

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

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR  
EXCLUSÃO MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DE  
INTERFERON-ALFA 2a E ESTUDOS DE  
CORRELAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Estevan Sonego Zimmermann**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR  
EXCLUSÃO MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DE  
INTERFERON-ALFA 2a E ESTUDOS DE CORRELAÇÃO**

**por**

**Estevan Sonogo Zimmermann**

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

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Departamento de Farmácia Industrial**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR EXCLUSÃO  
MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DE INTERFERON-ALFA 2a E  
ESTUDOS DE CORRELAÇÃO**

elaborada por  
**Estevan Sonogo Zimmermann**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

**Simone Gonçalves Cardoso, Dr<sup>a</sup> (UFSC)**

**Carlos Roberto Soares, Dr. (IPEN-USP)**

Santa Maria, 30 de Setembro de 2010.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, saúde e força para enfrentar os obstáculos;  
ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, confiança, orientação e revisão crítica;  
aos colegas e bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos  
Biológicos e Bioequivalência, em especial Diogo Paim Leal, Felipe Bianchini D'Avila e  
Ricardo Souto, pelo apoio e amizade;

aos meus pais, Sady Martim e Josete , pelo amor, educação e apoio incondicional na  
passagem de mais uma etapa;

ao meu irmão Samuel e minha irmã Elisa, pelo carinho e incentivo;

à Tiane Dias Canabarro, pelo carinho, apoio e compreensão;

aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial, em especial a  
Alessandra Fagundes da Costa, João Luiz Rizzi, Rosecler da Rosa Kulmann e Silvana Ferreira  
Vaccari;

à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

à CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão  
deste trabalho.

“Sonhos não morrem, apenas adormecem na alma da gente.”

Chico Xavier

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR EXCLUSÃO MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO DE INTERFERON-ALFA 2a E ESTUDOS DE CORRELAÇÃO**

AUTOR: ESTEVAN SONEGO ZIMMERMANN

ORIENTADOR: PROF. SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de Setembro de 2010.

O interferon- $\alpha$ 2a humano (hIFN- $\alpha$ 2a) é uma proteína produzida pelas células do sistema imune com propriedades imunomoduladora, antiviral e antiproliferativa. No presente trabalho, foi validado método por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM), para determinação de interferon- $\alpha$ 2a recombinante (rhIFN- $\alpha$ 2a) em formulações farmacêuticas sem albumina. O método CL-EM foi validado empregando coluna BioSep-SEC-2000 S (300 mm x 7,8 mm d.i.) mantida a temperatura de 25°C. A fase móvel foi composta de tampão fosfato de potássio monobásico 0,001 M, fosfato de sódio dibásico 0,008 M e cloreto de sódio 0,2 M, pH 7,4, eluída em gradiente de fluxo e utilizando arranjo de diodos (DAD) com detecção em 214 nm. A separação cromatográfica foi alcançada com o tempo de retenção de 17,2 min e o método foi linear no intervalo de concentração de 0,5-50 MUI/mL ( $r^2 = 0,9996$ ). A exatidão média foi de 101,39%, com erro calculado inferior a 1,67%. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,22 e 0,5 MUI/mL, respectivamente e a validação demonstrou parâmetros aceitáveis de precisão e robustez. O método proposto foi aplicado para análise de formulação farmacêutica de rhINF- $\alpha$ 2a e os teores/potências correlacionados com aqueles fornecidos pelos métodos previamente validados por CL-FR e bioensaio *in vitro*. Estabeleceu-se correlação entre os métodos, demonstrando que os biofármacos comerciais apresentaram diferenças entre as médias 1,5% maiores para o CL-EM, e 2,45% menores para CL-FR, em relação ao bioensaio. Assim, contribuiu-se para estabelecer alternativas que aprimoram o controle de qualidade, assegurando a eficácia terapêutica do produto biológico. Além disso, avaliaram-se os parâmetros farmacocinéticos das formulações A e B após injeção subcutânea em ratos, demonstrando perfis comp com  $C_{max}$  de 7924,60 e 8698,68 pg/mL, respectivamente, e  $T_{max} = 60$  min.

Palavras-chave: Interferon- $\alpha$ 2a, cromatografia líquida por exclusão molecular, bioensaio, validação.

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science  
Federal University of Santa Maria

### **VALIDATION OF A SIZE-EXCLUSION LC METHOD FOR THE EVALUATION OF rhIFN- $\alpha$ 2a AND CORRELATION STUDIES**

AUTHOR: ESTEVAN SONEGO ZIMMERMANN

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, September 30<sup>th</sup> 2010.

Human interferon- $\alpha$ 2a (hIFN- $\alpha$ 2a) is a natural protein produced by the cells of the immune system with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties. A size exclusion liquid chromatography (SE-LC) method was validated for the determination of recombinant interferon- $\alpha$ 2a (rhIFN- $\alpha$ 2a) in pharmaceutical formulations without human serum albumin. The SE-LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.) maintained at 25°C. The mobile phase consisted of 0.001 M monobasic potassium phosphate, 0.008 M sodium phosphate dibasic and 0.2 M sodium chloride buffer, pH 7.4, run at a gradient flow rate and using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The chromatographic separation was achieved with retention time of 17.2 min, and was linear over the concentration range of 0.5-50 MUI/mL ( $r^2 = 0.9996$ ). The accuracy was 101.39% with bias lower than 1.67%. The limits of detection and quantitation were 0.22 and 0.5 MIU/mL, respectively, and the method validation demonstrated acceptable results for precision and robustness. The proposed method was applied for the analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical dosage forms, and the content/potencies correlated to the previously validated reversed-phase (RP-LC), and the *in vitro* bioassay. The pharmaceutical samples were analyzed by the chromatographic methods and compared to the bioassay, showing mean differences between the estimated potency of 1.50% higher for SE-LC, and 2.45% lower for the RP-LC. The alternative methods studies contribute to improve the quality control, assuring the therapeutic efficacy of the biological medicine. Moreover, the pharmacokinetic parameters of the formulations A and B were evaluated by subcutaneous injection in rats, showing comparable profiles with  $C_{max}$  of 7924.60 and 8698.68 pg/mL, respectively, and  $T_{max} = 60$  min.

Keywords: Interferon- $\alpha$ 2a, size exclusion liquid chromatography, bioassay, validation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura primária do rhIFN- $\alpha$ 2a com suas duas pontes dissulfeto, adaptada (CINDRIC & VULETIC, 2003).....17

FIGURA 2 - Mecanismo de ação do interferon frente a estímulo viral, adaptada (ALARCÓN-RIQUELME et al., 2006).....18

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1**

FIGURE 1 - Representative SE-LC chromatograms of interferon- $\alpha$ 2a reference standard solution (A); pharmaceutical formulation (6 MIU/mL) (B); After degradation by glutaraldehyde (C). Peak 1, 5 and 7 = excipients, peak 2 = aggregates, peak 3 = dimmers, peak 4 = interferon- $\alpha$ 2a, peak 6 = glutaraldehyde.....52

### **DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE rhIFN- $\alpha$ 2a 4.1**

FIGURA 1 - Determinação da concentração do rhINF- $\alpha$ 2a no plasma por enzimaímmunoensaio, em relação aos tempos de coleta para cada animal.....57



## LISTA DE TABELAS

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1**

TABLE 1 - Inter-days and between-analysts precision data of SE-LC for interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations.....47

TABLE 2 - Accuracy of SE-LC for interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations.....48

TABLE 3 - Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing...49

TABLE 4 - Determination of interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations by the SE-LC method.....50

TABLE 5 - Comparative content/potencies evaluation of interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations by chromatographic methods and bioassay.....51

### **DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE rhIFN- $\alpha$ 2a 4.1**

TABELA 1- Valores obtidos para formulações A e B por enzimaensaio.....56

## LISTA DE ABREVIATURAS

BP	Farmacopéia Britânica/British Pharmacopoeia
Células NK	Células natural killer
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human use
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coeficiente de variação
CV%	Coeficiente de variação percentual
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de díodos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMCV	Vírus da encefalomiocardite
EMEA	European Medicines Agency
EP	Farmacopéia Européia
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de interferon- $\alpha$
IRF	Elemento responsivo pelo estímulo do interferon
JAK	Janus quinase
kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD/LOD	Limite de detecção
LQ/LOQ	Limite de quantificação
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minutos
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MUI	Milhões de unidades internacionais
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pI	Ponto isoelétrico
PEG	Polietilenoglicol
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
rhIFN- $\alpha$ 2a	Interferon-alfa2a humano recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TYK	Tirosina quinase
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
VSV	Vírus da estomatite vesicular
°C	Grau Celsius
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>26</b>
<b>4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE rhIFN-<math>\alpha</math>2a.....</b>	<b>53</b>
4.1 Materiais.....	54
4.2 Seleção dos animais e administração das amostras.....	54
4.3 Coleta e separação do plasma.....	55
4.4 Determinação de rhIFN- $\alpha$ 2a por ELISA.....	55
4.5 Procedimento.....	55
4.6 Resultados.....	56
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

## **INTRODUÇÃO**

---

# 1 INTRODUÇÃO

---

Os interferons são citocinas potentes que apresentam atividade antiviral, imunomoduladora e antiproliferativa. São produzidos pelas células, em resposta a diferentes estímulos, que incluem ácidos nucleicos virais, células estranhas, particularmente as neoplásicas, antígenos de bactérias (BARON et al., 1992; PFEFFER et al., 1998).

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a clonagem e expressão do gene do interferon alfa humano (hIFN- $\alpha$ ) em bactérias, especialmente *Escherichia coli*, com produção do interferon alfa humano recombinante (rhIFN- $\alpha$ ), que se encontra disponível sob a forma não-glicosilada. Devido às suas atividades farmacológicas, está sendo utilizado clinicamente para tratamento de hepatites B e C crônicas, leucemias, sarcoma de Kaposi, linfomas, melanomas, mielomas e carcinomas (FELD & HOOFNAGLE et al., 2005; SILVA et al., 2008).

Estruturalmente o rhIFN- $\alpha$ 2a é uma proteína não glicosilada com 165 aminoácidos, com duas pontes dissulfeto e massa molecular de, aproximadamente, 19,2 kDa (KLAUS et al., 1997).

Diferentes metodologias analíticas têm sido aplicadas para avaliação da identidade, pureza e potência de produtos biotecnológicos. A presença de formas relacionadas e degradadas nas proteínas recombinantes de uso terapêutico pode causar respostas imunológicas e redução ou perda da atividade farmacológica (DIRESS et al., 2010). Desse modo, deve ser determinado seu conteúdo e estabelecidos limites nos produtos farmacêuticos.

Recentemente, foram introduzidos bioensaios baseados na avaliação da atividade antiproliferativa em células Daudi, determinando as respostas espectrofotométricas com corantes vitais como azul de alamar e sais de tetrazólio. A potência do rhIFN- $\alpha$  também tem sido realizada através de ensaio biológico *in vitro*, baseado na inibição do efeito citopático das linhagens virais (VSV e EMCV) sobre linhagens celulares (MDBK e WISH) (MEAGER et al., 2001; CASERMAN et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Por sua vez, os métodos por cromatografia líquida viabilizam a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas, sendo estudados como alternativa ou para uso em combinação com os bioensaios. Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) com detecção no ultravioleta tem sido utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e determinação das formas oxidadas e

desamidadas de proteínas (SILVA et al., 2009). Do mesmo modo, a cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) é uma técnica versátil adotada para determinação de proteínas e das formas agregadas na sua configuração nativa, devido as condições de eluição compatíveis com as macromoléculas biológicas (QIAN et al., 2008).

Acrescenta-se que após o desenvolvimento do método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que o procedimento atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ICH, 2005; ROZET et al., 2007). A avaliação de biomoléculas produzidas por expressão em sistemas celulares, por métodos eficientes e validados é necessário para assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos, durante o processo de registro. Além disso, são importantes para viabilizar possíveis estudos de similaridade de macromoléculas biologicamente ativas. Por sua vez, as especificações preconizadas para os produtos biológicos visam garantir a eficácia e segurança clínica (EMEA, 2005; EMEA, 2007; LONGSTAFF et al., 2009).

