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

Ricardo Bizogne Souto

ESTUDOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11 HUMANA RECOMBINANTE

Santa Maria, RS

2015

RICARDO BIZOGNE SOUTO

ESTUDOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11 HUMANA RECOMBINANTE

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS

Dezembro, 2015

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

Bizogne Souto, Ricardo
ESTUDOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11 HUMANA RECOMBINANTE / Ricardo Bizogne Souto.-2015.
80 p.; 30cm

Orientador: Sérgio Luiz Dalmora
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. Interleucina-11 humana recombinante 2. Eletroforese capilar de zona 3. Cromatografia líquida por exclusão molecular 4. Validação 5. Correlação I. Dalmora, Sérgio Luiz II. Título.

Ricardo Bizogne Souto

ESTUDOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11 HUMANA RECOMBINANTE

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**

Aprovado em 04 de dezembro de 2015:

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

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (Centro Universitário Franciscano)

Lisiane Bajerski, Drª. (Unipampa)

Carine Viana Silva, Drª. (UFSM)

Melânia Palermo Manfron, Drª. (UFSM)

Santa Maria, RS

2015

AGRADECIMENTOS

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

ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, confiança, orientação e revisão crítica;

aos meus pais pelo amor e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa;

aos meus amigos pelo companheirismo, compreensão e altruísmo;

aos colegas e bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência pelo apoio, auxílio e amizade;

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

à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

à CAPES, pelo apoio financeiro;

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

“É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê."

(Marcelo Camelo)

RESUMO

ESTUDOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINA-11 HUMANA RECOMBINANTE

AUTOR: Ricardo Bizogne Souto
ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

A interleucina 11 (IL-11) é uma citocina endógena que estimula diretamente a proliferação de células tronco-hematopoiéticas e progenitoras megacariocíticas e induz o amadurecimento megacariocítico. Com os avanços na área da biotecnologia, especialmente com o advendo da tecnologia do DNA recombinante, possibilitou-se a expressão do gene da IL-11 em *Escherichia coli*, e assim a produção em grande escala da interleucina-11 humana recombinante (rhIL-11), a qual é clinicamente indicada, principalmente, para a prevenção de trombocitopenia grave e redução da necessidade de transfusões de plaquetas após quimioterapia mielossupressiva em pacientes com neoplasias malignas não mielóides com alto risco de trompocitopenia grave. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por eletroforese capilar de zona (ECZ) e cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) para a avaliação de rhIL-11 em produtos biofarmacêuticos. No método por ECZ, utilizou-se capilar de sílica fundida (40 cm de comprimento efetivo x 50 µm d.i.) e solução eletrolítica composta de 50 mM de fosfato de sódio dihidrogenado, pH 3,0. O capilar foi mantido a temperatura de 25ºC, e a tensão aplicada foi de 20 kV. O tempo de injeção foi de 45 s, com pressão de 50 mBar, e detecção por arranjo de diodos (DAD), em 196 nm. Para o método por CL-EM utilizou-se coluna BioSep-SEC-s-2000 (300 mm x 7,8 mm d.i.), mantida a 30ºC. A fase móvel foi constituída de tampão ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico 0,02 M e cloreto de sódio 0,5 M, pH 6, com vazão isocrática de 0,9 mL/min., por detector DAD em 220 nm. A rhIL-11 foi eluída nos tempos de 10,31 e 8,12, sendo linear na faixa de concentração de 1-300 µg/mL (r^2 = 0,9992) e 1-200 µg/mL (r^2 = 0,9996), respectivamente, para o método por ECZ e por CL-EM. Os limites de detecção e quantificação foram 0,21 e 1,0 µg/mL, para o método por ECZ e 0,23 e 1,0 µg/mL por CL-EM. A especificidade dos métodos foi verificada e confirmada por estudos de degradação e de interferência dos excipientes. A exatidão foi 100,37 e 99,81%, com bias inferior a 1,13 e 0,43%, respectivamente, para os métodos por ECZ e CL-EM. Além disso, realizou-se o teste de citotoxicidade *in vitro* das formas degradadas, apresentando, para as amostras submetidas às condições ácidas e fotolíticas, diferença significativa (p< 0,05) em relação à molécula íntegra. Os métodos propostos foram aplicados para a avaliação do teor/potência e dos produtos de degradação de rhIL-11 em formulações biofarmacêuticas, e os resultados foram correlacionados com o método validado por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e bioensaio em células TF-1, apresentando correlação significativa (p> 0,05). Assim, sugere-se que os métodos desenvolvidos e validados por ECZ e CL-EM sejam aplicados para aprimorar o controle da qualidade do produto biotecnológico de rhIL-11, contribuindo, desse modo, para garantir sua segurança e eficácia terapêutica.

Palavras-chave: Interleucina-11 humana recombinante. Eletroforese capilar de zona. Cromatografia líquida por exclusão molecular. Cromatografia líquida em fase reversa. Bioensaio. Validação. Correlação.

ABSTRACT

ANALYTICAL STUDIES FOR CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF RECOMBINANT HUMAN INTERLEUKIN-11

AUTHOR: Ricardo Bizogne Souto
ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Interleukin 11 (IL-11) is an endogenous cytokine that directly stimulates the proliferation of hematopoietic stem cells and megakaryocytic progenitor cells and induces megakaryocytic maturation. With advances in biotechnology, particularly with the advent of recombinant DNA technology has been enabled the expression of the IL-11 gene in *Escherichia coli* and thus the large-scale production of interleukin-11 Recombinant human (rhIL-11), which is clinically indicated, especially for severe thrombocytopenia to prevent and reduce the need for platelet transfusions following myelosuppressive chemotherapy in patients with non-myeloid malignancies at high risk of serious trompocitopenia. The analysis for CZE method were performed on a fused-silica capillary (effective length, 40 cm; 50 µm i.d.), using electrolyte solution consisted of 50 mM dihydrogen phospate solution at pH 3.0. The capillary was maintained at 25º C, the applied voltage was 20 kV. Injections were performed using a pressure mode at 50 mbar for 45 s, with detection by photodiode array detector set at 196 nm. The SE-LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.), maintained at 30ºC. The mobile phase consisted of 0.02 M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid and 0.5 M sodium chloride buffer, pH 6.0, run isocratically at a flow rate of 0.9 mL/min, and using a photodiode array (PDA) detection at 220 nm. Chromatographic separation was obtained with retention times of 10.31 min, and 8.12 min, and was linear over the concentration range of 1-300 µg/mL (r^2 = 0.9992) and 1-200 µg/mL (r^2 = 0.9996), respectively, for CZE and SE-LC. The limits of detection and quantitation were 0.21 and 1.0 µg/mL, respectively, for the CZE and 0.23 and 1.0 µg/mL, for the SE-LC. The specificity of the methods has been verified and confirmed by studies of degradation or interference of the excipients. Equally, the accuracy was 100.37% and 99.81%, with bias lower than 1.13% and than 0.43%, respectively, for CZE and SE-LC. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of related proteins and higher molecular weight forms showed significant differences (p< 0.05) compared to intact molecule. The validated methods were applied for the determination of rhIL-11 and related proteins in biotechnology-derived products, and the results were correlated to those of a validated reversed-phase LC method (RP-LC) and an TF-1 cell culture assay, with significant correlation (p> 0.05). Thus, we suggest the application of methods developed and validated by CZE and SE-LC to improve quality control of rhIL-11 biotechnology-derived product, thereby contributing to ensure their safety and therapeutic efficacy.

Keywords: Recombinant human interleukin-11. Capillary zone electrophoresis. Size exclusion liquid chromatography. Reversed-phase liquid chromatography. Bioassay. Validation. Correlations.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1 - Estrutura primária da rhIL-11, adaptada (YOKOTA et al., 2000a) 18

FIGURA 2 - Representação da estrutura tridimensional da IL-11, adaptada (HARMEGNIES et al., 2003) 19

FIGURA 3 - Vias de sinalização mediada pela IL-11, adaptada (DU e WILLIAMS, 1997)... 20

ARTIGO 1

FIGURA 1 - Effect of pH on migration time and peak width of rhIL-11 40 µg mL^{-1}. Running buffer 50 mmol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate. Conditions: capillary, 50 µm i.d. x 40 cm; applied voltage, 20 kV; UV detection, 196 nm; column temperature, 25°C. Pressure injection at 50 mbar for 45s 32

FIGURA 2 - Effect of buffer concentration on migration time and theoretical plate number of rhIL-11. Running buffer sodium dihydrogen phosphate pH 3.0, and conditions as described in the caption of Fig. 1 33

FIGURA 3 - Representative CZE electropherograms showing peak 1 = rhIL-11; peak 2 = internal standard (IS); peak 3, 4, 5 = degraded forms; peak 6 = hydrogen peroxide; peak 7 = glycine. (a) *BRS-rhIL-11*; (b) Sample of biopharmaceutical formulation. *BRS-rhIL-11* following degradation under conditions: (c) basic hydrolysis, (d) acid hydrolysis, (e) photolytic, (f) oxidative..... 33

FIGURA 4 - Representative blank plasma spiked with rhIL-11 and internal standard, showing peak 1 = internal standard; peak 2 = rhIL-11; peak 3 = excipient. *BRS-rhIL-11*: (a) CZE electropherogram, (b) RP-LC chromatogram 35

ARTIGO 2

FIGURA 1 - Representative SE-HPLC chromatograms showing peak 1 = rhIL-11; peak 2 = excipient (glycine); peak 3 = dimer and peak 4,5 = aggregate. (a) *BRS-rhIL-11*; (b) Sample of biopharmaceutical formulation. *BRS-rhIL-11* following degradation under conditions (c) photolytic, (d) neutral hydrolysis and (e) strong mixing 58

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABLE 1 – BGE conditions tested and current observed for the CZE method 32

TABLE 2 – Accuracy of CZE for rhIL-11 in the formulations 33

TABLE 3 – CZE conditions and range investigated during robustness testing with one-variable-at-a-time (OVAT) procedure 34

TABLE 4 – Comparative content/potency evaluation of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations by CZE and RP-LC methods, and bioassay 35

ARTIGO 2

TABLE 1 – Inter-days and between-analysts precision data of SE-HPLC for interleukin-11 in biopharmaceutical formulations 54

TABLE 2 – Accuracy of SE-HPLC for interleukin-11 in formulations 55

TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing..... 56

TABLE 4 – Comparative content/potency evaluation of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations by SE-HPLC, RP-HPLC and CZE methods..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS

BP	Farmacopeia Britânica
BRS-rhIL-11	Substância biológica de referência de interleucina-11 humana recombinante
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coeficiente de variação
CV%	Coeficiente de variação percentual
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Eletroforese Capilar
ECZ	Eletroforese Capilar de Zona
E. coli	*Escherichia coli*
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMA	European Medicines Agency
EP	Farmacopéia Européia
FDA	Food and Drug Administration
GDP	Guanosina difosfato inativa
GTP	Guanosina difosfato ativa
HES	Hidroximetilamido
His	Histidina
ICH	International Conference on Harmonisation
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina-6
IL-11	Interleucina-11
IL-11R	Receptor da interleucina-11
IV	Intravenoso
JAK	Janus Kinase
kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
Met	Metionina
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
RNA	Ácido ribonucleico
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
r^2	Coeficiente de determinação
rhIL-11	Interleucina-11 humana recombinante
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SC	Subcutâneo

STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TGFβ	Fator de transformação de crescimento beta
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TNFβ	Fator de necrose tumoral beta
ºC	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopeia Americana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO DA LITERATURA 17

3 ARTIGO 1 29

4 ARTIGO 2 38

5 DISCUSSÃO 60

6 CONCLUSÕES 65

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As citocinas constituem-se em um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante a modulação de respostas imunes. De acordo com suas funções, podem ser classificadas em: interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), interferons (IFN), fator de transformação de crescimento (TGF β), fator de necrose tumoral (TNFα e TNFβ) e quimiocinas (MIYAJIMA et al., 1992).

As IL são proteínas multifuncionais, as quais exercem atividade prevalentemente relacionadas à ativação ou supressão do sistema imune e na indução da divisão de células. A interleucina-11 (IL-11) é produzida no estroma dos fibroblastos da medula óssea e atua principalmente como fator de crescimento trombopoiético, estimulando diretamente a proliferação de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras megacariocíticas e induzindo o amadurecimento megacariocítico, o que resulta no aumento da produção de plaquetas (PAUL et al., 1990, 1991; KAYE, 1995).

