

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

Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

**PESQUISA DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA
QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CERTOLIZUMABE
PEGOL**

Santa Maria, RS
2022

Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

**PESQUISA DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DO CERTOLIZUMABE PEGOL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor 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

Cardoso Júnior, Clóvis Dervil Appratto
PESQUISA DE MÉTODOS CROMATOGRAFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO DO CERTOLIZUMABE PEGOL / Clóvis Dervil
Appratto Cardoso Júnior.- 2022.
91 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. Certolizumabe pegol 2. Cromatografia líquida por
exclusão molecular 3. Cromatografia líquida em fase
reversa 4. Validação 5. Bioensaio I. Dalmora, Sérgio Luis
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSC. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRN 10/1728.

Declaro, CLÓVIS DERVIL APPRATTO CARDOSO JÚNIOR, 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.

Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

**PESQUISA DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DO CERTOLIZUMABE PEGOL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 24 de maio de 2022.

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

Carine Viana Silva, Dr^a. (UFSM)

Marcelo Donadel Malesuik, Dr. (UNIPAMPA)

Maximiliano da Silva Sangoi, Dr. (UFRJ)

Fábio Santos de Souza, Dr. (UFPB)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos meus pais Naise Pereira Cardoso e Clóvis Dervil Appratto Cardoso, pelo amor, educação, incentivo e apoio ao longo de toda a minha vida;

A minha namorada e companheira de vida Thaís Stochero Teixeira, pelo amor, carinho, apoio incondicional e compreensão durante esta trajetória.

A minha irmã Amanda Pereira Cardoso pela amizade e companheirismo;

A toda a minha família, em especial, as tias Rosemary Pereira, Gleci Pereira e Glaci Tarragó, por sempre atuarem de forma presente em minha vida;

A todos os meus colegas e amigos dos Laboratórios do CTEFAR e CEBIFAR, pelo enorme aprendizado, apoio e carinho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial;

Agradeço a UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão desta etapa.

RESUMO

PESQUISA DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CERTOLIZUMABE PEGOL

AUTOR: Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

O certolizumabe pegol (CZP) é um fragmento de um anticorpo monoclonal (mAb) humanizado recombinante produzido em *E. coli*, conjugado com polietilenoglicol (PEG) que atua inibindo a atividade do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). O CZP apresenta indicação terapêutica no tratamento de enfermidades inflamatórias crônicas como, a artrite reumatoide e a doença de Crohn. Métodos por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) e por fase reversa (CL-FR) foram desenvolvidos e validados para quantificação de CZP em produtos biotecnológicos. O método por CL-EM foi desenvolvido em coluna cromatográfica BioSep-SEC-S3000 (300 x 4,6 mm, 5 μ m, 290 Å) mantida à 35°C. A fase móvel A consistiu de 100mM de fosfato de sódio monobásico e 200mM de cloreto de sódio pH 7,0 e a fase móvel B consistiu de Etanol (95:5, v/v), com fluxo de 0,5mL/min e detecção por DAD a 214 nm. No método CL-FR determinou-se a condição analítica com coluna Zorbax 300SB C18 (4.6 x 150 mm, 3,5 μ m), mantida a 80°C, com fase móvel A constituída de 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) em água e fase móvel B elaborada por propanol:acetonitrila:água:TFA (70:20:9,9:0,1, v/v). A eluição ocorreu em gradiente de concentração da fase móvel em fluxo de 1 ml/min e detecção por detector de arranjo de díodos (DAD) em 214nm. O CZP foi eluído nos tempos de retenção de 5,6 e 9,0 min, sendo linear na faixa de concentração de 1 – 40 mg / mL ($r^2 = 0,9993$) e 1 – 40 mg / mL ($r^2 = 0,9997$), respectivamente, para CL-EM e CL-FR. A especificidade dos métodos foi investigada por estudos de degradação forçada, interferência dos excipientes da formulação e análise da pureza dos picos. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,14 e 0,41 mg / mL para o método por CL-EM e 0,06 e 0,17 mg / mL para CL-FR. As médias da exatidão foram de 100,50 e 99,80 com bias de 0,85 e 0,82 %, respectivamente, para os métodos por CL-EM e CL-FR. A validação dos métodos seguiu as diretrizes estabelecidas nos guias oficiais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da Conferência Internacional de Harmonização (ICH). Além disso, estudou-se bioensaio por cultura celular utilizando a linhagem MONO-MAC-6 estimulada por lipopolissacarídeo (LPS), para avaliação da atividade biológica do CZP e inibição da liberação de TNF- α , que se mostrou significativa. Realizaram-se estudos de correlação entre os métodos validados, visando contribuir para aprimorar o controle de qualidade do produto biotecnológico, no intuito de garantir a segurança e eficácia terapêutica.

Palavras-chave: Certolizumabe pegol. Cromatografia líquida por exclusão molecular. Cromatografia líquida em fase reversa. Validação. Bioensaio.

ABSTRACT

RESEARCH OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR QUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CERTOLIZUMAB PEGOL

AUTHOR: Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

ADVISER: Sérgio Luiz Dalmora

Certolizumab pegol (CZP) is a fragment of a recombinant humanized monoclonal antibody (mAb) produced in *E. coli*, conjugated with polyethylene glycol (PEG) that acts by inhibiting the activity of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α). CZP has a therapeutic indication for the treatment of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease. Size exclusion chromatography (SEC) and Reversed phase liquid chromatography (RP-LC) methods were developed and validated for quantification of CZP in biotechnological products. The CL-EM method was developed on a BioSep-SEC-S3000 chromatographic column (300 x 4.6 mm, 5 μ m, 290 Å) maintained at 35°C. Mobile phase A consisted of 100mM monobasic sodium phosphate and 200mM sodium chloride pH 7.0 and mobile phase B consisted of Ethanol (95:5, v/v), with a flow of 0.5mL/min and detection by DAD at 214 nm. In the CL-FR method, the analytical condition was determined with a Zorbax 300SB C18 column (4.6 x 150 mm, 3.5 μ m), maintained at 80°C, with mobile phase A consisting of 0.1% (v/v) of trifluoroacetic acid (TFA) in water and mobile phase B prepared by propanol:acetonitrile:water:TFA (70:20:9,9:0.1, v/v). Elution took place in a mobile phase concentration gradient at a flow of 1 ml/min and detection by a diode array detector (DAD) at 214nm. CZP was eluted at retention times of 5.6 and 9.0 min, being linear in the concentration range of 1 - 40 mg / mL ($r^2 = 0.9993$) and 1 - 40 mg / mL ($r^2 = 0.9997$), respectively, for SEC and for RP-LC. The specificity of the methods was investigated by forced degradation studies, interference of formulation excipients and analysis of peak purity. The limits of detection and quantification were 0.14 and 0.41 mg / mL for the SEC method and 0.06 and 0.17 mg / mL for RP-LC. The accuracy means were 100.50 and 99.80 with a bias of 0.85 and 0.82%, respectively, for the SEC and RP-LC methods. The validation of the methods followed the guidelines established in the official guides of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) and the International Conference on Harmonization (ICH). In addition, a cell culture bioassay using the MONO-MAC-6 stimulated by lipopolysaccharide (LPS) was studied to evaluate the biological activity of CZP and inhibition of TNF- α release, which proved to be significant. Correlation studies were carried out between the validated methods, aiming to contribute to improve the quality control of the biotechnological product, in order to ensure safety and therapeutic efficacy.

Keywords: Certolizumab pegol. Size-exclusion liquid chromatography. Reversed-phase liquid chromatography. Validation. Bioassay.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Representação da estrutura do CZP e dos anticorpos monoclonais..... 19

Figura 2 - Representações das estruturas de terapias anti-TNF- α com destaque para o certolizumabe pegol 20

ARTIGO 1

Figure 1 - SEC chromatograms of degradation studies 50

Figure 2 - Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing MVAT 51

ARTIGO 2

Figure 1 - RP-LC chromatograms of degradation studies 72

Figure 2 - Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing MVAT 73

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Accuracy of SEC method for CZP	46
Table 2 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing using the one-variable-at-a-time (OVAT)	47
Table 3 - Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi-variable-at-a-time (MVAT)	48
Table 4 - Quantitation of CZP and determination of HMW forms in biopharmaceutical formulations by SEC method	49

ARTIGO 2

Table 1 - Accuracy of RP-LC method for CZP	68
Table 2 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing using the one-variable-at-a-time (OVAT)	69
Table 3 - Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi-variable-at-a-time (MVAT)	70
Table 4 - Quantitation of CZP, determination of its fragments in biopharmaceutical formulations by RP-LC method and its correlation with SEC	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Artrite reumatoide
axSpA	Espondiloartrite axial
BCA	Ácido bicinconínico
BS–CZP	Substância Biológica de Referência
CCDA	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-TI	Cromatografia de troca iônica
COVID-19	Infeção por SARS-CoV-2
CZE	Eletroforese capilar de zona
CZP	Certolizumabe pegol
DAD	Detector de arranjo de diodos
DC	Doença de Crohn
DPR	Desvio padrão relativo
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Eletroforese capilar
EC-MS	Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
EP	Farmacopeia Europeia
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
FDA	Food and Drug Administration
HC	Cadeia pesada
HIC	Cromatografia por interação hidrofóbica
ICH	Conferência Internacional de Harmonização

IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina-6
kDa	Kilodalton
LC	Cadeia leve
LPS	Lipopolissacarídeo
mAb	Anticorpo monoclonal
MDT	Manual de dissertações e teses
MEKC	Eletroforese capilar micelar
PDP	Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PsA	Artrite psoriática
r ²	Coeficiente de determinação
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TFA	Ácido trifluoracético
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 GERAL	16
2.2 ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	18
3.2 CERTOLIZUMABE PEGOL.....	19
3.3 MECANISMO DE AÇÃO DO CZP.....	21
3.4 TNF- α E AS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS	22
3.5 FORMULAÇÕES E INDICAÇÕES DE USO DO CZP	23
3.6 TECNOLOGIAS ANALÍTICAS PARA mAb's E PROTEÍNAS PEGUILADAS	25
4 ARTIGO 1	32
5 ARTIGO 2	53
6 DISCUSSÃO	75
6.1 ARTIGO 1.....	76
6.2 ARTIGO 2.....	78
7 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	85

APRESENTAÇÃO

A presente tese de Doutorado encontra-se de acordo com os padrões e normas estabelecidas pelo manual de dissertações e teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) do ano de 2021. A pesquisa compreende o desenvolvimento e validação de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação do anticorpo monoclonal Certolizumabe pegol, bem como o estudo do bioensaio por cultura de células para avaliação da atividade biológica. Os resultados obtidos deram origem a dois artigos científicos que serão submetidos a publicação. As seções MATERIAIS E MÉTODOS e RESULTADOS encontram-se nos ARTIGOS CIENTÍFICOS, que apresentam a íntegra da pesquisa realizada. As REFERÊNCIAS 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

Os produtos biológicos, assim como os demais medicamentos, são utilizados para prevenção e tratamento de diversas doenças humanas. Em contraste com as substâncias obtidas por síntese química, que possuem estrutura simples, bem definida e de baixo peso molecular, os produtos biológicos são produzidos por processos biotecnológicos que originam moléculas com estrutura complexa e de alto peso molecular (FDA, 2015).

Por definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os medicamentos biológicos podem ser classificados em seis grupos: (I) vacinas; (II) soros hiperimunes; (III) hemoderivados; (IV) biomedicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal ou a partir de procedimentos biotecnológicos; (V) medicamentos contendo microrganismos vivos, atenuados ou mortos; e (VI) anticorpos monoclonais (mAb's) (BRASIL, 2010).

Os anticorpos monoclonais e suas aplicações terapêuticas têm aumentado significativamente, com expectativas cada vez maiores para o futuro, pois trazem benefícios aos pacientes, como alta eficácia, especificidade, ampla faixa terapêutica e menor incidência de efeitos colaterais. São definidos como imunoglobulinas derivadas de um mesmo clone de linfócito B. Em geral, são moléculas complexas de imunoglobulina G (IgG) com aproximadamente 150 kDa, que possuem formas semelhantes à Y. E estruturalmente são constituídos por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas de 50 kDa e duas cadeias leves de 25 kDa (BRASIL, 2010; FEKETE et al., 2017).

O anticorpo monoclonal Certolizumabe Pegol (CZP) é um inibidor do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α). É um fragmento Fab' de um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, obtido através de fermentação com *Escherichia coli*, purificado e, então, conjugado com polietilenoglicol (PEG) (UCB Inc., 2014).

O CZP no Brasil (CIMZIA[®]) é comercialmente disponibilizado sob a forma de solução injetável para ser administrada por via subcutânea, produzido pelo laboratório UCB Biopharma e distribuído pela empresa AstraZeneca. Clinicamente é indicado para a redução de sinais e sintomas de patologias inflamatórias crônicas e seu uso pode ocorrer em monoterapia ou em conjunto com outros fármacos antireumáticos como o metotrexato (CONITEC, 2012; UCB Inc., 2011).

Com o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos surgiu a necessidade do estudo de tecnologias analíticas para sua caracterização e avaliação dos atributos de qualidade. Neste contexto, devido à complexidade molecular dos anticorpos monoclonais, é recomendada a combinação de métodos analíticos físico-químicos, imunológicos e biológicos. A cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM), tem sido adotada no estudo de mAb's, juntamente com a eletroforese capilar (EC) e bioensaios por cultura celular, pois demonstram perfis específicos conforme o mAb analisado (BRASIL, 2011; NAVAS et al., 2013; HERNANDEZ-JIMENEZ et al., 2016; HOSHIYAMA, et al., 2016; FEKETE et al., 2017).

O anticorpo monoclonal objeto deste estudo encontra-se disponível comercialmente para uso clínico, porém atualmente não há monografia farmacopeica específica para sua análise e na literatura encontram-se escassas referências relativas à sua caracterização. Portanto, justifica-se o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para caracterização, identificação, quantificação, avaliação de pureza e estabilidade desta biomolécula.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver métodos cromatográficos e teste biológico para quantificação e caracterização de CZP. Realizar estudos de correlação entre métodos e contribuir para aprimorar a qualidade do produto biotecnológico, garantindo a segurança e eficácia terapêutica.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) para identificação e quantificação do monômero e de seus agregados.
- b) Desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para identificação e quantificação da forma não alterada e dos fragmentos.
- c) Aplicar método por cultura celular com linhagem MONO-MAC-6 para avaliação de atividade biológica de CZP.
- d) Estudar a correlação entre métodos cromatográficos com análise estatística e interpretação dos resultados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS

O impacto dos anticorpos monoclonais na terapêutica médica nas últimas três décadas é notável. Durante esse período, os avanços científicos e tecnológicos possibilitaram a descoberta e o desenvolvimento dos mAb's. Além disso, o aprimoramento dos estudos da engenharia genética possibilitou produzir mAb's com domínios humanizados com vantagens para uso terapêutico, pois suprimem a reação imunológica do organismo e aprimoraram a farmacocinética e meia-vida de eliminação plasmática (PINTO, 2012; KAPLON & REICHERT, 2019).

A terapêutica baseada em anticorpos é agora amplamente utilizada para tratar uma variedade de doenças, como câncer, distúrbios imunológicos e doenças infecciosas, incluindo a infecção por SARS-CoV-2 (COVID-19). Alguns mAb's já foram desenvolvidos para se ligar à proteína *spike* do SARS-CoV-2 e bloquear o vírus de invadir células humanas, desse modo, estes biofármacos impedem o desenvolvimento de quadros graves de COVID-19 (WATIER & REICHERT 2017; ROBINSON et al., 2020; LLOYD et al., 2021).

As taxas de aprovação do registro de novos anticorpos monoclonais, assim como suas vendas, crescem progressivamente, de modo que em 2013 a receita global em vendas dos anticorpos monoclonais foi de aproximadamente 75 bilhões de dólares, representando metade das vendas de todos os produtos biotecnológicos. Já no ano de 2019, as vendas globais dos mAbs atingiram a marca de quase 163 bilhões de dólares, representando cerca de 70% das vendas de produtos biológicos (ECKER et al., 2015; ECKER et al., 2020).

Em nosso País, os produtos biológicos já representam um significativo impacto nos investimentos em saúde, pois dos gastos públicos realizados com medicamentos, os biológicos configuram cerca de 60% do valor total, no entanto, apenas 12% em quantidade de produtos. Esta discrepância ocorre pelo seu elevado custo, consequência do alto valor de produção, além de serem predominantemente importados (SALERNO et al., 2018).