O presente trabalho teve por objetivos desenvolver e validar método por cromatografia líquida: a) por exclusão molecular para a avaliação de potência, determinação de dímeros e agregados de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos sem albumina na formulação; b) estabelecer correlação com o método validado por fase reversa e com o bioensaio da atividade antiproliferativa em células Daudi; c) Determinar parâmetros farmacocinéticos em diferentes produtos farmacêuticos. Desse modo, pretendeu-se contribuir para o estabelecimento de alternativas que contribuam para aprimorar o controle de qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

---



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Os interferons humanos são proteínas naturais produzidas por células do sistema imune com propriedades antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. Entre mais de 12 subtipos naturais do IFN- $\alpha$ , interferon- $\alpha 2a$  recombinante humano (rhIFN- $\alpha 2a$ ), está sendo comercializado para o tratamento de doenças crônicas, como hepatite B e C, de câncer carcinoma, leucemia e mieloma múltiplo.

Estruturalmente o rhIFN- $\alpha 2a$  é uma proteína constituída de 165 aminoácidos, contendo duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições (Cis<sup>1,98</sup> e Cis<sup>29,138</sup>), com ponto isoelétrico (pI) entre 5,8 e 6,3 e massa molecular de, aproximadamente, 19,2 kDa. A fórmula química é C<sub>860</sub>H<sub>1353</sub>N<sub>229</sub>O<sub>255</sub>S<sub>9</sub> e a estrutura primária está representada na figura 1 (KLAUS et al., 1997; BP, 2010; THITINAN & McCONVILLE, 2009; CINDRIC & VULETIC, 2003).

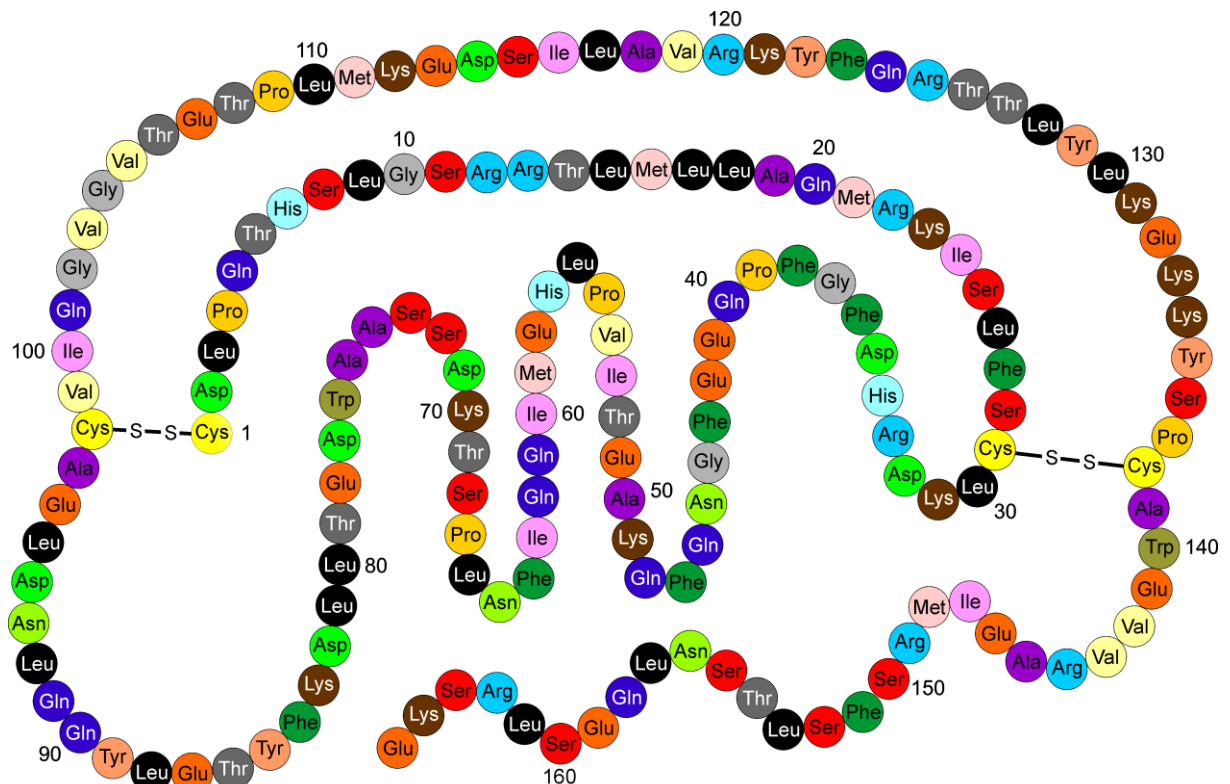


Figura 1 – Estrutura primária do rhIFN- $\alpha 2a$  com suas duas pontes dissulfeto, adaptada (CINDRIC & VULETIC, 2003).

A produção inicial do IFN ocorre através de indutores, que podem ser componentes de célula alogênica, ácido nucléico ou antígenos estranhos, que interagem com as células,

ativando os genes do IFN, seguido da produção do mRNA. Após tradução, o IFN é secretado para o fluído extracelular onde interage com receptor na membrana das células produtoras ou células ativadas. Essas ativam os genes que codificam proteínas efetoras, as quais causam resistência antiviral e alteração de células vizinhas para então produzir proteínas efetoras, como mostra a figura 2 (BARON & DIAZANI, 1994; MATTHEWS & McCOY, 2004; PESTKA et al., 2004; FELD & HOOFNAGLE, 2005).

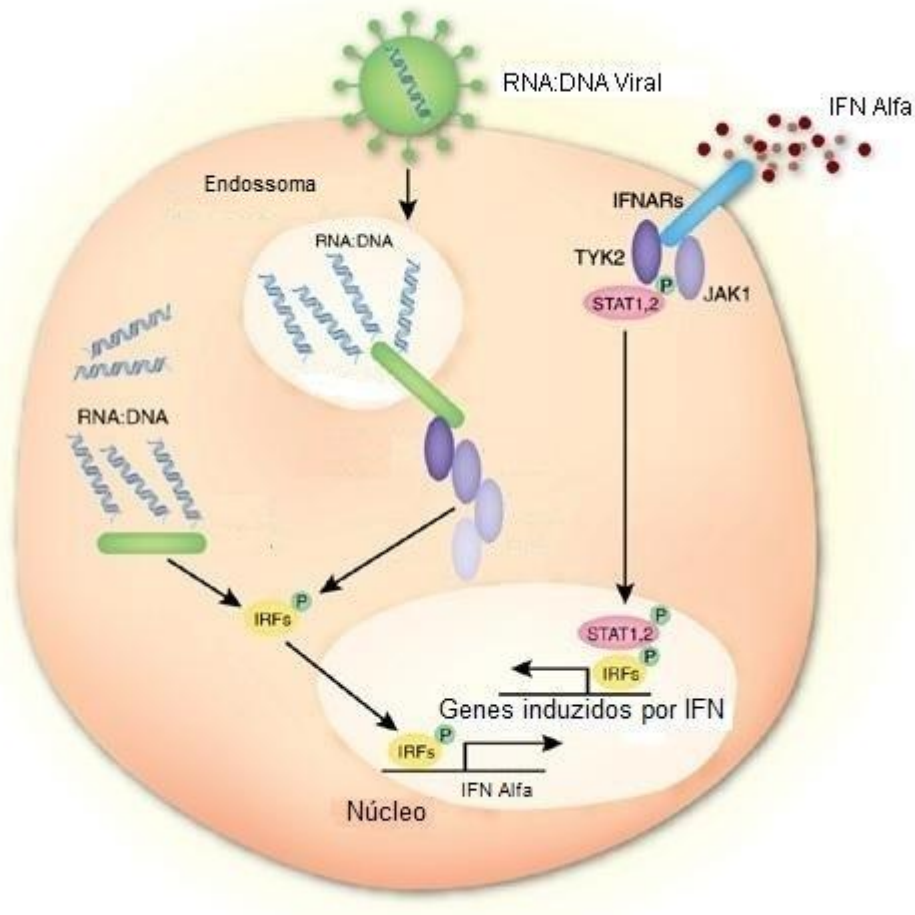


Figura 2 – Mecanismo de ação do interferon frente a estímulo viral, adaptada (ALARCÓN-RIQUELME, 2006).

O rhIFN- $\alpha$ 2a encontra-se disponível como produto farmacêutico para injeção intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). A dose inicial para pacientes com hepatite C crônica é de 3 milhões de unidades internacionais, sendo administrada três vezes por semana durante 24-48 semanas (THITINAN & McCONVILLE, 2009).

O IFN- $\alpha$  possui potente atividade antiviral, agindo através da indução de genes, protegendo as células da infecção ou atenuando a produção de pró-genes em células já

infectadas e ativando mecanismos indiretos da resposta imune (SAMUEL, 2001; FELD & HOOFNAGLE, 2005).

A atividade antiproliferativa do IFN- $\alpha$  ocorre pela ação nas células tumorais de maneira direta ou mediante a ativação das células citotóxicas do sistema imune do hospedeiro, tais como linfócitos T, células NK e macrófagos. O IFN- $\alpha$  também participa da regulação da diferenciação celular, sendo este efeito a base da terapia da leucemia pilosa, anomalia que é causada por bloqueio na diferenciação das células mielóides em fase de maturação (MEAGER, 2002; LANGER, 2007).

O IFN- $\alpha$  exerce atividades regulatórias sobre o sistema imune, tais como: aumento da expressão do antígeno de MHC classe I, aumento da expressão de receptores de Fc, elevação da produção de anticorpos por maturação de células B, ativação de macrófago, estimulação da atividade de células NK, aumento da produção de interleucina-1 e fator de necrose tumoral por macrófagos e monócitos e aumento da citotoxicidade (PFEFFER et al., 1998, ORITANI et al., 2001; SAMUEL, 2001).

O IFN $\alpha$  tem sido usado desde 1986, para o tratamento de hepatite C, combinado ou não com a ribavirina. A terapia resulta em rápido declínio dos níveis do vírus da hepatite C no soro e, a longo prazo, ocorre sua extinção no soro e fígado, ocorrendo a cura da infecção crônica (FELD & HOOFNAGLE, 2005; THITINAN & McCONVILLE, 2009).

O IFN- $\alpha$ 2a é quantificado no plasma 4-8 horas após injeção intravenosa e por 16-30 horas após administração IM ou SC (MATTHEWS et al., 2004; FOSER et al., 2003). É amplamente distribuído nos tecidos corporais com altas concentrações no baço, rins, fígado e pulmão. O volume de distribuição em humanos é de 20-60% do peso corporal e a meia-vida de eliminação do plasma após injeção IV é rápida (2-3 horas) e após administração SC e IM é mais lenta (3-8 horas). Os IFNs são totalmente filtrados nos glomérulos e degradados por proteases durante a reabsorção tubular (CHATELUT et al., 1999; THITINAN & McCONVILLE, 2009). Estudos de farmacocinética em humanos mostraram que a meia-vida *in vivo* de IFN- $\alpha$  é relativamente curta devido à depuração renal rápida e susceptibilidade às proteases do soro (WILLS et al., 1984; BAILON et al., 2001; SHECHTER et al., 2001; WANG et al., 2002).

Os ensaios biológicos *in vitro* têm sido amplamente utilizados para determinação de potência de rhIFN- $\alpha$ . Esses ensaios baseiam-se na inibição do efeito citopático de linhagens virais (VSV e EMCV) sobre linhagens celulares (MDBK e WISH), com as respostas espectrofotométricas determinadas com corantes vitais como azul de alamar e sais de tetrazólio (MEAGER et al., 2001; FOSER et al., 2003; BP, 2010).

Os IFNs exercem atividade antiproliferativa variável, sendo as células diplóides relativamente resistentes e as células precursoras hematopoiéticas, principalmente da linhagem mielóide mais sensíveis a inibição. Nesse sentido, recentemente tem sido usada a linhagem de células Daudi derivada do linfoma de Burkitt, para bioensaios de avaliação de potência de interferons do tipo I, com sensibilidade e reprodutibilidade. Demonstrou-se também, a correlação dos resultados com o ensaio de atividade antiviral (MEAGER, 2002).