Os avanços científicos recentes na área da biotecnologia, especialmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, possibilitaram a transferência de genes de um organismo para outro e possibilitaram a produção de moléculas altamente purificadas em grande escala. Entre elas destaca-se a interleucina-11 humana recombinante (rhIL-11), denominada também de oprelvecina, a qual é produzida em *Escherichia coli* (*E. coli*), constituída por cadeia polipeptídica de 177 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 19 kDa. Difere da IL-11 endógena somente pela ausência do resíduo prolina amino-terminal. É indicada na terapêutica, principalmente, para a prevenção de trombocitopenia grave e na redução de transfusão de plaquetas após quimioterapia mielossupressiva em pacientes com neoplasias malignas não mielóides com alto risco de trombocitopenia grave (CZUPRYN et al., 1995; PLAQUEMAX®, 2014).

Estudos iniciais relatam o uso de bioensaios *in vitro* para a determinação da potência da rhIL-11, com destaque para o ensaio biológico baseado na atividade proliferativa de células TF-1 (YIN et al.,1993). No entanto, uma das principais desvantagens dos bioensaios é a sua precisão, que é geralmente inferior a de técnicas físico-químicas (HAMMERLING et al., 1992; MIRE-SLUIS, 1999; EP, 2014).

Os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) viabilizam a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas, e também têm sido estudados para uso em combinação com os bioensaios ou como alternativa a esses (XINDU e

LILI, 2008). Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) com detecção na região do ultravioleta (UV) são amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e determinação das formas oxidadas e desamidadas de proteínas (FEKETE et al., 2012). 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 (FEKETE et al., 2014).

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica que pode ser utilizada para análise de proteínas ou peptídios, incluindo caracterização, identificação, detecção de variantes de carga e isoformas, interações entre biomoléculas e quantificação. Seu uso na análise de biofármacos é justificado principalmente devido ao baixo custo de consumo de reagentes e solventes, eficiente separação e detecção de impurezas, em alguns casos com vantagens em relação à CLAE, tornando essa técnica adequada para o controle de qualidade (LANDERS, 2008; DALMORA et al., 2012; USP, 2015).

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 CLAE, EC, espectrometria de massas e análise térmica (WANG, 1999; ICH, 1999). Esses procedimentos, juntamente com os ensaios de atividade biológica e enzimaimunoensaio (ELISA), possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, bem como avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos (STAMM et al., 2013a; ALMEIDA et al., 2014; EP, 2014). A presença de formas relacionadas e degradadas nas proteínas recombinantes de uso terapêutico pode causar alterações com redução ou perda da atividade farmacológica e efeitos imunológicos, além de efeitos indesejáveis (EMEA, 2007; FDA, 2014).

Acrescenta-se que, após o desenvolvimento de um método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que este atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ICH, 2005; FDA, 2015a). A avaliação de biomoléculas produzidas por expressão em sistemas celulares diversos, por métodos eficientes e validados, é fundamental 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 (BRASIL, 2011a). 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 (LONGSTAFF et al., 2009; BRASIL, 2010; EMA, 2014).

A oprelvecina (rhIL-11), objeto deste estudo, é produzida por tecnologia do DNA recombinante e encontra-se disponível comercialmente no Brasil na apresentação de pó liofilizado para injeção, sendo utilizada clinicamente, tendo reflexos diretos na área de saúde pública. Desse modo, justifica-se a importância do estudo de tecnologias analíticas para avaliação de identidade, pureza, teor/potência, estabilidade para viabilizar análises de correlação e assegurar a qualidade dos produtos biotecnológicos. Destaca-se que, até o presente momento, não existem em compêndios farmacopeicos oficiais, ensaios biológicos e métodos físico-químicos para a caracterização e avaliação da rhIL-11.

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver, otimizar e validar métodos físico-químicos para a caracterização e avaliação da identidade, pureza, teor/potência, estabilidade e qualidade de rhIL-11. Realizar estudos de correlação, avaliar e estabelecer metodologias analíticas para aprimorar o controle de qualidade, contribuindo para garantir a segurança e eficácia terapêutica desse biofármaco.

Por sua vez, os objetivos específicos constituem-se na aplicação de métodos previamente desenvolvidos e otimizados para avaliação de rhIL-11 por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência e imunodetecção para identificação; por cromatografia líquida em fase reversa para identificação e determinação de teor/potência da forma não alterada e de proteínas relacionadas; pelo ensaio da proliferação de células da linhagem TF-1 para avaliação de potência da forma íntegra e modificada. Paralelamente, pretende-se desenvolver e validar métodos para caracterização e avaliação de rhIL-11 por eletroforese capilar para identificação e determinação de teor/potência da biomolécula e de formas degradadas; por cromatografia líquida por exclusão molecular para identificação e determinação de teor/potência do monômero e de proteínas de alta massa molecular. Realizar análise estatística, correlação e interpretação dos resultados; estabelecer correlações entre métodos físico-químicos e biológico *in vitro;* aplicar os métodos desenvolvidos e validados para o controle de qualidade dos produtos biotecnológicos disponíveis no País.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Paul e colaboradores (1990, 1991) identificaram originalmente fator de crescimento produzido no estroma dos fibroblastos da medula óssea com base na sua capacidade de estimular a proliferação da linhagem de células T1165 de plasmacitoma de camundongo. Essa molécula foi designada de IL-11 e classificada na família de citocinas da interleucina-6, por apresentar estrutura tridimensional com cadeia longa de α-hélice, assim como a interleucina-6, interleucina-12, eritropoietina e fator estimulador da colônias de granulócitos (BAZAN, 1990; BERGER et al., 1994; CHACHADE, 2009; NOGUEIRA-SILVA et al., 2013). A IL-11, especificamente, pertence à sub-família de citocinas dependente do receptor gp130, do mesmo modo que a interleucina-6, fator de crescimento de neurotrófilos, entre outras (BELLIDO et al., 1996; UNDERHILL-DAY et al., 2003; SOMMER et al., 2012; ANNAMALAI et al., 2014).

O progresso científico na área farmacêutica, principalmente com o desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante, possibilitou a clonagem e expressão de genes humanos em outros organismos, e a consequente produção de biomoléculas altamente purificadas em grande quantidade. Entre elas destaca-se a interleucina-11 humana recombinante (rhIL-11), ou oprelvecina, a qual é produzida através da clonagem e expressão do gene humano da IL-11 em *E. coli*. Possui massa molecular de, aproximadamente, 19 kDa e cadeia polipeptídica de 177 aminoácidos, diferindo da IL-11 endógena apenas pela ausência do resíduo prolina amino-terminal. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que essa diferença na estrutura molecular da rhIL-11 não influenciou significativamente em sua bioatividade (CZUPRYN et al., 1995; AOYAMA et al., 1997; NEUMEGA®, 2004). Apresenta fórmula química composta por $C_{854}H_{1411}N_{253}O_{235}S_{2,}$ e sua estrutura primária está representada na Figura 1 (YOKOTA et al., 2000a; DRUG BANK, 2015).

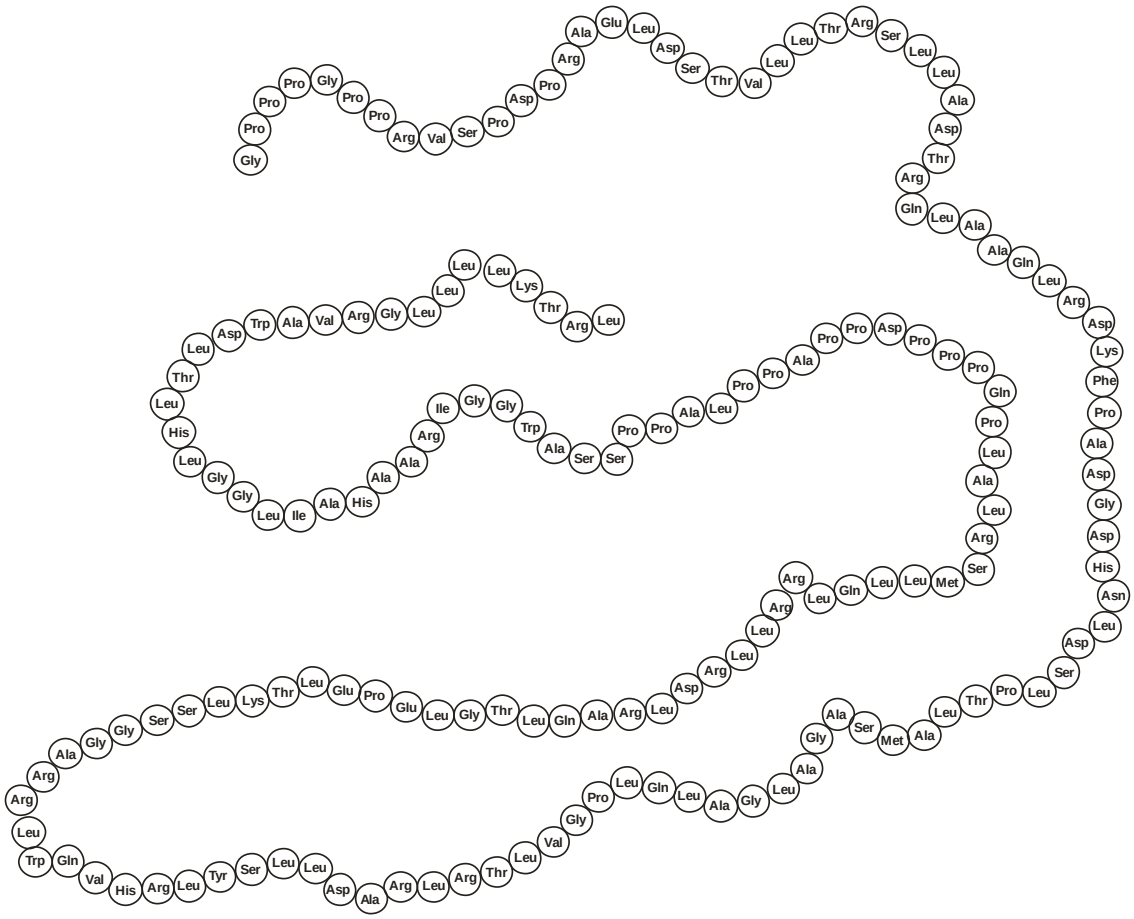

Figura 1 – Estrutura primária da rhIL-11, adaptada (YOKOTA et al., 2000a).

A IL-11 é uma citocina hematopoiética que estimula diretamente a produção de células tronco-hematopoiéticas e células progenitoras megacariocíticas e induz o amadurecimento megacariocítico, resultando no aumento da produção de plaquetas. Resumidamente, este processo se desencadeia através da ligação da IL-11 com receptores específicos e a consequente emissão de sinais transportados por proteínas mediadoras até o núcleo celular, no qual ocorrerá a transcrição de genes e posterior tradução para proteínas efetoras (PAUL et al., 1990, 1991).

Souto (2011, p. 18-20) realizou levantamento bibliográfico e descreveu as principais etapas do mecanismo de ação da IL-11conforme segue:

> Inicialmente a IL-11 liga-se a subunidade α do receptor IL-11R (responsável pela especificidade da ligação) resultando na formação do complexo IL-11-IL-11Rα. Este interage com a subunidade β do receptor gp130 (responsável pela transdução de sinal para o citoplasma das células). Com base na estrutura tridimensional do modelo de 4 α-hélices, 3 regiões são responsáveis por sua afinidade com os receptores: a região 1 que está relacionada à interação com o receptor IL-11Rα e as regiões 2 e 3 que são responsáveis pela interação com a subunidade β do receptor

gp130, conforme a Figura 2a. A energia principal para que ocorram as ligações com estes receptores é fornecida por aminoácidos hidrofóbicos apolares cercados por resíduos polares ou carregados, o que acontece nas regiões 2 e 3 (possuem alta afinidade de interação). A região 1 possui 2 aminoácidos hidrofílicos, histidina[182] e asparagina[186], que diminuem sua afinidade de interação como mostra a Figura 2b (HILTON et al., 1994; PANAYOTATOS et al., 1995; HUDSON et al., 1996; HARMEGNIES et al., 2003).

