.15 and 100.23 and the RSD values were found to be 0.11 and 0.46%, respectively, as given in Table 1.

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 0.8, 1.0 and 1.2 mg / mL, equivalent to 80, 100 and 120%, respectively, of the working concentration solutions. The absolute mean was 99.72 (Table 1), which demonstrates that the accuracy was within the desired range.

The DL and QL were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear regression line by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 0.03 mg / mL and 0.08 mg / mL, respectively. The evaluated experimental QL with a precision lower than 5% and accuracy within  $\pm 5\%$  (Shabir et al., 2007), was found to be 0.125 mg / mL, and therefore, suitable for quality control analysis.

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

assessed using the MVAT approach, and the significance of the effects was evaluated using Pareto charts. The parameters are described in Figure 2, and the two code combinations denote the effect of the interactions between the variables. The bars were drawn and ranked according to the strength of the effects, with the largest on the top, showing that they were not statistically significant ( $\alpha > 0.05$ ). Therefore, the method can be considered robust under the conditions tested. The samples were also tested, and the data showed stability for 24 h in the auto-sampler and for 48 h when maintained at 2 – 8 °C. In addition, samples diluted in ultrapure water were also tested, and no changes in the chromatographic profile, was detected related to the dilution in sodium chloride 0.9% solution.

The suitability of the system was tested and the RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.04, 0.68 and 0.45 %, respectively. The number of theoretical plates was 107554, with an RSD of 0.81%. The experimental results showed that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0 %), indicating that the system is suitable for the intended analysis.

### ***Method application***

The validated RP-HPLC method was applied to determine RAM in biopharmaceutical formulations, giving mean value 1.21% lower, than the values obtained from the cell culture bioassay, with non-significant differences ( $p > 0.05$ ) (Table 4). The Pearson's correlation coefficient was calculated, showing significant correlation for the RP-HPLC ( $r = 0.9053$ ), related to the bioassay. Furthermore, biopharmaceutical samples were artificially degraded, as described on the specificity, and were analyzed by the RP-HPLC method, and subjected to the cell culture bioassay (Table 5). The biological activities of the samples degraded containing fragments (Table 5, 2<sup>e</sup>, 2<sup>f</sup>, and 2<sup>g</sup>) were reduced by 28.90%, 10.50% and 28.14%, respectively, excluding the oxidative condition because of the interference of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 5, 2<sup>c</sup>). Concerning

to the degradations, depending on the site of changes and of the mAb, it may or may not result in loose of protein activity as mentioned (Wang et al., 2007). Thus, the employment of the methods in combination represents advances in terms of the development of alternative techniques necessary for the quality control analysis.

## **Conclusions**

The validation studies demonstrated that the proposed RP–HPLC method is rapid, specific, sensitive and accurate, and can be applied for the quantitation of RAM in biopharmaceutical formulations. Besides, the optimized cell culture A549 bioassay showed its capability to detect the effects of degradation on the bioactivity. Thus the correlation of the results enabled by the methods performed in conjunction, constitute an improvement for the quality control analysis. Besides, the methodologies can be applied during the biotechnology process and through subsequent purification steps, to monitor the stability, and to ensure the batch–to–batch consistency of the bulk and finished biotechnology–derived medicine, establishing also basis for potential study of the biosimilar.

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (Capes), for financial support.

## **References**

An, Y.; Zhang, Y.; Mueller, H.-H.; Shameem, M.; Chen, X. A new tool for monoclonal antibody analysis Application of IdeS proteolysis in IgG domain-specific characterization. *mAbs*. **2014**, 6, 879–893. DOI: 10.4161/mabs.28762.

Basle, Y. -L.; Philip, C.; Nicolas, T.; Alain, A.; Valérie, S. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 169–190. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.08.009.

Bocci, G.; Fioravanti, A.; Motta, C. -L.; Orlandi, P.; Canu, B.; Desidero, T. -D.; Mugnaini, L.; Sartini, S.; Cosconati, S.; Frati, R.; Antonelli, A.; Berti, P.; Miccoli, P.; Settimo, F. -D.; Danesi, R. Antiproliferative and proapoptotic activity of CLM3, a novel multiple tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with SN-38 on endothelial and cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 1309–1316. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.03.022.

D'Atri, V.; Murisier, A.; Fekete, S.; Veuthey, J. -L.; Guillaume, D. Current and future trends in reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of therapeutic proteins. *Trends Analyt Chem.* **2020**, *130*, 1–9. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115962.

EMA, European Medicines Agency, *CHMP Assessment Report for Cyramza*, **2021**.

Farjami, A.; Siah-Shadbad, M.; Akbarzadehlaleh, P.; Molavi, O. Development and Validation of Salt Gradient CEX Chromatography Method for Charge Variants Separation and Quantitative Analysis of the IgG mAb-Cetuximab. *Chromatographia.* **2018**, *81*, 1649–1660. DOI: 10.1007/s10337-018-3627-9.

Fekete, S.; Gassner, A. -L.; Rudaz, S.; Schappler, J.; Guillaume, D. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *Trends Anal. Chem.* **2013**, *42*, 74–83. DOI: 10.1016/j.trac.2012.09.012.

Fontanella, C. et al. Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors. *Ann. Transl. Med.* **2014**, *2*, 1–10. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.14.

Food and Drug Administration. FDA. *Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*, Food and Drug Administration. Silver Spring: FDA, **2015**.

Grotefend, S.; Kaminski, L.; Wroblewitz, S.; Deeb, S. -E.; Kuhn, N.; Reichl, S.; Limberger, M.; Watt, S.; Watzig, H. Protein quantitation using various modes of high performance liquid

chromatography. *J. Pharm. Biomed Anal.* **2012**, 71, 127– 138. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.08.024.

Hewitson, H. -B.; Wheat, T. -E.; Hong, P.; Fountain, K. -J. Method development considerations for reversed-phase protein separations. *Water AS.* **2011**:1–7.

International Conference on Harmonization. ICH. *Harmonized Tripartite Guideline, validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. Geneva: ICH, **2005**.

Javle, M.; SMYTH, E. -C.; CHAU, I. Ramucirumab: successfully targeting angiogenesis in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, 20, 5875–81. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1071.

Lenth, R. -V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. *Technometrics.* **1989**, 31, 469–473. DOI: 10.2307/1269997.

Maione, P.; Sgambato, A.; Casaluca, F.; Claudia, S. -P.; Giuseppe, S.; Rossi, A.; Gridelli, C. The Role of the Antiangiogenic Ramucirumab in the Treatment of Advanced Non Small Cell Lung Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2017**, 24, 3–13. DOI: 10.2174/0929867324666161118125103.

Shabir, G. -A.; Lough, W. -J.; Arain, S. -A.; Bradshaw, T. -K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, 30, 311–333. DOI: 10.1080/10826070601084753.

Silva, F. S. -D, Walter, M. -E; Xavier, B.; Perobelli, R. -F; Calegari, G. -Z; Cardoso, D. -F.; Perlin, V. -G.; Dalmora, S. -L. Evaluation of recombinant human interferon beta 1b by liquid chromatography methods and bioassay. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2019**, 55, 1–9. DOI: 10.1590/s2175-97902019000218328.

Syed, Y. -Y. Ramucirumab: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs.* **2020**, 80, 315–322. DOI: 10.1007/s40265-020-01263-6.

Verdaguer, H.; Tabernero, J.; Macarulla, T. Ramucirumab in metastatic colorectal cancer: evidence to date and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol.* **2016**, *8*, 230–242. DOI: 10.1177/1758834016635888.

Vlasak, J.; Ionescu, R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 468–481. DOI: 10.2174/138920108786786402.

Wadhwa, R.; Taketa, T.; Sudo, K.; Blum-Murphy, M.; Ajani, J. -A. Ramucirumab: a novel antiangiogenic agent. *Future Oncol.* **2013**, *9*, 789–795. DOI: 10.2217/fon.13.68.

Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D. -L.; King, K.; Nema, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 1–26. DOI: 10.1002/jps.20727.

Wang, S.; Liu, A. -P.; Yan, Y.; Daly, T. -J.; Li, N. Characterization of product-related low molecular weight impurities in therapeutic monoclonal antibodies using hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* **2018**, *154*, 468–475. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.03.034.



**TABLE 1 –** Accuracy and precision of RP–HPLC method for determining RAM in biopharmaceutical formulations.

Nominal concentration (mg / mL)	Accuracy		Precision			
	RSD <sup>b</sup> (%)	Accuracy <sup>a</sup> (%)	Repeatability <sup>a</sup> <u>RSD<sup>b</sup></u> (%)	Sample	Inter–days <sup>a</sup> <u>RSD<sup>b</sup></u> (%)	Between–analysts <sup>a</sup> <u>RSD<sup>b</sup></u> (%)
0.8	0.78	99.72	0.79	1	0.50	0.11
1.0	0.32	100.01	0.84	2	1.19	0.46
1.2	0.52	99.43	0.29			

<sup>a</sup>. Mean of three replicates. <sup>b</sup>. RSD = Relative standard deviation.

**TABLE 2** – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing using the one–variable–at–a–time for the RP–HPLC method.

Variable	Range investigated	RAM <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Optimized value
TFA (%)	0.09	99.10	0.70	0.10
	0.10	99.97	0.39	
	0.11	99.37	1.34	
Temperature ( °C)	78	99.55	0.78	80
	80	100.03	0.09	
	82	99.65	0.79	
Flow rate (mL / min)	0.9	99.31	0.94	1.0
	1.0	100.22	0.20	
	1.1	99.71	0.66	
Solution stability	Autosampler 24 h	100.18	0.40	–
	2 – 8 °C 24 h	100.99	0.23	–
	2 – 8 °C 48 h	99.67	0.35	–
Wavelength (nm)	190 – 320	–	–	214

<sup>a</sup> Mean of three replicates. <sup>b</sup> RSD = Relative standard deviation.