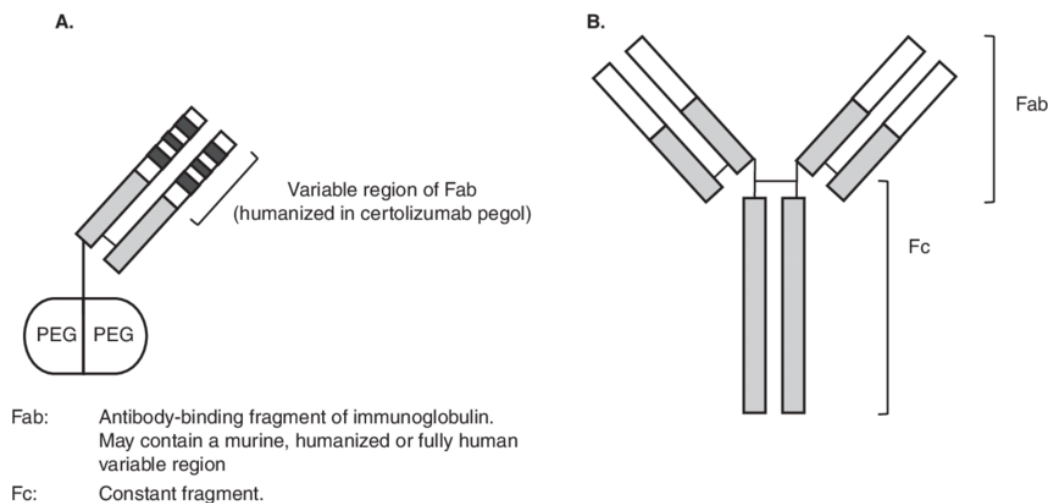
Com o objetivo de gerar menores despesas, o Ministério da Saúde através de sua Portaria nº 837, de 18 de abril de 2012, instituiu o estabelecimento das Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP). As PDP visam impulsionar a indústria nacional, estimulando a cooperação entre instituições públicas e privadas para o

desenvolvimento de tecnologias de ponta, visando a produção de medicamentos, considerados essenciais. Com isso, estão sendo desenvolvidos projetos biotecnológicos para a produção de biossimilares, entre eles o de desenvolvimento de um biossimilar do CZP, envolvendo como parceiro público a Biomanguinhos e parceiro privado a UCB Pharma (BRASIL, 2012; FIOCRUZ, 2018; SALERNO et al., 2018).

3.2 CERTOLIZUMABE PEGOL

O CZP é um fragmento Fab de um anticorpo monoclonal humanizado peguilado, com especificidade para o TNF- α humano (Figura 1). É expresso em *Escherichia coli* e composto por uma cadeia leve com 214 aminoácidos e uma cadeia pesada com 229 aminoácidos, apresentando fórmula química $C_{2115}H_{3252}N_{556}O_{673}S_{16}$. O fragmento Fab possui massa molecular de cerca de 47,8 kDa, mas quando conjugado com o PEG, totaliza uma massa molecular de aproximadamente 91 kDa (HORTON et al., 2012; UEDA, 2014).

Figura 1 – Representação da estrutura do CZP e dos anticorpos monoclonais.



A. Estrutura do CZP

B. Estrutura geral de anticorpo monoclonal

Fonte: (HORTON et al., 2012)

O CZP diferencia-se de outros inibidores do TNF- α devido à ausência da fração Fc, que minimiza a imunogenicidade e reduz efeitos de citotoxicidade

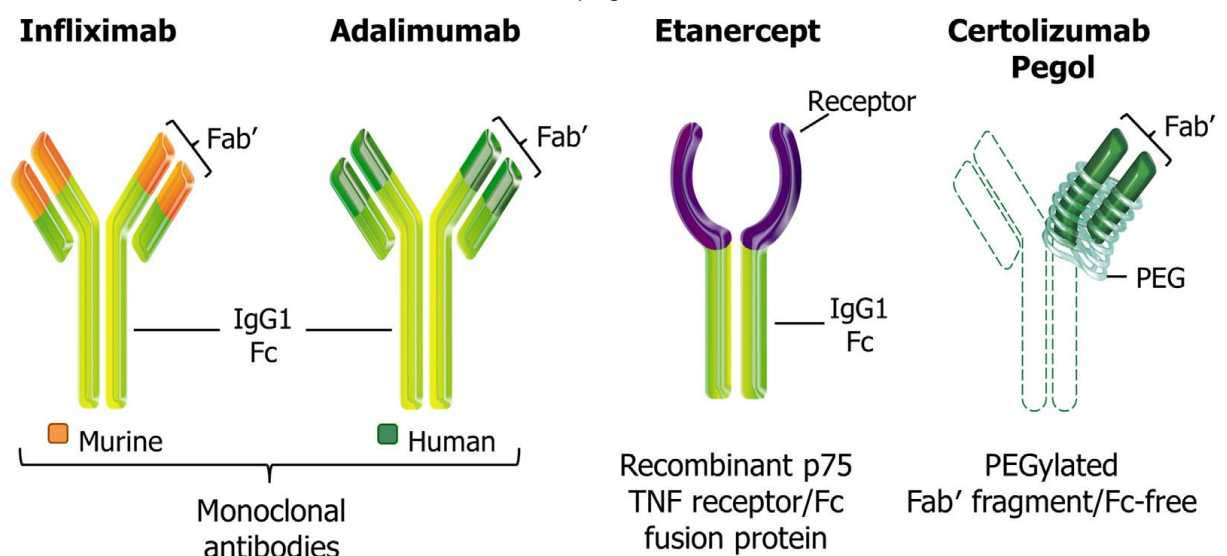
dependente de complemento (CDC) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA). Além disso, estudos indicam que a falta da região Fc contribui para a prevenção da passagem através da placenta durante a gravidez (MAHADEVAN et al., 2013; PORTER et al., 2016).

Por sua vez, a complexação com o PEG proporciona melhores características farmacocinéticas, como aumento no tempo de meia-vida, melhor solubilidade e estabilidade, além de menores efeitos imunogênicos e de toxicidade. A complexação com o PEG propicia uma meia-vida longa de aproximadamente 14 dias, permitindo assim que o CZP seja administrado a cada 2 ou 4 semanas por injeção subcutânea (HORTON et al., 2012; PASUT, 2014; DEEKS, 2016).

O CZP atinge sua concentração plasmática máxima no período entre 54 e 171 horas após a injeção subcutânea, apresenta biodisponibilidade perto de 80% e um volume de distribuição no estado de equilíbrio de 6 a 8 litros (CIMZIA, 2016; DEEKS, 2016).

Conforme a Figura 2, esta molécula tem uma estrutura única em comparação com as demais terapias anti-TNF- α aprovadas. Compreende um fragmento Fab' de um anticorpo monoclonal humanizado ligado à uma cadeia de PEG, que conseqüentemente não possui a região Fc (PORTER et al., 2016).

Figura 2 - Representações das estruturas de terapias anti-TNF- α com destaque para o certolizumabe pegol.



Fonte: (PORTER et al., 2016).

Os produtos biológicos estão se tornando cada vez mais indispensáveis na medicina moderna devido à sua alta potência combinada com alta especificidade. No entanto, a principal desvantagem desta classe terapêutica, é a sua baixa estabilidade na administração por via oral e durante a circulação subsequente. Como resultado, os fármacos biológicos têm uma biodisponibilidade muito baixa e meia-vida terapêutica curta, devido ao seu grande tamanho molecular e ao ambiente proteolítico do sistema digestivo. Felizmente, ferramentas de química e biotecnologia foram desenvolvidas para melhorar a farmacocinética dos biofármacos. Um exemplo é a conjugação com polímeros sintéticos ou biológicos, sendo o padrão ouro nessas aplicações o PEG (ZELIKIN et al., 2016; CLOWSE et al., 2017).

O produto inovador de CZP (Cimzia®) produzido pela UCB Biopharma teve seu registro aprovado nos Estados Unidos pelo Food and Drug Administration (FDA) em abril de 2008 e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em outubro de 2009. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) concedeu o registro em 2012. Seu faturamento de vendas chegou ao expressivo valor de U\$ 1.1 bilhão de dólares no ano de 2015. E devido ao seu alto faturamento e a proximidade das datas de expiração de sua patente, a empresa Pfenex já trabalha com o desenvolvimento de um biossimilar do CZP (CONITEC, 2012; GABI, 2017).

No ano de 2018, o CZP estava aprovado em 66 países em todo o mundo, atingindo um número estimado em mais de 420.000 pacientes por ano (CURTIS, et al., 2019). O produto biofarmacêutico Cimzia® apresenta-se na forma de solução injetável límpida, incolor a amarelada, com pH aproximadamente 4,7. Os excipientes que compõem a sua formulação são acetato de sódio, cloreto de sódio e água para injetáveis. O produto é fornecido na concentração de 200 mg/mL em seringa com volume de 1 mL, e o prazo de validade é de 24 meses (UCB Inc., 2011).

3.3 MECANISMO DE AÇÃO DO CZP

O TNF- α é uma citocina pluripotente que está presente na forma solúvel ou ligado à membrana e é responsável por uma ampla gama de efeitos biológicos. Fisiologicamente, o TNF- α apresenta dois receptores (TNFR-1 e TNFR-2) e sua atividade biológica depende da ligação a um ou ambos. Apesar de ter uma função fisiológica bastante relevante, em pacientes com doenças inflamatórias são encontrados níveis elevados de TNF- α e os dados clínicos sobre a eficácia dos

agentes anti-TNF- α sugerem que ele desempenha um papel fundamental na patogênese de várias doenças inflamatórias (NESBITT et al., 2007).

As citocinas inflamatórias, como as interleucinas e o TNF- α , são os principais reguladores das respostas imunes. Desse modo, a produção constante e excessiva destas citocinas acarreta no desenvolvimento de patologias, sugerindo que níveis altos podem contribuir diretamente para o dano tecidual. Portanto, neutralizar citocinas inflamatórias ou antagonizá-las é considerada uma estratégia terapêutica útil no tratamento dessas imunopatologias, ou seja, uma resposta inflamatória apropriada é fundamental para a defesa do hospedeiro, porém a produção excessiva ou persistente de citocinas inflamatórias resulta em imunopatologias, como doenças inflamatórias ou autoimunes (LAI & DONG, 2015).

Portanto, o mecanismo de ação do CZP fundamenta-se na supressão do sistema imune, inibindo a atividade do TNF- α , que é um potente indutor do efeito inflamatório. Ou seja, o CZP liga-se com alta afinidade ao TNF- α e inibe a sinalização da cascata pró-inflamatória (BLICK & CURRAN, 2007; MITTAL; RAYCHAUDHURI, 2010; ARAUJO, 2017).

3.4 TNF- α E AS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida em resposta a estímulos bacterianos, inflamatórios e outros, principalmente por células do sistema imunológico, como macrófagos e linfócitos T e B, mas também por outros tipos de células, incluindo células endoteliais, mastócitos e tecidos neuronais (APOSTOLAKI et al., 2010).

Apesar do efeito benéfico durante a infecção, é necessária uma regulação da sua produção para proteger o hospedeiro das atividades prejudiciais desta citocina, pois sua superexpressão pode originar doenças inflamatórias e autoimunes crônicas. Sendo assim, o TNF- α é determinante em uma série de doenças com um componente inflamatório significativo, incluindo doença de Crohn (DC), artrite reumatoide (AR), espondiloartrite axial (axSpA) e artrite psoriática (PsA) (APOSTOLAKI et al., 2010; PORTER et al., 2016). Desse modo, pode-se estabelecer que o TNF- α possui um papel importante na patogênese destas doenças. Portanto, o desenvolvimento de farmacoterapias que agem inibindo esta citocina configura um dos maiores avanços na imunologia nas últimas décadas (PLAYFAIR; CHAIN, 2013).

Neste sentido, terapias biológicas que envolvem o bloqueio da ação de proteínas específicas da inflamação, como TNF- α , estão sendo usadas para o tratamento de uma série de doenças inflamatórias. Medicamentos biológicos anti-TNF α , incluindo infliximabe, adalimumabe, etanercepte, golimumabe e certolizumabe pegol também são frequentemente empregados (PORTER et al., 2016; DIVYADHARSINI et al., 2017).

Pode-se destacar também as pesquisas envolvendo o uso de anti-TNF α para o controle dos sintomas graves em pacientes com COVID-19, pois sabe-se que um estado inflamatório exacerbado, com níveis elevados de TNF- α , é responsável por grande parte dos casos de morbidade e mortalidade na COVID-19. Paralelamente, dados observacionais demonstram uma taxa reduzida de morte em pacientes que fazem o uso de terapias anti-TNF α , se comparados com outras terapias imunossupressoras (ROBINSON et al., 2020).

3.5 FORMULAÇÕES E INDICAÇÕES DE USO DO CZP

De modo geral, as doenças inflamatórias autoimunes são crônicas e debilitantes. Portanto, o tratamento destas patologias visa, principalmente, a redução da inflamação e o alívio dos sintomas através do uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e imunossupressores, como os corticosteroides (DEEKS, 2016).

Na prática clínica o biofármaco objeto deste estudo é indicado para tratar diferentes doenças inflamatórias autoimunes, como a artrite reumatoide (AR), a doença de Crohn (DC), a artrite psoriásica (PsA) e a espondiloartrite axial (axSpA) (CIMZIA, 2016; DEEKS, 2016). Pode ser utilizado como monoterapia ou concomitante com fármacos anti-reumáticos modificadores da doença, como metotrexato (LAUNOIS et al, 2011).

A posologia para o tratamento das patologias acima citadas, deve ocorrer por meio de doses de indução e, após, por doses de manutenção. Recomenda-se como dose de indução a administração de 400mg de CZP, através de duas injeções subcutâneas de 200 mg, nas semanas 0, 2 e 4 do tratamento. Após o período de indução, recomenda-se as doses de manutenção de 200 mg a cada duas semanas ou 400 mg a cada quatro semanas (CIMZIA, 2016).

O uso do CZP no tratamento destas doenças é possível graças a capacidade que este fragmento de mAb tem de se ligar e neutralizar especificamente o TNF- α e,

assim, reduzir a gravidade e melhorar os sinais e sintomas da AR, DC, PsA e axSpA (CIMZIA, 2016; DEEKS, 2016).

Ressalta-se que o CZP apresenta vantagens quando comparado a outras drogas anti-TNF- α como o adalimumabe e o infliximabe. Devido a sua peguilação, o CZP proporciona maior tempo de meia-vida e melhor perfil farmacocinético, proporcionando administração subcutânea a cada quatro semanas, imunogenicidade reduzida e estabilidade da dose na fase de manutenção do tratamento (CONITEC, 2012).

A psoríase é uma doença inflamatória crônica que afeta 1% a 4% da população mundial, atingindo principalmente a pele e as articulações. Estudos demonstram que o CZP é uma opção terapêutica eficaz e segura para pacientes com psoríase crônica. Recomendado, principalmente, para pacientes com psoríase moderada a grave e para os quais os agentes sistêmicos convencionais não produzem uma resposta adequada, são contraindicados ou não tolerados (ESPOSITO, et al., 2020; TURKMEN & DOGAN, 2021). Além disso, a estrutura química diferenciada, juntamente com sua eficácia e segurança bem estabelecidas, favorecem o emprego deste biofármaco como medicamento de escolha em subgrupos específicos de pacientes com doença psoriásica, em particular pacientes com comorbidades e pacientes grávidas ou lactantes (CURTIS, et al., 2019; ESPOSITO, et al., 2020; MOJESKI & KALB, 2021).

É importante ressaltar que a COVID-19 pode induzir o surgimento de doenças autoimunes. Encontram-se na literatura relatos de caso sobre o uso bem-sucedido do CZP para artrite psoriática refratária desencadeada pós COVID-19, onde o paciente não respondeu à terapia com glicocorticoides e metotrexato, porém a administração de CZP levou à remissão do caso (OHMURA et al., 2022).

A axSpA é uma doença inflamatória crônica que afeta predominantemente as articulações sacroilíacas e a coluna vertebral. Um estudo clínico randomizado controlado por placebo avaliou os efeitos do CZP em pacientes com axSpA não radiográfica. Este estudo indicou que o uso do biofármaco proporcionou melhores resultados a remissão dos casos em comparação com o grupo controle, demonstrando a aplicação das terapias biológicas anti-TNF α no controle desta doença (DEODHAR et al., 2019).