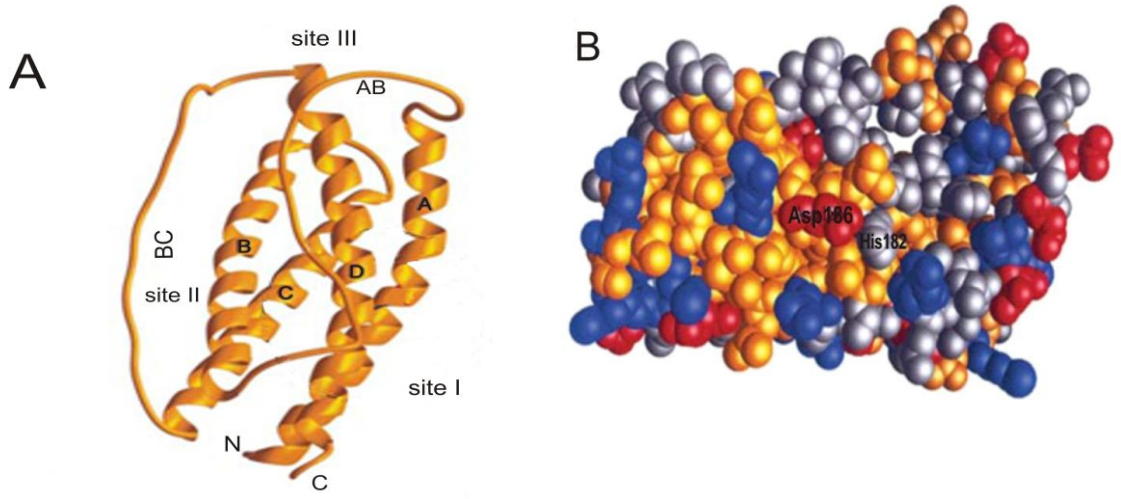

Figura 2: Representação da estrutura tridimensional da IL-11, adaptada (HARMEGNIES et al., 2003).

(A) Modelo tridimensional da IL-11 destacando as 3 regiões de interação com receptores.

(B) Modelo tridimensional da região 1 da IL-11. Aminoácidos carregados positivamente em azul, negativamente em vermelho, hidrofílicos em cinza e hidrofóbicos em amarelo.

A interação do complexo IL-11-IL-11Rα com a subunidade β do receptor gp130 induz sua heterodimerização, fosforilação e ativação (YIN et al.,1992, 1993; FOURCIN et al.,1994). Logo após, este receptor ativa as proteínas citoplasmáticas tirosina quinase da família Janus Kinase (JAK) tornando possíveis duas vias de sinalização (BERGER et al.,1994; YIN et al.,1994). Uma mais simples, através da interação das proteínas JAK com as proteínas da família STAT (do inglês *Signal Transducers and Activators of Transcription*), que resulta na transdução rápida de sinais para o núcleo. E outra mais complexa, que envolve a interação das proteínas JAK com a proteína adaptativa Grb2. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da proteína Ras, ou seja, induz a passagem conformacional da Ras do estado inativo para o ativo. Uma vez ativada, a Ras estimula a fosforilação da serina da cascata da proteína quinase MAPK, que transduz finalmente os sinais para o núcleo. No núcleo, estes sinais induzem a transcrição de

genes, que a seguir são traduzidos em proteínas efetoras, etapa final da expressão gênica. A IL-11 pode estimular também a transformação de alguns lipídios em ácido fosfatídico, o qual provoca a fosforilação tirosínica das MAPKs intensificando sua transdução de sinais (SIDDIQUI e YANG, 1995; WANG et al., 1995). As vias de sinalização mediada pela IL-11 estão esquematizadas na Figura 3 (DU e WILLIAMS, 1997).”

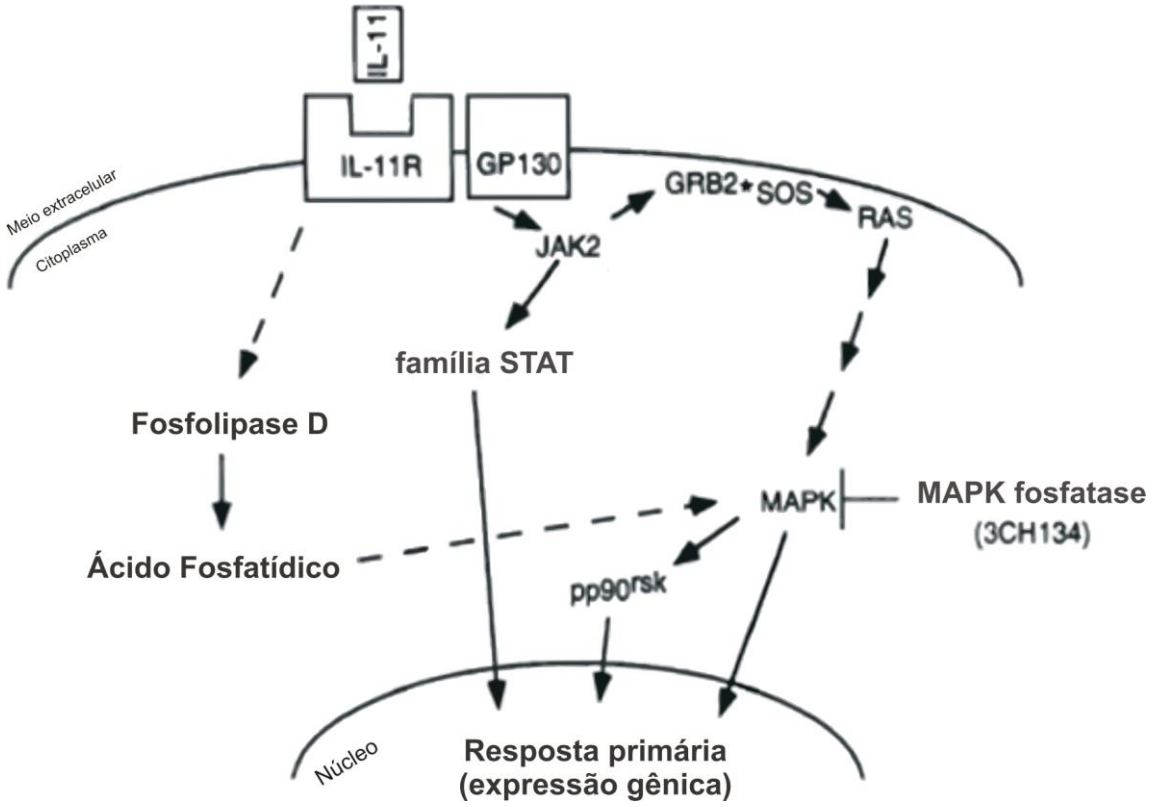

Figura 3: Vias de sinalização mediadas pela IL-11, adaptada (DU e WILLIAMS, 1997).

A rh-IL11 é o princípio ativo do produto biofarmacêutico Neumega® do laboratório Wyeth, primeiro agente trombopoiético aprovado para uso clínico pela agência reguladora estadunidense *US Food and Drug Administration* (FDA). Encontra-se disponível na forma de pó liofilizado para injeção, na apresentação de 5 mg de rhIL-11/frasco, e é indicado na terapêutica para o tratamento de trombocitopenia grave e na redução da necessidade de transfusão de plaquetas após quimioterapia mielossupressiva em pacientes com neoplasias malignas não mielóides com alto risco de trombocitopenia (KAYE, 1998; USUKI et al., 2007; YANAKA et al., 2011; BALDO et al., 2014; LIU et al., 2015). No Brasil, Neumega® teve sua comercialização descontinuada em julho de 2009.

Plaquemax®, do Laboratório Bergamo/Amgen, é o produto biofarmacêutico de rhIL-11 disponível para uso terapêutico no Brasil. A ANVISA concedeu seu registro em

18/02/2008. Apresenta-se sob a forma de pó liofilizado para injeção, nas concentrações de 3 e 5 mg/frasco. Sua dose recomendada em adultos é de 50 µg/Kg administrada subcutaneamente em injeção única no abdômen, coxa ou quadril, 24 a 48 horas após o término da quimioterapia ou após a ocorrência de trombocitopenia, uma vez ao dia por 7 a 14 dias.

O produto biofarmacêutico de rhIL-11, Plaquemax®, é indicado clinicamente para à prevenção de trombocitopenia (baixo nível de plaquetas no sangue) grave e na redução da necessidade de transfusões de plaquetas após quimioterapia mielossupressiva (terapia que causa supressão da produção de células sanguíneas da medula óssea) em pacientes com tumores malignos nãomielóides (não provenientes da medula óssea) com alto risco de trombocitopenia grave. Sua eficácia foi demonstrada em pacientes que tiveram trombocitopenia grave após ciclo de quimioterapia prévio. Não é indicado após quimioterapia mieloablativa (terapia que destrói as células da medula óssea). Pacientes com tumores sólidos e leucemias não-medulares que têm trombocitopenia de graus III e IV com contagem de plaquetas < 50 x 109 /L no ciclo de quimioterapia prévia, podem ser administrados com Plaquemax® de forma a reduzir o sangramento causado pela trombocitopenia e a dependência por transfusões de plaquetas. Pode ser combinado com filgrastim para tratar pacientes que tenham simultaneamente leucopenia (baixo número de células brancas no sangue) (PLAQUEMAX®, 2014).

Alguns pesquisadores relatam em seus trabalhos científicos atividades não-hematopoiéticas da rhIL-11, destacando-se: inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (TREPICCHIO et al., 1996, 1997; OPAL e DePALO, 2000; ELLIS et al., 2006; WAN et al., 2015), estimulação da osteoclastogênese e neurogênese (GIRASOLE et al. 1994; McCoy et al., 2013), inibição da adipogênese (KELLER et al., 1993; TENNEY et al., 2005; WHITE e STPHENS, 2011) e regulação do crescimento e absorção do epitélio intestinal (ALAVI et al., 2000; HUNTER et al., 2014)

Nesse sentido, encontram-se disponíveis na literatura estudos iniciais não clínicos, em diferentes modelos, que evidenciam a eficácia da rhIL-11 no tratamento da hemofilia A leve e doença de Von Willebrand (DENIS et al., 2001; NICHOLS et al., 2009; RAGNI et al., 2011), doença de Crohn e colite ulcerosa (SANDS et al., 1999; MEERVELD et al., 2001; GIBSON et al., 2010; NGUYEN et al., 2015), cirrose e hepatite C crônica (LAWITZ et al., 2004; GIANNINI, 2006; HAYASHI et al., 2014), artrite reumatóide (HERMANN et al., 1998; MORELAND et al., 2001; YAN et al., 2013), e atenuação da fibrose cardíaca após infarto do miocárdio (KIMURA et al., 2007; OBANA et al.,2010; FUJIO et al., 2011).

Schlerman e colaboradores (1996) investigaram a ação da rhIL-11 em macacos sadios e com mielossupressão induzida, evidenciaram aumento significativo da produção de plaquetas em relação aos grupos controle. Com o intuito de esclarecer os mecanismos da hematopoiese provocados pela rhIL-11, a cinética da megacariopoiese foi investigada, por Saitoh e colaboradores em 2001. Foram utilizados camundongos, mielossuprimidos previamente com mitomicina C, nos quais foram administrados rhIL-11, por 19 dias. Através da análise da resposta hematológica pela contagem de plaquetas e neutrófilos, observaram, como resultado, que o biofármaco estimulou, a proliferação e maturação de células megacariocíticas *in vivo*, reduzindo, assim, a trombocitopenia.

Aoyama e colaboradores (1997) avaliaram o comportamento farmacocinético da rhIL-11 após subcutânea (SC), nas doses de 3 e 50 µg/kg e injeção intravenosa (IV), nas doses de 10 e 50 µg/kg, em humanos do sexo masculino. Adicionalmente, administraram dose de 3 µg/kg por via SC, durante 7 dias consecutivos. Realizaram coleta de urina e sangue em tempos específicos para serem analisadas por ELISA. Os valores de meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) e tempo médio de retenção (TMR) no plasma indicaram farmacocinética linear, com taxa de absorção limitada, de 65%, após administração subcutânea, quando comparados com os valores obtidos após administração IV. A rhIL-11 não foi detectada na urina, após dose única de 50 µg/Kg. Por sua vez, Kaye (1998) estudou a farmacocinética da rhIL-11 em voluntários sadios, obtendo, para dose única de 50 µg/Kg de rhIL-11 pela via SC, concentração plasmática máxima (Cmáx) de 17,4 ng/mL e tempo para atingir esta concentração (Tmáx) de 3,2 h. Evidenciou biodisponibilidade superior a 80% após injeção SC.

Quanto a excreção da rhIL-11, pesquisadores monitoraram ratos e camundongos após infusões pela vias SC e IV de rhIL-11, e de rhIL-11 associada a biomarcadores. Avaliaram os perfis de liberação plasmática e depuração corporal por técnicas de perfusão renal e hepática e imunorreatividade em diferentes publicações e concluíram que a rhIL-11 é eliminada majoritariamente através dos rins e fígado (TAKAGI et al., 1995; TAKAGI et al., 1997; TAKAGI et al., 1998; UCHIDA et al., 1998).