**TABLE 3** – Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi-variable-at-a-time procedure for the RP-HPLC method.

Factor	Optimal	Low level	High level
TFA (%)	0.1	0.09	0.11
Flow (mL / min)	1.0	0.9	1.1
Column temperature (°C)	80	78	82
Wavelength (nm)	214	212	216

**TABLE 4 –** Comparative quantitation of RAM in biopharmaceutical formulations, using the cell culture A549 bioassay and the RP–HPLC method.

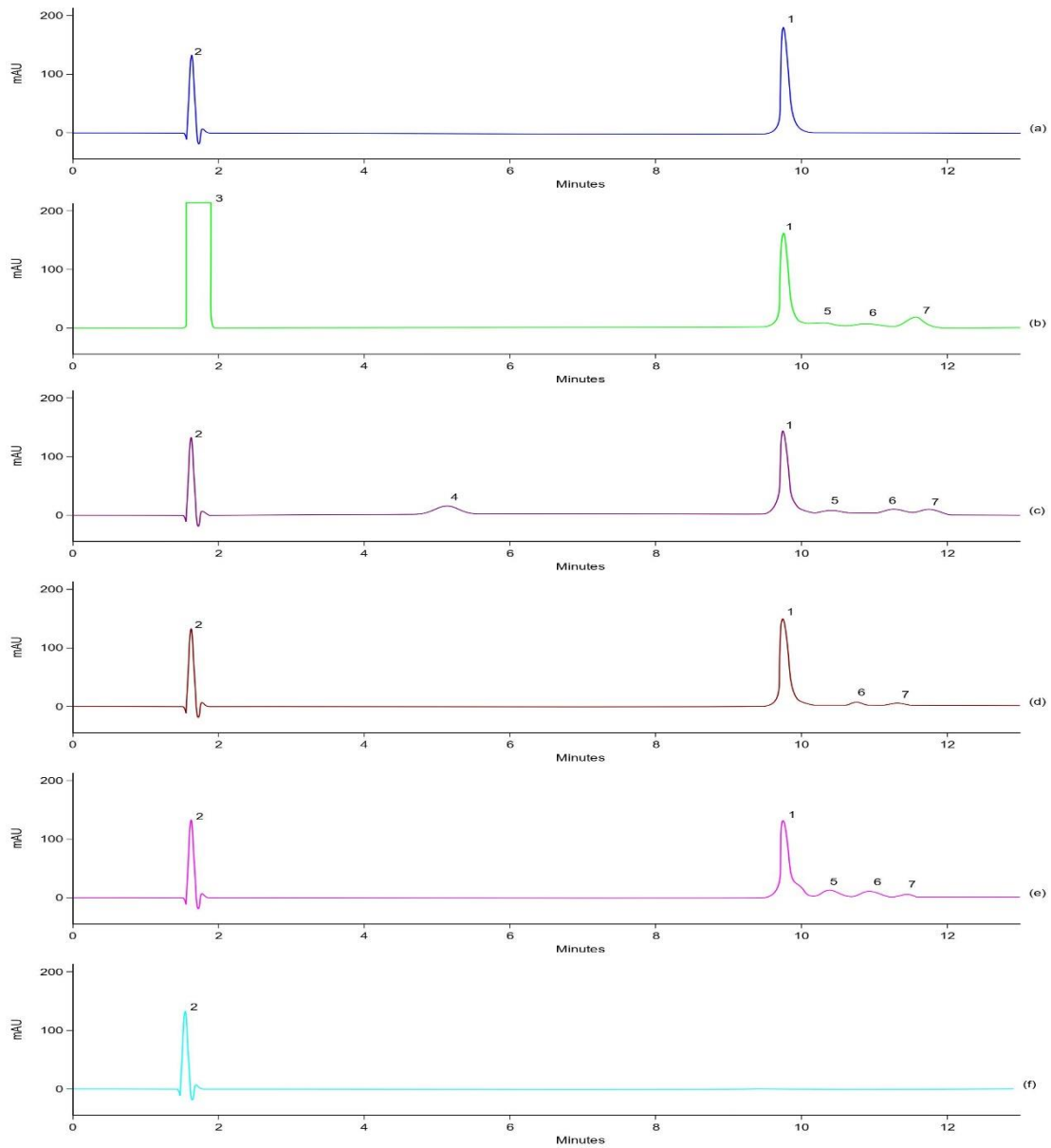
Sample	Theoretical Amount (mg / mL)	Bioassay <sup>a</sup>		RP–HPLC <sup>a</sup>	
		Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)	Main peak (%)	Fragments (%)
1	10	101.30	(98.10 – 104.70)	99.56	0.03
2	10	98.70	(95.30 – 102.30)	98.76	0.04
3	10	102.00	(98.80 – 105.30)	99.31	0.05
4	10	97.00	(92.80 – 101.40)	96.70	0.43
5	10	100.90	(97.30 – 104.60)	99.50	0.04
Mean	–	99.98	–	98.77	0.12
SD <sup>b</sup>	–	2.18	–	1.20	0.17

<sup>a</sup>. Mean of three replicates. <sup>b</sup>. SD = Standard deviation.

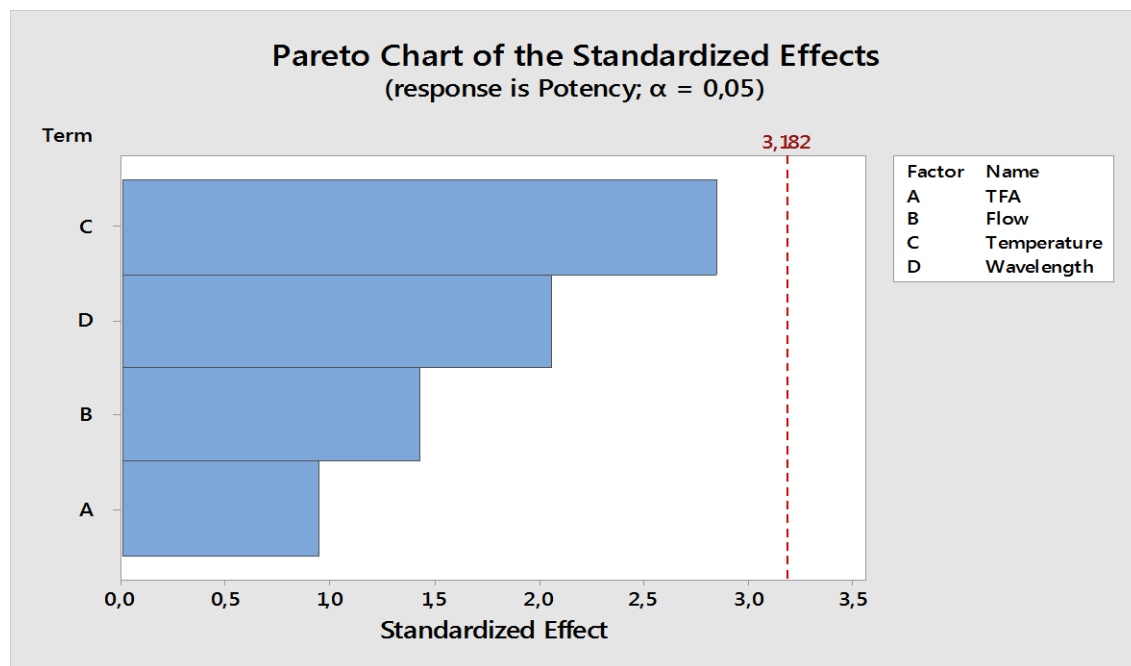
**TABLE 5 –** Comparative quantitation of RAM of the intact sample and after stress condition using bioassay and the RP–HPLC method.

Sample	Theoretical Amount (mg / mL)	Bioassay <sup>a</sup>		RP–HPLC <sup>a</sup>	
		Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)	Main peak (%)	Fragments (%)
2 <sup>b</sup>	10	98.70	(95.30 – 102.30)	98.76	0.04
2 <sup>c</sup>	–	Nt <sup>d</sup>	–	73.30	6.29
2 <sup>e</sup>	–	69.80	(61.35 – 79.29)	75.60	4.44
2 <sup>f</sup>	–	88.20	(85.10 – 91.30)	85.12	2.10
2 <sup>g</sup>	–	70.56	(64.92 – 76.72)	71.12	6.20

<sup>a</sup> Mean of three replicates. <sup>b</sup> Intact sample. <sup>c</sup> Oxidative condition. <sup>d</sup> Nt = Not tested. <sup>e</sup> UV degraded. <sup>f</sup> Acid condition. <sup>g</sup> Basic condition.



**FIGURE 1.** RP-HPLC chromatograms showing peak 1 = RAM; peak 2 = histidine; peak 3 = hydrogen peroxide; peaks 4, 5, 6 and 7 = fragments from RAM. (a) RAM Biological reference substance (BS-RAM); BS-RAM after: (b) forced oxidative degradation; (c) forced photolytic degradation; (d) acid stress; (e) basic stress; (f) placebo.



**FIGURE 2.** Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing for the determination of RAM by RP-HPLC method.

## **ARTIGO 2**

---



## 5 ARTIGO 2

---

### Validation of a Size Exclusion Liquid Chromatography Method for the Quantitation of Ramucirumab

Francielle Santos da Silva<sup>a</sup>, Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior, Bruna Xavier, Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel and Sérgio Luiz Dalmora<sup>b\*</sup>

*<sup>a</sup>Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105–900 Santa Maria–RS, Brazil; <sup>b</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105–900 Santa Maria–RS, Brazil*

Author for Correspondence: Sérgio Luiz Dalmora. Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria – RS, Brazil.