No estudo colaborativo internacional da Organização Mundial da Saúde (OMS) que estabeleceu o padrão biológico de referência de rhIFN- $\alpha$  foram adotados vários modelos de ensaios antivirais, com diferentes células, vírus e procedimentos, demonstrando-se respostas semelhantes. Além disso, pesquisaram-se bioensaios alternativos que não utilizam linhagem viral, que com calibração e validação adequadas podem ser usados para a avaliação de potência em formulações farmacêuticas (MEAGER et al., 2001). Nesse contexto, foi desenvolvido o bioensaio baseado na atividade antiproliferativa com células Daudi, bem como o bioensaio em linhagem de células geneticamente modificadas com ativação de promotor e expressão de marcadores enzimáticos como fosfatase alcalina (MEAGER, 2002; CASERMAN et al., 2007; SILVA et al., 2008).

A substância de referência de rhIFN- $\alpha$ 2a da Farmacopéia Européia (E.P.) é indicada para métodos físico-químicos, sem apresentar informação sobre sua atividade biológica (EP, 2007). Por outro lado, o 2º Padrão Internacional de rhIFN- $\alpha$ 2a, da Organização Mundial da Saúde, possui atividade definida e é indicado para avaliação de potência biológica. A atividade das duas preparações de referência foram comparadas em diferentes modelos de bioensaios, demonstrando atividades específicas similares, sendo então sugerido também o uso do padrão de referência da EP para bioensaios (SILVA et al., 2007).

As proteínas requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com o sítio de ação. Por essa razão, é enfatizada a caracterização físico-química para demonstrar estruturas correspondentes às formas biologicamente ativas dos produtos biotecnológicos. As instabilidades químicas e físicas de proteínas recombinantes têm sido investigadas por diferentes técnicas analíticas que incluem cromatografia líquida, espectrometria de massas, análise térmica e eletroforese capilar. Esses procedimentos, juntamente com os ensaios de atividade biológica e enzimaensaio, possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, bem como avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos, que por sua vez, podem contribuir para o desenvolvimento de novas moléculas similares (ICH 2005; RAO & NAGARAJU, 2003; EMEA, 2005; EP, 2007; LONGSTAFF et al., 2009).

Os avanços na compreensão do comportamento de proteínas, incluindo o IFN- $\alpha$ , instabilidades e estabilização em meio líquido, foram revisados visando o desenvolvimento das formulações. Paralelamente, foram destacadas as formas degradadas e metodologias analíticas publicadas na literatura, usadas juntamente com os ensaios biológicos, para a caracterização e avaliação de diferentes proteínas (WANG, 1999).

A cromatografia líquida destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como método específico, sensível, robusto e reproduzível, com custo e duração de análise adequados (ZARRIN et al., 2006). Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM), baseados na hidrofobicidade e tamanho das moléculas, respectivamente, são técnicas amplamente empregadas para a separação e controle de qualidade de proteínas. Possibilitam avaliar alterações físico-químicas e modificações pós-traducionais na estrutura, que incluem oxidação de resíduos de metionina, sulfatação, desamidação e agregação, que podem ocorrer devido a fatores como processo de produção, escolha do sistema de expressão, formulação e condições de armazenamento (HERMELING et al., 2004; SILVA et al., 2008; SILVA Jr, 2004).

Especialmente, as proteínas podem formar dímeros e oligômeros de alta massa molecular, cujas variantes podem conter ligações covalentes, não-covalentes ou por pontes dissulfeto, e apresentar bioatividade reduzida e reações imunogênicas. Essas agregações podem ser induzidas por temperaturas elevadas, agitação mecânica, mudanças de pH, liofilização, aumento da concentração de sais e interação com embalagem. A CL-EM é a melhor opção analítica para avaliar a provável presença de impurezas resultantes da fragmentação, agregação ou oligomerização. Nesse contexto, a CL-EM foi utilizada para determinação das proteínas e suas espécies agregadas na sua forma nativa, com fases móveis constituídas de tampões na faixa de pH de 6-8, minimizando assim, a desnaturação das proteínas (BARTH et al., 1998; TREUHEIT et al., 2002; GOETZ et al., 2004; QIAN et al., 2008).

A CL-EM com detecção de fluorescência intrínseca, usando colunas TSK 3000 e 2000 gel, foi desenvolvida para a avaliação da estabilidade e perfis de degradação do IFN- $\alpha$ 2 em formulações farmacêuticas, evidenciando diferenças na atividade e na estrutura dos agregados de alta massa molecular e da proteína nativa. Os autores observaram que a detecção por fluorescência apresentou sensibilidade seis vezes maior e melhor linearidade, em relação à detecção por UV, com limite de quantificação de 83 ng /mL. Os bioensaios demonstraram

redução de até 87% na atividade biológica em relação à molécula original (DIRESS et al., 2010).

Por outro lado, os métodos por CL-FR, apresentam como inconveniente a possível desnaturação ou dissociação das proteínas adsorvidas à matriz da coluna, podendo não ser apropriados para estabelecer a potência de produtos farmacêuticos que contenham oligômeros não covalentes e polímeros biologicamente inativos (AHRER & JUNGBAUER, 2006; BUCHHEIT et al., 2002; DALMORA et al., 1997; WANG, 1999; OLIVEIRA et al., 2007).

A validação do método de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) por fase reversa usando coluna C<sub>18</sub>, foi usado para quantificar IFN- $\alpha$ 2b após a etapa de fermentação. O método desenvolvido apresentou o valor 0,025 mg/mL e 0,008 mg/mL para os limites de quantificação e de detecção, respectivamente. Os demais parâmetros de validação, mostraram-se adequados para a quantificação do rhIFN- $\alpha$ 2b em corpos de inclusão durante o processo de expressão do fármaco (CUETO-ROJAS et al.; 2010).

Procedimentos físico-químicos e ensaios biológicos foram adotados para detectar alterações nas preparações de rhIFN- $\alpha$ 2a e rhIFN- $\alpha$ 2b sob condições de estresse. As amostras foram submetidas às condições que incluem oxidação de resíduos de metionina e armazenamento em temperaturas elevadas por diferentes períodos de tempo. Os autores demonstram a complementariedade dos métodos por CL-EM, CL-FR e espalhamento de luz dinâmico, para detectar alterações estruturais nos produtos biofarmacêuticos (SILVA et al.; 2008).

Formulações aquosas de rhIFN- $\alpha$ 2b, sem albumina foram pesquisadas para avaliar os efeitos de estabilizantes, como polissorbato e polietilenoglicol (PEG), visando também reduzir os efeitos imunogênicos de possíveis agregados. As análises foram realizadas por CL-FR, ensaio da atividade antiviral, ensaio imunoenzimático e também por estudos de farmacodinâmica e farmacocinética para demonstrar a estabilidade de longa-duração (RUIZ et al., 2003).

A titulação por calorimetria isotérmica, no estudo da estabilidade física de interferon- $\alpha$ 2a, foi aplicada para avaliar a influência dos diferentes fatores, incluindo temperatura, sais e tensoativos, e a importância do equilíbrio entre as forças intra e intermoleculares. As análises de formas agregadas foram realizadas por CL-EM, sendo sugerido o procedimento para monitorar os estágios de purificação, desenvolvimento e armazenagem de formulações (HUANG et al., 2005).

Sharma & Kalonia (2003) estudaram os efeitos das características da solução na conformação estrutural de rhIFN- $\alpha$ 2a, investigando a tendência de formar intermediários

parcialmente alterados. As propriedades estruturais da proteína foram estudadas em diferentes pHs (2,0 - 7,4) e temperaturas (5 - 80°C) utilizando espectrometria por fluorescência, dicroísmo circular e calorimetria diferencial. Os autores observaram maiores alterações nas soluções com altas temperaturas e baixos pH.

A agregação de proteínas, os mecanismos envolvidos, os fatores de influência e procedimentos para inibição nos estudos de formulação, foram tratados em recentes revisões da literatura (WANG, 2005; WANG et al., 2010). Os autores avaliaram metodologias sugeridas para análise durante o desenvolvimento de produtos acabados, avançaram para os efeitos colaterais e avaliação da atividade biológica dessas formas características da instabilidade da proteína e dos possíveis efeitos imunogênicos gerados pelo uso desses produtos biotecnológicos.

Destaca-se também o avanço no sentido do desenvolvimento de novas moléculas, especialmente a forma peguilada, que foi estudada e caracterizada por diferentes técnicas analíticas que incluem eletroforese, cromatografia líquida e espectrometria de massas avaliando-se também a atividade de isômeros. Paralelamente, foi efetuada a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos, em ratos, comparando diferentes vias de administração para produtos peguilados e não-modificados, demonstrando suas vantagens terapêuticas (FOSER et al., 2003; HARRIS & CHESS, 2003; ARDUINI et al., 2004).

Devido aos efeitos colaterais indesejados, foram estudadas mudanças na molécula protéica, como a conjugação de IFN- $\alpha$ 2a com polímeros de PEG, propiciando a preparação de formas peguiladas sítio-direcionadas que se encontram em uso terapêutico. As reações, método de conjugação e purificação foram revisados destacando-se os avanços necessários e a compreensão da peguilação (FEE & ALSTINE, 2006). A peguilação de proteínas é um método bem estabelecido para diminuição de sua eliminação, redução de sua imunogenicidade e aprimoramento das propriedades físicas (GLUE et al., 2000). Essas propriedades possibilitaram diminuir a frequência de administração para uma vez por semana, mantendo-se estável a concentração sanguínea e aumentando a eficácia do tratamento de pacientes com hepatite C crônica. As meias-vida observadas de IFN- $\alpha$ 2a não modificado e peguilado foram de 2,3 e 50 horas, respectivamente (MATTHEWS & McCOY, 2004).

O rhIFN- $\alpha$ 2b peguilado foi submetido à caracterização estrutural e biológica por diferentes técnicas analíticas, comparando com a forma nativa (GRACE et al., 2001). O rhIFN- $\alpha$ 2a foi monoconjugado com PEG e os diferentes isômeros de posição foram isolados e caracterizados por técnicas analíticas incluindo eletroforese, CL-FR e CL-EM, espectrometria de massas e bioensaio antiviral, demonstrando atividade variável de cada forma (FOSER et

al., 2003). Derivados do rhIFN- $\alpha$  foram preparados usando a combinação de metoxipoli(etil)enoglicol, com massas de 2 e 5 kDa, com técnicas de microencapsulação, e submetidos à estudos de caracterização (DIWAN & PARK, 2003). A peguilação sítio-específica de rhIFN- $\alpha$ 2a foi estudada através da adsorção por interação eletrostática, da proteína em matriz de troca iônica com PEG-aldeído de massas moleculares 5, 10 e 20 kDa, em meio ácido. Diferentes técnicas foram usadas para caracterizar a forma modificada incluindo estabilidade térmica e ensaio da atividade antiviral (LEE et al., 2007).

A Farmacopéia Britânica 2010 (BP, 2010), em sua monografia da solução concentrada de rhIFN- $\alpha$ 2a, especifica potência de não menos que 140 MUI/mg de proteína e, além disso, deve conter quantidade superior a 200 MUI/mL de rhIFN- $\alpha$ 2a. A potência estimada nos ensaios deve estar entre 80 – 125% e os intervalos de confiança (P=0,95) de 64 – 156%. A Farmacopéia Americana (USP 33, 2010) não faz referência ao rhIFN- $\alpha$ 2a.

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005; SHABIR, 2007; FDA, 2001; USP 33, 2010). Os principais parâmetros a serem avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. Esses parâmetros encontram-se detalhadamente descritos em dissertações já desenvolvidas no laboratório de produtos biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (SILVA, 2009; BARTH, 2007) e no artigo submetido. Desse modo, esses parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (SWARTZ & KRULL, 1998; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; ROZET et al., 2007; INJAC et al., 2008).

Os estudos de métodos físico-químicos, alternativos aos bioensaios *in vitro*, são importantes para as análises qualitativas e quantitativas das proteínas relacionadas, e das formas de alta massa molecular das macromoléculas biologicamente ativas. Além disso, a precisão, exatidão, condições e facilidade de execução em relação ao ensaio biológico contribuem para aprimorar o controle da qualidade dos produtos biológicos. Atualmente, os métodos preconizados para as etapas pré-clínicas, avaliação de identidade, pureza, potência e caracterização das biomoléculas são importantes, também, para fundamentar estudos de biosimilaridade conforme preconizam os guias internacionais, com os avanços sucessivos na área de bioterapêuticos (CHMP, 2005; EMEA, 2005).