Na artrite reumatoide, o sistema imunológico do indivíduo torna-se hiperativo e ataca o revestimento das articulações, tornando-as inchadas, rígidas e doloridas.

Desse modo, a implementação dos agentes anti-TNF α , como o CZP, são úteis ao tratamento da doença, por reduzir o risco de lesões articulares, reduzir a dor e a fadiga, além de melhorar a função física e a qualidade de vida dos pacientes (MEASE, 2011; GARCIA et al. 2017).

A DC é uma doença inflamatória crônica que pode envolver qualquer parte do trato gastrointestinal da boca ao ânus e apresenta sintomas característicos como diarreia crônica ou noturna, dor abdominal, perda de peso, febre e sangramento retal. Sugere-se que a DC é o resultado de uma resposta imune exagerada contra a microflora da mucosa pela ativação de células T e superexpressão de citocinas inflamatórias em pessoas predispostas geneticamente. Portanto, a terapia biológica baseada em citocinas pode ser uma opção importante de tratamento (SHAO et al., 2009).

Estudos que avaliam o uso de CZP na prática clínica para o tratamento da DC, sugerem que este mAb oferece remissão rápida e sustentada da doença em casos de moderado a grave. O CZP melhora a qualidade de vida dos pacientes e pode retardar a progressão da doença. Além disso, os benefícios desta terapia incluem um regime de dosagem estável, que permite a rápida indução de uma resposta clínica, seguida pela manutenção de longo prazo da resposta e remissão com uma dose fixa (SHAO et al., 2009; SCHREIBER, 2011; DA et al., 2013; MOON et al., 2015).

Por esses motivos o certolizumabe pegol, atualmente, faz parte do Componente Especializado da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) para o tratamento destas patologias (BRASIL, 2022).

Como se pode observar a relação risco-benefício dos medicamentos anti-TNF α é favorável e, no momento, o custo parece ser a principal barreira para o uso mais difundido e extenso desses agentes biológicos. Sendo assim, o desenvolvimento e o uso de biossimilares podem ter o potencial de reduzir esses custos para os pacientes e difundir ainda mais o uso destas terapias (MOJESKI & KALB, 2021).

3.6 TECNOLOGIAS ANALÍTICAS PARA mAb's E PROTEÍNAS PEGUILADAS

Os anticorpos monoclonais têm desempenhado importante papel na terapêutica, prevendo-se que desempenharão papel ainda mais importante no futuro. Porém, a caracterização dos mAb's apresenta muitos desafios em

comparação com a caracterização dos fármacos tradicionais, devido à sua complexidade de natureza proteica. Por isso, diversas técnicas analíticas de diferentes fundamentos são requisitadas para a completa caracterização dos mAbs (NAVAS et al., 2013).

A atividade biológica dos mAbs tem sido avaliada por ensaios biológicos *in vitro* e/ou *in vivo*, baseados no mecanismo de ação de cada produto. A resposta biológica *in vitro* é frequentemente quantificada por métodos imunoenzimáticos (ELISA), baseados na ligação antígeno-anticorpo ou respostas espectrofotométricas (EMA, 2009; EP, 2017). Desse modo, já se encontra disponível o método de ELISA para a quantificação do CZP livre em matriz biológica (IMMUNOGUIDE, 2017).

Embora, o ELISA seja a técnica mais amplamente utilizada para a quantificação dos mAbs, recomenda-se a utilização de técnicas físico-químicas, pois análises por imunoensaio demonstram baixos níveis de precisão e robustez. Portanto, devem ser planejados e desenvolvidos métodos rigorosos e validados para a determinação de todas as características dos mAbs (NAVAS et al., 2013).

Em um estudo que avaliou a transferência placentária de inibidores do TNF- α durante a gestação, observou-se que há baixa transferência de CZP em comparação aos demais inibidores, e que isso ocorre provavelmente pela falta da região Fc. Porém, neste estudo utilizou-se teste por ELISA desenvolvido e validado para determinação farmacocinética em adultos tratados com CZP e, portanto, projetados para detectar níveis mais altos do biofármaco em pacientes, diferentemente dos baixos níveis de CZP esperados na transferência placentária em cordões umbilicais e sangue infantil. Deste modo, os autores destacam a necessidade de métodos com maior sensibilidade e especificidade para avaliação do CZP em matrizes biológicas (MAHADEVAN et al., 2013).

Com base nisso, Smeraglia e colaboradores (2017) buscaram desenvolver e validar um método mais sensível e específico, por eletroquimioluminescência, para avaliar a transferência placentária de CZP. Este bioensaio analítico demonstrou um aumento de mais de dez vezes na sensibilidade em comparação com ensaios anteriores e melhor seletividade para CZP intacto em plasma humano.

Devido à crescente importância dos mAb's, as pesquisas avançaram no sentido do desenvolvimento de metodologias analíticas para a completa caracterização destes produtos. Desse modo, já se encontram alguns métodos cromatográficos usados para a quantificação de diferentes mAbs (MARTÍNEZ-

ORTEGA et al. 2016; HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2018; PEROBELLI et al., 2018, DUMONCEL et al., 2022).

A combinação de técnicas de separação tais como cromatografia líquida de fase reversa (CL-FR), cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM), cromatografia por interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de troca iônica (CL-TI) e eletroforese capilar (EC), tem sido utilizada para moléculas intactas, bem como, para monitorar o processo de produção, identificar variantes e impurezas do produto (SANDRA et al., 2014; ZHAO; CHEN, 2014).

A CL-FR destaca-se como uma importante técnica analítica para o estudo dos mAb's, considerada geralmente mais eficiente que a CL-TI. O uso de fases estacionárias com poros maiores (300 Å) e longas cadeias alquílicas (C8 e C18) juntamente com uma alta temperatura da coluna (60 - 75°C) e uma combinação de sistemas solventes não tradicionais, com agentes de emparelhamento iônico está gradualmente sendo consolidado como o procedimento estabelecido para a análise cromatográfica CL-FR de mAbs intactos (MARTÍNEZ-ORTEGA et al. 2016).

Os mAb's são proteínas, o que significa que podem facilmente formar agregados durante sua produção e armazenamento. A agregação dos mAb's pode influenciar a qualidade e estabilidade do produto, induzir potenciais respostas imunes e efeitos adversos aos pacientes. A CL-EM é o método padrão para controle de agregação em qualquer estágio da produção de biofarmacêuticos, devido a sua alta precisão, robustez e simplicidade. Além disso, CL-EM com detecção DAD pode também fornecer informações sobre modificações na estrutura por alterações no espectro UV do mAb (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, et al., 2016; HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2018).

Os métodos por CL-FR e CL-EM foram adotados para quantificação de diferentes anticorpos monoclonais, analisando biomoléculas, suas formas fragmentadas e agregadas, respectivamente. Os resultados publicados demonstram níveis variáveis e específicos dessas formas alteradas para cada mAb, inclusive detectadas nos estudos de degradação forçada, pois podem induzir efeitos imunológicos e de toxicidade. Os autores destacam a importância da análise dos produtos biofarmacêuticos avaliando as condições de uso clínico (NAVAS et al., 2013; FEKETE et al., 2017; SOUSA et al., 2017; PEROBELLI et al., 2018).

As particularidades do desenvolvimento de métodos cromatográficos para mAb's como Bevacizumab, Cetuximab, Infliximab, Rituximab e Trastuzumab são

descritas pela literatura, destacando resultados característicos para cada anticorpo. Até o momento, o CZP não tem sido incluído nesses estudos e são restritas as suas referências na literatura (PAUL et al., 2012; NAVAS et al., 2013; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2016; HERNANDEZ-JIMENEZ et al., 2018).

A caracterização dos mAb's Infliximab, Bevacizumab, Rituximab, Adalimumab e Trastuzumab tem sido realizada pela combinação de técnicas de separação por CL-TI, CL-FR e CL-EM e EC, e aplicada para biomoléculas intactas. Igualmente o processo de produção tem sido monitorado, para identificar variantes e impurezas do produto, sendo essencial para assegurar a eficácia clínica (SANDRA et al., 2014; ZHAO; CHEN, 2014).

Perobelli e colaboradores (2018) desenvolveram e validaram métodos cromatográficos por CL-EM e CL-FR para quantificação do anticorpo monoclonal humano Denosumabe, usado clinicamente para o tratamento de osteoporose. Demonstraram os parâmetros de validação e a aplicação dos métodos para análise de produtos biofarmacêuticos, detectando as formas intactas e alteradas.

A Farmacopeia dos Estados Unidos da América (USP) descreve um método geral para avaliação, identificação e determinação dos mAbs por CL-EM. Recomenda coluna com dimensões de 7,8 mm × 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).

Do mesmo modo, é descrito na literatura o uso da CL-EM com detecção UV como técnica analítica para avaliação de formulações biofarmacêuticas peguiladas. Os autores usaram coluna TSK-GEL G3000SW_{xl} (7.8 mm × 300 mm, 5 µm, 250 Å) e tampão fosfato 100 mM pH 6,9. Assim como, a CL-FR também tem sido utilizada para avaliação de biomoléculas conjugadas com PEG para o monitoramento de produtos de degradação durante a sua formulação, utilizando fases móveis com gradientes de solventes orgânicos (SHAHBAZI et al., 2017; PIEDMONTE & TREUHEIT, 2008).

Técnicas por EC também são descritas para a separação de proteínas peguiladas, utilizando capilar de sílica fundida e tampão de corrida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) demonstrando alta capacidade de separação, podendo ser

aplicadas no desenvolvimento e controle de qualidade destas proteínas (NA et al, 2008).

A EC é uma ferramenta analítica particularmente útil para a rotina do controle de qualidade de proteínas terapêuticas, como os anticorpos monoclonais. Envolve simples instrumentação, baixo consumo de reagentes e amostras, alta eficiência e resolução, além de separações relativamente rápidas (ZHAO & CHEN, 2014; VOETEN et al., 2018).

Estudos de desenvolvimento de métodos por eletroforese capilar de zona (CZE), eletroforese capilar micelar (MEKC) e eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (EC-MS) são descritos na literatura para análise de mAb's e de suas isoformas (ZHANG et al., 2010; HAN et al., 2016; SUBA et al., 2016; GIORGETTI et al., 2018).

Os bioensaios têm sido adotados em combinação com as metodologias analíticas por cromatografia líquida e eletroforese capilar para avaliação de atividade biológica, identidade, pureza, teor/potência e estabilidade de produtos biotecnológicos (SOUTO et al., 2014; CARDOSO JR et al., 2017; MALDANER et al., 2017; PEROBELLI et al., 2018).

Silveira e colaboradores (1997) e Andrade e colaboradores (2003), isolaram monócitos de sangue humano que foram usados em ensaios por cultura de células paralelamente com a cultura da linhagem de células monocíticas MONO-MAC-6. Estimularam as células com lipopolissacarídeo (LPS) (International Standard for Endotoxin) e observaram respostas de liberação de citocinas pró-inflamatórias, especialmente a interleucina-6 (IL-6). Aplicaram os procedimentos para teste de pirogênios em produtos farmacêuticos injetáveis. Destaca-se que Yamamoto e colaboradores (2003) observaram respostas de liberação de IL-6 e TNF- α em procedimento baseado no uso de monócitos de sangue humano também estimulados por LPS.

Por sua vez, em 2016, Hoshiyama e colaboradores, realizaram estudos com bioensaio por cultura de células de monócitos humanos para avaliar os efeitos do CZP. Os monócitos isolados de sangue humano foram inicialmente estimulados com LPS e incubados com o produto biofarmacêutico avaliando respostas de liberação de IL-6 e TNF- α . Observaram que o tratamento com CZP reduziu significativamente a secreção de TNF- α .

É conveniente destacar 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 é adequado para a finalidade pretendida (SHABIR et al., 2007). Procedimentos para validação de métodos analíticos encontram-se disponíveis em guias oficiais, que descrevem os principais parâmetros a serem avaliados (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Nos últimos anos tem aumentado o número de produtos biossimilares de mAbs. Devido aos diferentes processos de fabricação adotados para produção dos biossimilares e dos produtos inovadores, necessita-se de tecnologias analíticas para a sua caracterização e avaliação da identidade, pureza, quantificação, potência e estabilidade. Paralelamente, para sua comparabilidade, são preconizados estudos pré-clínicos para demonstrar a atividade biológica, toxicidade, imunotoxicidade, toxicocinética, biodisponibilidade e farmacocinética relativamente ao medicamento referência. Além disso, destaca-se que a patente do produto biológico inovador do CZP (Cimzia®) foi expirada no ano de 2021 aos países constituintes da União Europeia e irá expirar em 2024 para os Estados Unidos da América, abrindo espaço para outras indústrias farmacêuticas produzirem seus medicamentos biossimilares (GOEL; CHANCE, 2017; BRASIL, 2011; ICH, 2011).

ARTIGO 1

4 ARTIGO 1

Development and validation of a size exclusion liquid chromatography method for the quantitation of monoclonal antibody Certolizumab pegol.

Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior^b, Bruna Xavier^b, Francielle Santos da Silva, Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel and Sérgio Luiz Dalmora^a.

^a*Department of Industrial Pharmacy and* ^b*Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil*

*To whom correspondence should be addressed. *e-mail:* sdalmora@terra.com.br

ABSTRACT

The Certolizumab pegol (CZP) is a Fab' fragment of the humanized antibody produced in *Escherichia coli* with anti-TNF α activity, indicated to treat diseases such as Crohn's disease and Rheumatoid arthritis. The structure is composed of a light chain with 214 amino acids and a heavy chain with 229 amino acids, with a molecular weight of approximately 91 kDa. A size exclusion liquid chromatography (SEC) method was developed and validated for the quantification of CZP in biopharmaceutical formulations. The SEC method was performed on a BioSep-SEC-S3000 column (300 x 4.6 mm i.d, 5 μ m particle size, pore size 290 Å) maintained at 35°C. The mobile phase A consisted of 100mM monobasic sodium phosphate and 200mM sodium chloride pH 7.0, and mobile phase B was ethanol (95:5, v/v), run at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹, with detection by a diode array detector (DAD) set at 214 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time at 5.6 min, and the calibration curve was linear over the 1 – 40 mg mL⁻¹ range ($r^2 = 0.9993$). The specificity was confirmed by degradation studies, interference of the excipients and peak purity. The accuracy was 100.50%, with bias lower than 0.85%. The SEC method was applied to quantitate CZP, giving results between 99.18% – 101.47%, and showing high molecular weight (HMW) forms between 0.77% – 0.83%. The validated SEC method can be employed to quantify CZP, contributing to improve the quality control and to ensure the efficacy and safety of the biotherapeutic product.

Keywords: *certolizumab pegol, monoclonal antibody, size exclusion liquid chromatography, validation.*

1 INTRODUCTION

Monoclonal antibodies (mAbs) have become very relevant in the pharmaceutical market, due to their high specificity, these biomolecules have advantages such as high efficacy, wide therapeutic range and few side effects (FEKETE et al., 2017; SHEPARD, et al., 2017).

CZP is a recombinant humanized antibody Fab' fragment conjugated with polyethylene glycol (PEG) with specificity for human Tumor necrosis factor alpha (TNF- α). It is expressed in *Escherichia coli* and consists of a Lc with 214 amino acids and a Hc with 229 amino acids, giving a molecular mass of about 47.8 kDa. The pegylated biomolecule has a total molecular mass of approximately 91 kDa, and increases the plasma half-life (HORTON et al., 2012; UEDA, 2014).

Clinically, this biopharmaceutical is indicated to treat different chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), Crohn's disease (CD), psoriatic arthritis (PsA) and axial spondyloarthritis (axSpA). It can be used as monotherapy or concomitant with disease-modifying anti-rheumatic drugs, such as methotrexate (LAUNOIS et al, 2011; CIMZIA, 2016).

The mechanism of action of CZP is based on the suppression of the immune system, inhibiting the activity of TNF- α , which is a potent inducer of the inflammatory effect. Thus, CZP binds selectively and with high affinity to TNF- α , neutralizing both soluble and membrane-bound TNF- α , and inhibits the signaling of the pro-inflammatory cascade, being considered an anti-TNF α agent (DEEKS, 2016; MITOMA et al., 2016).

Anti-TNF α biological agents, such as CZP, deserve more attention nowadays, because evidences indicate the enormous potential of anti-TNF α therapies as a treatment for COVID-19. But further investigations and clinical trials are still necessary (ROBINSON et al., 2020).