E-mail: [sdalmora@terra.com.br](mailto:sdalmora@terra.com.br)

**ABSTRACT**

Ramucirumab (RAM) is a recombinant human vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (VEGFR-2) antagonist, indicated to treat advanced solid malignancies reducing endothelial cell permeability, migration and proliferation. In this work, size exclusion liquid chromatography (SE-LC) method was developed and validated for a rapid quantitation of RAM and its aggregates forms in biopharmaceutical products. The separation of RAM was achieved isocratically on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm × 7.8 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 145 Å), using 140 mmol / L potassium phosphate monobasic, 60 mmol / L potassium phosphate dibasic; 250 mmol / L potassium chloride buffer, pH 7.0, as a mobile phase, at a flow rate of 0.8 mL / min, and column temperature of 35 °C. RAM was eluted at 8.7 min with a run time of 20 min, with detection at 214 nm. Linearity of the method was measured in the concentration range of 0.250 – 10 mg / mL with a correlation coefficient of 0.9994. The specificity of the method was demonstrated by the chromatographic analyses of RAM, subjected to several stress conditions, interference of the excipients and peak purity. The percentage recovery was in the range of 99.57 – 100.60%, which indicated that method was accurate. The percentage relative standard deviation was found to be less than 2%, which confirm the precision of the method. The SE-LC method was applied to quantitate RAM, and the results were compared with those of the A549 cell culture assay, which gave mean values of 0.90% higher. The validated SE-LC method could be applied for the quality control of the biopharmaceutical formulations, contributing to assess the quality attributes ensuring the efficacy the biotechnology-derived medicine.

**Keywords:** Ramucirumab. Monoclonal antibody. Size Exclusion Liquid Chromatography. Validation. A549 Bioassay.

## INTRODUCTION

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are a class of mutually identical antibodies generated from a single B cell clone and are increasingly used and developed for anticancer therapies. The success of these biopharmaceuticals is related to their ability to specifically interact with their target, with relatively low adverse effects. Of the five classes of human antibodies, IgGs have been, up to now, the dominant antibody class used as therapeutics (Rozhkova, 2009; An et al., 2014; Jaccoulet et al., 2016).

Ramucirumab (RAM) is a fully human IgG1 monoclonal antibody, produced by recombinant DNA in the murine cell line (NSO). RAM binds to the VEGFR–2 with high affinity and potently inhibits binding of VEGFR–2 to its ligands, VEGF–A, –C and –D, reducing endothelial cell permeability, migration and proliferation (Vlachostergios et al., 2018). Clinically, RAM is indicated for the treatment of patients with gastric cancer, colorectal cancer, non–small cell lung cancer and hepatocellular carcinoma (Oholendt and Zadlo, 2015; Verdaguer et al., 2016; Cobo et al., 2017; Reig et al., 2020).

Structurally, RAM is composed by two identical 446 amino acid heavy (Y) chains and two 214 amino acid light ( $\kappa$ ) chains. This biotech product has 16 disulfide bonds and two N–linked glycosylation sites in the heavy chain Asn296. There is no O–linked glycosylation, and the molecular weight of glycosylated RAM is approximately 147 kDa. The crystal structure of the RAM has been identified; this complexes with domain 3 of VEGFR–2 at the N terminus and blocks VEGF signaling in two ways: by sterically preventing the ligand from binding to VEGFR–2, and by changing the receptor conformation so that it cannot bind to ligand (Cooper et al., 2016; Khan and Shah, 2019).

Developing antibodies is not an easy task. Various difficulties may be encountered during the separation, purification, formulation, storage and administration of antibodies. These difficulties, which mainly involve physical and chemical instabilities, in particular, aggregation are a common problem, and even may potentially induce immunological reactions in patients. Monitoring and controlling quality attributes within a predefined range during manufacture, provides added consistency to product quality (Schellekens, 2002).

Changes in potency can occur through a variety of physicochemical or structural changes. Such changes can occur directly through altering the biological activity of the protein. Thus, the potency is generally assessed by using cell culture assays based on the proliferation, inhibition of proliferation and apoptosis that quantifies product activity (Chirino, 2004; Basu et al., 2006; Silva et al., 2019).

Aggregation is one such quality attribute that affects safety and efficacy issues in the final drug products and is generally irreversible (Wang, 2020). One of the keys to evaluate the pharmaceutical quality is quantifying the active substance and determination of any degradants like aggregates which could change the studied molecule's integrity (Wang, 2005).

In general, several methods have been established to analyze aggregate. But SE-LC is one of the most important analytical technologies for the development of pharmaceutical proteins, particularly with regard to characterization of aggregate size and content. It is widely used because it is easy to use, it has relatively high throughput, the equipment and columns are readily available, and it is robust enough to be validated for lot release (D'Atri et

al., 2020; Fekete et al., 2014; Wang, 2018) (Arakawa et al.; 2010; Mahler et al., 2009).

The present work aimed to develop and validate a SE–LC method for the quantitation of the monoclonal antibody RAM, and its high–molecular–weight (HMW) forms in biopharmaceutical formulations; to correlate the results to the A549 cell culture assay. Thus, contribute to assess the quality attributes, and to assure the safety and efficacy of the biotechnology–derived medicine.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Chemicals and sample**

This study was conducted using Batches of RAM (Cyramza<sup>®</sup>, Eli Lilly, São Paulo, Brazil), acquired from commercially available medicine. The medicine, Cyramza<sup>®</sup>, is presented as a solution for infusion and indicates a quantitative composition of RAM of 100 mg / 10 mL (10 mg / mL) or 500 mg / 50 mL (10 mg / mL) in each vial, which also contains histidine, glycine, sodium acetate, polysorbate 80 and sodium hydroxide. The manufacturer indicates that the medicine should be stored away from the light and stored at 2–8 °C. Ultrapure water was obtained from an Elix 3 coupled to a Milli–Q Gradient A10 system from Millipore (Bedford, MA, USA). Potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic and potassium chloride were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). All materials were used as received, and the mobile phases were filtered through a 0.22 µm Millex filter (Millipore) before use. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and the alamarBlue<sup>™</sup> cell viability reagent were acquired from Sigma–Aldrich. Histidine, glycine, sodium acetate, polysorbate 80, Acetonitrile (ACN), trifluoroacetic acid (TFA),

sodium hydroxide and 30% (v / v) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### **Instrumentation**

Protein separations were performed on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan), composed of an SIL–20A autosampler, a CTO–20A column thermostat, a SPD–M20A wavelength detector and an LC–20 AD pump. Peak areas were automatically integrated using the LC Solution Version 1.22 SP1 software. The absorbances of the cell culture bioassay were measured on a Thermo Scientific Varioskan<sup>®</sup> Flash microplate reader (Vantaa, Finland).

### **Standard solutions and samples**

Cyramza<sup>®</sup> was used as a representative RAM reference material. Three vials were pooled, to quantitate a sample during the method development, and it was established as the representative RAM Biological reference substance (BS–RAM). For LC methods and bioassay, primary stock standard solutions of 1.0 mg / mL and of the samples of biopharmaceutical products (Cyramza<sup>®</sup>) were prepared in sodium chloride 0.9% solution and protected from light. Then, they were diluted with DMEM culture medium containing 2% (v / v), FBS to final concentration between 0.03 and 0.81 mg / mL, for bioassay, or with sodium chloride 0.9% solution to working concentrations of 1.0 mg / mL for the LC methods.

### **Procedures**

#### *Cell proliferation assay*

The bioassay using the A549 cell line of human alveolar adenocarcinoma (ATCC® No. CCL-185™) was performed as described elsewhere (Bocci et al., 2011) with some adjustments. We used  $1 \times 10^4$  cells per well were plated in 96 well plates containing 100  $\mu$ l of the complete DMEM culture medium. After 24 h, the RAM samples with starting concentrations with 0.03 mg / mL, in triplicate, as a parallel line assay, were added in to 96 well plates. BS-RAM was used as the standard and the control was DMEM. Microplates were then incubated for 72 h at 37°C in air condition of 5% (v / v) CO<sub>2</sub>. After 72 h of cells incubation with RAM, of AlamarBlue™ was used in order to evaluate the cell proliferation. The optical density values were recorded at a 570 nm and 600 nm respectively. Blank values were subtracted from experimental values. The biological activity was calculated with the parallel line statistical method by using CombiStats™ software developed by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM, Council of Europe, Strasbourg, France).

#### *SE-LC method*

The experiments were accomplished using a size-exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm  $\times$  7.8 mm i.d., with a particle size of 5  $\mu$ m and pore size of 145 Å) maintained at 35 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 140 mmol / L potassium phosphate monobasic, 60 mmol / L potassium phosphate dibasic; 250 mmol / L potassium chloride buffer, pH 7.0. The flow rate was 0.8 mL / min with PDA detection at 214 nm. The injection volume was 5  $\mu$ L.

## **Method validation**

To ensure that the analytical procedure was suitable for its intended purpose, the developed method was validated according to the International guidelines (ICH, 2005; FDA, 2015).

### *Selectivity and specificity*

The specificity of the SE–LC method was assessed by subjecting a BS–RAM solution and a sample of biopharmaceutical formulation (4.0 mg / mL) to oxidative stress induced by exposure to 200 Wh / m<sup>2</sup> near–ultraviolet light in a photostability chamber for 24 h. Besides, they were subjected to neutral hydrolysis (45 °C for 20 h) and shaken for 1h to evaluate its effect on aggregation. Also, working solutions prepared in 0.01 mol / L hydrochloric acid and in 0.01 mol / L sodium hydroxide were used for the acid and basic stress studies, maintained at room temperature for 10 and 20 min, respectively. The solutions were diluted in sodium chloride 0.9% solution to a final concentration of 1.0 mg / mL. In addition, possible interference from excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by analyzing a sample that contained only placebo, in–house mixture of the formulation excipients (histidine, glycine, sodium acetate, polysorbate 80) (EMA, 2021). The specificity was established by determining the peaks purity (RAM and degraded forms), by overlaying the spectra captured at the apex, upslope, and downslope with a diode array detector, using the LC Solution Version 1.22 SPI software.

### *Linearity*



The linearity of this method was evaluated up to 10 mg / mL. For this purpose, were constructing three independent analytical curves, with BS–RAM of 0.250, 0.500, 1.00, 2.50, 5.00, 7.00 and 10.00 mg / mL. The reference solutions were prepared in triplicate and injected (5  $\mu$ L) into the chromatographic instrument. The calibration curve was obtained by the method of least squares where the regression equation and the correlation coefficient ( $r^2$ ) > 0.999 was calculated. 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.