Nesse sentido, convém destacar que as estruturas moleculares tridimensionais complexas de alta massa molecular dos biofármacos e sua heterogeneidade, na dependência do processo de produção de células vivas, fazem com que os biofármacos sejam diferentes



dos fármacos clássicos. Assim, os métodos analíticos usuais não conseguem caracterizar estas moléculas suficientemente para confirmar a equivalência estrutural com a molécula de referência. Consequentemente, tem sido usada a combinação de métodos que representam a tecnologia do estado-da-arte para caracterização e estudos de comparabilidade desses biossimilares. Os guias e os parâmetros legais têm sido atualizados observando também o impacto na segurança e eficácia terapêutica (SCHELLEKENS, 2009; KRESSE, 2009; SCHELLEKENS & MOORS, 2010).

## **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA**

---

### 3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

---

3.1 – Zimmermann; E.S; Silva; L.M.; Dalla Lana; A.J.; Leal; D.P; Pavani Stam; F.P.; Dalmora; S.L. Validation of a Stability-Indicating Size-Exclusion LC Method and Evaluation of rhIFN- $\alpha$ 2a in Pharmaceutical Formulations by Liquid Chromatography and Bioassay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. Submetido 14/07/2010**

**Validation of a Stability-Indicating Size-Exclusion LC Method and  
Evaluation of rhIFN- $\alpha$ 2a in Pharmaceutical Formulations by Liquid  
Chromatography and Bioassay**

Estevan Sonogo Zimmermann<sup>b</sup>; Lucélia Magalhães da Silva<sup>b</sup>; Aline Jacobi Dalla Lana<sup>a</sup>;  
Diogo Paim Leal<sup>b</sup>; Fernanda Pavani Stam<sup>a</sup> and Sérgio Luiz Dalmora<sup>a\*</sup>

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

Running Title: "Interferon- $\alpha$ 2a SE-LC Method"

\*Corresponding author. Tel./fax: + 55 55 32208952

*E-mail address:* [sdalmora@terra.com.br](mailto:sdalmora@terra.com.br) (Sérgio Luiz Dalmora)

**Abstract:** A size exclusion liquid chromatography (SE-LC) method was validated for the determination of interferon- $\alpha$ 2a (rhIFN- $\alpha$ 2a) in pharmaceutical formulations without human serum albumin. The SE-LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.). The mobile phase consisted of 0.001 M monobasic potassium phosphate, 0.008 M sodium phosphate dibasic and 0.2 M sodium chloride buffer, pH 7.4, run at a gradient flow rate and using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The chromatographic separation was achieved with retention time of 17.2 min, and was linear over the concentration range of 0.5-50 MIU/mL ( $r^2 = 0.9996$ ). The accuracy was 101.39% with bias lower than 1.67%. The limits of detection and quantitation were 0.22 and 0.5 MIU/mL, respectively. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision and robustness. The proposed method was applied for the analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical dosage forms, and the content/potencies correlated to the previously validated reversed-phase (RP- LC), and the *in vitro* bioassay, contributing to establish alternatives to characterize and monitoring its instability and to improve the quality control, assuring the therapeutic efficacy of the biological medicine.

**Keywords:** Interferon- $\alpha$ 2a, Size Exclusion Liquid Chromatography, Pharmaceutical formulations, Validation, Correlations.

## INTRODUCTION

Human interferons (IFN) are natural proteins produced by the cells of the immune system with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties. Among more than 12 natural IFN  $\alpha$  subtypes, recombinant human interferon- $\alpha$ 2a (rhIFN- $\alpha$ 2a) has been successfully commercialized for the treatment of cancer and chronic diseases such as hepatitis B and C, carcinoma, leukemia and multiple myeloma with or without other complementary drugs.<sup>[1,2]</sup>

The rhIFN- $\alpha$ 2a is a cytokine with a polypeptide chain composed of 165 amino acids with two disulphide bonds between Cys<sub>1</sub> and Cys<sub>98</sub> and Cys<sub>29</sub> and Cys<sub>138</sub> and molecular weight of approximately 19 kDa.<sup>[3,4]</sup>

The assessment of the biological potency of rhIFN- $\alpha$ 2a has been performed by the *in vitro* cytopathic assay based on its protective effect of a variety of cell/virus systems and assays. Mainly, the rhIFN- $\alpha$ 2a sensitive human amniotic cell line (WISH) has been used against the vesicular stomatitis virus (VSV) evaluating the responses as viable protected cells stained with vital dyes such as alamarBlue.<sup>[5-7]</sup> However, subsequent discoveries of several other biological activities has opened the way to the development of assays, like the Daudi cell anti-proliferative assay, based on the incubation with alamarBlue and measurement of the absorbances in the microplate reader.<sup>[1,8,9]</sup>

The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) exploits the hydrophobic properties of the biomolecule in the separation process and offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants or degradation products.<sup>[10,11]</sup> A gradient RP-LC method was developed and validated for the analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a in parenteral dosage forms using a C<sub>4</sub> column with detection at 214 nm, the retention time of

32.6 min and the quantitation limit of 0.5 MIU/mL.<sup>[12]</sup> However, the typical RP-LC conditions could affect the conformation of the protein and the detector response does not necessarily represent the amount of bioactive compound.<sup>[10,13]</sup>

Moreover, size exclusion liquid chromatography (SE-LC) has been performed under separation conditions which are expected not to affect the higher order structure of the protein, and could be used for monitoring minor structural as well as conformational variations. It is usually applied for quantification and to determine the native size of the protein and to reveal possible dimmers and aggregates which have no or reduced activity, and altered immunogenicity.<sup>[11,14,15,16]</sup> A SE-LC coupled with intrinsic fluorescence detection using TSK gel 3000 and 2000 columns, was developed for the evaluation of the stability and degradation profiles of IFN- $\alpha$ 2 drug substance and products, demonstrating high molecular weight (HMW) aggregates from native proteins. The fluorescence detection provided a six-fold increase in sensitivity and better linearity compared to the UV detection, with the quantitation limit 83 ng/ml. The biological assays results revealed up to 87% decrease in biological activity of the physically and chemically altered variants compared to the original rhIFN- $\alpha$ 2a.<sup>[15]</sup> The utility of physicochemical and biological assays in detect changes in preparations of rhIFN- $\alpha$ 2a, was studied in order to create model of biopharmaceutical products containing product-related impurities. The samples were subjected to stressed conditions, including oxidation of methionine residues and storage at elevated temperatures for different periods of time. Relevant methods such as SE-LC, RP-LC and dynamic light scattering, proved their complementary in detecting structural changes in the stressed preparations.<sup>[9]</sup>

LC has been successfully used to monitor the purity, identity, chemical stability, and potency and for the correlation studies between physicochemical and biological methods for different bioterapeutics obtained through recombinant DNA technology.<sup>[5,17,18,19,20]</sup> However,

the development of methods for the analysis of rhINF- $\alpha$ 2a in pharmaceutical preparations present some difficulties, due to the low dose of the microheterogeneous protein in the presence of relatively large amounts of human serum albumin, added as excipient to prevent adsorptions to the vial walls and increase stability during storage.<sup>[11,21,22]</sup> In this context, the availability of robust, specific and low-time consuming method for detection and quantitation of rhIFN- $\alpha$ 2a would be very useful in the process monitoring, purification, and quality control.<sup>[23]</sup>

The aim of the present article was to develop and validate a specific, reliable and accurate gradient SE-LC method that can be used in combination with the RP-LC for the analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations. Moreover, evaluate the correlations between the physicochemical methods and the bioassay, seeking for alternatives, which contribute to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy of the biopharmaceutical products.

## **EXPERIMENTAL**

### **Chemicals and Reagents**

European Pharmacopoeia Certificated Reference Standard (Ph. Eur. CRS 1.46 mg/mL) for rhIFN- $\alpha$ 2a was obtained from EDQM (Strasbourg, France). A total of four batches of Roferon A<sup>®</sup> (Roche, Rio de Janeiro, Brazil), containing 6 MIU/mL of rhIFN- $\alpha$ 2a were identified by Arabic numbers from 1 to 4, and four batches of containing 9 MIU/mL were identified by Arabic numbers 5 to 8. The samples were obtained from commercial sources within their shelf life period. Monobasic potassium phosphate, dibasic sodium phosphate and sodium chloride were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was



purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, MA, USA). All solutions were degassed by ultrasonication Tecnal (São Paulo, SP, Brazil) and filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  Millex filter Millipore (Bedford, MA, USA).

### **Apparatus and Chromatographic Conditions**

The LC methods were carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, a LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD<sub>VP</sub> autosampler, and a SPD-M10A<sub>VP</sub> PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP<sup>®</sup> V 6.14 software program.

### **Procedure**

#### **Liquid Chromatography Procedure**

##### *Reversed-Phase Liquid Chromatography (RP-LC)*

The validated gradient RP-HPLC method applied for the analysis rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations is described elsewhere.<sup>[12]</sup> Briefly, the elution was carried out on a Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C<sub>4</sub> column (250mm x 4.6mm i.d., with a pore size of 300Å) maintained at 25°C. A security guard holder was used to protect the analytical column. Mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B consisted of 0.1% TFA in acetonitrile. The applied gradient was as follows: 0.1 min 38% of B, from 1–5 min linear to 43% of B, from 5.01–20 min linear to 45% of B, from 20.01–30 min linear to 48% of B, from 30.01–40 min linear back to 38% and 40–42 min 38% of B. The elution was performed by a fast gradient at a constant flow rate of 1 mL/min, using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The injection volume was 50  $\mu\text{L}$  of a solution containing 6 MIU/ml for both the reference standard and the samples.

### *Size-Exclusion Liquid Chromatography (SE-LC)*

The experiments were performed on a size exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.) maintained at 25°C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The LC system was operated isocratically using a mobile phase of 0.001 M monobasic potassium phosphate, 0.008 M dibasic sodium phosphate and 0.2 M sodium chloride buffer, pH 7.4, and using PDA detection at 214 nm. The following gradient flow-rate was used: from 0.1-7 min, 0.8 mL/min; from 7-7.05 min, 0.8 to 0.2 mL/min; from 7.05-15 min, 0.2 to 0.3 mL/min; from 15-20 min, 0.3 to 1 mL/min; from 20-25 min, 1 to 1.7 mL/min; from 25-35 min, 1.7 mL/min, and then equilibrated during 5 min with the flow-rate of 0.8 mL/min. The injection volume was 50 µL of the solutions containing 6 MIU/mL of the reference substance and the samples, respectively.

### *Samples and Standard Solutions*

Working standard solution of rhIFN- $\alpha$ 2a was daily prepared by diluting the Ph. Eur. CRS for rhIFN- $\alpha$ 2a containing 1.46 mg/mL in the mobile phase containing 0.15 mg/mL of polysorbate 80, to obtain the final concentration of 6 MIU/mL, equivalent to 0.024 mg/mL. Equally, the samples of pharmaceutical formulation were diluted in the mobile phase to obtain the concentration of 6 MIU/mL.

### **Anti-Proliferative Daudi Cells Assay**

The anti-proliferative assay was performed as described elsewhere.<sup>[9]</sup> The DAUDI cells were maintained in culture medium RPMI-1640 modified medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 75 cm<sup>2</sup> flasks and passaged two times a week, seeding at approximately 1-3 x 10<sup>5</sup> cells/mL. For the assay, the cells were seeded in 96-well cell culture plates (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at a

density  $4 \times 10^4$  cells/mL ( $1 \times 10^4$  cells/well) in culture medium and dosed on seeding with 2 fold dilution series range from 6 MIU/mL of IFN in culture medium. The negative control was culture medium alone. After incubation ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  in air) for 48 h, 25  $\mu\text{L}$ /well alamarBlue™ (Serotec, BUF012B) was added and the plates are incubated for a further 16 hours. The response was measured as the absorbance at 570 nm minus 620 nm, using a microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

### ***In vitro* Cytotoxicity Test**

The *in vitro* cytotoxicity method was performed as described elsewhere,<sup>[15,24,25]</sup> based on the neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) to the degraded samples of rhIFN- $\alpha$ 2a. The pH of the samples was adjusted to 7.0, the cycloheximide (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and the media used as the positive and negative controls respectively, together with the Ph. Eur. CRS for rhIFN- $\alpha$ 2a solution in the same assay. The NRU assay was performed on the 96-well microplates maintained at  $37^\circ\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator for 24 h, with the cell suspension having a density of about  $2 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . The neutral red released was evaluated by the addition of extractant solution, and the absorbance measured at 540 nm using a microplate reader.