The characterization of mAbs presents many challenges compared to the traditional chemical drugs. Due to their protein nature complexity and significant inherent heterogeneity, these biological must be assessed and characterized using different analytical techniques (NAVAS et al., 2013; FEKETE et al., 2017).

Chromatographic methods have been successfully applied to monitor the content, purity, identity and chemical stability of mAbs, that can also easily form aggregates during their purification, formulation, packaging and storage processes. Protein aggregation is one of the most challenging problems in pharmaceutical

monoclonal antibody formulations, and is directly related to the quality of the final product, in which large aggregates can induce immunogenicity (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2018). Size exclusion liquid chromatography (SEC) is widely applied and accepted as the most appropriate analytical methodology to monitor protein aggregation, because this technique allows the characterization of proteins with minimal impact on conformational structure. Furthermore, SEC can be applied for quantification and for determination of native protein size and to reveal possible high molecular weight (HMW) forms (STAMM et al., 2013; SHAHBAZI et al., 2017; PEROBELLI et al., 2018).

Chromatographic methods for the quantification and characterization of mAbs such as: Bevacizumab, Cetuximab, Denosumab, Infliximab, Rituximab and Trastuzumab, were described in the literature showing the application of the methods (PAUL et al., 2012; NAVAS et al., 2013; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2016; HERNANDEZ-JIMENEZ et al., 2018; PEROBELLI et al., 2018). ELISA is also widely used technique for the quantification of mAbs, however, these immunoassays demonstrated low levels of precision and robustness, when compared to the physicochemical methods (NAVAS et al., 2013).

It is noteworthy that after the development of new analytical methods, the validation is necessary to ensure the reproducibility and reliability of the results, ensuring that the method is suitable for the intended purpose. Procedures for validation of analytical methods are available in official guides, which describe the main parameters to be evaluated (ICH, 2005; SHABIR et al., 2007).

The aim of this work was to develop and validate a size exclusion liquid chromatography method for the quantification of the monoclonal antibody Certolizumab pegol and the aggregated forms in biopharmaceutical formulations. Thus, contribute to improve quality control and thereby ensuring the bioactivity and safety of the biotechnology-derived medicine.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 CHEMICALS AND REAGENTS

Commercially available batches of biopharmaceutical formulations of Cimzia® AstraZeneca (Cotia – São Paulo, Brazil), containing 200 mg mL⁻¹ solution in a prefilled syringe, were acquired from commercial sources within their shelf-life period, stored at 2–8 °C, protected from light. Monobasic sodium phosphate and sodium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol (HPLC-grade) was acquired from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). 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).

2.2. APPARATUS

The analyses were carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a CBM–20A system controller, an LC–20 AD pump, a DGU–20As degasser, an SIL–20ACHT autosampler, a CTO–20A column oven and an SPD–M20A diode array detector (DAD). Peak areas were automatically integrated using the LC Solution Version 1.22 SP1 software. The pH of the solutions was measured using a Thermo Orion model 420 pH-meter (Beverly, MA, USA).

2.3. STANDARD AND SAMPLE SOLUTIONS

As an official reference substance was not available, three samples of commercial batch of Cimzia® were pooled, to quantitate a sample during the method development, and it was established as the representative CZP Biological reference substance (BS–CZP). Then, solutions were prepared daily by diluting the BS–CZP and samples of biopharmaceutical products (Cimzia®) in ultrapure water, to final concentrations of 20 mg mL⁻¹.

2.4 SEC METHOD

The SEC experiments were performed on a size-exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep SEC-s3000 column (300 x 4,6 mm i.d., with a pore size of 290 Å and particle size of 5 µm) maintained at 35°C. To protect the analytical

column, a security guard holder GFC-3000 Phenomenex (Torrance, USA) was used. The mobile phase A consisted of 100 mmol L⁻¹ monobasic sodium phosphate and 200 mmol L⁻¹ sodium chloride at pH 7.0, and mobile phase B was ethanol (95:05, v/v). The elution was performed in the isocratic mode at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ and using DAD detection at 214 nm. The injection volume was 1 µL of a solution containing 20 mg mL⁻¹ for both BS-CZP and samples.

2.5 VALIDATION OF METHOD

The validation of the SEC method was performed using samples of biopharmaceutical products with a label claiming of 200 mg mL⁻¹, and the parameters were assessed according to the guidelines. The following validation parameters were determined: specificity, linearity, precision, accuracy, detection limit (DL), quantitation limit (QL), robustness and system suitability test (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.5.1 System suitability test

The system suitability test was carried out using five replicate injections of 1 µL of BS-CZP solutions containing 20 mg mL⁻¹, followed by analysis of the recommended parameters: peak area, retention time, peak symmetry, number of theoretical plates and peaks capacity (k).

2.5.2 Specificity

The specificity parameter of the SEC method was analyzed by degradation studies and interference of the excipients. So, a BS-CZP solution (20 mg mL⁻¹) was submitted to conditions stress such as, exposure to high temperature, to an acidic medium, to a basic medium and to an oxidative medium. After samples were stressed, the aliquots were analyzed without further dilutions to avoid changes.

The thermal condition was adjusted submitting the analyte to a neutral hydrolysis at 50 °C, for 24 h. In addition, sample solutions were subjected to stress using acid (0.1 M HCl), alkaline (0.1 M NaOH), and oxidative media (10% H₂O₂). The stress agent was applied at a concentration of 10% (v/v). The samples were analyzed 24 h after the stress agent was added. The profiles of the stressed samples were compared with those of the non-degraded mAbs (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2018).

Moreover, 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 (sodium acetate, sodium chloride and water to adjust pH 4.7) it was made (EMA, 2014).

The specificity of the method was also established by determining the peaks purity (CZP and degraded forms), by overlaying the spectra captured at the apex, upslope, and downslope with a DAD detector, using the LC Solution Version 1.22 SPI software.

2.5.3 Linearity

The linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each with seven concentrations of the CZP solution (1, 5, 10, 15, 20, 30 and 40 mg ml⁻¹). Reference solutions were injected in triplicate 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.

2.5.4 Precision and accuracy

The accuracy was evaluated by analysis of the in-house mixture of excipients spiked with known amounts of CZP; to obtain solutions at concentrations of 16, 20, and 24 mg mL⁻¹, equivalent to 80, 100 and 120% of the working solution concentrations, according to Table 1. Accuracy was calculated as the percentage of drug recovered from the formulation. Precision was determined by repeatability (intraday) and intermediate precision (inter-days and between-analysts). Repeatability was examined by six evaluations of sample of CZP, on the same day, under the same experimental conditions. The inter-days precision was assessed via the analysis of two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days, and the between-analysts precision was assessed by submitting the samples to analysis by different analysts in the same laboratory.

2.5.5 Detection and quantitation limits

The detection limit (DL) and the quantitation limit (QL) were calculated as defined by the International Council for Harmonisation (ICH) based on the standard deviation of the response and the slope, estimated from the three independent analytical curves of the CZP, determined by a linear-regression model. The factors 3.3 and 10, for the DL and QL, respectively, were multiplied by the standard deviation of y-intercept and then divided by the slope (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.5.6 Robustness

The robustness of an analytical procedure provides an indication of its reliability for routine analysis. So, the method was determined by analyzing the same samples containing 20 mg mL⁻¹, under one-variable-at-a-time (OVAT) conditions as observed in Table 2. Furthermore, 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., 2⁴⁻¹ or eight experiments), fractional factorial design carried out with the selection of four factors: mobile phase pH, flow rate (mL min⁻¹), column temperature (°C) and wavelength (nm). The factors and their high and low levels were evaluated as presented in Table 3. The obtained responses were processed using the Minitab 18.1 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 CZP samples was tested after storage, and any changes in the chromatographic pattern were compared with the freshly prepared samples.

2.6 ANALYSIS OF CZP IN BIOPHARMACEUTICAL FORMULATIONS

To quantitate CZP in biopharmaceutical products by the chromatographic method, five batches of Cimzia[®], labeled from 1 to 5, commercially available for clinical use were diluted to the appropriate concentrations in ultrapure water. The analyses were performed in triplicate, and the percentage recoveries were calculated against BS-CZP.

3 RESULTS AND DISCUSSION

An important issue for biotechnology-derived medicines is the research of the chromatographic method, selected due to its capability and validated for the qualitative and quantitative analysis, following the international guidelines

3.1 DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

To develop the method, tests were carried out to determine which mobile phase, pH, flow rate, column and wavelength would lead to satisfactory selectivity and sensitivity. So, mobile phases containing potassium phosphate, sodium phosphate and phosphoric acid were tested. Furthermore, the use of sodium chloride as an additive has also been studied. The mobile phase consisting of monobasic sodium phosphate added with sodium chloride resulted in greater sensitivity and shorter retention time with adequate resolution. The influence of the mobile phase salts concentration was evaluated and better conditions were obtained in the concentrations of 100 mmol L⁻¹ monobasic sodium phosphate and 200 mmol L⁻¹ sodium chloride. 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, ethanol and isopropanol - were also evaluated in the concentration range of 5 to 15% v / v, with a better chromatographic profile being observed with the addition of ethanol at 5% v / v. 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-s3000 column was selected. The optimal wavelength was selected using a PDA detector, selecting 214 nm. Typical chromatogram demonstrating the resolution of the symmetrical peaks corresponding to CZP is shown in Figure 1a.

The choice of the mobile phase in this work corroborates what has already been reported in the literature (RATTO et al., 1997; GOYON et al, 2017; SHAHBAZI et al., 2017).

For the analysis of biopharmaceutical proteins, a mobile phase containing a large amount of salt is commonly used in SEC, in order to reduce possible electrostatic interactions. Furthermore, analysis of pegylated proteins by SEC results in rapid degradation of chromatographic columns, where peak tailing and loss of resolution is observed after approximately 20 injections. Salts such as sodium

chloride have been shown to be effective in reducing unwanted ionic interactions between the column packing surface and the protein. Other additives may also be needed to eliminate these interactions. It is known that polar organic compounds, such as ethanol, can reduce protein packaging interactions (RATTO et al., 1997; GOYON et al, 2017; SHAHBAZI et al., 2017). It is noteworthy that the use of these additives maintained column efficiency throughout the period of method development and validation.

3.2 VALIDATION OF LC METHODS

The suitability of the system was tested and the RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.09, 1.77 and 1.18 %, respectively. The number of theoretical plates was 33102.91, with an RSD of 1.47 %. These results were considered acceptable (RSD < 2 %).

The specificity of the method was evaluated. For the acid condition, 7.6 % decrease of the area was observed and one additional peak was detected at 4.9 min (Figure 1b). Under basic condition, 21.6 % decrease of the area was observed, with four additional peaks at 4.9, 6.2, 7.2 and 7.6 min (Figure 1c). Oxidative degradation, showed a reduction of 10.5 % of the main peak area, with one peak related to the H₂O₂ at 8.8 min and additional peaks at 4.9 and 7.6 min (Figure 1d). The thermal condition showed a decrease of 13.7% of the monomer peak area, with three additional peaks at 4.9, 7.2 and 7.6 min (Figure 1e). Moreover, the placebo injection showed only the baseline of the chromatogram, with no evident peaks (Figure 1f), demonstrating that there is no interference from the excipients. In addition, the 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 in the range between 0.9999-1, the data showed that the peaks were free of any co-eluting peak and that the excipients did not interfere in the analysis, which confirmed that the LC methods were specific for the analysis of CZP. All peaks eluting before the monomer were attributed to high molecular weight (HMW) proteins, and the peaks eluted after the monomer were named as low molecular weight (LMW) proteins of CZP.

The analytical curves were found to be linear over a concentration range of 1 – 40 mg mL⁻¹. The determination coefficient was calculated as $r^2 = 0.9993$, $y = 1237158,739x - 201746,749$, where x is concentration and y is the peak absolute

area. The DL and QL of the method were calculated as 0.14 and 0.41 mg mL⁻¹, respectively.

The precision parameter was evaluated by calculating the mean values and relative standard deviation (RSD %). For repeatability, the RSD value obtained was 1.13%. The inter-days precision was tested, showing RSD values of 0.51 and 0.31 %. The between-analysts precision was also determined; the RSD values were found to be 0.25 and 0.17 %.

The accuracy of the method was studied, and the absolute mean was 100.50 %, Table 1, which demonstrates that the accuracy was within the desired range.

The results and experimental range of the selected variables evaluated for robustness using an OVAT approach are demonstrated in Table 2, together with the optimized values, demonstrating that they were within the acceptable deviation (RSD ≤ 2 %), with non-significant differences ($p > 0.05$), as calculated by analysis of variance. In addition, the robustness of the method was assessed using the MVAT approach, and the significance of the effects was evaluated using Pareto charts and the parameters are described in Figure 2. 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.

3.3 APPLICATION OF THE METHOD

The validated method was applied to determine CZP in biopharmaceutical formulations, giving the results shown in Table 4, with values in the range of 99.18 - 101.47%, related to the content declared, and HMW between 0.77 - 1.83%. Furthermore, biopharmaceutical samples were artificially degraded, as described in the section 2.5.1, and were analyzed. The degraded samples allowed reduction of the main peak area by 7.6%, 21.6%, 10.5% and 13.7%, respectively. It was demonstrated that the different stress conditions caused degradations that affect the quality of the product. Thus, the method represents an improvement for the characterization of the biotherapeutic and for its emerging biosimilar.

4 CONCLUSIONS

The results of the validation studies show that the chromatographic method is specific, sensitive and accurate, and can be initially applied for the quantitation of biopharmaceutical formulations. Besides, the method validated can be used to assess the biomolecule during the biotechnology processes, and through subsequent purification steps, to monitor the stability, and to ensure the batch-to-batch consistency of the bulk and finished biotechnology-derived medicines. In the near future, could be applied to evaluate the biosimilars of CZP.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

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.

CIMZIA: Certolizumabe pegol. Cotia: AstraZeneca do Brasil Ltda., 2016. Bula de Remédio.

DEEKS, E. D. Certolizumab pegol: a review in inflammatory autoimmune diseases. **BioDrugs**, v. 30, n. 6, p. 607-617, 2016.

EMA. European Medicines Agency. **Cimzia, INN-Certolizumab pegol**. Product Information. 2014

FEKETE, S; VEUTHEY, J; GUILLARME, D. Achievable separation performance and analysis time in current liquid chromatographic practice for monoclonal antibody separations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 141, p. 59-69, 2017.

GOYON, A. et al. Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 µm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1498, p. 80-89, 2017.

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**, 2018.

HORTON, S.; WALSH, C.; EMERY, P. Certolizumab pegol for the treatment of rheumatoid arthritis. **Expert opinion on biological therapy**, v. 12, n. 2, p. 235-249, 2012.

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.

LAUNOIS, R. et al. Comparison of Certolizumab Pegol with Other Anticytokine Agents for Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Multiple-treatment Bayesian Metaanalysis. **The Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 5, p. 835 – 845, 2011.

LENTH, R. V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. **Technometrics**, v. 31, n. 4, p. 469 – 473, 1989.

MARTÍNEZ-ORTEGA, A. et al. 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, n. 2, p. 117-124, 2016.

MITOMA, H. et al. Molecular mechanisms of action of anti-TNF-α agents—Comparison among therapeutic TNF-α antagonists. *Cytokine*. 2016.

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, n. 29, p. 9351-9363, 2013.

PAUL, M. et al. Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 282-290, 2012.

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.

RATTO, J. J. et al. Ethanol-sodium chloride-phosphate mobile phase for size-exclusion chromatography of poly (ethylene glycol) modified proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 763, n. 1-2, p. 337-344, 1997.

ROBINSON, P. C. et al. Accumulating evidence suggests anti-TNF therapy needs to be given trial priority in COVID-19 treatment. **The Lancet Rheumatology**, v. 2, n. 11, p. e653-e655, 2020.

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.

SHAHBAZI, M. et al. Determination of pegfilgrastim aggregates by size-exclusion high-performance liquid chromatography on a methacrylate-based column. **Biologicals**, v. 46, p. 153-158, 2017.

SHEPARD, H.M.; PHILLIPS, G.L.; THANOS, C.D.; FELDMANN, M. Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. **Clinical Medicine**, v. 17, n. 3, p. 220–232, 2017.

STAMM, F. P. et al. Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays. **Analyst**, v. 138, p. 1419 – 1426, 2013.