Efeitos adversos signigficativos ($p < 0,05$), causados pelo uso de rhIL-11 em pacientes após serem submetidos à quimioterapia foi relatado por Kaye (1998), entre os quais estão taquicardia conjuntiva, edema, dispnéia e derrame pleural. De acordo com a bula do produto Plaquemax®, as seguintes reações adversas, ocorrendo em ≥ 10% dos pacientes, foram observadas em igual ou maior frequência que em pacientes tratados com placebo: astenia, dor, calafrios, dor abdominal, infecção, anorexia (diminuição ou perda do apetite), constipação (prisão de ventre), desconforto estomacal, equimose (pequenos pontos de hemorragia na pele

ou membranas mucosas), dor muscular, dor óssea, nervosismo e queda de cabelos. Ainda, reações adversas selecionadas que ocorreram foram, no corpo como um todo: edema (inchaço), febre neutropênica (neutropenia ou diminuição dos glóbulos brancos do sangue, acompanhada de febre), dor de cabeça e febre; no sistema cardiovascular: taquicardia (aumento da frequência dos batimentos cardíacos), vasodilatação, palpitações, desmaios e fibrilação/flutter atrial; no sistema digestivo náusea/vômitos, mucosite (inflamação da mucosa), diarréia e candidíase oral (sapinho); no sistema nervoso: tontura e insônia; no sistema respiratório: dispnéia, rinite, aumento da tosse, faringite (inflamação da garganta) e derrame pleural (presença de líquido excedente na cavidade pleural); outros erupção cutânea, congestão conjuntival (vermelhidão dos olhos) e visão embaçada (PLAQUEMAX®, 2014).

Yin e colaboradores (1993) estudaram o processo de emissão de sinais desencadeado pela atividade da rhIL-11 em células TF-1 (linhagem humana multifatorial eritroleucemica dependente). Observaram aumento na indução da fosforilação de proteínas, ativação da expressão celular proto-oncogene e proliferação celular. Concluíram que para a transdução de seus sinais e ativação de mecanismos, a rhIL-11 depende diretamente do receptor gp130.

Biensaio *in vitro* foi pesquisado por Yokota e colaboradores (2000b) para determinar a potência biológica da rhIL-11. Utilizaram linhagem celular T10, corante azul de tetrazólio e a resposta foi quantificada através da absorbância, em 450 nm e 650 nm, das doses da curva dose-resposta em leitor de micro placas. O coeficiente de variação percentual (CV%) obtido nos resultados foi inferior a 8%. O bioensaio foi destacado como simples, reprodutível e preciso.

Modificações químicas e mutagênese sítio-dirigida foram realizadas na estrutura molecular da rhIL-11 por Czupryn e colaboradores em 1995. Após, efetuaram caracterização estrutural com identificação das regiões/resíduos essenciais para a expressão atividade da rhIL-11 por diferentes técnicas, como: eletroforese em gel de poliacrilamida, cromatografia líquida por troca iônica, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Evidenciaram que a supressão do resíduo metionina[58] reduz aproximadamente de 25 vezes a atividade da rhIL-11 e a ausência dos últimos resíduos de aminoácidos da porção carboxi-terminal podem reduzir ou até inativar sua ação.

Proteína de fusão de rhIL-11 expressa em lisado de *E. coli* foi investigada por Amari e Mazsaroff em 1996. Inicialmente as proteínas de baixa e alta massa molecular foram separadas por CL-EM, utilizando coluna cromatográfica Bio-Sil® SEC-250 (dimensões: 300 x 7,8 mm; tamanho de partícula: 5µm; e tamanho do poro: 250 A. BioRad Richmond, CA, USA), fase móvel composta de tampão Bis-Tris propano 15 mM, 200 mM de NaCl e 5% de

etanol, com detecção em 214 nm. Após a rhIL-11 foi quantificada por método por CL-FR utilizando coluna cromatográfica Poros® R1/H (dimensões: 100 x 4,6 mm; tamanho de partícula: 10 µm; e tamanho do poro: 400 A. PerSeptive BioSystems, MA, USA) e fase móvel em gradiente composta por fase A ácido trifluoroacético (TFA) em água 0,1% (v/v) e fase B 0,1% de TFA em 80:20 (v/v) de acetonitrila e água, com detecção em 214 nm. Os autores sugeriram os métodos utilizados para o monitoramento do processo de produção e purificação de rhIL-11.

Yokota e colaboradores (2000a) avaliaram a estabilidade da rhIL-11 quando armazenada em recipientes plásticos de polipropileno e poliestireno. Para a separação e quantificação da molécula íntegra e de seus produtos de degradação, foi desenvolvido método por CL-FR sob as seguintes condições: coluna cromatográfica Bondasphere® C_4 (dimensões: 150 x 3,9 mm; tamanho de partícula: 5µm; e tamanho do poro: 300 A. Waters, Tokyo, Japan), fase móvel em gradiente composta por fase A TFA 0,1% em 50:50 (v/v) de acetonitrila e água e fase B 0,1% de TFA em 70:30 (v/v) de acetonitrila e água, com detecção em 214 nm. Após, identificaram formas degradadas de rhIL-11 por mapeamento peptídico e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Atribuíram maior oxidação da metionina[58] nas amostras armazenadas em tubos de polipropileno do que aquelas em tubos de poliestireno, sendo a oxidação intensificada quando os tubos eram previamente expostos à luz.

Zhang e colaboradores (2002) investigaram a deamidação da asparagina e isomerização do aspartato em amostras de rhIL-11, submetidas à temperatura de 30º C por 6 semanas, por métodos de eletroforese em gel de poliacrilamida, eletroforese capilar e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Evidenciaram e níveis baixos de isomerização do aspartato[51] e deamidação da asparagina[49] e significativa isomerização do aspartato[45] e aspartato[47]. Obervaram redução da atividade biológica das amostras sob estresse através de bioensaio com linhagem de células T10, embora com diferença não significativa.

A estabilidade da rhIL-11 liofilizada foi avaliada em amostras preparadas utilizando diferentes excipientes no preparado de sua formulação, por Garzon-Rodriguez e colaboradores em 2004. Método por CL-EM utilizando coluna cromatográfica TosoHaas® TSK-2000 SWXL (dimensões: 300 x 7,8 mm; tamanho de partícula: 5 µm; e tamanho do poro: 125 A. Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan), fase móvel composta por tampão MES 50 mM, glicina 0,1 mM e NaCl 50 Mm, com detecção em 225 nm foi desenvolvido para monitorar agregados e substâncias de alta massa molecular. Método por CL-FR utilizando coluna cromatográfica Poros® R1/H (dimensões: 100 x 4,6 mm; tamanho de partícula: 10 µm; e tamanho do poro: 400 A. PerSeptive BioSystems, MA, USA), fase móvel em gradiente

composta por fase A TFA 0,1% em água (v/v) e fase B 0,1% de TFA em 80:20 (v/v) de acetonitrila e água, com detecção em 214 nm foi desenvolvido para determinar produtos de oxidação e clivagem. Observaram nas amostras que foram preparadas por uma combinação de excipientes de dissacarídeos e hidroxietilamido, menor formação de agregados e formas oxidadas, sugerindo melhor estabilidade para a formulação.

Souto e colaboradores (2012) desenvolveram método por CL-FR para identificação e avaliação de rhIL-11 e suas formas de desamidados e sulfóxidos, em formulações biofarmacêuticas. O método CL-FR foi validado nas seguintes condições analíticas: coluna cromatográfica Jupiter® C_4 (dimensões: 250 x 4,6 mm; tamanho de partícula: 5 µm; e tamanho do poro: 300 A. Phenomenex, CA, USA), fase móvel em gradiente composta por fase A 0,1% de TFA em água (v/v) e fase B 0,1% de TFA em acetonitrila (v/v), com detecção em 214 nm. O método foi aplicado para avaliação de produtos biofarmacêuticos de rhIL-11 e os resultados foram correlacionados com bioensaio *in vitro* em células TF-1, observando-se teor/potência em média 2,60% superior por CL-FR em relação ao bioensaio, com correlação significativa ($p > 0,05$). Adicionalmente foi avaliada a citotoxicidade das proteínas relacionadas em relação à molécula íntegra, não encontrado diferenças significativas ($p > 0,05$).

Jung e colaboradores (2011) realizaram alterações específicas na estrutura molecular da rhIL-11 através de técnicas de mutagênese sítio-dirigida, obtendo uma biomolécula modificada. Após, pesquisaram a atividade biológica do novo composto em roedores e primatas. Nesse experimento, observaram, para a rhIL-11 modificada em relação à natural, aumento superior a três vezes da concentração plasmática máxima (Cmax) e área-sob a curva (AUC), bem como aumento três vezes maior na contagem de plaquetas, após sete dias consecutivos de injeções. Testes de degradação demonstraram maior estabilidade da molécula alterada em relação à original, sugerindo menor toxicidade.

É importante destacar os avanços realizados na área farmacêutica com o desenvolvimento de moléculas conjugadas, especialmente de formas peguiladas, que foram então estudadas e caracterizadas por diferentes técnicas analíticas que incluem EC, CL e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, avaliando-se também a atividade de isômeros. Paralelamente, foram submetidas a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos, comparando diferentes vias de administração para produtos peguilados e não-modificados, demonstrando suas vantagens terapêuticas (FOSER et al., 2003; HARRIS e CHESS, 2003).

Nesse contexto, Takagi e colaboradores (2006) estudaram a incorporação de protamina e ácido hialurônico no preparo de formulações de rhIL-11. Logo a seguir, Takagi e

colaboradores (2007) continuaram pesquisando formas modificadas de rhIL-11, com destaque para o preparo de formulações peguiladas. Em ambos os estudos, avaliaram o perfil farmacocinético em ratos por ELISA e determinaram a atividade biológica pelo aumento da contagem do número de plaquetas. Demonstraram que as formulações modificadas aumentaram significativamente a contagem de plaquetas e prolongaram o tempo de retenção plasmática da rhIL-11 e quando comparados com a formulação original.

Portanto, considerando as tecnologias analíticas disponíveis, pode-se destacar que os métodos por CL têm sido amplamente descritos na literatura científica para análise de produtos farmacêuticos e suas matérias-primas, contribuindo para a identificação e quantificação de fármacos, produtos de degradação e excipientes. Diversos autores destacam as vantagens do uso de métodos desenvolvidos por cromatografia na área farmacêutica, entre as quais se podem citar: especificidade, sensibilidade, robustez e reprodutibilidade, além de duração de análise e custo adequados especialmente para estudos de estabilidade (XINDU e LILI, 2008; MANNING et al., 2010). As técnicas por CL-FR e por CL-EM baseadas na hidrofobicidade e tamanho das moléculas, respectivamente, são frequentemente empregadas no 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 (GUNTURI et al., 2007; ALMEIDA et al., 2011). As modificações podem reduzir a bioatividade do biofármaco e causar reações imunogênicas (HERMELING et al., 2004; ROSENBERG, 2006; GROOT e SCOTT, 2007; ALMEIDA et al., 2010; STAMM et al., 2013a).

Por sua vez, a EC é uma técnica que pode ser utilizada para a identificação, determinação de cargas, isoformas, pureza e quantificação de proteínas. O processo de separação da EC decorre do movimento do analito no capilar sob um campo elétrico e um fluxo eletro-osmótico (FEO). Este movimento é dependente, sobretudo, da carga e da magnitude do campo elétrico aplicado, assim como, da viscosidade do eletrólito e do raio da molécula. Consequentemente, a mobilidade eletroforética intrínseca do composto é determinada pela combinação de forças de atrito e elétricas, indicando que a separação dos componentes de uma mistura está baseada na relação massa/carga dos analitos. A EC é uma técnica adequada para uso no controle de qualidade de medicamentos, pois pode permitir eficiente separação, detecção e quantificação de fármacos, impurezas e excipientes, além de

apresentar baixo consumo de solventes e reagentes e o uso de pequena quantidade de amostra para análise (LANDERS, 2008; DALMORA et al., 2012; USP, 2015).

A validação de métodos analíticos é necessária para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados, assegurando que o método é adequado para a finalidade pretendida (SHABIR, 2003; SHABIR, et al., 2007; ROZET, et al., 2007; INJAC, et al., 2008). Procedimentos para validação de métodos analíticos encontram-se disponíveis em guias oficiais (ICH, 2005; FDA, 2015a; USP, 2015), os quais descrevem os principais parâmetros para serem avaliados durante a validação de um método, entre eles: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. Trabalhos de validação de métodos analíticos aplicados a produtos biotecnológicos podem ser encontrados, detalhadamente, em dissertações desenvolvidas no laboratório de produtos biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (SOUTO, 2011; STAMM, 2013b) e nos artigos científicos desta tese (ARTIGOS 1 e 2).