#### *Precision*

The precision of the method was evaluated on two levels: repeatability and intermediate precision. In the repeatability assessment, successive determinations at three concentrations levels (0.8, 1.0 and 1.2 mg / mL) were analyzed on the same day and under the same experimental conditions. For intermediate precision, two samples of each concentration (low, intermediate, and high) were prepared daily by two different analysts each day, on three different days. The acceptance criteria of RSD  $\leq$  2% was considered

#### *Accuracy*

The accuracy parameter was assessed based on the average recovery, calculated by analysis of the in–house mixture of excipients spiked with known amounts of RAM at three concentration levels: low (0.8 mg / mL), intermediate (1.0 mg / mL), and high (1.2 mg / mL), equivalent to 80, 100 and 120%,

respectively, of the working concentration solutions. Accuracy was calculated in terms of the percentage of recovery.

#### *Limit of detection (LOD) and Limit of quantification (LOQ)*

The detection and quantification limit of the method was calculated from the standard deviation and the slope of the calibration curve used in the linearity study as described in ICH guidelines (ICH, 2005).

#### *Robustness*

In the present study, robustness of an analytical procedure was investigated using one-variable-at-a-time (OVAT) procedure which is making small deliberated variation at each step in only one factor among those affecting the separation efficiency in this method, while the other parameters are held constant. The SE-LC method was tested analyzing the same samples, containing 1.0 mg / mL. Additionally, the robustness parameters were also evaluated and compared by the MVAT method using an experimental design. The procedure selected was a two-level (i.e., 2<sup>4</sup>-1 or eight experiments), fractional factorial design carried out with the selection of four factors. The factors and their high and low levels were evaluated as presented in Table III. The obtained responses were processed using the Minitab 14 statistical software to assess the significance of the effects, as represented by the Pareto charts, which consist of bars with a length proportional to the absolute value of the estimated effect, divided by the pseudo standard error (PSE), as defined by Lenth (Lenth et al., 1989). The chart includes a vertical line at the critical t-value ( $\alpha = 0.05$ ), and smaller effects are considered non-significant. The stability of the RAM samples

was tested after storage, and any changes in the chromatographic pattern were compared with the freshly prepared samples.

#### System suitability

For system suitability, five replicates of the BS–RAM (1.0 mg / mL prepared in 0.9% NaCl), were successively injected. The peak area, retention time, number of theoretical plates and peak symmetry were measured.

#### *Analysis of RAM in biopharmaceutical formulations*

The method capability for quantification of RAM in biopharmaceutical products was demonstrated by analyzing five batches of Cyramza<sup>®</sup>, commercially available. To this end, each sample was prepared by dilution to obtain concentration of 1.0 mg / mL prepared in 0.9% NaCl or DMEM medium. The analyses were performed in triplicate, and the percentage recoveries were calculated against BS–RAM.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Optimization of the chromatographic conditions**

To develop the SE–LC method, mobile phases containing potassium phosphate, sodium phosphate and potassium chloride were tested. Potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic and potassium chloride buffer resulted in higher sensitivity and better retention time. The influence of the concentration of potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic and potassium chloride were evaluated from 50 to 250 mmol / L, where higher concentrations strongly affected the peak shape; thus, 140, 60 and 250 mmol / L, respectively,

were selected. The mobile phase pH was investigated from 6.0 to 7.5, and the best performance was achieved at pH 7.0. The effects of organic modifiers—methanol and isopropanol—were also evaluated in the concentration range from 5 to 10% (v / v); however, no improvement of the chromatographic profile was achieved. In addition, a BioSep SEC–s2000 column, BioSep SEC–s3000 column, and YARRA SEC–2000 column were tested on the basis of their separation and the BioSep SEC–s2000 column was selected. The optimal wavelength was selected using a PDA detector. The optimized conditions of the SE–LC method were used to obtain reference chromatograms, which showed peak with retention time at 8.7 min corresponding to RAM, as shown in Figure Ia.

### **SE–LC method validation**

The specificity of the method was demonstrated by the separation of the analytes of interest from other potential components such as excipients and impurities. The photolytic conditions showed a reduction of 26% of the monomer peak detected at 8.7 min and three additional peaks with retention times at 5.6, 6.7 and 7.7 min (Figure Ib). The neutral hydrolysis, showed a reduction of 27% of the monomer peak area, and an additional peaks with retention times at 6.6 and 7.7 min (Figure Ic). The acid condition showed a reduction of 86% of the monomer peak area, and one additional peak that appeared with retention time at 7.4 min (Figure Id). Besides, basic condition showed a reduction of 93% of the monomer peak area, it also showed two additional peaks that appeared with retention times at 5.7 and 7.7 min, respectively (Figure Ie). The injection of a sample containing only the placebo showed one peak at 13.5 min, related to the histidine (Figure If). The overall peaks purity was determined, indicating that the peaks were

spectrally pure, and there was no chromatographic or spectroscopic evidence that impurities were present. Together with the peak purity index of 0.9999–1, the data showed that the peaks were free of any co-eluting peak and that the excipients, mainly histidine, did not interfere in the analysis, which confirmed that the SE–LC method was specific for the analysis of RAM. All peaks eluting before the monomer were attributed to HMW proteins of RAM.

Linearity was performed at seven different concentration levels and in independent replicates to determine the calibration function. The analytical curves for SE–LC method, were found to be linear over a concentration range of 0.250 – 10 mg / mL. The determination coefficient was calculated as  $r^2 = 0.9994$ ,  $y = (23588 \pm 9994.49) x - (751266 \pm 91317.65)$ .

The prepared BS–RAM and sample concentration solutions were intended for calibration curves. With the help of slope obtained from the calibration curve, the obtained values for LOD and LOQ were 0.04 mg / mL and 0.13 mg / mL, respectively. The results unveiled that the developed SE–LC method is highly sensitive in estimating RAM.

Precision was evaluated by employing repeatability and intermediate precision, considering the calculated RSD%. A summary, of the precision results is displayed in Table I. The absolute means of repeatability and intermediate precision were 0.31 and 0.68, which are both in agreement with the acceptance criteria.

The recovery studies show the accuracy in the proposed method; the known amount of pure drug concentrations was spiked in placebo at three different levels, i.e., 80%, 100%, and 120%, and the study was carried out in triplicates for each level. Accuracy was calculated in terms of the percentage of recovery. The

absolute mean was 100.08, which demonstrates that the accuracy was within the desired range. The results are demonstrated in Table I.

Robustness testing was performed to provide us with reliable information about the critical operational variables affecting the response. The results of the study performed using OVAT approach to evaluate the robustness of the method, are summarized in Table II together with the optimized values. The %RSD values determined under robustness conditions were < 2.0%, with non-significant differences ( $p > 0.05$ ), as calculated by analysis of variance, ensuring the present method is robust. In addition, the robustness was assessed applying a suitable methodology multi-variable-at-a-time (MVAT) approach, based on experimental design (Table III). The significance of the effects was evaluated using Pareto charts (Figure II). The bars were drawn and ranked according to the strength of the effects, with the largest on the top, showing that they were not statistically significant ( $\alpha > 0.05$ ). Therefore, the method can be considered robust under the conditions tested. The samples were also tested, and the data showed stability for 24 h in the auto-sampler and for 48 h when maintained at 2–8 °C. In addition, samples diluted in ultrapure water were also tested, and no changes in the chromatographic profile, was detected related to the dilution in sodium chloride 0.9% solution.

System suitability was determined by injecting five replicate injections of the BS-RAM (1.0 mg / mL). The RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.05, 0.76 and 0.40%, respectively. The number of theoretical plates was 4886.67 with an RSD of 0.70%. The results of system suitability parameters were within the acceptable range with %RSD values of < 2.0%.

### **Application of the Method**

The proposed SE–LC method was validated and used to quantify the RAM in biopharmaceutical formulations showing mean values of 99.50% with 0.28% of aggregated forms (Table IV). This results were compared with those previously obtained by the A549 cell culture assay, which gave mean values of 0.90% higher, with non–significant differences ( $p > 0.05$ ). Furthermore, biopharmaceutical samples were artificially degraded, as described on the specificity, and were analyzed by the SE–LC method, and subjected to the cell culture bioassay (Table IV). The biological activities of the samples degraded containing HMW proteins or fragments (Table IV, 2<sup>d</sup>, 2<sup>e</sup>, 2<sup>f</sup> and 2<sup>g</sup>) were reduced by 28.75%, 29.43%, 13.50% and 30.35%, respectively. The results demonstrated the capability of the validated SE–LC method and the effects of the aggregated forms on the bioactivity. This research represents advances in terms of the development of alternative techniques necessary for the quality control analysis.

### **CONCLUSIONS**

In this study, a new SE–LC method efficient and simple was successfully developed and validated for the quantification of RAM. Good selectivity, accuracy, reproducibility, and repeatability were achieved with the analysis time of 20 min. Besides, the optimized cell culture A549 bioassay showed its capability to detect the effects of degradation on the bioactivity. Thus the methods performed in conjunction, constitute an improvement for the quality control analysis, and can be successfully applied for the routine quality control analysis

in process and final product samples in the biotechnology industry, establishing also basis for potential study of the biosimilar.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (Capes), for financial support.

## **REFERENCES**

An Y, Zhang Y, Mueller H-H, Shameem M, Chen X. A new tool for monoclonal antibody analysis Application of IdeS proteolysis in IgG domain-specific characterization. *mAbs*. 2014;6(4):879–893.

Arakawa T, Ejima D, Li T, Philo JS. The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* 2010;99(4):1674–1692.

Basu A, Yang K, Wang M, Liu S, Chintala R, Palm T, Zhao H, Peng P, Wu D, Zhang Z, Hua J, Hsieh MC, Zhou J, Petti G, Li X, Janjua A, Mendez M, Liu J, Longley C, Zhang Z, Mehlig M, Borowski V, Viswanathan M, Filpula D. Structure-Function Engineering of Interferon- $\beta$ -1b for Improving Stability, Solubility, Potency, Immunogenicity, and Pharmacokinetic Properties by Site-Selective Mono-PEGylation. *Bioconjugate Chem.* 2006;17:618-630.