UEDA, T. Next-generation optimized biotherapeutics—A review and preclinical study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 11, p. 2053-2057, 2014.

Table 1 - Accuracy of SEC method for CZP

Nominal concentration (mg mL⁻¹)	Mean concentration measured^a (mg mL⁻¹)	RSD^b (%)	Accuracy (%)	Bias^c (%)
16	16.14	0.50	100.85	0.85
20	20.05	0.30	100.27	0.27
24	24.09	0.07	100.39	0.39

^aMean of three replicates

^bRSD = Relative standard deviation

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

Table 2 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing using the one-variable-at-a-time (OVAT)

Variable	Range investigated	CZP ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
Monobasic sodium phosphate concentration	90 mmol L ⁻¹	99.11	0.21	
	100 mmol L ⁻¹	99.93	0.10	100 mmol L ⁻¹
	110 mmol L ⁻¹	99.37	0.45	
Flow rate (mL/min)	0.4 mL min ⁻¹	100.83	0.06	
	0.5 mL min ⁻¹	99.30	0.20	0.5 mL min ⁻¹
	0.6 mL min ⁻¹	100.49	0.48	
Mobile phase pH	6.8	100.16	0.26	
	7.0	99.93	0.10	7.0
	7.2	99.85	0.14	
Ethanol (%)	4	99.69	0.55	
	5	98.12	0.16	5
	6	98.30	0.13	
Temperature (°C)	33	100.10	0.32	
	35	99.59	0.14	35
	37	99.10	0.08	
Solution stability	Autosampler 24 h	101.45	0.28	-
	2 – 8 °C 24 h	101.01	1.27	-
	2 – 8 °C 48 h	99.18	0.55	-
Wavelength (nm)	190 – 320	-	-	214

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

Table 3 - Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi-variable-at-a-time (MVAT)

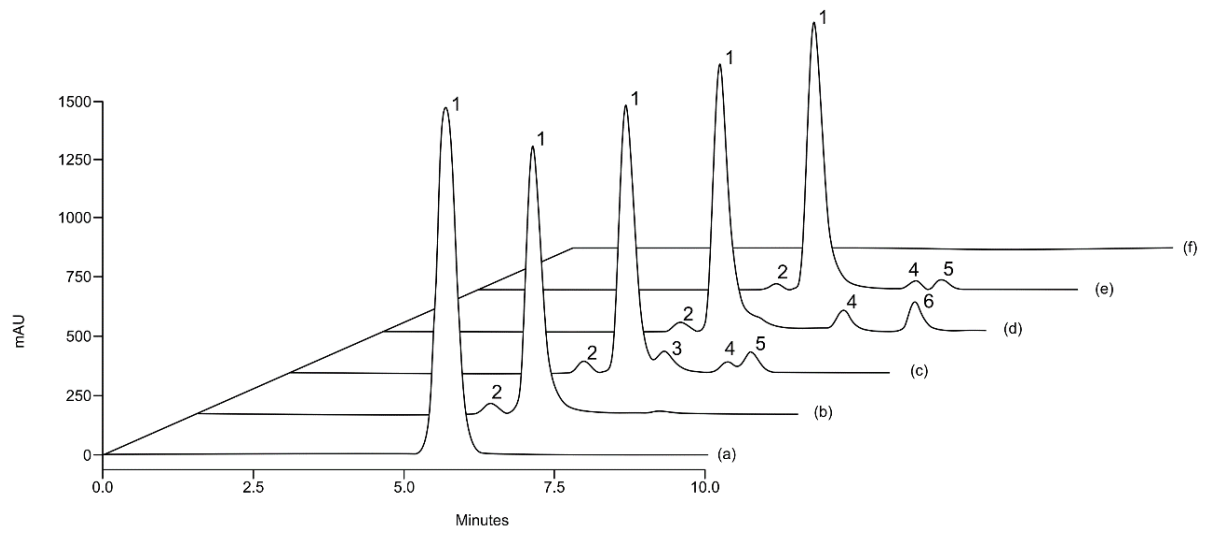
Factor	Optimal	Low level	High level
Mobile phase pH	7.0	6.8	7.2
Flow rate (mL min⁻¹)	0.5	0.4	0.6
Column temperature (°C)	35	33	37
Wavelength (nm)	214	212	216

Table 4 - Quantitation of CZP and determination of HMW forms in biopharmaceutical formulations by SEC method

Sample	Label claim (mg mL⁻¹)	HMW^a (%)	Content^a (%)
1	200	1.12	99.18
2	200	0.77	100.23
3	200	1.83	99.17
4	200	0.84	101.47
5	200	0.92	99.22

^aMean of three replicates.

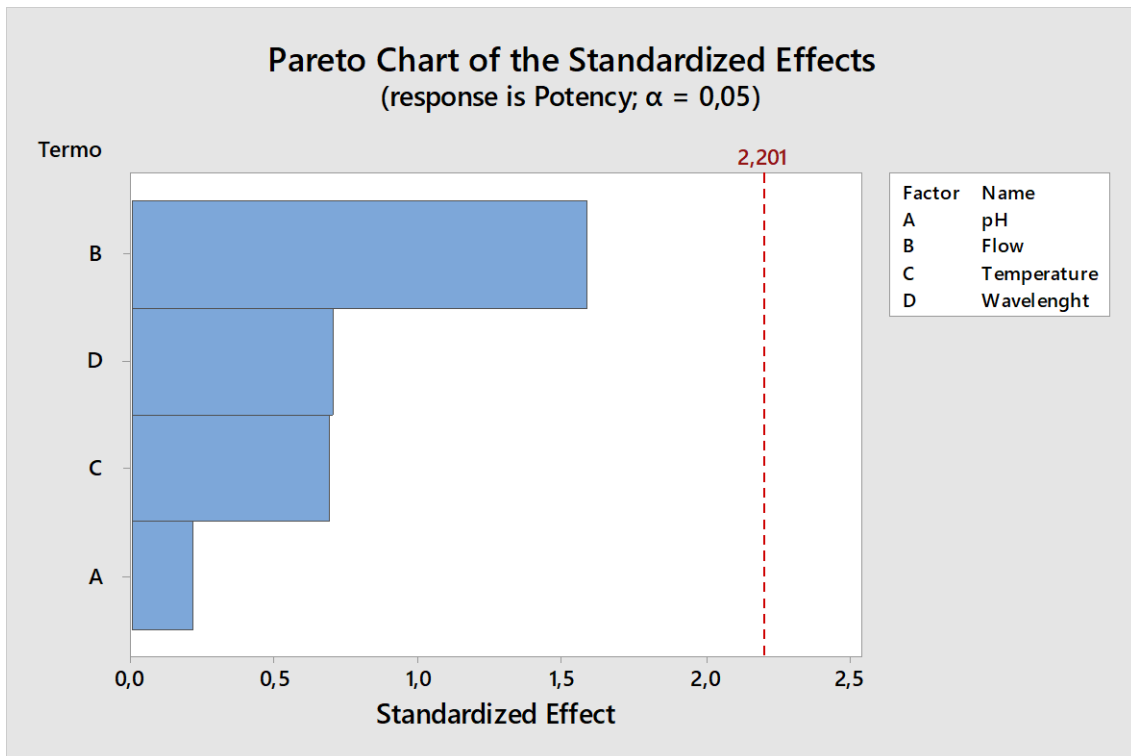
Figure 1 - SEC chromatograms of degradation studies



(a) CZP 20mg/mL (b)acid; (c)basic; (d)oxidative; (e)thermal; (f)placebo.

Peak 1 = CZP; peak 2 = HMW; peaks 3,4 and 5 = LMW; peak 6 = hydrogen peroxide.

Figure 2 - Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing MVAT



ARTIGO 2

5 ARTIGO 2

Analysis of certolizumab pegol in pharmaceutical formulations by validated reversed-phase liquid chromatography method and bioassay

Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior^b, Bruna Xavier^b, Francielle Santos da Silva, Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel and Sérgio Luiz Dalmora^a.

^aDepartment of Industrial Pharmacy and ^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. *e-mail:* sdalmora@terra.com.br

ABSTRACT

The Certolizumab pegol (CZP) is an anti-TNF α biological agent indicated to treat different chronic inflammatory diseases. It has a different structure compared to other anti-TNF- α therapies, as it is pegylated and does not have the Fc fraction. It has a molecular mass of about 47.8 kDa, but when conjugated with polyethylene glycol, it has a total molecular mass of approximately 91 kDa. A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was developed and validated for the quantification of CZP and its fragments in biopharmaceutical formulations. The RP-LC method was optimized on a Zorbax 300 SB C18 column (150 x 4.6 mm i.d, 3.5 μ m particle size, pore size 300 Å) maintained at 80°C. The mobile phase A consisted of 0.1% (v/v) TFA in ultrapure water and mobile phase B was a mixture of propanol, acetonitrile, ultrapure water and TFA (70 + 20 + 9.9 + 0.1, v/v), run at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ in a gradient elution mode, with detection by a diode array detector (DAD) set at 214 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time at 9.0 min, and the calibration curve was linear over the 1 – 40 mg mL⁻¹ range ($r^2 = 0.9997$). The specificity was confirmed by degradation studies, analyze of interference of the excipients and peak purity. The accuracy was 99.80%, with bias lower than 0.82%. The method was applied to quantitate CZP, giving results between 98.72% – 100.24%, and showing fragments forms between 0.87% – 1.51%. Moreover, the MONO-MAC-6 cell culture bioassay was carried out to evaluated the biological activity of CZP. The results showed that CZP significantly reduced the levels of TNF- α expressed by the cell line MONO-MAC-6. So, the validated RP-LC method can be employed to analyze CZP and its fragments, contributing to improve the quality control and to ensure the efficacy and safety of the biopharmaceutical product and its future biosimilars.

Keywords: *certolizumab pegol, monoclonal antibody, reversed-phase liquid chromatography, validation, bioassay.*

1 INTRODUCTION

The tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a pro-inflammatory cytokine that plays a key role in the inflammatory cascade. Thus, biological agents TNF- α inhibitors (anti-TNF- α), have revolutionized the treatment of chronic inflammatory diseases in areas such as dermatology, rheumatology and gastroenterology. This anti-TNF- α antibodies attenuate the inflammatory process by binding to precursor transmembrane TNF- α and soluble TNF- α , blocking the interaction between TNF- α molecules and its receptors, neutralizing TNF- α mediated pro-inflammatory cell signaling (MEASE, 2011; CURTIS et al., 2019).

Certolizumab pegol (CZP) is a pegylated humanized Fab fragment of an anti-TNF- α antibody with a high affinity for TNF- α , but lacks the Fc portion. That is, a Fab fragment attached to a 40-kDa PEG moiety. The pegylation increases the plasma half-life of CZP to about 2 weeks and contribute to the preferential distribution of the drug to inflamed tissues (UEDA, 2014; DEEKS, 2016; MITOMA et al., 2016).

In clinical practice, can be used in monotherapy or with disease-modifying anti-rheumatic drugs, such as methotrexate, to treat different chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), Crohn's disease (CD), psoriatic arthritis (PsA) and axial spondyloarthritis (axSpA) (LAUNOIS et al, 2011; CIMZIA, 2016).

Nowadays, monoclonal antibodies (mAbs) are class of biopharmaceuticals in rising very relevant in the pharmaceutical market, because have been successfully utilized in therapeutic, due high specificity, high efficacy, wide therapeutic range and few side effects. Because of this growing importance, researches aimed at development of analytical methods for their complete characterization has emerged. But, the characterization of mAbs is not easy, these biomolecules have protein nature, resulting in a complexity structural and significant heterogeneity. Therefore, these biopharmaceuticals must be evaluated and characterized using a combination of analytical techniques (MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2016; FEKETE et al., 2017; FARJAMI et al., 2019).

Immunoenzymatic assays as ELISA are commonly employed to quantitate mAbs, however, this technique presents lower precision and robustness than physicochemical techniques (NAVAS et al., 2013).

Despite size exclusion liquid chromatography (SEC) are well-established for the analysis of intact protein, the reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) using stationary phases with large pore size (300 Å), long alkyl chains (C8 and C18),

high column temperature and a solvent system with ion pairing agents is a very effective chromatographic method for the analysis of intact proteins. Therefore, RP-LC is more efficient than ion-exchange chromatography (IXC) and with less retention time, being the most appropriate technique for quantify mAbs (MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2018).

Many RP-LC and SEC chromatographic methods have been described for the quantification and characterization of the intact mAbs, besides of stability, aggregation and degradation studies. However, there are no methods developed specifically for CZP analysis (PAUL et al., 2012; NAVAS et al., 2013; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2016; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2018; HERNANDEZ-JIMENEZ et al., 2016; HERNANDEZ-JIMENEZ et al., 2018; PEROBELLI et al., 2018).

The validation study is necessary to demonstrate that the method developed is suitable for the intended purpose, ensuring the reproducibility and reliability of the results. So, after the development of new analytical methods, the validation is imperative. The parameters to be evaluated in validation of the analytical methods are describe in official guidelines (ICH, 2005; SHABIR et al., 2007; BRASIL, 2017).

The aim of this work was to develop and validate a RP-LC method for the analysis of the Certolizumab pegol and the its fragments and compare the proposed method against SEC. Moreover, carry out *in vitro* inflammatory inhibition bioassay to evaluate biological activity of CZP. In this way, provide new analytical tools that can assess the safety and bioactivity of the monoclonal antibody under study, improving quality control.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 CHEMICALS AND REAGENTS

Different batches of biopharmaceutical formulations of Cimzia® AstraZeneca (Cotia – São Paulo, Brazil) were commercially acquired, containing a 200 mg mL⁻¹ solution in a prefilled syringe. These samples were within their expiration date and were stored refrigerated at 2-8°C and protected from light. The trifluoroacetic acid (TFA) HPLC-grade and 30% v/v hydrogen peroxide (H₂O₂) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile and propanol (HPLC-grade) were acquired from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Before the analysis, the solutions were filtered in a 0.22 µm Millex filter (Millipore) and degassed with a Tecnal ultrasonicator (São Paulo, Brazil). To perform all analyses, the ultrapure water was purified by Elix 3 coupled to a Millipore Milli-Q Gradient A10 system (Bedford, MA, USA). In addition to those mentioned, all other chemicals used were HPLC grade or special analytical grade. For the bioassay, the monocytic cell line (MONO-MAC-6) was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank – BCRJ (Rio de Janeiro, Brazil). RPMI-1640 medium and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Human TNF-α ELISA Development Kit was acquired from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). And as the lipopolysaccharide (LPS), was employed the 3rd International Standard for Endotoxin WHO 10/178 from National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC (London, UK).

2.2. APPARATUS

The analyses were performed on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, a SIL-20A autosampler, a LC-20 AD pump, a DGU-20As degasser, a CTO-20A column oven and a SPD-M20A diode array detector (DAD). The LC Solution Version 1.22 SP1 software was used to automatically integrate the peak areas. The absorbances of the cell culture bioassay were measured on a Thermo Scientific Varioskan® Flash microplate reader (Vantaa, Finland).

2.3. STANDARD AND SAMPLE SOLUTIONS

As an official reference substance was not available, three samples of commercial batch of Cimzia® were pooled, to quantitate a sample during the method

development, and it was established as the representative CZP Biological reference substance (BS-CZP). Then, solutions were prepared daily by diluting the BS-CZP and samples of biopharmaceutical products (Cimzia®) in ultrapure water, to final concentrations of 20 mg mL⁻¹. For the bioassay, CZP was diluted at concentration to 10 µg/ml and LPS was diluted at 50 pg/ml.

2.4 RP-LC METHOD

The RP-LC method was carried out on a reversed-phase Agilent (Santa Clara, CA, USA) Zorbax 300 SB C18 column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a pore size of 300 Å and particle size of 3.5 µm) maintained at 80°C. To protect the analytical column, a security guard holder C18 Phenomenex (Torrance, USA) was used. The eluent flow rate was 1.0 mL min⁻¹, and consisted of a gradient of 0.1% (v/v) TFA in ultrapure water (mobile phase A) and a mixture of propanol, acetonitrile, ultrapure water and TFA (70 + 20 + 9.9 + 0.1, v/v) (mobile phase B). The chromatographic run started at 30% of mobile phase B. A linear gradient was applied from 0.01 to 7.00 minutes, then increasing to 40% of B in minute 7.00, and kept constant for 3.50 min. In minute 10.50 to 11.00 decreased the mobile phase B concentration to 30%. A post-time of 4 min was required under the initial conditions of the gradient, i.e., 30 % of mobile phase B, finishing the analysis in 15 minutes. The injection volume was 1 µL of a solution containing 20 mg mL⁻¹ for both BS-CZP and samples and chromatograms were registered at 214 nm, using DAD detection.