O desenvolvimento de métodos físico-químicos aplicáveis à análise de proteínas recombinantes são importantes, pois, em geral, apresentam maior exatidão, precisão e facilidade de execução em relação aos ensaios biológicos. Esses métodos podem ser usados em combinação com os bioensaios ou como alternativos para a avaliação de identidade, pureza, teor/potência e caracterização das biomoléculas, incluindo seu uso durante a etapa pré-clinica e também em estudos de comparabilidade/biosimilaridade, conforme preconizam os guias nacionais e internacionais, (BRASIL, 2011b; EMA, 2015; FDA, 2015b).

As proteínas bioterapêuticas apresentam estruturas moleculares complexas e alta massa molecular. Podem apresentar heterogeneidade lote a lote, pois dependem do processo de produção em células vivas, razão pela qual tornam essas biomoléculas distintas dos fármacos clássicos. Nesse sentido, os ensaios biológicos e os métodos físico-químicos não conseguem, isoladamente, avaliar estas moléculas suficientemente para confirmar a sua equivalência estrutural com o biofármaco de referência. Sendo assim, tem sido usada a combinação de métodos analíticos que representem a tecnologia do estado-da-arte para caracterização e estudos de comparabilidade, com destaque para a garantia da segurança e eficácia terapêutica desses produtos biotecnológicos (KRESSE, 2009; SCHELLEKENS e MOORS, 2010; KÁLMÁN-SZEKERES et al., 2012; EMA, 2014; WEISE et al., 2014).

A seguir estão anexadas as publicações científicas referentes aos estudos desenvolvidos no contexto desta tese (ARTIGOS 1 e 2). Observa-se que os materiais e métodos utilizados, assim como os resultados obtidos, encontram-se descritos nas mesmas.

ARTIGO 1

3 ARTIGO 1

3.1 – Ricardo Bizogne Souto, Fernanda Pavani Stamm, Jéssica Barbieri Schumacher, Clovis Dervil Appratto Cardoso Junior, Guilherme Weber de Freitas, Rafaela Ferreira Perobelli and Sérgio Luiz Dalmora. Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with reversed-phase liquid chromatography and bioassay. **Talanta**, v.123, p. 179-185, 2014, doi:10.1016/j.talanta.2014.01.065.

Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.065.

Talanta 123 (2014) 179–185

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with reversed-phase liquid chromatography and biossay

Ricardo Bizogne Souto, Fernanda Pavani Stamm, Jéssica Barbieri Schumacher, Clovis Dervil Appratto Cardoso Jr., Guilherme Weber de Freitas, Rafaela Ferreira Perobelli, Sérgio Luiz Dalmora *

Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 December 2013
Received in revised form
29 January 2014
Accepted 30 January 2014
Available online 20 February 2014

Keywords:
Recombinant human interleukin-11
Capillary zone electrophoresis
Reversed-phase liquid chromatography
TF-1 cell culture
Biotechnology

ABSTRACT

A stability-indicating capillary zone electrophoresis (CZE) method was validated for the analysis of recombinant human interleukin-11(rhIL-11) using rupatadine fumarate, as internal standard (IS). A fused-silica capillary, (50 μm i.d.; effective length, 40 cm) was used at 25 °C; the applied voltage was 20 kV. The background electrolyte solution consisted of 50 mmol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate solution at pH 3.0. Injections were performed using a pressure mode at 50 mbar for 45 s, with detection by photodiode array detector set at 196 nm. Specificity and stability-indicating capability were established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The method was linear over the concentration range of 1.0–300 μg mL^{-1} (r^2=0.9992) and the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.2 μg mL^{-1} and 1.0 μg mL^{-1}, respectively. The accuracy was 100.4% with bias lower than 1.1%. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed significant differences ($p < 0.05$). The method was applied for the content/potency assessment of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations, and the results were correlated to those of a validated reversed-phase LC method (RP-LC) and an TF-1 cell culture assay, showing non-significant differences ($p > 0.05$). In addition the CZE and RP-LC methods were applied for the analysis of rhIL-11 in human plasma. Therefore, the proposed alternative method can be applied to monitor stability, to assure the batch-to-batch consistency and quality of the bulk and finished biotechnology-derived medicine.
© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Thrombocytopenia occurs in patients with malignancies undergoing myelosuppressive chemotherapy, which may lead to hemorrhagic tendency and treatment delay. Recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) is a kind of cytokine produced by DNA technology in *Escherichia coli*, now marketed worldwide as Oprelvekin, for clinical use in prevention of severe chemotherapy-induced thrombocytopenia and to reduce the need for platelet transfusions in patients with nonmyeloid malignancies [1–3].

The rhIL-11 biomolecule consists of 177 amino acids polypeptide chain, non-glycosylated with a molecular mass of 19 kDa and isoelectric point of 11.7. Differs from the naturally occurring human interleukin-11 (IL-11) only by the absence of an amino-terminal proline, and the presence of two residues of Met^{58} and Met^{122} [4].

The bioassays are useful to assess the efficacy and quality of those proteins, which cannot be adequately characterized only by physicochemical methods. Early signals triggered by IL-11 were assessed in a multifactor-dependent human erythroleukemic cell line TF1, which showed that this protein stimulated cell proliferation [5] and was applied to assess the bioactivity of biopharmaceuticals formulations [6]. However, a major concern of using a bioassay is its precision, which is generally inferior to the precision of physicochemical techniques [7–9].

Physicochemical techniques are used to monitor content/potency, purity, chemical stability of biopharmaceutical proteins obtained through recombinant DNA technology. No single technique can satisfactorily provide sufficient information about the protein and therefore a combination of physicochemical, immunological, and biological methods is recommended, and has been applied in correlation studies [10–13]. The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants or degradation products which may have reduced activity and altered immunogenicity [14,15]. A linear gradient RP-LC method using C_4

* Corresponding author. Tel./fax: +55 55 3220 8952.
E-mail address: sdalmora@terra.com.br (S.L. Dalmora).

http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.065
0039-9140 © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

column and UV detection at 214 nm was employed to determine the oxidative effect of plastic tubes used for storage of protein samples [16]. Optimal storage stability of lyophilized rhIL-11 was evaluated by quantifying the oxidation levels and cleavage products by the gradient RP-LC [17]. A stability-indicating RP-LC method was validated using a C_4 column with PDA detection at 214 nm, and was applied to the assessment of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations [6]. Capillary electrophoresis (CE) has expanded its scope as a powerful analytical technique for pharmaceutical analysis, allowing the determination of biotechnology-derived medicines and their degraded forms, charged variants and isoforms [9,10,18–20]. At the moment, rhIL-11 is not included in any Pharmacopoeia and no CE method has been published for quality control analysis. However, validation of the method is essential to show that the procedure is suitable for its intended purpose [21].

The aim of this research was to develop and validate a specific, sensitive and stability-indicating capillary zone electrophoresis (CZE) method for the analysis of rhIL-11; to correlate the results with a validated RP-LC method and with an *in vitro* bioassay; and to evaluate the bioactivity and the cytotoxicity of the degraded forms, thus contributing to the development of an alternative method to monitor stability, improve quality control, and thereby assuring the therapeutic efficacy of the biotechnology-derived medicine.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Reference reagent Interleukin-11, human rDNA derived, (*R-rhIL-11* WHO 92/788), for bioassays was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control-NIBSC (Herts, UK). Biological reference substance of rhIL-11, (*BRS-rhIL-11*), for physicochemical assays was supplied by Amoytop Biotech Co., Ltd. (Xiamen, Fujian, China). Rupatadine fumarate (IS) was purchased from by Sequoia Research Products (Oxford, UK). A total of ten batches of Plaquemax® Bergamo (São Paulo, Brazil), containing 5 mg/vial of rhIL-11 were identified by numbers from 1 to 10 and two batches of Neumega® Wyeth (São Paulo, Brazil), containing 5 mg/vial of rhIL-11 were identified by numbers from 11 to 12. Samples were obtained from commercial sources within their shelf life period. Acetonitrile, disodium hydrogen phosphate, glycine, methanol, sodium dihydrogen phosphate, sodium dodecyl sulfate and trifluoroacetic acid used as reagents or excipients were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Fetal bovine serum, RPMI-1640 medium and thiazolyl blue formazan (MTT) were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was obtained using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Apparatus

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

The RP-LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, a LC-10 AD_{VP} pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD_{VP} autosampler, and a SPD-M10A_{VP} PDA detector. Peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP® V 6.14 software program.

2.3. Capillary zone electrophoresis method

2.3.1. Solutions preparation

Stock solutions were prepared by diluting the *BRS-rhIL-11* reference solution and the sample of biopharmaceutical formulation in water, to a final concentration of 400 μg mL^{-1}. IS was diluted to a final concentration of 200 μg mL^{-1} in methanol. The stock solutions were stored at 2–8 °C protected from light and daily diluted with BGE to working concentrations of 40 μg mL^{-1} and 20 μg mL^{-1} respectively, for the rhIL-11 and IS, and filtered through a 0.22 μm membrane Millex Millipore (Bedford, MA, USA).

2.3.2. Electrophoretic procedure

All experiments were carried out on a fused-silica capillary with 50 μm i.d. and 48.5 cm of total length (effective length 40 cm), thermostatized at 25 °C, and using a PDA detector set at 196 nm. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing with 1 mol L^{-1} sodium hydroxide for 5 min, followed by water for 2 min and 1 mol L^{-1} phosphoric acid for 5 min, and then by water for 2 min and with a running BGE solution for 5 min. Samples were injected using the pressure mode at 50 mbar for 45 s with a constant voltage of 20 kV (current about 55.2 μA) applied during the analysis. Since electrolysis can change the electroosmotic flow (EOF) and affect the migration time, efficiency and selectivity, the running electrolyte was replaced by a fresh solution after each three injections. The Background electrolyte solution (BGE) consisted of 50 mmol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate at pH 3.0, adjusted by adding 8.5% phosphoric acid.

2.3.3. Validation of the capillary zone electrophoresis method

The method was validated using samples of a biopharmaceutical formulation of rhIL-11 with a label claim of 5 mg/vial, 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 [21,22]. Rupatadine fumarate (IS) was selected as internal standard to compensate for any injection errors and minor fluctuations of migration time, thus improving the reproducibility and performance of the CZE method.

2.3.4. Forced degradation studies

The stability-indicating capability of the CZE method was determined by subjecting a *BRS-rhIL-11* reference solution (400 μg mL^{-1}) and a biopharmaceutical formulation (400 μg mL^{-1}) to accelerated degradation by different acidic, basic, oxidative, photolytic and temperature conditions [23,24]. Working solutions prepared in 1 mmol L^{-1} hydrochloric acid were used for acidic hydrolysis and working solutions in 1 mmol L^{-1} sodium hydroxide for the basis hydrolysis evaluation. Both solutions were maintained at room temperature for 10 min and 1 h, respectively, and neutralized with base or acid, as necessary. Oxidative degradation was induced by maintaining the solutions in 3% hydrogen peroxide, at ambient temperature for 3 min, protected from light. Photodegradation was induced by exposing the sample in a photostability chamber to 200 W h m^{-2} of near ultraviolet light from 1 to 24 h. For a study under neutral condition, sample solutions were diluted in water and heated at 80 °C for 3 h. Then, the solutions were diluted with the BGE solution to final concentrations of 40 μg mL^{-1}. The interference of the excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only a placebo (in-house mixture of all the formulation excipients), and by the standard addition method, where a calibration curve

was constructed by the addition of known amounts of the reference substance to the placebo [21]. Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity of rhIL-11 in the samples using a PDA detector.

2.4. Reversed-phase LC method

The validated gradient RP-LC method was performed as described elsewhere [6]. Briefly, the elution was carried out on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C_4 column (250 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 μm and pore size of 300 Å) maintained at 25 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The elution was performed using a linear gradient at a constant flow rate of 1 mL min^{-1} and using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. Mobile phase A consisted of water with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B was acetonitrile with 0.1% TFA, run as follows: time 0–0.1 min 40% of B; from 0.1 to 30 min linear up to 65% of B; from 30.01 to 31 min linear down to 40% of B, maintained up to 40 min. The injection volume was 50 μL of a solution containing 50 μg mL^{-1} for both standard *BRS-rhIL*-11 and samples.

2.5. In vitro TF-1 cell proliferation bioassay

The assay was performed as described elsewhere [6], and the growth-promoting activity of rhIL-11 assessed on TF-1 cell line (ATCC number CRL-2003), and the absorbance was assessed at 595 nm, using microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland). The biological potencies were calculated against the *R-rhIL*-11 (WHO 92/788) with the biological potency of 1000 IU μg^{-1} by the parallel line statistical method using the CombiStats® software (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM Council of Europe).

2.6. In vitro cytotoxicity test

The *in vitro* cytotoxicity assay was performed as described elsewhere [13] based on a 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 rhIL-11, and the absorbance was measured at 540 nm.