Bocci G, Fioravanti A, Motta CL, Orlandi P, Canu B, Desidero TD, Mugnaini L, Sartini S, Cosconati S, Frati R, Antonelli A, Berti P, Miccoli P, Settimo FD, Danesi



R. Antiproliferative and proapoptotic activity of CLM3, a novel multiple tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with SN-38 on endothelial and cancer cells. *2011*;81:1309–1316.

Chirino AJ, Mire-Sluis A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. *Nat. Biotechnol.* 2004;22,(11)1383–1391.

Cobo M, Gutiérrez V, Villatoro R, Trigo JM, Ramos I, López O, Ruiz M, Godoy A, López I, Arroyo M. Spotlight on ramucirumab in the treatment of nonsmall cell lung cancer: design, development, and clinical activity. *Lung Cancer: Targets Ther.* 2017; 8:57–66.

Cooper MR, Binkowski C, Hartung J, Towle J. Profile of ramucirumab in the treatment of metastatic non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2016;9:1953–1960.

D'Atri, V.; Murisier, A.; Fekete, S.; Veuthey, J. -L.; Guillarme, D. Current and future trends in reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of therapeutic proteins. *Trends Analyt Chem.* 2020;130:1–9.

EMA, European Medicines Agency, *CHMP Assessment Report for Cyramza*, 2021.

Fekete S, Beck A, Veuthey JL, Guillarme D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J. Pharm. Biomed.* 2014;101:161–173.

Food and Drug Administration. FDA. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Food and Drug Administration. Silver Spring: FDA, 2015.

International Conference on Harmonization. ICH. *Harmonized Tripartite Guideline, validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. Geneva: ICH, 2005.

Jaccoulet E, Boccard J, Taverna M, Azevedos AS, Rudaz S, Smadja C. High-throughput identification of monoclonal antibodies after compounding by UV spectroscopy coupled to chemometrics analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(21):5915–5924.

Khan U, Shah MA. Ramucirumab for the treatment of gastric or gastro-esophageal junction cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2019;36(4):1–7.

Lenth RV. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. *Technometrics.* 1989;31(4):469–473.

Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis. *J. Pharm. Sci.* 2009;98(9):2909–2934.

Oholendt AL, Zadlo JL. Ramucirumab: A New Therapy for Advanced Gastric Cancer. *J Adv Pract Oncol*. 2015;6:71–75.

Reig M, Galle PR, Kudo M, Finn R, Llovet JM, Metti AL, Schelman WR, Liang K, Wang C, Widau RC, Abada P, Zhu AX. Pattern of progression in advanced hepatocellular carcinoma treated with ramucirumab. *Liver Int*. 2020;41(3):598–607.

Rozhkova, A. Quantitative analysis of monoclonal antibodies by cation-exchange Chromatofocusing. *J. Chromatogr. A*. 2009;1216:5989–5994.

Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2002;1(6):457-62.

Silva, FSD, Walter ME, Xavier B, Perobelli RF, Calegari GZ, Cardoso DF, Perlin VG, Sérgio Luiz Dalmora SL. Evaluation of recombinant human interferon beta 1b by liquid chromatography methods and bioassay. *Braz. J. Pharm. Sci*. 2019;55:1–9.

Verdaguer H., Tabernero J, Macarulla T. Ramucirumab in metastatic colorectal cancer: evidence to date and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(3):230–242.

Vlachostergios PJ, Lee A, Thomas C, Walsh R, Scott TT. A critical review on ramucirumab in the treatment of advanced urothelial cancer. *Future Oncol.* 2018; 14(11): 1–14.

Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int. J. Pharm.* 2005;289:1–30.

Wang S, Liu AP, Yan Y, Daly TJ , Li N. Characterization of product–related low molecular weight impurities in therapeutic monoclonal antibodies using hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;154:468–475.

Wang L, Trang HK, Desai J, Dunn ZD, Richardson DD, Marcus RK. Fiber-based HIC capture loop for coupling of protein A and size exclusion chromatography in a two-dimensional separation of monoclonal antibodies. *Anal Chim Acta.* 2020;15(1098):190–200.

**TABLE I –** Accuracy and precision of SE–LC method for determining RAM in biopharmaceutical formulations.

Nominal concentration (mg / mL)	Accuracy		Precision			
	RSD <sup>b</sup> (%)	Accuracy <sup>a</sup> (%)	Repeatability <sup>a</sup> RSD <sup>b</sup> (%)	Sample	Inter–days <sup>a</sup> RSD <sup>b</sup> (%)	Between–analysts <sup>a</sup> RSD <sup>b</sup> (%)
0.8	0.61	100.60	0.22	1	0.91	1.06
1.0	0.11	100.06	0.43	2	0.72	0.02
1.2	0.26	99.57	0.29			

<sup>a</sup>. Mean of three replicates. <sup>b</sup>. RSD = Relative standard deviation.

**TABLE II** – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the SE–LC method.

Variable	Range investigated	RAM <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Optimized value
Mobile phase pH	6.9	99.75	0.67	7.0
	7.0	100.01	0.22	
	7.1	99.79	0.46	
Monobasic potassium phosphate (mM)	130	99.48	1.04	140
	140	100.03	0.24	
	150	99.62	0.35	
Dibasic potassium phosphate (mM)	50	100.32	0.87	60
	60	100.09	0.17	
	70	99.86	0.37	
Potassium chloride (mM)	240	99.97	0.67	250
	250	100.07	0.34	
	260	99.80	0.69	
Flow rate (mL / min)	0.7	99.95	0.90	0.8
	0.8	99.99	0.78	
	0.9	99.94	0.89	
Solution stability	Autosampler	100.52	0.48	–
	24 h			
	2 – 8 °C 24 h	101.01	0.66	
	2 – 8 °C 48 h	99.80	0.15	–
Wavelength (nm)	190 – 320	–	–	214

<sup>a</sup> Mean of three replicates. <sup>b</sup> RSD = Relative standard deviation.

**TABLE III** – Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi–variable–at–a–time procedure for the SE–LC method.

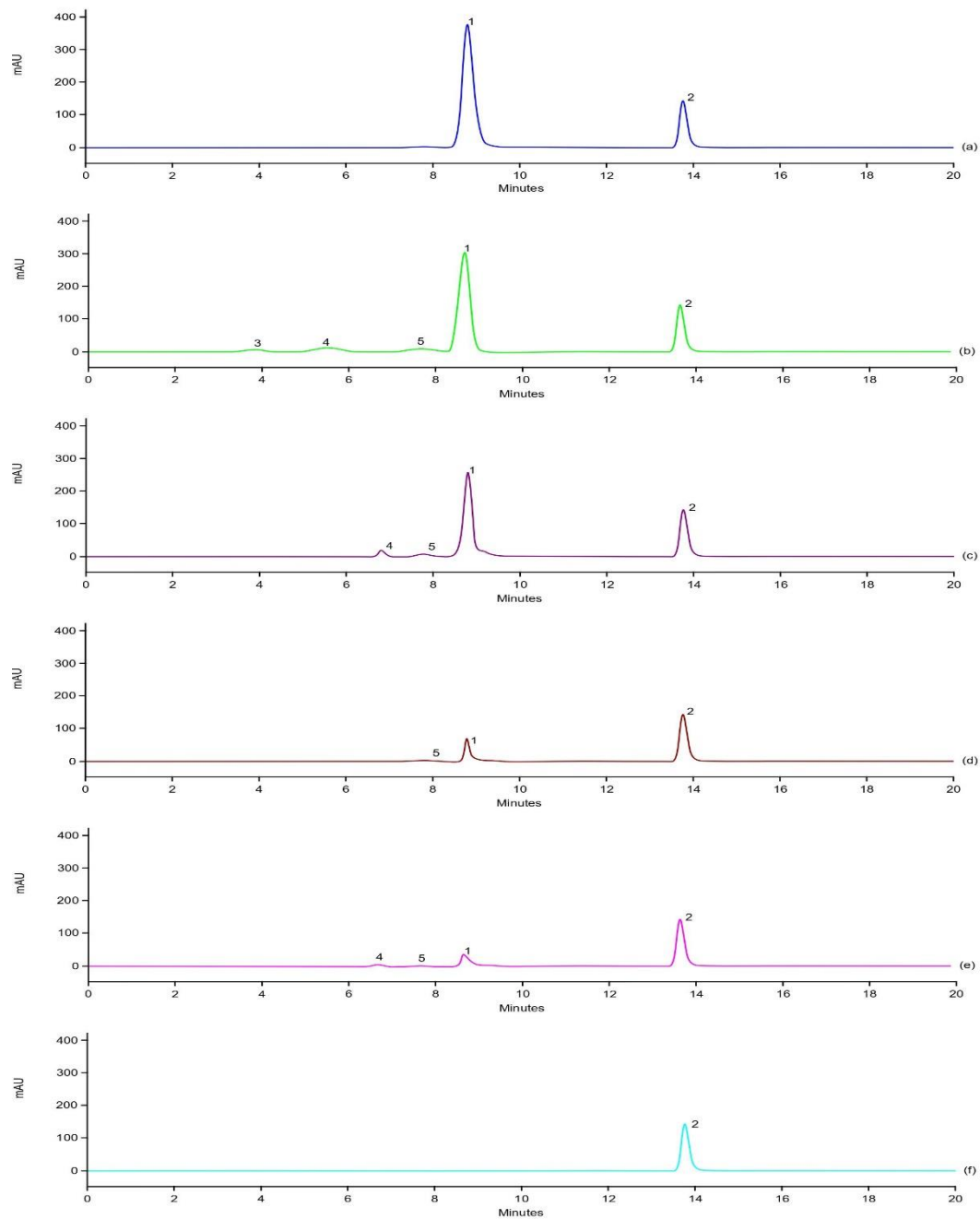
Factor	Optimal	Low level	High level
Phosphate buffer pH	7.0	6.9	7.1
Flow (mL / min)	0.8	0.7	0.9
Column temperature (°C)	35	34	36
Wavelength (nm)	214	212	216

**TABLE IV** – Comparative quantitation of RAM in biopharmaceutical formulations, using the cell culture A549 bioassay and SE-LC method.