2.5 VALIDATION OF RP-LC METHOD

The validation of the RP-LC method was performed using samples of biopharmaceutical products with a label claiming of 200 mg mL⁻¹, and the parameters were assessed according to the guidelines. The following validation parameters were determined: specificity, linearity, precision, accuracy, detection limit (DL), quantitation limit (QL), robustness and system suitability test (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.5.1 System suitability test

The system suitability test was carried out using five replicate injections of 1 µL of BS-CZP solutions containing 20 mg mL⁻¹, followed by analysis of the

recommended parameters: peak area, retention time, peak symmetry, number of theoretical plates and peaks capacity (k).

2.5.2 Specificity

The specificity of the RP-LC method was analyzed by degradation studies and interference of the excipients. Thus, the BS-CZP solutions (20 mg mL^{-1}) were submitted to stress conditions in acidic medium, basic medium, oxidative medium and photolytic medium. The solutions were subjected to stress using acid (1 M HCl), alkaline (0.1 M NaOH), and oxidative media (10% H_2O_2). The stress agent was applied at a concentration of 10% (v/v). In addition, the effect of UV light was investigated by exposure to 200 W h/m^2 near ultraviolet light in a photostability chamber. The samples were analyzed 24 h after the stress agent was added. After samples were stressed, the aliquots were analyzed without further dilutions to avoid changes. The chromatograms of the stressed samples were compared with those of the non-degraded BS-CZP (NAVAS et al., 2013; HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2018). Possible interferences from excipients of the biopharmaceutical formulation were determined by analyzing a sample that contained only placebo, in-house mixture of the formulation excipients (sodium acetate, sodium chloride and water to adjust pH 4.7) it was made (EMA, 2014). Also, the spectral peak purity (CZP non-degraded and degraded forms) was checked with a DAD detector using the LC Solution Version 1.22 SPI software.

2.5.3 Linearity

This parameter was investigated by constructing three independent analytical curves, each with seven concentrations of the BS-CZP solution (1, 5, 10, 15, 20, 30 and 40 mg mL^{-1}). The solutions were injected in triplicate 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 statistical software STATGRAPHICS Centurion XVII Version 17.2.05 (Statistical Graphics System, 2017, Warrenton, VA, USA) was used to analyze the chromatographic data.

2.5.4 Precision and accuracy

Precision must be expressed through the repeatability (intraday) and intermediate precision (inter-days and between-analysts). The repeatability was examined by six evaluations of BS-CZP, under the same experimental conditions, on the same day. The between-analysts precision was assessed by submitting samples for analysis by different analysts in the same laboratory. The inter-days precision was determined by the analysis of two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days. The accuracy was evaluated by analysis of the in-house mixture of excipients spiked with known amounts of BS-CZP; to obtain solutions at concentrations of 16, 20, and 24 mg mL⁻¹, equivalent to 80, 100 and 120% of the working solution concentrations, according to Table 1. Accuracy was calculated as the percentage of drug recovered from the formulation.

2.5.5 Detection and quantitation limits

The detection limit (DL) and the quantitation limit (QL) were calculated as defined by the International Council for Harmonisation (ICH) based on the standard deviation of the response and the slope, estimated from the three independent analytical curves of the CZP, determined by a linear-regression model. The factors 3.3 and 10, for the DL and QL, respectively, were multiplied by the standard deviation of y-intercept and then divided by the slope (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.5.6 Robustness

Robustness is a parameter typically used in the development of the analytical method that indicates its ability to resist small and deliberate variations in the analytical conditions. So, the method was evaluated by analyzing the same samples containing 20 mg mL⁻¹, under one-variable-at-a-time (OVAT) conditions as observed in Table 2. The robustness was also analyzed by the multi-variable-at-a-time (MVAT) method. The experimental design was a two-level (i.e., 2⁴⁻¹ or eight experiments), fractional factorial design carried out with the selection of four factors: mobile phase pH, flow rate (mL min⁻¹), column temperature (°C) and wavelength (nm). The factors and their high and low levels were evaluated as shown in Table 3. The Minitab 18.1 statistical software was employed 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. In addition, the stability of the CZP samples was tested after storage, and any changes in the chromatographic pattern were compared with the freshly prepared samples.

2.6 MONO-MAC-6 CELL CULTURE BIOASSAY OF CZP

Following the method previously described (POOLE et al., 1988; SILVEIRA, 1997), the monocytic cell line MONO-MAC-6 was incubated with RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were counted and used in the concentration of 10^6 monocytes/ml. The MONO-MAC-6 cells were stimulated by the addition of 50 pg/ml of the 3rd International Standard for Endotoxin WHO 10/178 (LPS). To test the effects of CPZ, 10 $\mu\text{g/ml}$ was added after the LPS in the same procedure. Then, the supernatant was harvested and assayed, respectively, for TNF- α 24 hours after the incubation.

2.7 APPLICATION OF THE RP-LC METHOD AND SEC CORRELATION

To quantify CZP and its fragments by the RP-LC method, five commercially available lots of Cimzia[®] were named from 1 to 5, and diluted to 20 mg mL⁻¹, in ultrapure water. The analyses were performed in triplicate, and the percentage were calculated against BS-CZP. Moreover, the RP-LC method was submitted to correlation study against the SEC by analysis of variance (ANOVA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

Tests were carried out to determine the ideal conditions of the method, such as mobile phase, temperature, flow rate, elution mode, column and wavelength, seeking to develop a sensitive, selective, robust and reproducible RP-LC method. Thus, were tested mobile phases containing 0.1% TFA in water (v/v) and 0.1% TFA in acetonitrile (v/v), TRIS buffer, monobasic sodium phosphate, sodium sulphate anhydrous and a mixture of isopropanol, acetonitrile, ultrapure water and TFA (70 + 20 + 9.9 + 0.1) (v/v). Moreover, others solvents with high elutropic strength coefficients such as, methanol and propanol were analyzed in this mixture. The

mobile phase consisting of a mixture of propanol, acetonitrile, ultrapure water and TFA (70 + 20 + 9.9 + 0.1) (v/v) resulted in better sensitivity, resolution and shorter retention time. The influence of the column temperature was evaluated (30 - 80°C) and desirable chromatographic profiles started obtained from 60°C. At 80°C the chromatographic profile presents better conditions with high resolution between the peaks and great symmetry of the peaks. The isocratic and gradient elution mode was also evaluated, in which better symmetry and peaks resolution results were observed using mobile phase concentration gradients. In addition, Vydac 214TP C₄ column, Jupiter C₄ column, Zorbax 300 SB C₈ column and Zorbax 300 SB C₁₈ column were tested on the basis of their separation and the Zorbax 300 SB C₁₈ column was selected. The optimal wavelength was selected using a DAD detector, selecting 214 nm. Typical chromatogram demonstrating the resolution of the symmetrical peaks corresponding to CZP is shown in Figure 1a.

The choice of method conditions in this work corroborates what is reported in the literature, as it is observed that the use of chromatographic columns with long alkyl chains of the stationary phase, high column temperature combined with the organic solvents with high eluotropic strength coefficient and ion pairing agents, such as trifluoroacetic acid (TFA), are essential for monoclonal antibody analysis by RP-LC method (DILLON et al., 2006; NAVAS et al., 2013; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2016).

3.2 VALIDATION OF LC METHODS

The suitability of the system was tested and the RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.08, 0.28 and 1.50 %, respectively. The number of theoretical plates was 6047.54, with an RSD of 1.93 %. These results were considered acceptable (RSD < 2 %).

The specificity of the method was investigated. For the acid condition, 12.8 % decrease of the area was observed and one additional peak was detected at 2.5 min (Figure 1b). Under basic condition, 20.6 % decrease of the area was observed, with three additional peaks at 2.5, 3.2 and 7.6 min (Figure 1c). Oxidative degradation, showed a reduction of 12.1 % of the main peak area, with one peak related to the H₂O₂ at 1.7 min and additional peaks at 2.5 and 9.6 min (Figure 1d). The photolytic condition showed a decrease of 12.6% of the monomer peak area, with three additional peaks at 3.1, 3.3 and 8.4 min (Figure 1e). The placebo injection showed

chromatogram with no evident peaks (Figure 1f), demonstrating that there is no interference from the excipients. Moreover, the peaks purity was analyzed, indicating that the peaks were spectrally pure, and there was no chromatographic or spectroscopic evidence that impurities were present. The peak purity index remained in the range between 0.9999-1, showing that the peaks were free of any co-eluting peak and that the excipients did not interfere in the analysis, which confirmed that the RP-LC method was specific for the analysis of CZP. All peaks eluting before or after the major peak were named as fragments of mAb.

The analytical curves were found to be linear over a concentration range of 1 – 40 mg mL⁻¹. The determination coefficient was calculated as $r^2 = 0.9997$, $y = 581209,0009x + 204086,2547$, where x is concentration and y is the peak absolute area. The DL and QL of the method were calculated as 0.06 and 0.17 mg mL⁻¹, respectively.

The precision parameter was evaluated by calculating the mean values and relative standard deviation (RSD %). For repeatability, the RSD value obtained was 1.78%. The inter-days precision was tested, showing RSD values of 0.70 and 0.99 %. The between-analysts precision was also determined; the RSD values were found to be 0.49 and 0.69 %.

The accuracy of the method was studied, and the absolute mean was 99.80%, Table 1, which demonstrates that the accuracy was within the desired range.

The results and experimental range of the selected variables evaluated for robustness using an OVAT approach are demonstrated in Table 2, together with the optimized values, demonstrating that they were within the acceptable deviation (RSD ≤ 2 %), with non-significant differences ($p > 0.05$), as calculated by analysis of variance. In addition, the robustness of the method was assessed using the MVAT approach, and the significance of the effects was evaluated using Pareto charts and the parameters are described in Figure 2. 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.

3.3 APPLICATION OF THE RP-LC METHOD AND SEC CORRELATION

The validated RP-LC method was applied to analyze CZP in five different batches of biopharmaceutical products commercially available, demonstrating results according to Table 4, with values in the range of 98.72 - 100.24%, related to the content declared, and its fragments between 0.87 - 1.51%. Moreover, the samples were artificially degraded, as described in the section 2.5.1, and were analyzed. The degraded samples allowed reduction of the main peak area by 12.8%, 20.6%, 12.1% and 12.6%, respectively. It was demonstrated that the different stress conditions caused degradations that affect the quality of the product and that this method is able to detect these alterations. Therefore, the method represents an improvement for the characterization of the biopharmaceutical and for its future biosimilar, ensuring analytical methods capable to evaluate both the monoclonal antibody and its fragments. In addition, the RP-LC method was submitted to correlation study against SEC method to evaluate the intact biomolecule, and the results are observed in Table 4. The analysis by ANOVA showed non-significant differences, demonstrating the capabilities of each one of the methods to evaluate the biomolecule.

3.4 MONO-MAC-6 CELL CULTURE BIOASSAY OF CZP

The MONO-MAC-6 cells stimulated by LPS showed TNF- α levels quantified by the ELISA method, approximately of 820 pg/ml. Then, after treatment of the cells with CZP, the ELISA method was carried out again, showing significant reduction of TNF- α levels to 236 pg/ml. The analysis showed that CZP significantly reduced the quantification of the pro-inflammatory cytokine (TNF- α) expressed by the cell line due to the biological activity of the monoclonal antibody.

4 CONCLUSIONS

The RP-LC method was developed and validated following the ICH guidelines for biotechnological products and the results of the validation studies show that the chromatographic method is specific, sensitive and accurate. In this way it can be applied to quantitation of CZP and its fragments in biopharmaceutical formulations, as well as stability-indicating method, because can be used to test CZP stability in quality control processes and long-term stability studies.

Besides, the method validated can be used to assess the biomolecule during the biotechnology processes, and through subsequent purification steps, to monitor

the stability, and to ensure the batch-to-batch consistency of the bulk and finished biotechnology-derived medicines. In the near future, could be applied to evaluate the biosimilars of CZP, representing one of the methods needed to characterize CZP. In addition, the bioassay demonstrated the biological activity of CZP and its ability to inhibit TNF- α , however further studies are necessary to correlate with its mechanism of action in order to optimize and validate this method.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

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.

CIMZIA: Certolizumabe pegol. Cotia: AstraZeneca do Brasil Ltda., 2016. Bula de Remédio.

CURTIS, Jeffrey R. et al. Long-term safety of certolizumab pegol in rheumatoid arthritis, axial spondyloarthritis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease: a pooled analysis of 11 317 patients across clinical trials. **RMD open**, v. 5, n. 1, p. e000942, 2019.

DEEKS, E. D. Certolizumab pegol: a review in inflammatory autoimmune diseases. **BioDrugs**, v. 30, n. 6, p. 607-617, 2016.

DILLON, T. M. et al. Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability. **Journal of chromatography A**, v. 1120, n. 1-2, p. 112-120, 2006.

EMA. European Medicines Agency. **Cimzia, INN-Certolizumab pegol**. Product Information. 2014

FARJAMI, A. et al. Stability-Indicating Size Exclusion Chromatography Method for the Analysis of IgG mAb-Cetuximab. **Chromatographia**, v. 82, n. 4, p. 767-776, 2019.

FEKETE, S; VEUTHEY, J; GUILLARME, D. Achievable separation performance and analysis time in current liquid chromatographic practice for monoclonal antibody separations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 141, p. 59-69, 2017.

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**, 2018.

HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, J et al. The effects of light-accelerated degradation on the aggregation of marketed therapeutic monoclonal antibodies evaluated by size-exclusion chromatography with diode array detection. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 105, n. 4, p. 1405-1418, 2016.

HOSHIYAMA, T. et al. Effects of certolizumab pegol on human monocytes. **The Kitasato medical journal**, v. 46, n. 1, p. 60-66, 2016.

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.

LAUNOIS, R. et al. Comparison of Certolizumab Pegol with Other Anticytokine Agents for Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Multiple-treatment Bayesian Metaanalysis. **The Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 5, p. 835 – 845, 2011.

LENTH, R. V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. **Technometrics**, v. 31, n. 4, p. 469 – 473, 1989.

MARTÍNEZ-ORTEGA, A. et al. 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, n. 2, 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.

MEASE, P. J. Certolizumab pegol in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of its clinical efficacy and safety. **Rheumatology**, v. 50, n. 2, p. 261-270, 2011.

MITOMA, H. et al. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents—Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. **Cytokine**, 2016.

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, n. 29, p. 9351-9363, 2013.

PAUL, M. et al. Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 282-290, 2012.

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.

POOLE, S. et al. Detection of pyrogen by cytokine release. **The Lancet**, v. 331, n. 8577, p. 130, 1988.

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.

SILVEIRA, R. L. **Estudo de Metodologias para Avaliação de Pirogênios**. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1997.

UEDA, T. Next-generation optimized biotherapeutics—A review and preclinical study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 11, p. 2053-2057, 2014.