### **Validation of Size-Exclusion Liquid Chromatography Method**

The method was validated using samples of pharmaceutical formulation of rhIFN- $\alpha$ 2a with the label claim of 6 MIU/mL by determinations of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, stability, and system suitability test, following the ICH guidelines.<sup>[26]</sup>

#### *Specificity*

Specificity of the method towards the biomolecule was established through the determination of the peak purity of reference solutions and samples of pharmaceutical formulation of rhIFN- $\alpha$ 2a (6.0 MIU/mL) subjected to degradation by glutaraldehyde using PDA detector. Furthermore, the interference of the excipients of the pharmaceutical formulations was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of all the pharmaceutical formulation excipients). Additionally the rhIFN- $\alpha$ 2a reference substance and the degraded samples were subjected to the *in vitro* cytotoxicity test.

#### *Linearity*

The linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight concentrations of the Ph. Eur. CRS for rhIFN- $\alpha$ 2a in the 0.5 - 50 MIU/mL range. Three replicate of 50  $\mu$ L injections of the reference solutions were prepared to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of rhIFN- $\alpha$ 2a to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and the determination coefficient.

#### *Precision and accuracy*

The precision of the method was determined by the repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-days). Repeatability was examined by six evaluations of the same sample concentration of rhIFN- $\alpha$ 2a, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulations on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was assessed from three replicate determinations of three in-house mixture solutions of the excipients with known amounts of the biomolecule, containing 4.8, 6.0 and 7.2 MIU/mL,

corresponding to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentrations, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias%) between the measured mean concentrations and the added concentrations.

#### *Limits of detection and quantitation*

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH,<sup>[26]</sup> by using the mean values of the three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

#### *Robustness*

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same samples (6 MIU/mL) under a variety of conditions of the method parameters, such as: temperature, injection volume and mobile phase pH. To assess the stability of sample solutions of rhIFN- $\alpha$ 2a, the samples were tested maintained at 2-8°C for 48 h and also placed into the auto sampler, at room temperature, for 24 h. The stability of these solutions was studied by observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

#### *System suitability test*

To ensure the validity of the analytical procedure, data from five injections of 50  $\mu$ L of the working standard solution containing 6 MIU/mL were used for evaluation of the system

suitability parameters, such as asymmetry, number of theoretical plates, retention time, and peak area, through the CLASS-VP® V 6.12 software.

### **Analysis of Interferon $\alpha$ -2a in Pharmaceutical Formulations**

For the quantitation of rhIFN $\alpha$ -2a in the pharmaceutical formulations, when necessary the samples were diluted to appropriate concentration with the mobile phase containing polysorbate 80, injected in triplicate, and the percentage recoveries of the biological product calculated against the Ph. Eur. CRS for rhIFN- $\alpha$ 2a.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Optimization of Chromatographic Conditions**

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide appropriate selectivity and sensitivity. Phosphate buffered saline resulted in higher sensitivity compared to phosphate buffer and phosphoric acid solution. The use of gradient flow-rate resulted in better resolution between the peaks of rhIFN- $\alpha$ 2a and the excipients of the formulation. The best wavelength was selected using the PDA detector. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations and correlation studies.

### **Method Validation**

#### *Specificity*

The specificity of the analytical method was evaluated under strong mixing and also coupled with water-bath temperature from 45 to 70°C, which showed no additional peak. Then, the addition of glutaraldehyde resulted in dimmers and aggregates, as shown in the

typical chromatograms of Figure 1, together with the peak of the monomer, with the retention times at 14.7 min, 16.0 min and 17.2 min, respectively. The data, together with the peak purity index in the range of 0.9999 – 1, showed that the peak was free from any coeluting peak, with no interference of excipients, thus confirming that the method is specific for the analysis of rhIFN- $\alpha$ 2a.

#### *Linearity*

The analytical curves constructed for rhIFN- $\alpha$ 2a were found to be linear in the 0.5-50 MIU/mL range. The value of the determination coefficient calculated [ $r^2 = 0.9996$ ,  $y = (337228.86 \pm 3610.69) x + (163792.29 \pm 22449.99)$ , where,  $x$  is concentration and  $y$  is the peak absolute area] indicated the linearity of the analytical curve for the method.

#### *Precision*

The precision of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) for six analyses of the concentration of 6 MIU/mL, performed on the same day, and under the same experimental conditions. The obtained RSD value was 0.41%. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulations on three different days (inter-days), giving RSD values of 0.39 and 0.89%, respectively. The between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulations by three analysts; the values were found to be 0.65 and 0.93%, respectively, as shown in Table 1.

#### *Accuracy*

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 4.8, 6.0 and 7.2 MIU/mL, corresponding to 80, 100 and 120% of the analytical

concentrations, respectively. The absolute means obtained with a mean value of 101.39% and bias lower than 1.67% (Table 2), show that the method is accurate within the desired range.

#### *Limits of detection and quantitation*

For the calculation of the LOD and LOQ, a calibration equation,  $y = 337228.86x + 163792.29$ , was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LOD and LOQ were obtained by using the mean of the slope,  $337228.86 \pm 3610.69$ , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as 22449.99. The LOD and LOQ calculated were 0.22 and 0.67 MIU/mL, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with a precision lower than 5% and accuracy within  $\pm 5\%$ ,<sup>[27,28]</sup> was found to be 0.5 MIU/mL, suitable for the quality control analysis.

#### *Robustness*

The results and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 3, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when the modifications were introduced in the experimental conditions, thus showing the method to be robust. The stability of the sample solutions was studied and the data obtained showed the stability during 24 h into the auto sampler and during 48 h when maintained at 2-8°C.

#### *System suitability*

The system suitability test was carried out to evaluate the resolution and repeatability of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference substance solution containing 6 MIU/mL of rhIFN $\alpha$ -2a. The obtained RSD values for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.10, 1.11 and 0.76%, respectively. The



number of theoretical plates was about 6089, with RSD of 1.17%. The parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%).

#### *Biological Potency Assessment*

The potency of the pharmaceutical formulations was assessed by the anti-proliferative Daudi cells bioassay and the statistical analysis performed by the parallel line method using a PLA 2.0 Program (Stegmann System-beratung, Rodgau, Germany), giving the values shown in Table 5, together with the results of the physicochemical methods.

#### *Cytotoxicity evaluation*

The cytotoxicity test of the degraded forms related to the intact molecule, was performed trying to detect some possible effects resulting from the instability of the samples during storage, showing non-significant differences ( $p > 0.05$ ).

#### **Method Application**

The validated SE-LC method was applied for the determination of rhIFN $\alpha$ -2a in pharmaceutical formulations, giving content/potencies within 95.67% and 107.90% of the stated potency, with calculated RSD lower than 0.94%, as shown in Table 4. The results demonstrated the stability-indicating capability and the application of the method in the purification process and for the quality control laboratories.

#### **CONCLUSION**

The results of the validation studies show that the SE-LC method is specific, sensitive with a LOQ of 0.5 MIU/mL, accurate and possesses significant linearity and precision characteristics. The separation was achieved with the retention time of 17.2 min. The pharmaceutical samples were analyzed by the chromatographic methods and compared to the

bioassay, showing mean differences between the estimated potency of 1.50% higher for SE-LC, and 2.45% lower for the RP-LC. The experimental values were statistically compared by the analysis of variance (ANOVA), showing non-significant differences ( $p>0.05$ ). The combination of the validated physicochemical techniques employed offered a high degree of resolving power and selectivity, which can be used together with the *in vitro* bioassay to characterize the rhIFN- $\alpha$ 2a and monitoring its instability, improving the quality control of the biopharmaceutical formulations.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Project 304860/2008-5 and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

## REFERENCES

1. Meager, A. Biological assays for interferons. *J. Immunol. Methods.* 2002, 261, 21-36.
2. Matthews, S. J.; Mccoy, C. Peginterferon alfa-2a: A review of approved and investigational uses. *Clin. Therap.* 2004, 26, 991-1025.
3. Klaus, W. ; Gsell, B. ; Labhardt, A.M.;Wipf, B.; Senn, H. The three-dimensional high resolution structure of human interferon  $\alpha$ -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.* 1997, 274, 661-675.
4. Oritani, K.; Kincadeb, P.; Zhangb, C.; Tomiyamaa, Y.; Matsuzawaa, Y. Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 2001, 12, 337-348.
5. Foser, S.; Schacher, A., Weyer, K.; Brugger, D.; Dietel, E.; Marti, S.; Schreitmüller, T. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon  $\alpha$ -2a (PEGASYs). *Protein Expr. Purif.* 2003, 30, 78-87.
6. Meager, A.; Das, R.G.; Zoon, K.; Mire-Sluis A. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha and omega. *J. Immunol. Methods.* 2001, 257, 17-33.
7. *European Pharmacopoeia*, 6th Ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2007.
8. Caserman, S.; Menart, V.; Das, R.G.; Williams, S.; Meager, A. Thermal stability of the WHO international standard of interferon alpha 2b (INF $\alpha$ -2b): Application of new reporter gene assay for IFN- $\alpha$ 2b potency determinations. *J. Immunol. Methods.* 2007, 319, 6-12.
9. Silva, M.M.C.G. ; Lamarre, B. ; Cerasoli E.; Rakowska, P.; Hills, A.; Bailey, M. J.A.; Wheeler, J. X.; Burns, C. J.; Gaines-Das, R. E.; Jones, C.; Robinson, C. J.

- Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceuticals: Interferon alfa-2 case study. *Biologicals*. 2008, 36, 383-392.
10. Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 1999, 185, 129-188.
  11. Ruiz, L.; Reyes, N.; Duany, L.; Franco, A.; Aroche, K.; Rando, E. Long-term stabilization of recombinant human interferon  $\alpha$  2b in aqueous solution without serum albumin. *Int. J. Pharm.* 2003, 264, 57-72.
  12. Silva, L.M.; Souto, R.B.; Sangoi, M.S.; Alcorde, M.D.; Dalmora, S.L. Validation of an RP-LC Method for the Determination of Interferon- $\alpha$ 2a in Pharmaceutical Formulations. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.* 2009, 32, 370–382.
  13. Luykx, D.M.A.M.; Goerdayal, S.S.; Dingemans, P.J.; Jiskoot, W.; Jongen, P.M.J.M. HPLC and tandem detection to monitor conformational properties of biopharmaceuticals. *J. Chromatogr. B.* 2005, 821, 45-52.
  14. Goetz, H.; Kuschel, M.; Wulff, T.; Sauber, C.; Miller, C.; Fisher, S.; Woodward, C. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. *J. Biochem Biophys. Methods.* 2004, 60, 281-293.
  15. Diress, A.; Lorberskie, B.; Larocque, L.; Li, X.; Alteen, M.; Isbrucker, R.; Girard, M. Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 3297-3306.
  16. Wang, W.; Nema, S.; Teagarden, D. Protein aggregation—Pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* 2010, 390, 89-99.
  17. Beldarrain, A.; Cruz, Y.; Cruz, O.; Navarro, M.; Gil, M. Purification and conformational properties of a human interferon- $\alpha$ 2b produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 2001, 33, 173–182.

18. Dalmora, S.L.; D'Avila, F.B.; M.S.; Silva, L.M.; Bergamo, A.C.; Zimmermann, E.S. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay. *J. Chromatogr. B.* 2009, 877, 2471-2476.
19. Almeida, B.E.; Oliveira, J. E.; Carvalho, C.M.; Dalmora, S.L.; Bartolini, P.; Ribela, M.T.C.P. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 53, 90-97.
20. Cindric, M.; Vuletic, M. Characterisation of interferon  $\alpha$ -2b by liquid chromatography and mass spectrometry techniques. *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1263-1268.
21. Lara-Quintanar, P.; Lacunza, I.; Sanz, J.; Diez-Masa, J.C.; de Frutos, M. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2007, 1153, 227-234.
22. Buchheit, K. H.; Daas, A.; Jönson, K. H. Collaborative study for establishment of an HPLC-method for batch consistency control of recombinant interferon-alfa-2. *Pharmeuropa Spec. Issue Biol.* 2002, 1, 7-27.
23. Zarrin, A.; Foroozesh, M.; Hamidi, M.; Mohammadi-Samani, S. A simple and rapid HPLC method for quantification of interferon- $\alpha$ 2b in dosage forms and delivery systems. *J. Chromatogr. B.* 2006, 833, 199-203.
24. Wang, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int. J. Pharm.* 2005, 289, 1-30.