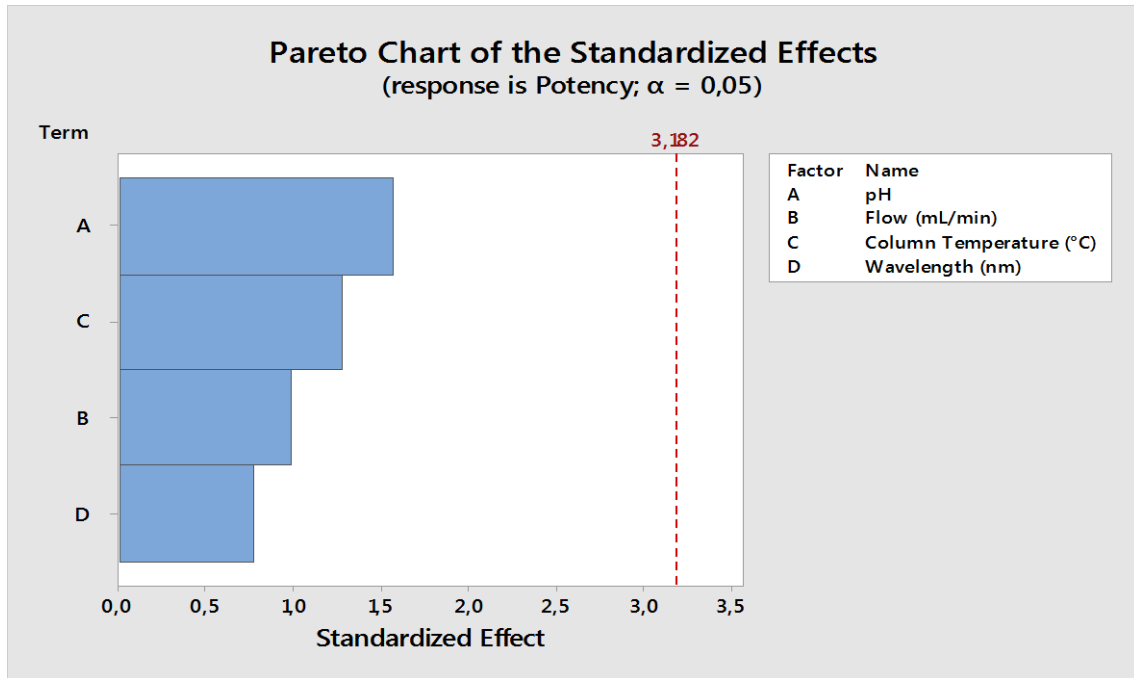
Sample	Theoretical Amount (mg / mL)	Bioassay <sup>a</sup>		SE-LC <sup>a</sup>	
		Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)	Main peak (%)	HMW proteins (%)
1	10	101.68	(98.46 – 105.86)	100.19	0.18
2	10	99.06	(95.65 – 102.65)	98.70	0.23
3	10	102.13	(99.02 – 106.61)	99.90	0.25
4	10	98.09	(93.84 – 102.04)	98.60	0.36
5	10	101.02	(97.41 – 105.11)	100.10	0.38
Mean	–	100.40	–	99.50	0.28
SD <sup>b</sup>	–	1.74	–	0.78	0.09
2 <sup>c</sup>	10	99.06	(95.65 – 102.65)	98.70	0.23
2 <sup>d</sup>	–	70.31	(66.15 – 82.50)	72.44	5.60
2 <sup>e</sup>	–	69.63	(65.70 – 81.70)	72.86	5.94
2 <sup>f</sup>	–	85.56	(82.70 – 88.30)	26.37	2.21
2 <sup>g</sup>	–	68.71	(66.36 – 73.76)	22.56	8.33

<sup>a</sup>. Mean of three replicates. <sup>b</sup>. SD = Standard deviation. <sup>c</sup>. Intact sample. <sup>d</sup>. Forced photolytic degradation. <sup>e</sup>. Neutral hydrolysis. <sup>f</sup>. Acid stress. <sup>g</sup>. Basic stress.





**FIGURE I.** SE-LC chromatograms showing peak 1 = RAM; peak 2 = histidine; peaks 3, 4 and 5 = high-molecular-weight proteins. (a) RAM Biological reference substance (BS-RAM); BS-RAM after: (b) forced photolytic degradation; (c) neutral hydrolysis; (d) acid stress; (e) basic stress; (f) placebo.



**FIGURE II.** Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing for the determination of RAM by SE–LC method.

## DISCUSSÃO

---

## 6 DISCUSSÃO

---

Os avanços na área da biotecnologia, principalmente com a tecnologia do DNA recombinante, viabilizaram maior desenvolvimento e produção de mAbs. Entretanto, devido sua origem e estrutura complexa, necessitam da combinação de métodos físico-químicos, biológicos e imunológicos para avaliar sua identidade, pureza, teor, atividade biológica e estabilidade. Assim, destaca-se a importância do desenvolvimento e validação de métodos analíticos para garantir a sua completa caracterização e avaliação, assegurando a qualidade nas diversas etapas dos processos de produção e produtos acabados, bem como viabilizar estudos de comparabilidade de biofármacos (ECKER et al., 2015; WANG et al., 2018).

Os bioensaios são fundamentais para avaliação da atividade dos mAbs de uso terapêutico, pois expressam sua potência biológica *in vitro* ou *in vivo*. A potência biológica dos mAbs com atividade antiangiogênica tem sido determinada por bioensaios *in vitro* com avaliação da inibição, migração e formação de tubos das células endoteliais HUVEC, e por ensaios de antiproliferação e apoptose celular em linhagem de células tumorais, como a A-549. Por sua vez, os ensaios *in vivo* tem sido têm sido utilizados para avaliar efeitos na redução do tumor através da inoculação das células A-549 e HT-29 em camundongos imunodeficientes (LU et al., 2002; LIU et al., 2011; KIM et al., 2014; XIE et al., 2015).

Métodos cromatográficos e biológicos têm sido aplicados para caracterização, identificação, quantificação e avaliação de potência de produtos biotecnológicos, porém existem poucas publicações que abordam essas técnicas para análise de RAM. Neste contexto, foram realizados os estudos para desenvolvimento e validação de métodos por CL-FR e CL-EM, bem como ensaio por cultura de células A549 *in vitro*.

É importante destacar que não existe Padrão Internacional para o RAM. Há empresas internacionais que fornecem a substância biológica como referência, porém não possuem certificação da substância e não são reconhecidas por órgão oficial. Desse modo, optou-se por utilizar o produto comercial Cyramza® (500 mg / 50 mL) produzido e patenteado pelo laboratório Eli Lilly, que foi adotado como Substância Biológica de Referência (BS-RAM) para o desenvolvimento e validação dos métodos. Artigos publicados na literatura internacional adotaram procedimentos semelhantes (GOYON et al., 2017; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2018; NAVAS et al., 2013).

A presente discussão aborda o ARTIGO 1 e o ARTIGO 2, anexados no capítulo anterior, no qual estão demonstrados através de figuras e tabelas os resultados obtidos experimentalmente.

ARTIGO 1. Desenvolveu-se e validou-se método por CL-FR para caracterização e avaliação de RAM. Foram testadas fases móveis com diferentes concentrações de TFA em água e TFA em ACN ou em mistura com isopropanol, com eluição por gradiente. Colunas cromatográficas como Vydac 214TP C4 e ZORBAX 300SB-C8 foram testadas em temperaturas que variaram de 60 a 82 °C, de acordo com as recomendações de uso. Selecionou-se então, a fase móvel composta por TFA 0,1% v / v em água e TFA 0,1% v / v em ACN, e a coluna ZORBAX 300SB-C18 mantida a 80 °C, que possibilitou a separação cromatográfica com tempo de retenção de 9,7 min (Figura 1a).

Os picos adicionais gerados durante os estudos de degradação forçada, sob condições de estresse oxidativo, fotolítico, condição ácida e condição básica, podem ser atribuídos às proteínas relacionadas de RAM, pois os mAbs são suscetíveis a oxidação da metionina e reações químicas de desamidação (CHIRINO; MIRE-SLUIS, 2004). A análise da amostra preparada somente com os excipientes da formulação, confirmou a especificidade do método e a pureza do pico de RAM avaliada com DAD (> 0,9999).

O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 0,125 – 10 mg / mL ( $r^2 = 0,9998$ ). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV% inferiores a 1,19%, que demonstram precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV% menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Na Tabela 1 podem ser observados os valores experimentais obtidos no teste de exatidão, com média de 99,72%. Os resultados obtidos asseguram a precisão e exatidão do método proposto.

Os teores obtidos quando foram introduzidas variações independentes de parâmetros como % de ACN, fluxo, temperatura da coluna e comprimento de onda, não apresentaram diferenças significativas (Tabela 2). Além disso, executaram-se testes com planejamento experimental baseado na avaliação de quatro fatores em conjunto (% de TFA, vazão da fase móvel, temperatura da coluna e comprimento de onda) em dois níveis (baixo e alto,  $\pm 1$ ) (Tabela 3). O gráfico de Pareto foi construído utilizando o software estatístico Minitab. Os resultados obtidos não demonstraram

alterações significativas nos teores / potências, com nível de significância 5%, sendo inferiores ao valor crítico (3,182), conforme observado na Figura 2.

Por sua vez, parâmetros de adequabilidade do sistema foram avaliados, observando-se que os resultados obtidos cumpriram especificações preconizadas, além de CV inferiores a 2%, garantindo assim, que as condições do método foram adequadas para assegurar a confiabilidade dos resultados (ICH, 2005; USP 43, 2020). O método desenvolvido e validado por CL-FR cumpre os requisitos estabelecidos em guias oficiais, podendo ser empregado para caracterização de RAM em produtos biofarmacêuticos.

Adicionalmente, avançou-se para o estudo do bioensaio *in vitro* por cultura em células A-549, para avaliação de potência de RAM em produtos biofarmacêuticos, com base na avaliação de respostas de antiproliferação celular. Durante o desenvolvimento do método, parâmetros e reagentes foram avaliados e abordados por seu impacto, se alterado. Entre as variações aplicadas investigou-se a concentração celular, diferentes tempos de exposição das células com a amostra, tempo de incubação com o corante, número de passagens para testar a estabilidade da linhagem, diferentes lotes de soro fetal bovino. O ensaio foi executado com quatro doses de RAM que variaram entre 0.03 e 0.81 mg / mL, para avaliação da inibição da proliferação celular pela determinação de células viáveis com o uso do corante azul de alamar e leitura espectrofotométrica.