Table 1 - Accuracy of RP-LC method for CZP

Nominal concentration (mg mL⁻¹)	Mean concentration measured^a (mg mL⁻¹)	RSD^b (%)	Accuracy (%)	Bias^c (%)
16	15.87	1.85	99.18	-0.82
20	20.06	1.46	100.31	0.31
24	23.98	0.54	99.90	-0.10

^aMean of three replicates

^bRSD = Relative standard deviation

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

Table 2 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing using the one-variable-at-a-time (OVAT)

Variable	Range investigated	CZP ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
Gradient: maximum percentage of mobile phase B (%B)	39 (% B)	100.61	1.45	
	40 (% B)	100.45	0.99	40 (% B)
	41(% B)	100.27	1.08	
Flow rate (mL/min)	0.9 mL min ⁻¹	101.16	1.33	
	1.0 mL min ⁻¹	100.94	0.47	1.0 mL min ⁻¹
	1.1 mL min ⁻¹	101.72	0.96	
TFA (%)	0.09	100.12	1.33	
	0.10	100.85	0.44	0.10
	0.11	101.08	0.62	
Temperature (°C)	79	101.03	1.34	
	80	100.76	0.87	80
	81	100.84	1.68	
Solution stability	Autosampler 24 h	99.83	1.13	-
	2 – 8 °C 24 h	99.12	0.41	-
	2 – 8 °C 48 h	98.64	0.96	-
Wavelength (nm)	190 – 320	-	-	214

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

Table 3 - Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi-variable-at-a-time (MVAT)

Factor	Optimal	Low level	High level
Flow rate (mL min⁻¹)	1.0	0.9	1.1
Column temperature (°C)	80	79	81
Gradient: maximum percentage of mobile phase B (%B)	40	39	41
Wavelength (nm)	214	212	216

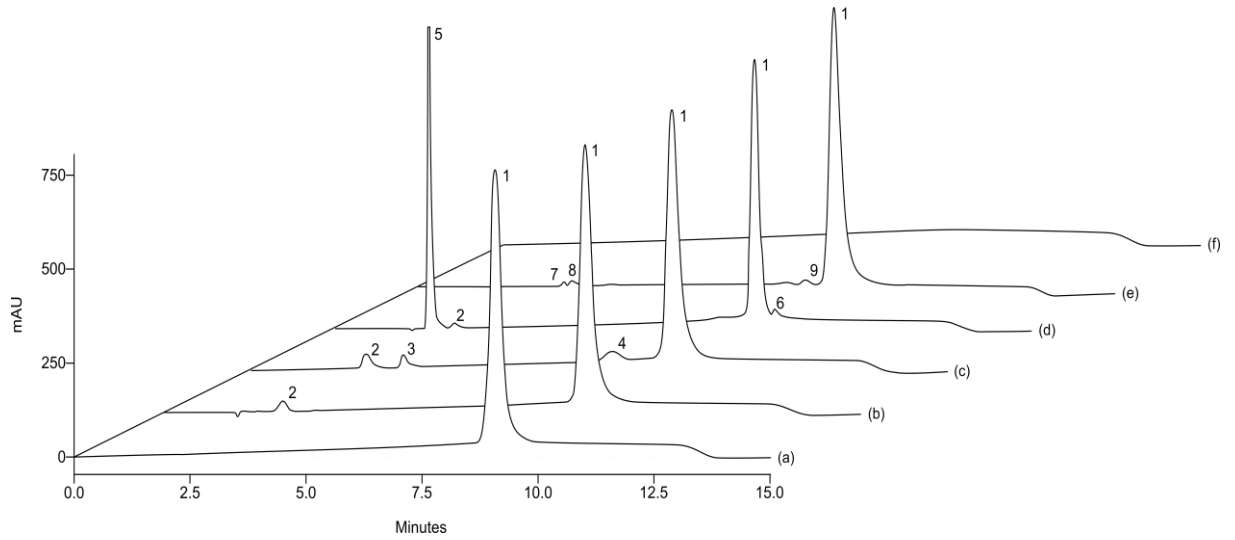
Table 4 - Quantitation of CZP, determination of its fragments in biopharmaceutical formulations by RP-LC method and its correlation with SEC

Sample	Label claim (mg mL ⁻¹)	RP-LC		SEC	
		Fragments ^a (%)	Non-altered form ^a (%)	HMW ^a (%)	Content ^a (%)
1	200	0.94	98.93	0.62	100.19
2	200	1.02	99.25	1.60	100.27
3	200	0.87	98.72	0.88	98.54
4	200	1.33	100.24	1.08	101.06
5	200	1.51	99.09	1.43	98.05
Mean	-	1.13	99.25	1.12	99,62
SD^b	-	0.27	0.59	0.40	1,27

^aMean of three replicates.

^bStandard Deviation

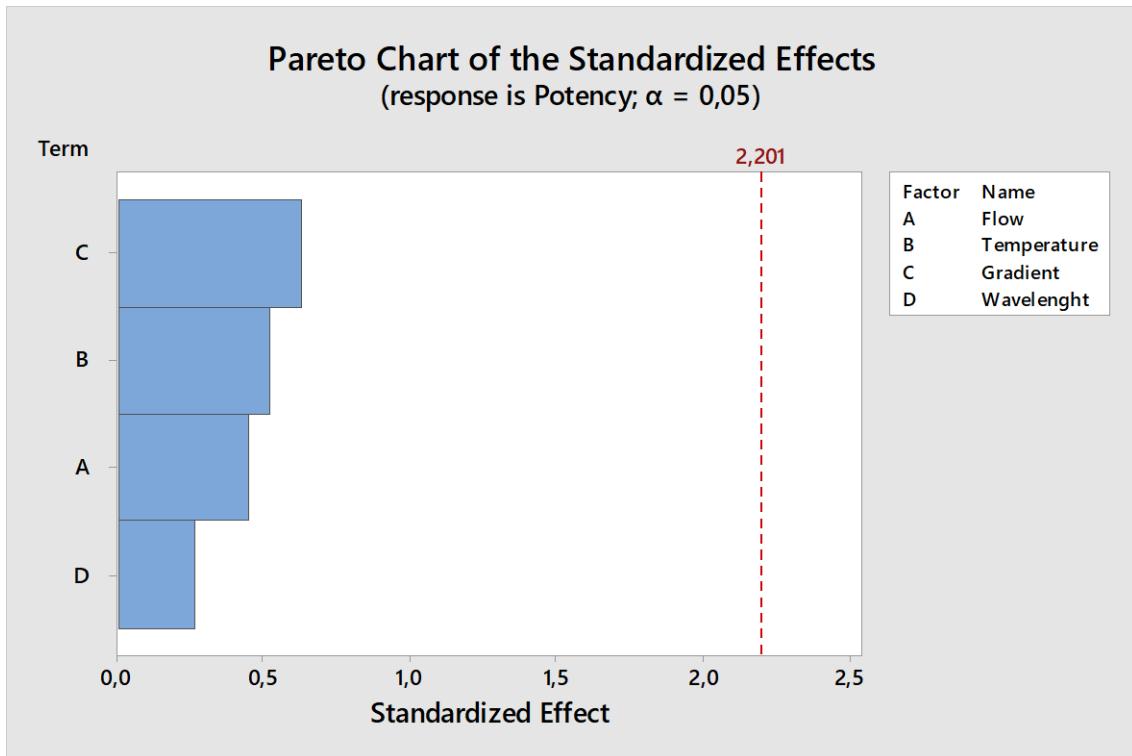
Figure 1 - RP-LC chromatograms of degradation studies



(a) CZP 20mg mL⁻¹ (b)acid; (c)basic; (d)oxidative; (e)photolytic; (f)placebo.

Peak 1 = CZP; peaks 2, 3, 4, 6, 7, 8 and 9 = fragments; peak 5 = hydrogen peroxide.

Figure 2 - Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing MVAT



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

No momento atual, graças ao avanço científico e tecnológico na área da Biotecnologia, que passou a dominar importantes técnicas para a produção de medicamentos biológicos como, a tecnologia do DNA recombinante e dos hibridomas, observa-se o desenvolvimento e produção em larga escala de mAbs. Contudo, devido a sua origem biológica estes compostos apresentam estrutura molecular complexa, requisitando a combinação de métodos para que se possa determinar seu teor, impurezas e estabilidade, garantindo a qualidade integral do produto (ECKER et al., 2015; WANG et al., 2018).

Métodos cromatográficos são comumente utilizados para a caracterização de medicamentos biológicos, apesar disso, ainda não temos metodologia oficial e especificação farmacopeica para a avaliação de produtos acabados de CZP, bem como não há publicações científicas, até o presente momento, trazendo estas técnicas. Observando esta lacuna, foram desenvolvidos estudos para propor métodos inovadores por CL-EM e CL-FR que possam avaliar a qualidade destes biofármacos. A investigação de métodos que possam contribuir para a caracterização do CZP apresenta significativa importância e pode viabilizar também o desenvolvimento de produtos biossimilares, haja vista que a patente do Cimzia® acabou de expirar, no ano de 2021, na Europa e está prevista para expirar em 2024 nos Estados Unidos da América, abrindo caminho para que biossimilares de CZP sejam produzidos (GABI, 2017).

Convém elucidar nesta discussão que, até o presente momento, não há Padrão Internacional para o CZP e algumas empresas internacionais fornecem substância biológica como referência, porém não possuem certificação da substância e não são reconhecidas por órgão oficial. Sendo assim, decidiu-se utilizar um pool de produto comercial Cimzia® (200 mg/mL), que foi adotado como Substância Biológica de Referência (BS-CZP) para o desenvolvimento e validação dos métodos. Este procedimento foi adotado com base em artigos publicados na literatura internacional que seguiram procedimentos semelhantes (NAVAS et al., 2013; HERNANDEZ-JIMENEZ et al., 2018; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2018; PEROBELLI et al., 2018; DUMONCEL et al., 2022).

A discussão a seguir está baseada nos artigos 1 e 2 apresentados nos capítulos anteriores, que serão submetidos para publicação, no qual estão detalhados os

métodos estudados e os resultados experimentais encontrados. Conforme citado, no artigo 1 foi desenvolvido e validado método por CL-EM para quantificação de CZP e suas formas agregadas em formulações biofarmacêuticas. Paralelamente, no artigo 2 foi desenvolvido método por CL-FR para a análise do CZP e seus fragmentos em produtos biofarmacêuticos e teste de atividade biológica.

6.1 ARTIGO 1

Primeiramente, se desenvolveu e validou um método por CL-EM para avaliação de CZP. Testou-se distintas fases móveis contendo fosfato de potássio, fosfato de sódio e ácido fosfórico, bem como, foi estudado o cloreto de sódio como um aditivo do eluente. Com base nos resultados obtidos, a fase móvel constituída por fosfato de sódio monobásico e cloreto de sódio com pH neutro (7,00) foi escolhida. Modificadores orgânicos também foram analisados na constituição da fase móvel, dentre os solventes analisados podemos destacar o etanol, o metanol e o isopropanol, e neste estudo obteve-se melhor resposta pelo uso do etanol (5% v/v).

Colunas cromatográficas também foram estudadas, para isso, testou-se alguns modelos compatíveis com o objetivo da técnica em desenvolvimento como, BioSep SEC-s2000, BioSep SEC-s3000 e YARRA SEC-2000. Neste caso, a coluna BioSep SEC-s3000 foi a escolhida. Pode-se destacar que a escolha dos elementos constituintes da fase móvel está de acordo com o que já foi previamente apresentado na literatura para a análise de proteínas peguiladas por CL-EM (RATTO et al., 1997; GOYON et al., 2017; SHAHBAZI et al., 2017).

Portanto, com base em um perfil cromatográfico adequado e tempo de retenção de 5,6 min, determinou-se a fase móvel A constituída de fosfato de sódio monobásico (100mM) e cloreto de sódio (200mM) pH 7,0 e a fase móvel B sendo etanol (95:5, v/v), à uma vazão de 0,5 ml/min, com detecção DAD à 214 nm.

Os picos adicionais formados durante os estudos de degradação forçada por aquecimento, condição ácida, básica e oxidativa, podem ser atribuídos às proteínas de alta massa molecular (agregados) e de baixa massa molecular. A análise do placebo preparado com os excipientes da formulação foi avaliada e demonstrou não haver interferência dos excipientes, bem como, a análise da pureza do pico do CZP nos cromatogramas das amostras forneceu elevada pureza (> 0,9999), indicando que não há co-eluição, garantindo a especificidade do método.

O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 1 – 40 mg/mL ($r^2 = 0,9993$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram DPR inferiores a 1,13 % (SHABIR, 2003). Na Tabela 1 (artigo 1) podem ser observados os valores experimentais obtidos no teste de exatidão, com média de 100,50 %. Desse modo, os resultados alcançados determinam a precisão e exatidão do método proposto.

A robustez do método também foi investigada avaliando-se uma variável de cada vez através de pequenas modificações independentes na concentração (mM) de fosfato de sódio monobásico, na concentração (%) de etanol, no pH da fase móvel, no fluxo e na temperatura da coluna, observando que não houve influência na quantificação do CZP. Além disso, também se avaliou múltiplas variáveis de cada vez, por meio de desenho experimental determinado pelo programa estatístico Minitab (versão 18.1), onde foi aplicado modificando quatro fatores em conjunto (pH, fluxo da fase móvel, temperatura da coluna e comprimento de onda) em dois níveis (baixo e alto, ± 1). O gráfico de Pareto foi construído utilizando o mesmo software estatístico. Os resultados obtidos não demonstraram alterações significativas nas potências, com nível de significância 5 %, sendo inferiores ao valor crítico (2,201), conforme observado na Figura 2 (artigo 1).

De acordo com o que foi citado na revisão da literatura do presente trabalho, a Farmacopeia Americana apresenta um método geral por CL-EM para avaliação de mAb's (USP, 2016). Desse modo, é apropriado ressaltar as vantagens do método desenvolvido e validado nesta pesquisa em relação ao método farmacopeico.

Realizaram-se corridas cromatográficas de amostras de CZP nas condições determinadas pela USP (2016) e os resultados obtidos foram insatisfatórios, pois o perfil cromatográfico apresentou-se com picos sem resolução, com baixa sensibilidade e maior tempo de retenção, aproximadamente 20 min. Relacionam-se estes resultados, ao fato de que o método farmacopeico é um método geral proposto aos mAb's, que possuem como estrutura básica uma molécula de imunoglobulina G (IgG). Por sua vez, o CZP com sua estrutura molecular única e distinta dos demais mAb's pode ser a causa de não se obter êxito com a execução do método da USP. Desse modo, se justifica o desenvolvimento e pesquisa de métodos específicos a este medicamento, pois mesmo os compostos de sua classe farmacêutica, são diferentes estruturalmente.

Paralelamente, outro ponto importante é o tempo de corrida de ambos os métodos, no qual o método proposto nesta tese possui tempo de corrida de 10 min, enquanto, o método farmacopeico apresenta tempo de corrida de 30 min, gerando maior demanda de tempo, de solventes e recursos, além de gerar maior conteúdo de resíduos.

6.2 ARTIGO 2

Na sequência, realizou-se o desenvolvimento e a validação do método por CL-FR (artigo 2). Para a determinação das melhores condições analíticas analisou-se diferentes colunas cromatográficas, temperatura do método, composição da fase móvel, modo de eluição, comprimento de onda, entre outros aspectos, sempre levando em consideração o que é descrito na literatura internacional, bem como, as características do produto a ser analisado.

Colunas cromatográficas de diferentes produtores, com distintos materiais de empacotamento foram avaliadas, entre elas, Vydac 214TP C₄, Jupiter C₄, Zorbax 300SB C₈ e Zorbax 300SB C₁₈. Selecionou-se então, a coluna Zorbax 300SB C₁₈, que possibilitou a separação cromatográfica com tempo de retenção de 9,0 min.

A temperatura da coluna foi avaliada na faixa de 30°C a 80°C, de acordo com as suas recomendações de uso. Os perfis cromatográficos desejáveis começaram a ser obtidos a partir de 60°C. O cromatograma apresentou o melhor perfil cromatográfico, com alta simetria e resolução entre os picos, quando atingida a marca de 80°C. Quanto ao modo de eluição, os melhores resultados em pureza dos picos, simetria e resolução foram atingidos quando empregada a eluição em gradiente.

Examinou-se fases móveis constituídas de 0,1% de TFA em água (v/v) e 0,1% de TFA em acetonitrila (v/v), tampão TRIS, fosfato de sódio monobásico, sulfato de sódio anidro e uma mistura de isopropanol, acetonitrila, água ultrapura e TFA (70 + 20 + 9,9 + 0,1) (v/v). Solventes com alta força de eluição, como metanol e propanol, também foram testados nesta mistura, sendo o propanol o solvente de escolha por apresentar melhor perfil cromatográfico.

Para a determinação da especificidade estudos de degradação forçada sob condições de estresse ácido, básico, oxidativo e fotolítico foram realizados. Picos adicionais foram gerados durante estes estudos, podendo ser atribuídos aos fragmentos de CZP. A análise do placebo preparado com os excipientes da

formulação, confirmou a não interferência destes, bem como, a pureza do pico de CZP também foi avaliada por detector DAD ($> 0,9999$).

O método desenvolvido ofereceu regressão linear significativa na faixa de concentração de 1 – 40 mg/mL ($r^2 = 0,9997$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram DPR inferiores a 1,78 %, que demonstram precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza DPR % menor ou igual a 2 % (SHABIR, 2003). Na Tabela 1 (artigo 2) podem ser observados os valores experimentais obtidos no teste de exatidão, com média de 99,80 %. Desse modo, os resultados adquiridos garantem a precisão e exatidão do método proposto.