25. Nogueira, D.R.; Sangoi, M.S.; Silva, L.M.; Todeschini, V.; Dalmora, S. L. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 3098.
26. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1), November 2005, 1-13.
27. Shabir, G.A.; Lough, W.L.; Arain, S.A.; Bradshaw, T.K. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 2007, 30, 311-333.
28. Ermer, J.; Miller J.H.M. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Wiley-VCH. Weinheim, Germany, 101, 2005.

**Table 1.** Inter-days and between-analysts precision data of SE-LC for interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations.

Sample	Day	Inter-days		Analysts	Between-analysts	
		Recovery <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)		Recovery <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)
1	1	101.22		A	101.99	
	2	101.84	0.39	B	102.46	0.65
	3	101.97		C	101.15	
2	1	104.04		A	104.10	
	2	102.48	0.89	B	102.31	0.93
	3	104.12		C	102.63	

<sup>a</sup>Mean of three replicates.

<sup>b</sup>RSD = Relative standard deviation.

**Table 2.** Accuracy of SE-LC for interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations.

Nominal concentration (MIU/mL)	Mean concentration found <sup>a</sup> (MIU/mL)	RSD <sup>b</sup> (%)	Accuracy (%)	Bias <sup>c</sup> (%)
4.8	4.88	1.32	101.67	1.67
6.0	6.05	0.56	100.83	0.83
7.2	7.32	1.59	101.67	1.67

<sup>a</sup>Mean of three replicates.

<sup>b</sup>RSD = Relative standard deviation.

<sup>c</sup>Bias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.



**Table 3.** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.

Variable	Range investigated	Interferon- $\alpha 2a^a$ (%)	RSD <sup>b</sup> %	Optimized value
Column temperature (°C)	25	100.50	0.36	25
	30	101.16	0.40	
	35	101.50	1.24	
Injection volume ( $\mu$ L)	30	100.17	0.64	50
	40	102.33	1.54	
	50	100.67	0.28	
Mobile phase pH	7.0	101.33	1.55	7.4
	7.4	100.33	0.61	
	7.8	98.50	1.32	
Solution stability	Autosampler 24 h	101.83	0.52	-
	2-8°C 24 h	100.67	0.31	-
	2-8°C 48 h	100.50	0.89	-

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

**Table 4.** Determination of interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations by the SE-LC method.

Theoretical amount		Experimental amount		
Interferon $\alpha$ -2a		Interferon $\alpha$ -2a <sup>a</sup>		
Sample	MIU/mL	MIU	Recovery (%)	RSD <sup>b</sup> (%)
1	6	6.31	105.17	0.29
2	6	6.19	103.17	0.63
3	6	5.85	97.50	0.94
4	6	6.07	101.17	0.75
5	9	9.22	102.44	0.57
6	9	8.61	95.67	0.46
7	9	9.71	107.90	0.51
8	9	8.66	96.22	0.49

<sup>a</sup>Mean of three replicates.

<sup>b</sup>RSD = Relative standard deviation.

**Table 5.** Comparative content/potencies evaluation of interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations by chromatographic methods and bioassay.

Sample	SE-LC <sup>a,b</sup>		RP-LC <sup>a,b</sup>		Bioassay <sup>a</sup>	
	Monomer (%)	HMW <sup>e</sup> (%)	Main peak (%)	Deamidate/sulphoxides (%)	Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)
1	105.17	n.d. <sup>d</sup>	98.75	n.d. <sup>d</sup>	102.80	94.80 – 109.98
2	103.17	0.23	97.04	0.38	101.70	92.55 – 107.81
3	97.50	0.41	92.77	0.45	99.96	93.86 – 108.96
4	101.17	n.d. <sup>d</sup>	95.18	0.51	98.80	91.78 – 106.23
5	102.44	0.79	100.13	0.26	98.95	92.03 – 108.85
6	95.67	0.18	94.87	0.19	91.10	82.81 – 99.39
7	107.90	0.54	105.84	n.d. <sup>d</sup>	106.42	98.79 – 114.93
8	96.22	0.15	93.01	0.89	97.50	88.72 – 104.32
Mean	101.15	0.28	97.20	0.33	99.65	-
SD <sup>c</sup>	4.39	0.27	4.35	0.29	4.46	-

<sup>a</sup>Non-significant difference ( $p > 0.05$ ).

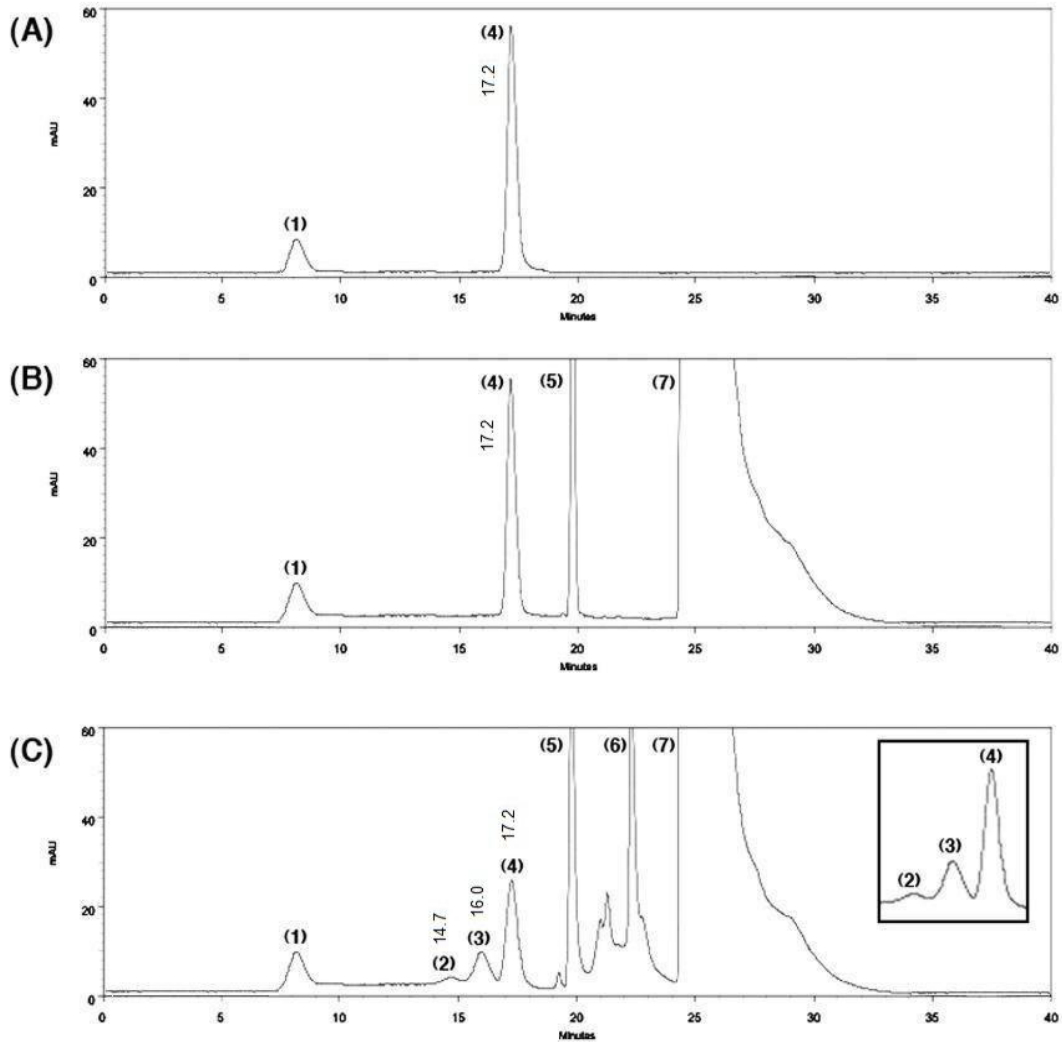
<sup>b</sup>Mean of three replicates.

<sup>c</sup>SD = Standard deviation.

<sup>d</sup>n.d. = non detected.

<sup>e</sup>HMW= High molecular weight

## Figure Caption



**Figure 1.** Representative SE-LC chromatograms of interferon- $\alpha$ 2a reference standard solution (A); pharmaceutical formulation (6 MIU/mL) (B); After degradation by glutaraldehyde (C). Peak 1, 5 and 7 = excipients, peak 2 = aggregates, peak 3 = dimmers, peak 4 = interferon- $\alpha$ 2a, peak 6 = glutaraldehyde.

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE  
rhIFN- $\alpha$ 2a**

---

## **4. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE rhIFN- $\alpha$ 2a**

---

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Produtos farmacêuticos comerciais**

Utilizaram-se amostras de dois produtos comerciais de IFN- $\alpha$ 2a, identificadas como Formulação A, inovador (Roferon A<sup>®</sup> 6 MUI/mL Laboratório Roche) e formulação B (Kinnoferon 2A<sup>®</sup> 9 MUI/mL Laboratório Bergamo).

#### **4.1.2 Tampões e reagentes**

- KIT VeriKine<sup>®</sup> ELISA COD:41100-1, PBL Biomedical Laboratories, contendo: Padrão de interferon alfa humano, anticorpo de detecção, conjugado de peroxidase concentrado (HRP), substrato de tetrametilbenzidina (TMB).

#### **4.1.3 Equipamentos e acessórios**

- Centrífuga refrigerada, Sigma<sup>®</sup>
- Freezer -40 °C, SANYO<sup>®</sup>
- Leitor de microplacas MULTISKAN FC, Thermo Scientific<sup>®</sup>.
- Microcomputador, Dell<sup>®</sup>.
- Micropipetas de volume ajustável P10, P20, P100, P200 e P1000, Gilson<sup>®</sup>.
- Microtubos estéreis, Eppendorf<sup>®</sup>.
- Ponteiras descartáveis de 200 e 1000  $\mu$ L, Brand<sup>®</sup>.
- Sistema purificador de água, Milli-Q, Millipore<sup>®</sup>.

### **4.2 Seleção dos animais e administração das amostras**

Foram utilizados 36 ratos da linhagem Wistar com 6 a 7 semanas de idade e peso de 300 – 350 g. Planejam-se 4 animais para cada tempo de coleta e aplicaram-se doses de 8 MUI/Kg

de cada amostra, por via subcutânea na região dorsal da nuca. O ensaio se enquadra em projeto registrado no Comitê de Ética e Bem Estar Animal – UFSM.

### **4.3 Coleta e separação do plasma**

As coletas foram realizadas pelo seio venoso ocular nos tempos pré-determinados (30, 45, 60, 75, 105, 150, 240, 360, 480 minutos), com o equivalente a 10 UI de heparina por mililitro de sangue coletado. Centrifugou-se por 15 min. a 2500 rpm, transferiu-se o plasma para tubos Eppendorf, identificou-se e armazenou-se a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### **4.4 Determinação de rhIFN- $\alpha$ 2a por ELISA**

A quantificação de rhIFN- $\alpha$ 2a humano no plasma dos animais, foi realizada através do método de enzimaímoensaio (ELISA), baseado no sistema de duplo anticorpo. Para detecção, o segundo anticorpo foi conjugado com HRP e a resposta colorimétrica observada pela reação com substrato TMB.

### **4.5 Procedimento**

#### **4.5.1 Padrão, amostras e branco**

Preparou-se a curva padrão e diluição das amostras seguindo instruções do fabricante do kit. Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  por poço do padrão de interferon, das amostras e do branco, respectivamente. Incubou-se por 1 h. Desprezou-se o sobrenadante e efetuaram-se lavados com tampão de lavagem diluído (TLD).

#### **4.5.2 Anticorpo**

Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  por poço da solução do anticorpo de detecção. Incubou-se por 1 h. Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante e lavou três vezes com TLD.