Para o estudo de correlação entre os métodos, 5 lotes de produtos biofarmacêuticos comerciais com teor declarado de 100 mg \ 10 mL, com data de validade vigente, foram analisados por CL-FR e bioensaio em células A549 (Tabela 4). Observou-se que o resultado obtido por CL-FR foi 1,21% menor, quando comparado com o resultado do bioensaio, com diferenças não-significativas ( $p > 0,05$ ). Também, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), que forneceu valor de  $r = 0,9053$  mostrando correlação significativa entre os métodos. Além disso, as amostras biofarmacêuticas foram degradadas artificialmente, e analisadas pelo método RP-HPLC, e submetidas ao bioensaio por cultura de células (Tabela 5). As atividades biológicas das amostras degradadas contendo fragmentos (Tabela 5, 2<sup>e</sup>, 2<sup>f</sup> e 2<sup>g</sup>) foram reduzidas em 28,90%, 10,50% e 28,14%, respectivamente, excluindo a condição oxidativa devido à interferência do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 5, 2<sup>c</sup>). Assim, os métodos realizados em conjunto, constituem uma melhoria para a análise de controle de

qualidade, podendo ser aplicados com sucesso para a quantificação do RAM em produtos biofarmacêuticos.

ARTIGO 2. Desenvolveu-se e validou-se método por CL-EM. Fases móveis compostas por tampão fosfato de potássio, fosfato de sódio e ácido fosfórico foram testadas nas concentrações entre 50 – 250 mM. Testaram-se também colunas cromatográficas como BioSep SEC-s2000, BioSep SEC-s3000 e YARRA SEC-2000. A partir das recomendações sobre as condições de uso da coluna selecionada, BioSep SEC-s2000, a fase móvel foi então testada na faixa de pH entre 2,5 e 7,5. Adicionalmente avaliou-se a interferência dos modificadores orgânicos metanol e isopropanol (5 a 10% v / v). Com base na simetria do pico e tempo de retenção de 8,7 min (Figura 1a), optou-se pela utilização da fase móvel composta por fosfato de potássio monobásico (140 mM), fosfato de potássio dibásico (60 mM) e cloreto de potássio (250 mM) pH 7,0.

Os picos adicionais gerados durante os estudos de degradação forçada por aquecimento e agitação, condições de estresse fotolítico, condição ácida e condição básica, podem ser atribuídos às proteínas de alta massa molecular. A análise da amostra preparada somente com os excipientes da formulação, foi avaliada com DAD, que forneceu elevada pureza ( $> 0,9999$ ), indicando que não há co-eluição, confirmando a especificidade do método proposto.

O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 0,250 – 10 mg / mL ( $r^2 = 0,9994$ ). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV% inferiores a 1,06% (SHABIR, 2003). Na Tabela I podem ser observados os valores experimentais obtidos no teste de exatidão, com média de 100,08%. Os resultados obtidos asseguram a precisão e exatidão do método proposto.

Por sua vez, a robustez do método foi estudada através de pequenas modificações independentes na concentração (mM) de fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico e cloreto de potássio, no pH da fase móvel, na temperatura da coluna e comprimento de onda, observando que não houve influência na quantificação de RAM. Os resultados variaram entre 99,48 e 101,32 (Tabela III). O desenho experimental já descrito no método analítico por CL-FR, foi aplicado modificando quatro fatores em conjunto (pH e vazão da fase móvel, temperatura da coluna e comprimento de onda) em dois níveis (baixo e alto,  $\pm 1$ ) (Tabela III). O gráfico de Pareto foi construído utilizando o software estatístico Minitab.

Os resultados obtidos não demonstraram alterações significativas nos teores com nível de significância 5%, sendo inferiores ao valor crítico (3,182), conforme observado na Figura II.

Os dados obtidos na verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico confirmam que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estado de acordo com a literatura, com CV inferiores a 2% (ICH, 2005; USP 43, 2020).

Os resultados obtidos no bioensaio para avaliação da potência de RAM foram correlacionados com os resultados fornecidos pelo método por CL–EM, demonstrados na Tabela IV. A correlação entre o método analítico por CL–EM e o bioensaio por cultura de células, foi calculada pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), que forneceu o valor de  $r = 0,9353$ , respectivamente, demonstrando a significância dos dados.

Vale destacar que, conforme descrito na revisão da literatura, na validação do método por CL–FR desenvolvida por Prashanthi e colaboradores (2018), foi realizada quantificação do RAM em comprimidos, forma farmacêutica não registrada pelos órgãos oficiais, o método utiliza temperatura ambiente para análise e comprimento de onda (320 nm) não compatível com a absorção do composto. Além do mais, os autores não demonstraram a capacidade do método em quantificar o RAM na presença de substâncias que podem estar presentes na amostra, como excipientes e produtos de degradação, além de não citarem a Substância de Referência utilizada nas análises cromatográficas.

Neste contexto, os métodos desenvolvidos e validados por CL–FR, CL–EM no presente estudo, cumpriram com os requisitos preconizados pelos compêndios oficiais, podendo ser empregados em conjunto para caracterização de RAM em produtos biotecnológicos (FDA, 2015; ICH, 2005).

Até o presente momento não existe monografia farmacopeia para caracterização e avaliação de RAM. Por essa razão, sugere-se que os métodos por CL–FR e CL–EM sejam adotados em combinação com o bioensaio da atividade antiproliferativa, para avaliação de RAM, bem como suas formas degradadas, com intuito de estabelecer métodos alternativos. Além disso, os procedimentos aqui estudados podem ser usados durante as etapas do processo de expressão e purificação, para monitorar variações que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica.



## **CONCLUSÕES**

---

## 7 CONCLUSÕES

---

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa específico, preciso, exato e robusto, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e quantificação do anticorpo monoclonal Ramucirumabe e seus fragmentos.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular específico, preciso, exato e robusto que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para quantificação do anticorpo monoclonal Ramucirumabe e de suas proteínas de alta massa molecular.
- ✓ Desenvolveu-se o bioensaio antiproliferativo *in vitro* por cultura em células A549 que foi adotado para avaliar a atividade biológica de Ramucirumabe.
- ✓ Estudou-se a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos por CL-FR e CL-EM e o bioensaio da atividade antiproliferativa em células A549, para as amostras selecionadas, pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), que forneceu os valores de  $r = 0,9053$  e  $r = 0,9353$ , respectivamente, demonstrando a significância dos dados.
- ✓ Sugere-se a aplicação dos métodos cromatográficos para avaliação do anticorpo monoclonal Ramucirumabe, em combinação com o bioensaio, pois representa contribuição para aprimorar a caracterização do produto biotecnológico, viabilizando a determinação dos seus fragmentos e das proteínas de alta massa molecular.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados, certamente contribuirão para aprimorar o controle da qualidade, e se constituir em bases para futuros estudos de comparabilidade de RAM, e avanços na área de produtos biofarmacêuticos no País.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABHINAND, C. S. et al. VEGF–A/VEGFR–2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, p. 347–354, 2016.
- ARJAANS, M. et al. VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, p. 21247–21258, 2016.
- ARLOTTA, K. J.; OWEN, S. C. Antibody and antibody derivatives as cancer therapeutics. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 11, p. 1–16, 2019.
- Basle, Y. L. et al. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 169–190, 2020.
- BOBÁLY, B. et al. Characterizing various monoclonal antibodies with milder reversed phase chromatography conditions. **Journal of Chromatography B**, v. 1096, p. 1–10, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 55, de 16 de Dezembro de 2010. **Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências**. Publicada no D.O.U. de 16 de dezembro de 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Registro ANVISA nº 1126001930015 – CYRAMZA**. Publicado no D.O.U. de 22 de fevereiro de 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Brasília, DF, 2017.
- BREEDVELD, F. C. Therapeutic monoclonal antibodies. **The Lancet**, v. 355, p. 735–40, 2000.
- BRUNS, C. J. et al. Vascular endothelial growth factor is an *in vivo* survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. **Cancer**, v. 89, n. 3. p. 488–499, 2000.
- BUSS, N. A. P. S. et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. **Current Opinion in Pharmacology**, v.12, p. 615–622, 2012.
- BUSTAMANTE-CÓRDOVA, L. et al. Recombinant Antibodies in Veterinary Medicine: An Update. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. 175, p. 1–9, 2018.
- 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.

CHISARI, C. G. et al. Rituximab for the treatment of multiple sclerosis: a review. **Journal of Neurology**, v. 269, p. 159–183, 2022.

CRUZ-TERAN, C. et al. Challenges and opportunities for antiviral monoclonal antibodies as COVID-19 therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 169, p. 100–117, 2021.

CYRAMZA: Ramucirumabe. Eli Lilly do Brasil Ltda., 2021, **Bula de Remédio**.

De LUCA, E. et al. Ramucirumab, A Second-Line Option For Patients With Hepatocellular Carcinoma: A Review of The Evidence. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 3721–3729, 2020.

ECKER, D. M. et al. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 9–14, 2015.

EMA – European Medicines Agency: **Europe Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products**. 2009.

EMA, European Medicines Agency, **CHMP Assessment Report for Cyramza**, 2014.

EMA, European Medicines Agency, **CHMP Assessment Report for Cyramza**, 2021.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 10<sup>th</sup> ed., Strasbourg: **Council of Europe**, 2021.

FEKETE, S. et al. Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: Toward a generic method development approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p.158–168, 2012.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annual Review of Medicine**, v.57, p.1–18, 2006.

GABI – Generics and Biosimilars Initiative. **Patent expiry dates for biologicals: 2016 update**. Disponível em: <<http://gabi-journal.net/patent-expiry-dates-for-biologicals-2016-update.html>>Acesso em: 12/11/2019.