2.7. Analysis of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations

For the quantitation of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations, the stock solutions were diluted to appropriate concentrations of 40 μg mL^{-1} and 50 μg mL^{-1}, respectively, with a BGE solution, or a mobile phase, for the electrophoretic and chromatographic methods, injected in triplicate and the percentage recoveries calculated against the *BRS-rhIL*-11, that was calibrated against the *R-rhIL*-11 (WHO 92/788).

2.8. Analysis of rhIL-11 in human plasma

Plasma samples were spiked with 40 μg mL^{-1} of rhIL-11 and 20 μg mL^{-1} of IS and separated using a Waters Oasis® HLB extraction cartridges (Milford, MA, USA). The biomolecule was eluted with the mixture of water and acetonitrile (20:80,v/v), and 0.1% TFA. After evaporation under a nitrogen stream to obtain 1 ml, precipitation with 5 mL of methanol (−20 °C) for at least 1.5 h eliminated the remaining impurities, and the supernatant was used for the analysis by the CZE and RP-LC methods.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the electrophoretic conditions

To develop the CZE method, it was considered the isoeletric point of 11.7 as at this pH the rhIL-11, although charged, behaves as if it is neutral and has no tendency to migrate in the electrical field [25,26]. Then some electrolyte solutions were tested with variations in the composition, ionic strength and pH as shown in (Table 1), selecting sodium dihydrogen phosphate. The optimum pH of a BGE solution containing 50 mmol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate was investigated in the range of 2–4, which enabled the separation (Fig. 1). Higher pHs resulted in peak tailing and increased migration time, therefore pH 3.0 was selected since it showed better peak symmetry (about 1.08). The sodium dihydrogen phosphate was evaluated at concentrations of 10–90 mmol L^{-1} at pH 3.0 (Fig. 2), which demonstrated a significant effect on the separation performance through its influence on the EOF and the current produced in the capillary. A 50 mmol L^{-1} solution was selected due to its low effect on current and non-significant increase on the migration time. The temperature effect on the separation was investigated in the range of 20–35 °C, and a temperature of 25 °C was chosen due to short run time and acceptable current. The effect of the voltage was studied through changes from 10 to 30 kV, showing that a potential of 20 kV yielded a short analysis time with an acceptable current (about 55.2 μA). Sample solutions were injected using a pressure mode at 50 mbar for 45 s, equivalent to a injection volume of 86 nL. The electrophoretic buffers usually have a minimal background in the whole UV region. This allows the use of capillary electrophoresis techniques with UV detector operating in 190–215 nm, where many organic analytes have a significant higher adsorption. On the contrary, application of chromatographic methods which use organic solvents in the liquid phases is limited, as within a short UV wavelength range most of the commonly used organic solvents absorb UV light strongly [27]. Then, wavelength detection was

Table 1
BGE conditions tested and current observed for the CZE method.

BGE	Ionic strength (mmol L^{-1})	pH	Current (μA)
Boric acid	20–30	4.0–7.0	20–35
Bis-tris propane	10–70	3.0–7.0	15–60
Di-sodium tetraborate	25–40	3.5–7.0	20–40
Potassium phosphate	10–60	3.0–6.0	15–100
MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid]	15–50	4.0–7.0	20–60
Sodium dihydrogen phosphate	10–90	2.0–4.0	15–110
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	10–30	2.0–5.0	20–40

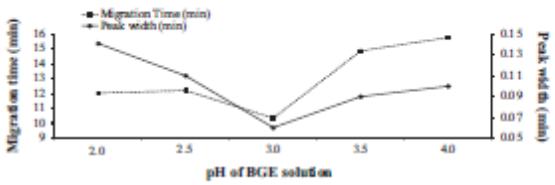

Fig. 1. Effect of pH on migration time and peak width of rhIL-11 40 μg mL^{-1}. Running buffer 50 mmol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate. Conditions: capillary, 50 μm i.d. × 40 cm; applied voltage, 20 kV; UV detection, 196 nm; column temperature, 25 °C. Pressure injection at 50 mbar for 45 s.

evaluated in the range of 190–400 nm, and a wavelength of 196 nm was chosen due to better sensitivity and signal-to-noise ratio.

3.2. Validation of the method

The CZE method was validated for the analysis of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations with a migration time of about 10.31 min, as shown in typical electropherograms (Fig. 3a, b). The stability-indicating capability of the method was tested under basic condition which showed decrease of the area, and only one additional peak was detected at 9.73 (Fig. 3c). The acidic condition resulted in a decrease of the area with two additional peaks at 9.62 and 14.10 min. (Fig. 3d). The forced photolytic condition showed decrease of the area with one additional peak at 12.31 (Fig. 3e). The forced oxidative degradation studies exhibited one peak related to the hydrogen peroxide at 7.43 min and one additional peak at 9.91 (Fig. 3f). Under the neutral hydrolysis condition described, decrease of the area was observed, without any additional peak. The specificity of the method was established by determining the peak purity of the analyte and the IS in the working BRS-rhIL-11 reference solution, by overlaying the spectra captured at the apex, upslope and downslope using a PDA detector. Additionally, the standard addition method was applied to evaluate the interference from formulation excipients. Non-significant difference ($p > 0.05$) was found between the slopes calculated for the calibration curve and the standard addition method. The data, together with the peak purity index in the range of 0.9999–1, showed that the peak was free from any co-migrating peak, with no interference of excipients, thus confirming that the proposed method is specific for the analysis of rhIL-11. Additionally the *BRS-rhIL*-11 and the degraded samples were subjected to the *in vitro* cytotoxicity test.

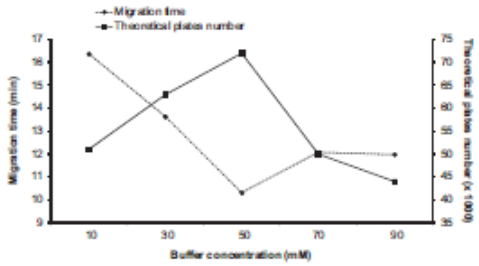

Fig. 2. Effect of buffer concentration on migration time and theoretical plate number of rhIL-11. Running buffer sodium dihydrogen phosphate pH 3.0, and conditions as described in the caption of Fig. 1.

The linearity determined by constructing three calibration curves, each one with ten concentrations of *BRS-rhIL*-11 solution in the 1.0–300 μg mL^{-1} range, spiked with IS at 20 μg mL^{-1}. The value of the determination coefficient calculated by a least-squares regression analysis (r^2=0.9992, n=10, y=(0.0349 ± 0.0012)x+(0.0473 ± 0.0097), where, x is concentration in μg mL^{-1} and, y is the peak-area ratio of *BRS-rhIL*-11 to IS, indicated linearity of the calibration curve for the method.

The precision of the method was evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD%) of the migration time and the peak-area ratio, for eight determinations at a concentration of 40 μg mL^{-1}, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD values were 0.8 and 1.1% for the migration time and the peak-area ratio, respectively. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-days) giving RSD values of 1.4 and 0.8%, respectively. The between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples by three analysts; the values were calculated as 1.1 and 0.6%, respectively.

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three solutions of in-house mixtures of the excipients with known amounts of the biomolecule, containing 30, 40, and 50 μg mL^{-1}. The absolute means obtained with a mean value of 100.4% and a bias lower than 1.1% as given in Table 2, shows that the method is accurate within the desired range [28].

The LOD and the LOQ were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression model, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 0.2 and 1.1 μg mL^{-1}, respectively. The evaluated experimental LOQ with a precision lower than 5% and an accuracy within ± 5%, [29,30] was determined as 1.0 μg mL^{-1}, which is suitable as an alternative comparable to the RP-LC, for quality-control analysis [6].

The robustness of the analytical procedure [31] was determined by analyzing samples of the *BRS-rhIL*-11 reference solution

Table 2
Accuracy of CZE for rhIL-11 in the formulations.

Nominal concentration (μg mL^{-1})	Mean concentration found[a] (μg mL^{-1})	RSD[b] (%)	Accuracy (%)	Bias[c] (%)
30	30.2	1.1	100.6	−0.7
40	40.1	0.3	100.1	−0.2
50	50.2	0.9	100.4	−1.1

[a] Mean of three replicates.
[b] RSD = relative standard deviation.
[c] Bias = [(measured concentration − nominal concentration)/nominal concentration] × 100.

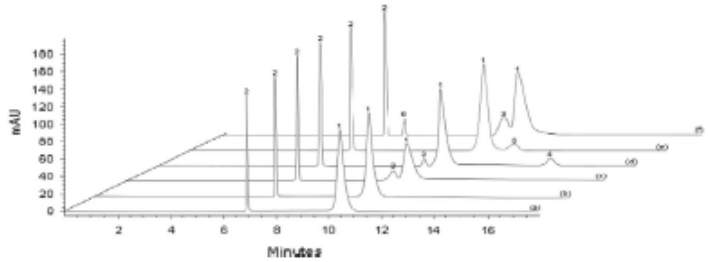

Fig. 3. Representative CZE electropherograms showing peak 1 = rhIL-11; peak 2 = internal standard (IS); peak 3, 4, 5 = degraded forms; peak 6 = hydrogen peroxide; peak 7 = glycine. (a) *BRS-rhIL*-11; (b) Sample of biopharmaceutical formulation. *BRS-rhIL*-11 following degradation under conditions: (c) basic hydrolysis, (d) acid hydrolysis, (e) photolytic, and (f) oxidative.

containing 40 μg mL^{-1} in triplicate by the one-variable-at-a-time (OVAT) approach. The results and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 3, together with the optimized values. Additionally, the robustness was also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach [32] at three levels (one unit per parameter up or down around optimized values). This procedure gives results for minimum changing of the maximum number of parameters at a time, and is a very useful, rapid and efficient approach for a robustness determination. The results for the OVAT and MVAT procedures were within the acceptable deviation (RSD < 2%), and an analysis of the variance showed non-significant differences ($p > 0.05$). The analysis performed with a wider level of variations of the solution pH, temperature and voltage, showed changes of the migration time related to the optimized conditions. Moreover, the peak symmetry values were also evaluated, showing non-significant differences ($p > 0.05$). The electropherogram pattern was not altered and different capillary batches also indicated robustness under the conditions tested.

The stability of rhIL-11 in BGE was assessed after storage of the samples for 48 h at 2–8 °C, and also placed in an auto-sampler for 24 h at room temperature, showing non-significant changes (< 2%) relative to freshly prepared samples, as suggested [33].

A system suitability test was carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicate injections of a *BRS-rhIL-11* reference solution containing 40 μg mL^{-1} of rhIL-11. The obtained RSD values for the migration time, peak area, peak symmetry and peak width were 0.1%, 1.3%, 1.2%, and 1.3%, respectively, as calculated by the standard deviation of the Gaussian function. The number of theoretical plates was approximately 56,238, with RSD of 0.9%. The parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2%).

3.3. Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity test was performed on degraded forms related to the intact molecule, in order to detect possible effects resulting from the instability of the samples during storage, giving mean IC_{50} = 18.7 μg mL^{-1}, IC_{50} = 22.2 μg mL^{-1}, respectively, for acidic and photolytic conditions with significant differences as calculated by the Student's *t* test ($p < 0.05$) compared to the intact molecule that showed IC_{50} = 67.1 μg mL^{-1}. Such evaluations are now necessary, mainly due to the recent concerns related to possible human undesirable effects of the degraded forms [15,34].