#### **4.5.3 Solução peroxidase (HRP)**

Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  por poço da solução de HRP diluída. Incubou-se por 1 h. Durante o período de incubação manteve-se o substrato TMB à temperatura ambiente ( $22-25^{\circ}\text{C}$ ). Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se quatro vezes com TLD.

#### 4.5.4 Substrato TMB e final da reação

Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de substrato TMB por poço. Incubou-se, no escuro, por 15 minutos. Posteriormente, adicionaram-se em todos os poços, 100  $\mu\text{L}$  da solução de ácido sulfúrico 1M para interrupção da reação. Então, efetuou-se a determinação das absorbâncias em leitor de microplacas em 450 nm.

#### 4.6 Resultados

Os resultados experimentais obtidos nas determinações dos parâmetros farmacocinéticos em plasma estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1- Valores obtidos para formulações A e B por enzimaensaio.

<b>Tempo em minutos</b>	<b>Formulação A pg/mL*</b>	<b>CV %</b>	<b>Formulação B pg/mL*</b>	<b>CV %</b>
30	5643,45	6,10	6380,63	10,00
45	5821,48	7,47	7967,70	8,93
60	7924,60	8,84	8698,68	11,28
75	7496,63	14,60	8473,43	10,52
105	6403,10	10,25	7568,35	11,83
150	2790,98	11,18	3863,08	13,30
240	2780,73	12,81	3189,28	12,53
360	2436,68	14,40	1287,93	9,93
480	0,0	-	0,0	-

\*Média de 4 determinações

Com base nesses valores elaborou-se o perfil farmacocinético para as duas amostras como mostra a figura 1.



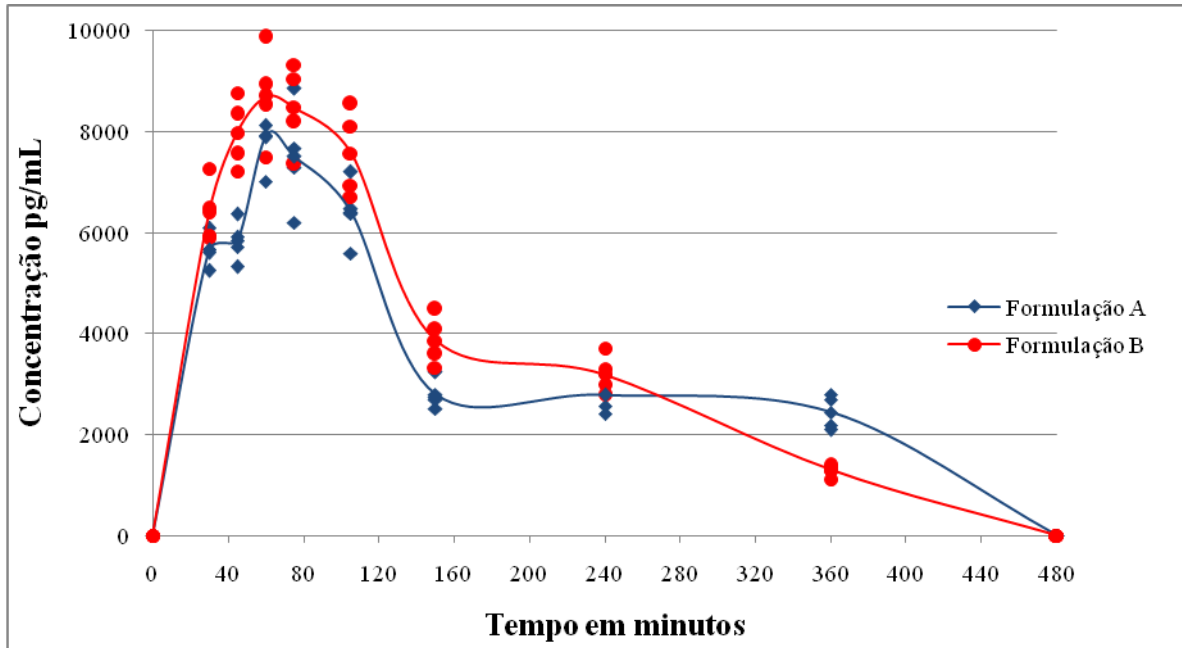


Figura 1: Determinação da concentração do rhINF- $\alpha$ 2a no plasma por enzimaímuoensaio, em relação aos tempos de coleta para cada animal.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando o WinNonLin Professional Network Edition versão 5.2.2.1 e Microsoft Excel versão 7.0. Os valores obtidos para o pico de concentração máxima plasmática ( $C_{max}$ ) foram 7924,60 e 8698,68 pg/mL para a formulação A e formulação B, respectivamente. O tempo necessário para atingir a concentração máxima ( $T_{max}$ ) foi de 60 minutos, para ambos produtos, conforme demonstrado na tabela 1.

## **DISCUSSÃO**

---

## 4 DISCUSSÃO

---

A produção de proteínas de interesse terapêutico tem evoluído significativamente nos últimos anos, devido à tecnologia do DNA recombinante. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a avaliação da identidade, pureza e potência, fundamenta-se na combinação de técnicas biológicas, físico-químicas e imunológicas, necessárias para a completa caracterização de bioterapêuticos de uso clínico.

A atividade biológica do rhIFN- $\alpha$ 2a tem sido determinada por bioensaios *in vitro* (BORDENS et al., 1997; MEAGER, 2002). Paralelamente, são realizados procedimentos para identificação por eletroforese em gel de poliacrilamida, focalização isoelétrica e imunoenaios com anticorpos específicos (PISCITELLI et al., 1997; HENNIG et al., 2000). Avança-se no estudo de métodos cromatográficos que têm sido usados para diferentes produtos biológicos recombinantes como importante técnica de separação, purificação e análise qualitativa e quantitativa, possibilitando estudos de correlação com os bioensaios *in vivo* e *in vitro*. (ALMEIDA et al., 2010; DALMORA et al., 2006; KAISER et al., 1997; SILVA et al., 2009).

Acrescenta-se que os teores foram expressos em unidades internacionais para possibilitar a análise dos resultados em relação ao teor declarado dos diferentes produtos farmacêuticos em uso terapêutico. Estabeleceu-se a transformação de massa para unidades internacionais com base na expressão preconizada no 2º Padrão Internacional de interferon- $\alpha$ 2a (WHO 95/650), no qual 252 MUI correspondem a 1 miligrama.

A discussão detalhada a seguir fundamenta-se no ARTIGO 3.1, submetido para publicação. O método por cromatografia líquida por exclusão molecular foi validado visando a determinação de potência, dímeros e substâncias de alta massa molecular de rhIFN- $\alpha$ 2a em formulações farmacêuticas sem albumina. O método apresentou regressão linear significativa  $r^2 = 0,9996$ , na faixa de concentração de 0,5 a 50 MUI/mL. A vazão da fase móvel foi aplicada sob gradiente para obter adequada separação em 17,2 minutos do pico relativo ao rhIFN- $\alpha$ 2a. O método demonstrou-se exato, com valor médio de 101,39% e desvio menor que 1,67% (tabela 2). Os resultados da precisão apresentaram CV inferiores a 0,93% como pode ser observado na tabela 1. Por sua vez, os valores calculados (ICH, 2005) para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) de 0,22 e 0,67 MUI/mL, respectivamente, indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade o biofármaco em produtos comerciais. O LQ encontrado experimentalmente,

com precisão ( $\leq 5\%$ ) e exatidão de  $\pm 5\%$ , foi de 0,5 MUI/mL. Na avaliação da robustez do método, as alterações realizadas nas condições otimizadas não provocaram mudanças significativas nos resultados de teor rhIFN- $\alpha$ 2a (tabela 3). Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico, mostraram que as condições da metodologia são adequadas para assegurar a exatidão e precisão dos dados analíticos. A especificidade do método foi testada sob condições de degradação com glutaraldeído, originando picos adicionais relativos a dímeros e agregados, e também, através da análise da amostra preparada com os excipientes que apresentaram picos com tempos de retenção bem resolvidos em relação ao rhIFN- $\alpha$ 2a. Os estudos através do detector de arranjo de diodos (DAD) mostraram o pico de rhIFN- $\alpha$ 2a livre de picos co-eluídos, confirmando a especificidade do procedimento proposto para a análise de produtos farmacêuticos.

Demonstrou-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregados para análise de rhIFN- $\alpha$ 2a em produtos farmacêuticos. Além disso, as amostras de medicamentos foram analisadas pelos métodos cromatográficos e em relação ao bioensaio, apresentando diferenças das médias entre as potências estimadas de 2,45% menor para o CL-FR, e 1,5% maior para CL-EM. Os valores experimentais dos métodos foram comparados estatisticamente com o bioensaio *in vitro*, por análise de variância que demonstrou diferenças não significativas ( $P > 0,05$ ).

A solução concentrada de rhIFN- $\alpha$ 2a está descrita na literatura oficial (BP., 2010), e não há nenhuma referência ao produto acabado. Por sua vez, os estudos de correlação entre métodos cromatográficos validados para avaliação de rhIFN- $\alpha$ 2a em formulações farmacêuticas, são altamente aplicáveis no contexto da produção de produtos biológicos recombinantes. Sugere-se, portanto, que os métodos por CL-EM e por CL-FR, sejam adotados como alternativa ou em combinação com o bioensaio para a avaliação de potência e pureza de rhIFN- $\alpha$ 2a durante as etapas do processo de produção/purificação e para o controle da qualidade do produto farmacêutico acabado. Além disso, a combinação dos métodos é importante para monitorar pequenas variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica do biofármaco.

Por sua vez, realizaram-se avaliações dos níveis plasmáticos por ELISA, a fim de estabelecer procedimento para comparabilidade de diferentes formulações do biofármaco. Os resultados obtidos com as formulações A e B foram semelhantes, conforme demonstrado na figura 1, e pelos parâmetros farmacocinéticos calculados. Observa-se, neste contexto, que IFN- $\alpha$ 2a encontra-se também disponível sob a forma modificada de peguilação e os estudos

de metodologias analíticas, bem como de parâmetros farmacocinéticos, são importantes para o desenvolvimento de novas formulações e/ou novos produtos.

Desse modo, objetivou-se contribuir para aprimorar o controle da qualidade através de avanços na caracterização da biomolécula, ampliando os procedimentos disponíveis para os estudos de comparabilidade no contexto de biosimilares, garantindo sua eficácia terapêutica e segurança.

## **CONCLUSÕES**

---

## 5 CONCLUSÕES

---

- ✓ Validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular, que apresentou parâmetros adequados para identificação, determinação de dímeros, agregados de alta massa molecular e monômero do rhIFN- $\alpha$ 2a. Os resultados de teor/potência forneceram diferenças entre as médias, 1,5% superiores em relação ao bioensaio.
- ✓ Utilizou-se o ensaio por cromatografia líquida por fase reversa, encontrando valores, em entre as médias, 2,45% menores em relação ao bioensaio.
- ✓ Sugere-se a combinação dos métodos cromatográficos e biológico para avaliação de pureza e potência de rhIFN- $\alpha$ 2a, representando alternativa para análise de produtos farmacêuticos, com vantagens de precisão, exatidão, especificidade, segurança e tempo de execução em relação aos ensaios biológicos *in vitro*.
- ✓ A determinação dos parâmetros farmacocinéticos por ELISA demonstrou perfis comparáveis entre as formulações analisadas.
- ✓ O método validado no presente trabalho contribui para estabelecer bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, de comparabilidade com biomoléculas da área e procedimentos importantes para aprimorar o controle de qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos biotecnológicos disponíveis no País.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AHRER, K.; JUNGBAUER, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. **Journal of Chromatography B**, v. 841, p. 110-122, 2006.

ALARCÓN-RIQUELME, M.E. Nucleic acid by-products and chronic inflammation. **Nature genetics**. v.38, p.866-867, 2006.

ALMEIDA, B. E.; OLIVEIRA J. E.; CARVALHO, C. M.; DAMOLRA, S. L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reverse-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 90-97, 2010.