Para a avaliação do parâmetro de robustez do método, investigou-se primeiramente uma variável de cada vez através de pequenas modificações independentes na proporção da fase móvel B (%), fluxo, concentração de TFA (%) e temperatura da coluna, neste estudo não houveram diferenças significativas na determinação das potências. Paralelamente, realizou-se testes com múltiplas variáveis baseado na avaliação de quatro fatores em conjunto (fluxo da fase móvel, temperatura da coluna, % máximo do gradiente e comprimento de onda) em dois níveis (baixo e alto, ± 1). O desenho experimental e a análise estatística foram executados por meio do software Minitab (versão 18.1). A análise de Pareto foi realizada e os resultados não demonstraram alterações significativas nas potências, com nível de significância 5 %, sendo inferiores ao valor crítico (2,201), conforme observado na Figura 2 (artigo 2).

Destaca-se também que, embora tenhamos um método farmacopeico por CL-EM disponível para a avaliação de mAb's, a quantificação de fragmentos dos mAbs por esta técnica pode ser altamente variável dependendo do produto analisado (USP, 2016). Sendo assim, justifica-se o emprego de outras metodologias, como a CL-FR, para a análise do CZP e de seus fragmentos.

Os métodos propostos por CL-EM e CL-FR, que foram desenvolvidos e validados, cumpriram com os requisitos preconizados pelos compêndios oficiais, podendo ser empregados para caracterização e determinação de potência de CZP em produtos biotecnológicos (ICH, 2005, FDA, 2015). Além de tudo, cinco lotes de produtos biofarmacêuticos de CZP, com teor declarado de 200 mg/mL, foram analisados pelos métodos validados, conforme indicado na Tabela 4 (artigos 1 e 2).

Os métodos cromatográficos estudados neste trabalho foram submetidos a análise de correlação para avaliar se ambas as técnicas, com suas especificidades, fornecem resultados correlacionáveis para a caracterização e quantificação da biomolécula íntegra. Desta forma, os métodos validados apresentaram como médias de suas determinações valores de 99,25% e 99,62%, respectivamente para RP-LC e SEC, apresentando uma diferença média de 0,37% inferior para o método por RP-LC. Estes valores médios foram ponderados por análise de variância (ANOVA) e se mostraram sem diferença significativa ($p > 0,05$). Destaca-se que apenas o resultado de avaliação do CZP íntegro foi correlacionado, pois as formas agregadas, analisadas por CL-EM, e os fragmentos, analisados por CL-FR, determinam compostos distintos, portanto, não podendo ser correlacionáveis.

O bioensaio por cultura da linhagem de células MONO-MAC-6 foi estudado para avaliar a atividade biológica, com base no mecanismo de ação do CZP, na inibição da liberação do TNF- α pelas células estimuladas com LPS *in vitro*. O PEG também interage e pode interferir com as células. O mecanismo das influências supressivas sobre as células monocíticas necessita de maiores estudos, conforme também descrito na literatura (HOSHIYAMA et al., 2016). Neste contexto, os dados preliminares fornecidos pela aplicação do método disponível no laboratório e otimizado, são importantes para propiciar avanços na elucidação de mecanismos envolvidos na atividade farmacológica da biomolécula intacta do anticorpo monoclonal e de suas formas degradadas, que podem ser analisadas pelos métodos cromatográficos desenvolvidos e validados neste trabalho.

Portanto, o desenvolvimento desta pesquisa representa uma importante contribuição para a determinação do teor de CZP, quantificação de suas formas de alta massa molecular e de seus fragmentos. Estas metodologias podem ser adotadas nas diferentes etapas de produção, purificação e controle de qualidade do produto, garantindo sua consistência lote a lote, além de fornecer ferramentas analíticas que podem ser empregadas em estudos dos futuros biossimilares da molécula.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- ✓ 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 avaliação do anticorpo monoclonal Certolizumabe pegol e de suas proteínas de alta massa molecular.
- ✓ 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, avaliação do anticorpo monoclonal Certolizumabe pegol e seus fragmentos.
- ✓ Determinou-se que os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos desenvolvidos e validados apresentaram correlação significativa ($p > 0,05$) para a realização da quantificação da biomolécula intacta.
- ✓ Sugere-se a aplicação dos métodos cromatográficos para avaliação do anticorpo monoclonal Certolizumabe pegol, pois representa contribuição para aprimorar a caracterização do produto biotecnológico, viabilizando a determinação dos seus fragmentos e das proteínas de alta massa molecular.
- ✓ O bioensaio estudado demonstrou sua aplicação para avaliação da atividade biológica do CZP, com base na sua capacidade em inibir o TNF- α em linhagem de células MONO-MAC-6. No entanto, mais estudos serão necessários para otimizar e validar este método.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados, juntamente com o bioensaio executado no presente trabalho, certamente contribuirão para

aprimorar o controle da qualidade e se constituir em avanços para estudo de biosimilar e para área de produtos biotecnológicos no País.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. S. et al. Comparative evaluation of the human whole blood and human peripheral blood monocyte tests for pyrogens. **International journal of pharmaceutics**, v. 265, n. 1-2, p. 115-124, 2003.

APOSTOLAKI, Maria et al. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. **TNF Pathophysiology**, v. 11, p. 1-26, 2010.

ARAÚJO, G. S. A. **Medicamentos Biológicos no Tratamento da artrite reumatoide: segurança sob a perspectiva das notificações espontâneas**. 2017. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2017.

BLICK, S. K. A.; CURRAN, M. P. Certolizumab pegol. **BioDrugs**, v. 21, n. 3, p. 195-201, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Realização do Exercício de Comparabilidade para Registro de Produtos Biológicos**. Brasília, DF, 2011.

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.

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. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2022**. Brasília, DF, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 837, de 18 de abril de 2012. **Define as diretrizes e os critérios para o estabelecimento das Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP)**. Brasília, DF, 2012.

CARDOSO JR, C. D. A. et al. Analysis of streptokinase by validated liquid chromatography methods and correlation with an in vitro bioassay. **Journal of separation science**, v. 40, n. 2, p. 407-414, 2017.

CIMZIA: Certolizumabe pegol. Cotia: AstraZeneca do Brasil Ltda., 2016. Bula de Remédio.

CLOWSE, M. E. B. et al. Minimal to no transfer of certolizumab pegol into breast milk: results from CRADLE, a prospective, postmarketing, multicentre, pharmacokinetic study. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 76, n. 11, p. 1890-1896, 2017.

CONITEC, Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Certolizumabe Pegol para o tratamento da Doença de Crohn**. 2012.

CURTIS, J. R. et al. Long-term safety of certolizumab pegol in rheumatoid arthritis, axial spondyloarthritis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease: a pooled analysis of 11 317 patients across clinical trials. **RMD open**, v. 5, n. 1, p. 01-14, 2019.

DA, W. et al. Efficacy and safety of certolizumab pegol for Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. **Advances in therapy**, v. 30, n. 5, p. 541-553, 2013.

DEEKS, E. D. Certolizumab pegol: a review in inflammatory autoimmune diseases. **BioDrugs**, v. 30, n. 6, p. 607-617, 2016.

DEODHAR, A. et al. A fifty-two-week, randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol in nonradiographic axial spondyloarthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 71, n. 7, p. 1101-1111, 2019.

DIVYADHARSINI, V. et al. Contraindications in the Use of Biological Therapies-Active or Recent History of Malignancy and Neurological Disorders. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 6, p. 910, 2017.

DUMONCEL, R. F. P. et al. Analysis of Denosumab by a Validated CZE Method and Determination of Sialic Acids by the RP-HPLC Method. **Journal of Chromatographic Science**, 2022.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. In: **MAbs**. Taylor & Francis, p. 9-14, 2015.

ECKER, D. M.; CRAWFORD, T. J.; SEYMOUR, P. The therapeutic monoclonal antibody product market. **BioProcess Int**, v. 18, n. 10, 2020.

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

ESPOSITO, M. et al. Certolizumab pegol for the treatment of psoriatic arthritis and plaque psoriasis. **Expert review of clinical immunology**, v. 16, n. 2, p. 119-128, 2020.

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

FDA - Food and Drug Administration. **Frequently Asked Questions About Therapeutic Biological Products**. Maryland, 2015.

FEKETE, S; VEUTHEY, J; GUILLARME, D. Achievable separation performance and analysis time in current liquid chromatographic practice for monoclonal antibody

separations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 141, p. 59-69, 2017.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Saúde aprova parcerias da Fiocruz para produção de biofármacos**. 2018. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/saude-aprova-parcerias-da-fiocruz-para-producao-de-biofarmacos>> Acesso em: 10 jan. 2022.

GABI – Generics and Biosimilars Initiative. **Biosimilars of certolizumab pegol**. 2017. Disponível em: <<http://www.gabionline.net/Biosimilars/General/Biosimilars-of-certolizumab-pegol>> Acesso em: 27 dez. 2021.

GARCIA, V. R. et al. Certolizumab pegol (CDP870) for rheumatoid arthritis in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2017.

GIORGETTI, J. et al. Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis–Mass spectrometry: Assessment and method validation. **Talanta**, v. 178, p. 530-537, 2018.

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

GOYON, A. et al. Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 µm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1498, p. 80-89, 2017.

HAN, M. et al. Intact mass analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis-Mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1011, p. 24-32, 2016.

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**, 2018.

HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, J. et al. The effects of light-accelerated degradation on the aggregation of marketed therapeutic monoclonal antibodies evaluated by size-exclusion chromatography with diode array detection. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 105, n. 4, p. 1405-1418, 2016.

HORTON, S.; WALSH, C.; EMERY, P. Certolizumab pegol for the treatment of rheumatoid arthritis. **Expert opinion on biological therapy**, v. 12, n. 2, p. 235-249, 2012.

HOSHIYAMA, T. et al. Effects of certolizumab pegol on human monocytes. **The Kitasato medical journal**, v. 46, n. 1, p. 60-66, 2016.

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.

IMMUNOGUIDE. **Instructions for Use: Certolizumab pegol ELISA (mAb-based)**. 2017.

KAPLON, H.; REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2019. In: **MAbs**. Taylor & Francis, p. 219-238, 2019.

LAI, Y.; DONG, C. Therapeutic antibodies that target inflammatory cytokines in autoimmune diseases. **International immunology**, v. 28, n. 4, p. 181-188, 2015.

LAUNOIS, R. et al. Comparison of Certolizumab Pegol with Other Anticytokine Agents for Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Multiple-treatment Bayesian Metaanalysis. **The Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 5, p. 835 – 845, 2011.

LLOYD, E. C.; GANDHI, T. N.; PETTY, L. A. Monoclonal antibodies for COVID-19. **JAMA**, v. 325, n. 10, p. 1015-1015, 2021.

MAHADEVAN, U. et al. Placental transfer of anti-tumor necrosis factor agents in pregnant patients with inflammatory bowel disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. v. 11, n. 3, p. 286-292, 2013.

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. et al. 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, n. 2, 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.

MEASE, P. J. Certolizumab pegol in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of its clinical efficacy and safety. **Rheumatology**, v. 50, n. 2, p. 261-270, 2011.

MITTAL, M.; RAYCHAUDHURI, S. P. Golimumab and certolizumab: The two new anti-tumor necrosis factor kids on the block. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 76, n. 6, p. 602, 2010.

MOJESKI, J. A.; KALB, R. E. Infliximab, Golimumab, and Certolizumab Pegol. **Advances in Psoriasis**, p. 173-199, 2021.

MOON, W. et al. Efficacy and safety of certolizumab pegol for Crohn's disease in clinical practice. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 42, n. 4, p. 428-440, 2015.

NA, D. H. et al. Capillary electrophoretic separation of high-molecular-weight poly (ethylene glycol)-modified proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 373, n. 2, p. 207-212, 2008.

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, n. 29, p. 9351-9363, 2013.

NESBITT, A. et al. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor α agents. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 11, p. 1323-1332, 2007.

OHMURA, S. et al. Successful Use of Certolizumab Pegol for Refractory Psoriatic Arthritis Triggered by COVID-19 Infection. **Internal Medicine**, p. 8643-21, 2022.

PASUT, G. Pegylation of biological molecules and potential benefits: pharmacological properties of certolizumab pegol. **BioDrugs**, v. 28, n. 1, p. 15-23, 2014.

PAUL, M. et al. Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 282-290, 2012.

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.

PIEDMONTE, D. M.; TREUHEIT, M. J. Formulation of Neulasta[®] (pegfilgrastim). **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 1, p. 50-58, 2008.

PINTO, V. Entendendo os medicamentos biológicos. **São Paulo: Interfarma**, 2012.

PLAYFAIR, J.H. L.; CHAIN, B. M. **Imunologia Básica: Guia Ilustrado de Conceitos Fundamentais**. Barueri, SP: Editora Manole, 2013.

PORTER, C. et al. Certolizumab pegol does not bind the neonatal Fc receptor (FcRn): consequences for FcRn-mediated in vitro transcytosis and ex vivo human placental transfer. **Journal of reproductive immunology**, v. 116, p. 7-12, 2016.

RATTO, J. J. et al. Ethanol-sodium chloride-phosphate mobile phase for size-exclusion chromatography of poly (ethylene glycol) modified proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 763, n. 1-2, p. 337-344, 1997.

ROBINSON, P. C. et al. The Potential for Repurposing Anti-TNF as a Therapy for the Treatment of COVID-19. **Med**, 2020.

SALERNO, M. S.; MATSUMOTO, C.; FERRAZ, I. **Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento.** 2018.

SANDRA, K.; VANDENHEEDE, I.; SANDRA, P. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 81-103, 2014.

SCHREIBER, S. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 4, n. 6, p. 375-389, 2011.

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.

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.

SHAHBAZI, M. et al. Determination of pegfilgrastim aggregates by size-exclusion high-performance liquid chromatography on a methacrylate-based column. **Biologicals**, v. 46, p. 153-158, 2017.

SHAO, L. M. et al. Meta-analysis: the efficacy and safety of certolizumab pegol in Crohn's disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 29, n. 6, p. 605-614, 2009.

SILVEIRA, R. L. **Estudo de Metodologias para Avaliação de Pirogênios.** 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1997.

SMERAGLIA, J.; SILVA, J.; JONES, K. Improving the sensitivity and specificity of a bioanalytical assay for the measurement of certolizumab pegol. **Bioanalysis**, v. 9, n. 16, p. 1217-1226, 2017.

SOUSA, F.; GONÇALVES, V. M. F.; SARMENTO, B. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the quantification of monoclonal antibody bevacizumab from polyester-based nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 142, p. 171-177, 2017.

SOUTO, R. B. et al. Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with reversed-phase liquid chromatography and bioassay. **Talanta**, v. 123, p. 179-185, 2014.

SUBA, D.; URBÁNYI, Z.; SALGÓ, A. Method development and qualification of capillary zone electrophoresis for investigation of therapeutic monoclonal antibody quality. **Journal of Chromatography B**, v. 1032, p. 224-229, 2016.

TURKMEN, M.; DOGAN, S. Certolizumab pegol in the treatment of psoriasis: Real-life data. **Dermatologic Therapy**, v. 34, n. 3, p. e14929, 2021.

UCB Inc. **CIMZIA® (certolizumab pegol) - Product Monograph**, 2014.

UCB Inc. **Cimzia prescribing information**. Smyrna (GA), 2011.

UEDA, T. Next-generation optimized biotherapeutics—A review and preclinical study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 11, p. 2053-2057, 2014.

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

VOETEN, R. L. C. et al. Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances. **Analytical chemistry**, v. 90, n. 3, p. 1464-1481, 2018.

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.

WATIER, H.; REICHERT, J. M. Evolution of antibody therapeutics. **Protein Therapeutics**, v. 1, p. 25-49, 2017.

YAMAMOTO, A. et al. A cell line assay system for predicting the response of human blood to endotoxin. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 56, n. 3, p. 93-100, 2003.

ZELIKIN, Alexander N.; EHRHARDT, Carsten; HEALY, Anne Marie. Materials and methods for delivery of biological drugs. **Nature chemistry**, v. 8, n. 11, p. 997-1007, 2016.

ZHANG, J. et al. Method development and validation of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for the characterization of a monoclonal antibody. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 53, n. 5, p. 1236-1243, 2010.

ZHAO, S. S.; CHEN, D. D. Y. Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics. **Electrophoresis**, v. 35, n. 1, p. 96-108, 2014.