3.4. Method application

The CZE method was applied to the determination of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations and the results compared to those obtained using a validated RP-LC method and an *in vitro* bioassay, giving mean differences of the estimated content/potencies of 0.4% and 1.4% higher, respectively, as shown in Table 4. The experimental values were compared statistically by analysis of the variance (ANOVA), which showed non-significant differences ($p > 0.05$). Both of the methods showed similar results for degraded forms and related proteins, and the CZE method demonstrated better sensitivity to detect the degraded forms from forced degradation studies. The oxidation levels and cleavage products were formerly determined only by RP-LC [16,17]. CE methods were previously used to evaluate different therapeutic peptides and

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

Variable	Values	rhIL-11[a] (mg)	RSD[b] (%)	Migration time (min)	RSD[b] (%)	Symmetry	RSD[b] (%)	Optimized condition
BGE solution pH	2.6	4.96	1.0	10.23	1.1	1.46	1.0	3.0
	2.8	4.96	0.6	10.40	1.0	1.57	1.1	
	3.0	4.99	0.3	10.27	0.4	1.08	0.5	
	3.2	4.94	0.9	10.52	0.9	1.16	0.9	
	3.4	4.94	0.7	10.34	1.0	1.32	1.2	
BGE (mM)	46	5.05	1.3	11.49	1.1	1.74	1.0	50
	48	5.07	0.8	11.08	0.6	1.62	0.4	
	50	5.03	0.2	10.32	0.2	1.31	0.3	
	52	5.04	0.7	10.26	0.8	1.48	0.6	
	54	4.96	0.6	10.21	1.2	1.52	0.8	
Temperature (°C)	21	4.84	0.3	10.44	0.7	1.42	0.7	25
	23	4.95	0.3	10.41	0.7	1.26	1.1	
	25	4.95	0.2	10.34	0.2	1.07	0.4	
	27	5.06	0.4	10.53	0.5	1.14	1.2	
	29	5.08	0.5	10.31	0.8	1.33	1.3	
Voltage (kV)	16	5.11	1.2	11.36	1.0	1.66	0.8	20
	18	5.12	0.8	11.01	0.8	1.89	0.4	
	20	5.03	0.3	10.36	0.5	1.24	0.2	
	22	4.96	0.7	10.31	1.0	1.57	0.4	
	24	4.90	0.9	10.28	1.2	1.92	0.6	
Time injection (s)	41	4.81	1.7	10.53	0.5	1.23	1.6	45
	43	4.89	1.3	10.42	0.3	1.49	1.3	
	45	4.95	0.7	10.30	0.1	1.16	0.7	
	47	4.93	0.8	10.37	0.3	1.37	1.0	
	49	4.93	1.3	10.41	0.4	1.88	1.1	
Wavelength (nm)	192	5.03	1.0	10.48	0.4	1.63	0.9	196
	194	5.07	1.1	10.29	0.5	1.54	1.0	
	196	5.00	0.6	10.27	0.3	1.14	0.7	
	198	5.01	0.8	10.36	0.8	1.49	1.0	
	200	5.08	0.7	10.42	0.8	1.32	0.9	

[a] Mean of three replicates.
[b] RSD = relative standard deviation.

Table 4
Comparative content/potency evaluation of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations by CZE and RP-LC methods, and bioassay.

Sample	Theoretical amount (mg)	CZE[a]		RP-LC[a]		*In vitro* bioassay[a]	
		Found (mg)	Degraded Forms (mg)	Main peak (mg)	Deamidated/Sulfoxides (mg)	Potency (mg)	Confidence intervals ($p=0.95$)
1	5	5.01	0.02	5.00	0.01	4.88	4.69–5.42
2	5	4.96	0.07	4.93	0.05	4.84	4.32–4.87
3	5	4.84	0.10	4.77	0.07	4.72	4.17–4.93
4	5	4.59	0.31	4.65	0.24	4.65	4.43–4.78
5	5	5.28	0.12	5.19	0.08	5.13	4.85–5.21
6	5	5.17	0.03	5.12	0.04	5.25	4.72–5.60
7	5	5.36	0.02	5.21	0.02	5.11	4.73–5.41
8	5	5.22	0.00	5.07	0.00	5.06	4.67–5.32
9	5	4.81	0.00	4.98	0.00	4.77	4.35–5.56
10	5	4.97	0.01	4.92	0.02	4.90	4.37–5.48
11	5	4.66	0.05	4.61	0.09	4.56	4.09–4.84
12	5	5.00	0.06	5.22	0.04	5.17	4.53–5.47
Mean	–	4.99	0.07	4.97	0.05	4.92	–
SD[b]	–	0.24	0.09	0.21	0.07	0.22	–
					ANOVA Between-methods		*F* calculated[c] 1.31

[a] Mean of three replicates.
[b] SD = Standard deviation of the distribution.
[c] *F* critic for $p=0.05$.

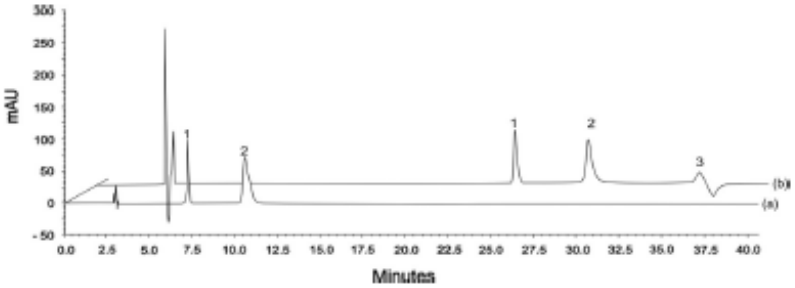

Fig. 4. Representative blank plasma spiked with rhIL-11 and internal standard, showing peak 1 = internal standard; peak 2 = rhIL-11; peak 3 = excipient. *BRS-rhIL-11*: (a) CZE electropherogram, and (b) RP-LC chromatogram.

proteins, but the potential demonstrated by the validated method can be useful for the determination of rhIL-11, and to support biosimilarity studies [35], without prior separation of the excipients of the formulation, with the added advantages of small sample volumes without consumption of organic solvents, and a short analysis time.

The validated CZE and RP-LC methods were also applied for the analysis of rhIL-11 in human plasma after SPE extraction procedure, as shown in Fig. 4, giving mean recoveries of 97.0% and 98.3% by the CZE, and of 96.1% and 97.6%, by the RP-LC, respectively, for rhIL-11 and IS. The LLOQs evaluated in experimental assays, were found to be 10 $\mu g\,mL^{-1}$ and 5 $\mu g\,mL^{-1}$, respectively, for the CZE and RP-LC methods, with the precision of 8.5% and 9.0%, and accuracy of 107.5% and 102.3%, showing lower sensitivity for the CZE method, probably due to the low sample injection volume and the short optical path-length.

4. Conclusions

The results of the validation studies show that the CZE method is sensitive with a LOQ of 1.0 $\mu g\,mL^{-1}$ accurate with a mean value of 100.4%, possesses significant linearity ($r^2=0.9992$) and precision characteristics without any interference from the excipients. The proposed method was applied to the assessment of rhIL-11, showing a higher mean difference of the estimated content/potencies of 0.4% and 1.4% compared to the RP-LC and to the *in vitro* bioassay, respectively, but with significant correlation, as calculated by ANOVA ($p > 0.05$). Therefore, represents an alternative to current methods which can be applied for quantitative analysis during the biotechnology process and through subsequent purification steps, to monitor its stability and to assure the quality of the bulk and finished biotechnology-derived medicine.

Acknowledgments

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

References

[1] M. Ellis, U. Hedstrom, C. Frampton, H. Alizadeh, J. Kristensen, F.V. Shammas, B.K. Al-Ramadi, Clin. Immunol. 120 (2006) 129–137.
[2] K. Usuki, A. Urabe, Y. Ikeda, Y. Ohashi, H. Mizoguchi, F. Takaku, Int. J. Hematol. 85 (2007) 59–68.
[3] S. Yanaka, E. Sano, N. Naruse, K. Miura, M. Futatsumori-Sugai, J.M. Caveiro, K. Tsumoto, J. Biol. Chem. 286 (2011) 8085–8093.
[4] M. Czupryn, F. Bennett, J. Dube, K. Grant, H. Scoble, J.M. Mccoy, Ann. N. Y. Acad. Sci. 762 (1995) 152–164.
[5] T. Yin, T. Taga, M.L. Tsang, K. Yasukawa, T. Kishimoto, Y. Yang, J. Immunol. 151 (1993) 2555–2561.
[6] R.B. Souto, F.P. Stamm, M.T.C.P. Ribela, P. Bartolini, G.Z. Calegari, S.L. Dalmora, Anal. Sci. 28 (2012) 215–220.
[7] U. Hammerling, A. Henningsson, L. Sjödin, J. Pharm. Biomed. Anal. 10 (1992) 547–553.

[8] A. Meager, J. Immunol. Methods. 261 (2002) 21–36.
[9] European Pharmacopoeia, 27th ed., Council of Europe, Strasbourg, France, 2013.
[10] A.F. Bristow, S.L. Jeffcoate, Biologicals 20 (1992) 221–231.
[11] C. Longstaff, C.M. Whitton, R. Stebbings, E. Gray, Drug. Discov. Today 14 (2009) 50–55.
[12] S.L. Dalmora, C.S. Butzge, F.T. Machado, M.E. Walter, M.E.A. Dalmora, R.B. Souto, Talanta 94 (2012) 1–7.
[13] F.P. Stamm, G.Z. Calegari, G.W. Freitas, R.B. Souto, L.P. Porto, C.D.A. Cardoso, S.L. Dalmora, Analyst 138 (2013) 1419–1426.
[14] W. Wang, Int. J. Pharm. 185 (1999) 129–188.
[15] A.S. Groot, D.W. Scott, Trends Immunol. 28 (2007) 482–490.
[16] H. Yokota, H. Saito, K. Masuoka, H. Kaniwa, T. Shibanuma, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2000) 317–324.
[17] W. Garzon-Rodriguez, R.L. Koval, S. Chongprasert, S. Krishnan, T.W. Randolph, N.W. Warne, J.F. Carpenter, J. Pharm. Sci. 93 (2004) 684–696.
[18] Y. Alahmad, M. Taverna, H. Mobdi, J. Duboeuf, A. Grégoire, L. Rancé, N.N. Tran, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 882–888.
[19] S.L. Dalmora, E.B. D'Avila, L.M. da Silva, A.C. Bergamo, E.S. Zimmermann, J. Chromatogr. B 877 (2009) 2471–2476.
[20] The United States Pharmacopeia (USP 36), The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2013.
[21] ICH, Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology, ICH Steering Committee, 2005, pp. 1–13.
[22] S. Ahuja, M.I. Jimidar, Sep. Sci. Technol. 9 (2008) 225–244.
[23] ICH, Guideline Q5C: Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products, 1995, pp. 1–8.
[24] ICH, Guideline Q1A(R2): Stability Testing of New Drugs Substance and Products, 2003, pp. 1–18.
[25] H. Schwartz, T. Pritchett, Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis: Application to Analytical Biotechnology (1.2.2 Buffer Composition, pH Control)Beckman (1994) 1–14.
[26] J.P. Landers, Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques, 3, Taylor & Francis Group, New York, Boca Raton, USA (2007) 80–83.
[27] J.C. Valette, A.C. Bizet, C. Demesmay, J.L. Rocca, E. Verdon, J. Chromatogr. A 1049 (2004) 171–181.
[28] E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 111–125.
[29] J. Ermer, J.H.McB. Miller, Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best PracticeWiley-VCH, Weinheim,Germany, 2005.
[30] G.A. Shabir, W.L. Lough, S.A. Arain, T.K. Bradshaw, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 30 (2007) 311–333.
[31] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 138–157.
[32] R. Injac, M. Boskovic, N. Kocevar, T. Vovk, Anal. Chim. Acta 620 (2008) 150–161.
[33] G.A. Shabir, J. Chromatogr. A 987 (2003) 57–66.
[34] W. Wang, S. Nema, D. Teagarden, Int. J. Pharm. 390 (2010) 89–99.
[35] H. Schellekens, E. Moors, Nat. Biotechnol. 28 (2010) 28–31.

ARTIGO 2

4 ARTIGO 2

4.1 – Ricardo B. Souto, Rafaela F. Perobelli, Bruna Xavier, Fernanda P. S. Maldaner, Francielle S. Silva and Sérgio L. Dalmora. Validation of a SE-HPLC Method for the Analysis of Recombinant Human Interleukin-11and its Correlation with RP-HPLC and CZE Methods. (Artigo submetido em 29/10/2015, na revista Journal of Chromatographic Science).

Validation of a SE-HPLC Method for the Analysis of Recombinant Human Interleukin-11and its Correlation with RP-HPLC and CZE Methods

Ricardo B. Souto[2], Rafaela F. Perobelli[2], Bruna Xavier[1], Fernanda P. S. Maldaner[2], Francielle S. Silva[2] and Sérgio L. Dalmora[1*]

[1]*Department of Industrial Pharmacy,* [2]*PostGraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil*

[*]Corresponding author. E-mail: sdalmora@terra.com.br

Abstract: A size exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) method was validated for the assessment of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11). The SE-HPLC method was carried out on a BioSep-SEC-s2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.), maintained at 30ºC. The mobile phase consisted of 0.02 M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid and 0.5 M sodium chloride buffer, pH 6.0, run isocratically at a flow rate of 0.9 mL min^{-1}, and using a photodiode array (PDA) detection at 220 nm. Chromatographic separation was obtained with a retention time of 8.12 min. Specificity and stability-indicating capability were established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The method was linear over the concentration range of 1.0-200 µg mL^{-1} (r^2= 0.9996) and the detection limit (DL) and quantitation limit (QL) were 0.23 µg mL^{-1} and 1.0 µg mL^{-1}, respectively. The accuracy was 99.81% with bias lower than 0.43%. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision and robustness. The method was applied to the assessment of rhIL-11 and higher molecular weight forms in biopharmaceutical dosage forms, and the results of content/potencies were correlated to those of validated reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and capillary zone electrophoresis (CZE) methods, showing non-significant differences (p> 0.05). These correlation studies represent a contribution to evaluate alternatives to monitor stability, improve quality control and to assure batch-to-batch consistency of the bulk and finished biotechnology-derived medicine.