ARDUINI, R. M.; LI, Z.; RAPOZA, A.; GRONKE, R.; HESS, D. M.; WEN, D.; MIATKOWSKI, K.; COOTS, C.; KAFFASHAN, A.; VISEUX, N.; DELANEY, J.; DOMON, B.; YOUNG, C. N.; BOYNTON, R.; CHEN, L. L.; CHEN, L.; BETZENHAUSER, M.; MILLER, S.; GILL, A.; PEPINSKY, R. B.; HOCHMAN, P. S.; BAKER, D. P. Expression, purification, and characterization of rat interferon- $\beta$  and preparation of an N-terminally PEGylated form with improved pharmacokinetic parameters. **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 229-242, 2004.

BAILON, P.; PALLERRONI, A.; SCHAFFER, C.; SPENCE, C.; FUNG, W.; POTER, J.; EHRLICH, G.; PAN, W.; XU, Z.; MODI, M.; FARID, A.; BERTHOLD, W. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. **Bioconjugate Chemistry**, v. 12, p. 195-202, 2001.

BARON, S.; COPPENHAVER, D.; DIANZANI, F. Introduction to the interferon system. In: BARON, S. et al. **Principles and medical applications**. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1992. p.1-15.

BARON, S.; DIAZANI, F. The interferons: biological system with therapeutic potential in viral infections. **Antiviral Research**, v. 24, n. 2-3, p.97-110, 1994.

BARTH, H.G.; BOYES, B.E.; JACKSON, C. Size exclusion chromatography and related separation techniques. **Analytical Chemistry**, v.70, p. 251R-278R, 1998.

BARTH, T. **Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para avaliação de potência de eritropoietina humana recombinante. Correlação com o ensaio biológico.**

2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BORDENS, R.; GROSSBERG, S.E.; TROTTA, P.P; NAGABHUSHAN, T.L. Molecular and biologic characterization of recombinant interferon-alpha2b. **Seminars in Oncology**, v. 24, n. 3, p. S9 (41-51), 1997.

BRITISH Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2010.

BUCHHEIT, K. H.; DAAS, A.; JÖNSON, K. H. Collaborative study for establishment of an hplc-method for batch consistency control of recombinant interferon-alfa-2. **Pharmeuropa Special Issue Biol**, v. 1, p. 7-27, 2002.

CASERMAN, S.; MENART, V.; DAS, R.; WILLIAMS, S.; MEAGER, A. Thermal stability of the WHO international standard of interferon alpha 2b (INF-  $\alpha$ -2b): Application of new reporter gene assay for IFN-  $\alpha$ -2b potency determinations. **Journal of Immunological Methods**, v. 319, p. 6-12, 2007.

CHATELUT, E.; ROSTAING, L.; GRÉGOIRE, N.; PAYEN, J.; PUJOL, A.; IZOPET, J. HOUIN, G.; CANAL, P. A pharmacokinetic model for alpha interferon administered subcutaneously. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p. 365-371, 1999.

CHMP – Committee for medicinal products for human use, “**Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues**”. London, October 2005.

CINDRIC, M.; VULETIC, M. Characterisation of interferon  $\alpha$ -2b by liquid chromatography and mass spectrometry techniques. **Journal of Separation Science**, v.26, p.1263-1268, 2003.

CUETO-ROJAS, H. F.; PÉREZ, N.O.; PÉREZ-SÁNCHEZ, G.; OCAMPO-JUAREZ, I.; MEDINA-RIVERO, E. Interferon- $\alpha$  2b quantification in inclusion bodies using Reversed Phase-Ultra Performance Liquid Chromatography (RP-UPLC). **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 1019–1023, 2010.

DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, J. E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M. T.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 782, p. 199 – 210, 1997.

DALMORA, S. L., MASIERO, S. M. K.; OLIVEIRA, P. R.; SANGOI, M. S.; BRUM, L. Validation of an RP-LC method and assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 1753-1767, 2006.

DIWAN, M.; PARK, T.G. Stabilization of recombinant interferon- $\alpha$  by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252 p. 111-122, 2003

DIRESS, A.; LORBETSKIE, B.; LAROCQUE, L.; LI, X.; ALTEEN, M.; ISBRUCKER, R.; GIRARD, M. Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, p. 3297-3306, 2010.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guidance on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Quality Issues**”. London, 30 June 2005.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins**”. London, July 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia 6<sup>th</sup> ed., Strasbourg: Council of Europe, 2007.

FDA – Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, May 2001.

FEE, C. J.; ALSTINE, J.M.V. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 924-939, 2006.

FELD, J.; HOOFNAGLE, J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v. 436, p. 967-972, 2005.

FOSER, S.; SCHACHER, A.; WEYER, K. A.; BRUGGER, D.; DIETEL, E.; MARTI, S.; SCHREITMÜLLER, T. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon  $\alpha$ -2a (PEGASYS). **Protein Expression and Purification**, v.30, p. 78-87, 2003.

GLUE, P.; FANG, J.; ROUZIER-PANIS, R.; RAFFANEL, C.; SABO, R.; GUPTA, S.K.; SALFI, M.; JACOBS, S. Pegylated interferon- $\alpha$ 2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics,

safety, and preliminary efficacy data. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, p. 556-567, 2000.

GOETZ, H.; WULFF, T.; SAUBER, C.; MILLER, C.; FISHER, S.; WOODWARD, C. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 60, p. 281-293, 2004.

GRACE, M.; YOUNGSTER, S.; GITLIN, G.; SYDOR, W.; LEI, W.; WESTREICH, L.; JACOBS, S.; BRASSARD, D.; BAUSCH, J.; BORDENS, R. Structural and Biologic characterization of pegylated recombinant IFN- $\alpha$ 2b. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 21, p. 1103-1115, 2001.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 214-221, 2003.

HENNIG, C.; RINK, L.; FAGIN, U.; WOLFRAM, J.J; HOLGER, K. The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. **Journal of Immunological Methods**, v. 235, p. 71-80, 2000.

HERMELING, S.; CROMMELIN, D. J. A.; SCHELLEKENS, H.; JISKOOT, W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n.6, p.897-903, 2004.

HUANG, S.; LIN, F.; YANG, C. Microcalorimetric studies of the effects on the interactions of human recombinant interferon- $\alpha$ 2a. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 545-552, 2005

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for human use, “**Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**”, 2005.

INJAC, R.; BOSKOVIC, M.; KOCEVAR, N.; VOVK, T. Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, p. 150-161, 2008.

KAISER, R. E.; STREGE, M. A.; LAGU, A. L. Assessment of protein drugs obtained by recombinant DNA technology. **Process Control and Quality**, v. 10, n. 1-2, p. 205-228, 1997.

KLAUS, W.; GSELL, B.; LABHARDT, A.M.; WIPF, B.; SENN, H. The three-dimensional high resolution structure of human interferon  $\alpha$ -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, p. 661-675, 1997.

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

LANGER, J.A. Interferon at 50: New molecules, new potential, new (and old) questions. **Science's STKE**, v. 405, pe53, 2007.

LEE, B. K.; KWON, J.S.; KIM, H.J.; YAMAMOTO, S.; LEE, E.K. Solid-Phase PEGylation of Recombinant Interferon  $\alpha$ -2a for Site-Specific Modification: Process Performance, Characterization, and in Vitro Bioactivity. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 1728-1734, 2007.

LONGSTAFF, C.; WHITTON, C. M.; STEBBINGS, R.; GRAY, E. How do we assure the quality of biological medicines? **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 1/2, p. 50-55, 2009.

MATTHEWS, S. J.; McCOY, C. Peginterferon alfa-2a: A review of approved and investigational uses. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 7, p. 991-1025, 2004.

MEAGER, A.; GAINES DAS, R.; ZOON, K.; MIRE-SLUIJS, A. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha and omega. **Journal of Immunological Methods**, v. 257, p. 17-33, 2001.

MEAGER, A. Biological assays for interferons. **Journal of Immunological Methods**, v. 261, p. 21-36, 2002.

ORITANI, K.; KINCADE, P.W.; ZHANG, C.; TOMIYAMA, Y.; MATSUZAWA, Y. Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 12, p. 337-348, 2001.

OLIVEIRA, J. E.; DAMIANI, R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography method for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, p. 206-211, 2007.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 8-32, 2004.

PFEFFER, L.M.; DINARELLO, C.A.; HERBERMAN, R. B.; WILLIAMS, B.R.G.; BORDEN, E.C.; BORDENS, R.; WALTER, M.R.; NAGABHUSHAN, T.L.; TROTTA, P.P.; PESTKA, S. Biological properties of recombinant  $\alpha$ - interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. **Cancer Research**, v.58, p. 2489-2499, 1998.

PISCITELLI, S. C.; REISS, W. G.; FIGG, W. D.; PETROS, W. P. Pharmacokinetic studies with recombinant cytokines. Scientific issues and practical considerations. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 32, n. 5, p. 368-381, 1997.

QIAN, J.; TANG, Q.; CRONIN, B.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of human serum albumin in a lyophilized formulation of interferon alfa-2b. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, p. 48-56, 2008.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 335-377, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1 – 2, p. 111-125, 2007.

RUIZ, L.; REYES, N.; DUANY, L.; FRANCO, A.; AROCHE, K. RANDO, E. H. Long-term stabilization of recombinant human interferon  $\alpha$  2b in aqueous solution without serum albumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 57-72, 2003.

SAMUEL, C.E. Antiviral actions of Interferons. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n. 4, p.778-809, 2001.

SCHELLEKENS, H. Biosimilar therapeutics - what do we need to consider?. **Nephrology Dialysis Transplantation Plus**, v. 2, p. 27-36, 2009.

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

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

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. L.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311-333, 2007.

SHARMA, V. K.; KALONIA, D. S. Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon- $\alpha$ 2a: possible implications in protein stability. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 11, p. 1721-1729, 2003.

SHECHTER, Y.; PRECIADO-PATT, L.; SCHREIBER, G.; FRIDKIN, M. Prolonging the half-life of human interferon-alpha 2 in circulation: Design, preparation, and analysis of (2-sulfo-9-fluorenylmethoxycarbonyl)(7)-interferon-alpha 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 3, p. 1212-1217, 2001.

SILVA, M. M. C. G.; GAINES-DAS, R. E.; JONES, C.; ROBINSON, C. J. Biological activity of EDQM CRS for interferon alfa-2a and interferon alfa-2b - assessment in two in vitro bioassays. **Pharmeuropa Bio**, v. 1, p. 1-6, 2007.

SILVA, M. M. C. G.; LAMARRE, B.; CESAROLI, E.; RAKOWSKA, P.; HILLS, A.; BAILEY, M. J. A.; WHEELER, J. X.; BURNS, C. J.; GAINES-DAS, R. E.; JONES, C.; ROBINSON, C. J. Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceuticals: Interferon alfa-2 case study. **Biologicals**, v. 36, p. 383-392, 2008.

SILVA, L. M. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para avaliação de interferon-alfa 2a em formulações farmacêuticas**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SILVA, L. M.; SOUTO, R. B.; SANGOI, M. S.; ALCORTE, M. D.; DALMORA, S. L. Validation of an RP-LC method for the determination of interferon- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, p. 370-382, 2009.

SILVA Jr., J. G. **Cromatografia de Proteínas**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. 111p.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n. 1, p. 12-20, 1998.

THE UNITED States Pharmacopeia. 33. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2010.

THITINAN, S.; McCONVILLE, J. T. Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, p. 121-135, 2009.

TREUHEIT, M. J.; KOSKY, A. A.; BREMS, D. N. Inverse relationship of protein concentration and aggregation. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 4, p. 511-516, 2002.

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

WANG, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 1–30, 2005.

WANG, W.; NEMA, S.; TEAGARDEN. D. Protein aggregation-Pathways and influencing factors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, p. 89–99, 2010.

WANG, Y. S.; YOUNGSTER, S.;GRACE, M.; BAUSCH, J.; BORDENS, R.;WYSS, D.F. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon-alpha-2b and its therapeutic implications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 547-570, 2002.

WILLS, R. J.; DENNIS, S.;SPIEGEL, H.E.; GIBSON, D.M.; NADLER, P.I.; Interferon kinetics and adverse reactions after intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 722-727, 1984.

ZARRIN, A.; FOROOZESH, M.; HAMIDI, M.; MOHAMMADI-SAMANI, S. rapid HPLC method for quantification of interferon- $\alpha$ 2b in dosage forms systems. **Journal of Chromatography B**, v. 833, p. 199-203, 2006.