GOEL, N.; CHANCE, K. Biosimilars in rheumatology: understanding the rigor of their development. **Rheumatology**, v. 56, n. 2, p. 187–197, 2017.

GOLAY, J.; INTRONA, M. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of *in vitro* and *in vivo* assays. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 526, p. 146–153, 2012.

GOYON, A. et al. Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation. **Journal of Chromatography B**, v. 1065 –1066, p. 35–43, 2017a.

- GOYON, A. et al. Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies. **Journal of Chromatography B**, v. 1065–1066, p. 119–128, 2017b.
- GRAF, J. et al. Monoclonal Antibodies for Multiple Sclerosis: An Update. **BioDrugs**, v. 33, p. 61–78, 2019.
- HARDING, F. A. et al. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. **mAbs**, v.2, n. 3, p. 256–265, 2010.
- HERNÁNDEZ–JIMÉNEZ, J. et al. Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long–term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 511–524, 2018.
- HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 2005.
- ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**. November 2005.
- ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **ICH Harmonized Tripartite Guideline: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology–Derived Pharmaceuticals S6 (R1)**, 2011.
- JAIN, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. **Science**, v. 307, p. 58–62, 2005.
- JAPELJ, B. et al. Biosimilar structural comparability assessment by NMR: from small proteins to monoclonal antibodies. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–2, 2016.
- JAVLE, M. et al. Ramucirumab: successfully targeting angiogenesis in gastric cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 23, p. 5875–81, 2014.
- JELTSCH, M. et al. Receptor Tyrosine Kinase–Mediated Angiogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, p. 1–22, 2013.
- JIANG, X–R. et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 101–110, 2011.
- KENNEDY, P. J. et al. Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 394–408, 2017.
- KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n, 19, p. 2039–2049, 2008.

KIM, Y-E. et al. Therapeutic effect of a TM4SF5-specific monoclonal antibody against colon cancer in a mouse model. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8402–8415, 2014.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495–497, 1975.

KRUPITSKAYA, Y.; WAKELEE, H. A. Ramucirumab, a fully human mAb to the transmembrane signaling tyrosine kinase VEGFR-2 for the potential treatment of cancer. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 10, n. 6, p. 597–605, 2009.

LIU, D. et al. Tumor specific delivery and therapy by double-targeted nanostructured lipid carriers with anti-VEGFR-2 antibody. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, p. 2291–2301, 2011.

LOHELA, M. et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, p. 154–165, 2009.

LOWE, D. et al. Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics. **Advances in protein chemistry**, v. 84, p. 41–61, 2011.

LU, D. et al. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR-2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy. **International Journal of Cancer**, v. 97, p. 393–399, 2002.

LU, D. et al. Tailoring *in vitro* selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 44, p. 43496–43507, 2003.

LUTTEROTTI, A., MARTIN, R. Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, v. 7, p. 538–47, 2008.

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.

MARTÍNEZ-ORTEGA, A. Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 117–124, 2016.

MARTÍNEZ-ORTEGA, A. et al. Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 993–1003, 2018.

MIAO, H-Q. et al. Potent neutralization of VEGF biological activities with a fully human antibody Fab fragment directed against VEGF receptor 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 438–445, 2006.

MOELLER, B. J. et al. The relationship between hypoxia and angiogenesis. **Seminars in Radiation Oncology**, v.14, N. 3, p. 215–221, 2004.

MORAES NETO, J. E. e al. Preclinical assessment of intravitreal ramucirumab: in vitro and in vivo safety profile. **International Journal of Retina and Vitreous**, v. 6, n. 40, p. 1–9, 2020.

MOYAERT, H. et al. A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 593–145, 2017.

NAVAS, N. et al. Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 9351–9363, 2013.

NEILL, A. et al. Characterization of Recombinant Monoclonal Antibody Charge Variants Using OFFGEL Fractionation, Weak Anion Exchange Chromatography, and Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 6204–6211, 2015.

NELSON, A. L. et al. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 767–774, 2010.

ORDÁS, I. et al. Anti-TNF Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: Pharmacokinetics-Based Dosing Paradigms. **Clinical pharmacology & Therapeutics**, v. 91, n. 4, 2012.

PEACH, C. J. et al. Molecular Pharmacology of VEGF–A isoforms: binding and signalling at VEGFR–2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1–27, 2018.

PENTO, J. T. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. **Anticancer Research**, v. 37, p. 5935–5939, 2017.

PEROBELLI, R. F. et al. Quantitation of the monoclonal antibody Denosumab by bioassay and validated LC methods. **International journal of biological macromolecules**, v. 119, p. 96–104, 2018.

PRASHANTHI, Y et al. A novel HPLC method for identification and quantification of ramucirumab in tablet dosage form. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 4, p. 2231–5667, 2018.

QUINTERO-FABIÁN, S. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–21, 2019.

REGAZZI, M. et al. Monoclonal Antibody Monitoring: Clinically Relevant Aspects, A Systematic Critical Review. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 42, n. 1, p. 45–56, 2020.



REHDER, D. S. et al.; Reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry analysis of reduced monoclonal antibodies in pharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p.164–175, 2006.

ROSKOSKI Jr. R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 62, p. 179–213, 2007.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, 267–285, 2005.

SANDRA, K. et al. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization. **Journal of Chromatography A**, v.1335, p. 81–103, 2014.

SANTORO, D. Therapies in Canine Atopic Dermatitis: An Update. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 49, p. 9–26, 2019.

SCHNEIDER, C. K.; KALINKE, U. Toward biosimilar monoclonal antibodies. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 985–990, 2008.

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

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.

SHIN, S. U.; MORRISON, S. L. Production and Properties of Chimeric Antibody Molecules. **Chimeric Antibody Molecules**, v. 178, p. 459–476, 1989.

SILVA, F. S. et al. Evaluation of recombinant human interferon beta 1b by liquid chromatography methods and bioassay. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 1–9, 2019.

SINGH, A. D. Ramucirumab (Cyramza). A Breakthrough Treatment for Gastric Cancer. **Drug Forecast**, v. 40, n. 7, p. 430–468, 2015.

SINGH, S. et al. Monoclonal Antibodies: A Review. **Current Clinical Pharmacology**, v. 13, p. 85–99, 2018.

SLEVIN, S. M.; EGAN, L. J. New Insights into the Mechanisms of Action of Anti-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2909–2920, 2015.

SOTOMATSU, S. et al. High-temperature reversed-phase Ic separation of heavy and light chain fragments of therapeutic monoclonal antibodies and antibody–drug

conjugate produced by chemical reduction. **Chromatography**, v. 40, p. 99–104, 2019.

SPAGNUOLO, A. et al. Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of advanced non-small cell lung cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 21, p. 4, p. 491–506, 2020.

SPRATLIN, J. L. et al. Phase I Pharmacologic and Biologic Study of Ramucirumab (IMC-1121B), a Fully Human Immunoglobulin G1 Monoclonal Antibody Targeting the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 5, p. 780–787, 2010.

SPRATLIN, J. Ramucirumab (IMC-1121B): Monoclonal Antibody Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2. **Current Oncology Reports**, v. 13, p. 97–102, 2011.

TADA, Y. et al. Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/activated regulatory T cells and CD8+ T cells in the tumor microenvironment. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 6, n. 106, p. 1–14, 2018.

TIAN, S. et al. YN968D1 is a novel and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor–2 tyrosine kinase with potent activity *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Science**, v.102, n. 7, p. 1374–1380, 2011.

TORRENTE-LÓPEZ, A. The Relevance of Monoclonal Antibodies in the Treatment of COVID-19. **Vaccines**, v. 9, n. 557, p. 1–17, 2021.

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

VÁZQUEZ-REY, M.; LANG, D. A. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 1494–1508, 2011.

VENNEPUREDDY, A. et al. Evolution of ramucirumab in the treatment of cancer – A review of literature. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 23, n. 7, p. 525–539, 2017.

VOGE, N. V.; ALVAREZ, E. Monoclonal Antibodies in Multiple Sclerosis: Present and Future. **Biomedicines**, v. 7, n. 2, p. 1–13, 2019.

WADHWA, R. et al. Ramucirumab: a novel antiangiogenic agent. **Future Oncology**, v.9, n. 6, p. 789–795, 2013.

WANG, X. et al. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics. **mAbs**, v. 1, n. 3. p. 254–267, 2009.

WANG, S. et al. Characterization of product–related low molecular weight impurities in therapeutic monoclonal antibodies using hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 468–475, 2018.

WEINER, L. M. Fully Human Therapeutic Monoclonal Antibodies. **Journal of Immunotherapy**, v. 29, n. 1, p. 1–9, 2006.

WEINER, L. M. et al. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. **The Lancet**, v. 373, p. 1033–1040, 2009.

WEINER, L. M. et al. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer Immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 317–327, 2010.

WU, Y. et al. The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR–1) supports growth and survival of human breast carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 119, p. 1519–1529, 2006.

XIE, J. et al. The antitumor effect of tanshinone IIA on anti–proliferation and decreasing VEGF/VEGFR–2 expression on the human non–small cell lung cancer A549 cell line. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 6, p. 554–563, 2015.

YANG, J. et al. Potent anti–angiogenesis and anti–tumor activity of a novel human anti–VEGF antibody, MIL60. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 11, p. 285–293, 2014.

ZAHAVI, D.; WEINER, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. **Antibodies**, v. 9, n. 34, p. 1–20, 2020.

ZENONI, D. et al. Aortic dissection after ramucirumab infusion. **European Journal of Hospital Pharmacy**, v. 27, p. 117–120, 2020.

ZHAO, S. S.; CHEN, D. D. Y. Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics. **Electrophoresis**, v. 35, p. 96–108, 2014.

ZHU, Z. et al. Inhibition of human leukemia in an animal model with human antibodies directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. Correlation between antibody affinity and biological activity. **Leukemia**, v. 17, p. 604–611, 2003.

ZURAWSKI, D. V.; MCLENDON, M. K. Monoclonal Antibodies as an Antibacterial Approach Against Bacterial Pathogens. **Antibiotics**, v. 9, n. 155, p. 1–12, 2020.

ZWICK, E. et al. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 1p. 17–23, 2002.