Keywords: Recombinant Human Interleukin-11, Size Exclusion High-Performance Liquid Chromatography, Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, Capillary Zone Electrophoresis, Validation.

Introduction

Interleukin-11 (IL-11) is a multifunctional cytokine secreted from bone marrow stromal cells, which promotes megakaryocytopoiesis and platelet formation in mammals. Recombinant human IL-11 (rhIL-11) is expressed in *Escherichia Coli* and was approved to treat chemotherapy-induced thrombocytopenia (1-3).

The polypeptide structure of rhIL-11 consists of 177 amino acids with a molecular mass of 19 kDa. Differs from the naturally occurring protein by the presence of two residues of Met^{58} and Met^{122} and the absence of the amino-terminal proline (4).

Currently, biological assays are required for the potency assessment of biotechnology-derived medicines. Early signals triggered by IL-11 were assessed in a multifactor-dependent human erythroleukemic cell line TF1, which showed that this protein stimulated cell proliferation (5) and was applied to assess the bioactivity of biopharmaceuticals formulations (6). However, a major concern of using a bioassay is its precision, and variability due to the use of living cells, which is generally inferior to the precision of physicochemical techniques (7).

Physicochemical techniques can produce information about structure and composition and are used to monitor content/potency, purity, and chemical stability of biopharmaceutical proteins obtained through recombinant DNA technology, and a combination of physicochemical, immunological, and biological methods has been applied inclusive to correlation studies (8, 9). A gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was developed and validated for the analysis of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations using a C_4 column with PDA detection at 214 nm, with retention time of 27.60 min and quantitation limit of 1.0 µg mL^{-1} (6). However, the typical RP-HPLC conditions could affect the conformation of the protein and the detector response does not necessarily represent the amount of bioactive compound. Size exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) has been performed to quantitate and determine the native size of the protein and to

reveal possible dimers and aggregates which have no or reduced activity, and altered immunogenicity (10-12). Chemical modifications combined with site-directed and deletion mutagenesis were analyzed by SE-HPLC using TSK G 2000 column and mobile phase with MES pH 6.0 (4). The aggregation was evaluated by SE-HPLC using a TSK 2000 SW column with UV detection at 225 nm (13). A stability-indicating capillary zone electrophoresis (CZE) method was validated using a fused-silica capillary (50 µm i.d.; effective length, 40 cm), with PDA detection at 196 nm, and retention time of 10.31 min. with quantitation limit of 1.0 µg mL^{-1} (14). No SE-HPLC validated method has been published for quality control analysis, and the validation is essential to show that the procedure is suitable for its intended purpose (15, 16).

The aim of the this research was to develop and validate a specific, sensitive and stability-indicating size exclusion liquid chromatography (SE-HPLC) method for the content/potency assessment of rhIL-11 in biopharmaceuticals formulations; to correlate the results with validated RP-HPLC and CZE methods; thus contributing to the development of methods to monitor stability, improve quality control, and thereby assuring the therapeutic efficacy of the biotechnology-derived product.

Experimental

Chemicals and reagents

Biological reference substance of rhIL-11, (*BRS-rhIL-11*), for physicochemical assays was supplied by Amoytop Biotech Co., Ltd (Xiamen, Fujian, China). Reference reagent Interleukin-11, human rDNA derived, (*R-rhIL-11* WHO 92/788), for bioassays was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control-NIBSC (Herts, UK). A total of twelve batches of Plaquemax® Bergamo (São Paulo, Brazil), and of Neumega® Wyeth (São Paulo, Brazil), containing 5mg/vial of rhIL-11 were identified by numbers from 1 to 12. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), sodium dihydrogen phosphate, potassium phosphate monobasic, sodium chloride, polysorbate 80, glycine, acetonitrile and trifluoroacetic acid used as reagents or excipients were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of HPLC or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was obtained using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system Millipore (Bedford, MA, USA).

Apparatus

Liquid Chromatography (LC) methods were carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, a LC-10 AD_{VP} pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD_{VP} autosampler, and a SPD-M10A_{VP} PDA detector. Peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP® V 6.14 software program.

Capillary Electrophoresis (CE) experiments were performed on an Agilent ^{3D}CE apparatus Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) consisting of a photodiode array (PDA) detector, a temperature-controlling system (4-60ºC) and a power supply able to deliver up to

30 kV. CE ChemStation® software was used for instrument control, data acquisition and analysis.

Size exclusion high-performance liquid chromatography method (SE-HPLC)

Solutions preparation

Stock solutions were prepared by diluting the *BRS-rhIL-11* and the sample of biopharmaceutical formulation in water, to a final concentration of 500 µg mL^{-1}. The stock solutions were stored at 2-8°C protected from light and daily diluted with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5 mg mL^{-1} of polysorbate 80, to working concentrations of 50 µg mL^{-1}.

Procedure

All experiments were performed out on a size-exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-s2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 150 Å) maintained at 30°C. A security guard holder was used to protect the analytical column. Mobile phase consisted of 0.02 M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid and 0.5 M sodium chloride buffer (pH 6.0), run isocratically at a flow rate of 0.9 mL min^{-1} with photodiode array (PDA) detection at 220 nm. The mobile phases were filtered through a 0.45 µm membrane filter Millipore (Bedford, MA, USA). The injection volume was 30 µL of a solution containing 50 µg mL^{-1}.

Validation of SE-HPLC

The method was validated using samples of a biopharmaceutical formulation of rhIL-11 with a label claim of 5 mg/vial, by determinations of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, detection limit (DL), quantitation limit (QL), robustness, stability, and system suitability test, following the guidelines (15, 16).

Forced degradation studies

The stability-indicating capability of the SE-HPLC method was assessed by subjecting a *BRS-rhIL-11* solution (500 µg mL^{-1}) and a biopharmaceutical formulation (500 µg mL^{-1}) to accelerated degradation (17, 18). For a study under mixing condition, sample solutions were strongly mixed for 5 min. Thermal degradation condition was tested with sample solutions diluted in water and heated at 80ºC for 2 h. Then, the solutions were diluted with the mobile phase to final concentrations of 50 µg mL^{-1}. The interference of the excipients of the biopharmaceutical formulations was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of formulation excipients), and by the standard addition method, where a calibration curve was constructed by the addition of known amounts of the reference substance to the placebo (15). Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity of rhIL-11 in the samples using a PDA detector.

Reversed-phase high-performance liquid chromatography method (RP-HPLC)

The validated gradient RP-HPLC method was performed as described elsewhere (6). Briefly, the elution was carried out on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C_4 column (250 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 300 Å) maintained at 25ºC. A security guard holder was used to protect the analytical column. The elution was performed using a linear gradient at a constant flow rate of 1 mL min^{-1} and using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. Mobile phase A consisted of water with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B was acetonitrile with 0.1% TFA, run as follows: time 0 to 0.1 min 40% of B; from 0.1 to 30 min linear up to 65% of B; from 30.01 to 31 min linear down to 40% of B, maintained up to 40 min. The injection volume was 50 µL of a solution containing 50 µg mL^{-1} for both standard *BRS-rhIL-11* and samples.

Capillary zone electrophoresis method (CZE)

The validated CZE method was performed as described elsewhere (14). A fused-silica capillary (50 µm i.d.; effective length, 40 cm) was used at 25ºC; the applied voltage was 20 kV. The Background electrolyte solution consisted of 50 mM L^{-1}sodium dihydrogen phosphate solution at pH 3.0. Solution containing 40 µg mL^{-1} for both standard *BRS-rhIL-11* and samples were performed using a pressure mode at 50 mbar for 45 s, with PDA detection set at 196 nm.

Analysis of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations

For the quantitation of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations, the stock solutions were diluted with phosphate buffer or BGE solution to appropriate concentrations of 50 µg mL^{-1} and 40 µg mL^{-1}, respectively, for the chromatographic and electrophoretic methods, injected in triplicate and the percentage recoveries calculated against the *BRS-rhIL-11*, that was calibrated against the *R-rhIL-11* (WHO 92/788).

Results

Method development and optimization

Some analytical parameters like composition and pH of the mobile phase were tested. MES buffer was evaluated with concentrations between 0.01-0.05 M MES and 0.2-0.7 M sodium chloride, at pH 6.0. Then, the optimum pH of MES buffer was investigated in the range of 2.5-7.5. The best wavelength was evaluated in the range of 190-400 nm. Then, the selected conditions of the SE-HPLC method were optimized and validated for the analysis of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations and correlation studies, with a migration time of about 8.12 min, as shown in typical chromatograms (Fig. 1a; 1b).

Validation parameters of the SE-HPLC method

Specificity

The stability-indicating capability of the method was tested under forced mixing and thermal conditions which resulted in reduction of 17% and 18%, respectively, for the aggregates and dimmers, with retention times at 3.63 and 6.98 min, as shown in the typical chromatograms (Figs. 1c and 1d). The specificity of the method was established by determining the peak purity of the biomolecule and the BRS-rhIL-11 solutions, by overlaying the spectra captured at the apex, upslope and downslope using a PDA detector. Additionally, the standard addition method was applied to evaluate the interference from formulation excipients showing non-significant difference (p>0.05). The data, together with the peak purity index in the range of 0.9999-1, showed that the peak was free from any co-migrating peak, with no interference of excipients, thus confirming that the proposed method is specific for the analysis of rhIL-11.

Linearity

The analytical curves constructed for rhIL-11 were found to be linear over the range 1.0-200 µg mL^{-1}.The value of the determination coefficient calculated (r^2 = 0.9996, n=10, y = (40877 ± 229.122) x + (117510.30 ± 5181.112), where, x is concentration in µg mL^{-1} and, y is the peak absolute area, indicated linearity of the analytical curve for the method.

Precision

The precision was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) for eight analyses at a concentration of 50 µg mL^{-1}, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD value was 0.39%. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-days), giving RSD values of 0.64 and 1.20%, respectively. Between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples by three analysts; the values were calculated as 0.78 and 0.86%, respectively, as given in Table I.

Accuracy

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 40, 50, and 60 µg mL^{-1}, respectively. The absolute means obtained with a mean value of 99.81% and a bias lower than 0.43% (Table II).

Detection and quantitation limits

The DL and the QL were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression line, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 0.23 and 1.10 µg mL^{-1}, respectively.

Robustness

The results and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table III, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when 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 for 24 h in an auto sampler and 48 h when maintained at 2-8°C.

System suitability

A system suitability test was carried out to evaluate the resolution among aggregates, dimers and monomer and repeatability of the system for the analysis to be performed, using eight replicates injections of a *BRS-rhIL-11* reference solution containing 50 µg mL^{-1} of rhIL-11. The obtained RSD values for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.12, 0.95 and 0.85%, respectively. The number of theoretical plates was about 6088, with RSD of 1.15%. The parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%).

Method Application

The SE-HPLC method was applied for the determination of rhIL-11 in biotechnology-derived products, giving content/potencies within 4.81 mg and 5.31 mg of the stated potency. These results were compared to those obtained using validated RP-HPLC and CZE methods, showing mean differences of the estimated content/potencies of 0.80% and 0.40% higher, respectively, as shown in Table IV.

Discussion

The SE-HPLC method was optimized to obtain the best chromatographic conditions with appropriate selectivity and sensitivity. The MES buffer was selected with 0.02 M MES and 0.5 M sodium chloride solution due to their significant effect on the separation performance through the influence on the peak width, and resolution. Lower pHs resulted in peak tailing, therefore pH 6.0 was selected since it showed better peak symmetry (about 1.17). A wavelength of 220 nm was chosen using the PDA due to its better sensitivity and signal-to-noise ratio.

Specificity and stability-indicating capability were established in degradation studies under mixing and thermal degradation conditions, which showed reduction of 17% and 18%, respectively, for the aggregates and dimers. Such determinations are now necessary, mainly due to the recent concerns related to possible human undesirable effects of the degraded forms (10-12). The method was linear over the concentration range of 1.0-200 µg mL^{-1} (r^2= 0.9996), and the QL as also evaluated experimentally with a precision lower than 5% and an accuracy within ± 5%, (19, 20), and determined as 1.0 µg mL^{-1}, which is suitable as an alternative comparable to the RP-HPLC and CZE, for quality-control analysis. The results of the accuracy showed also that the method is accurate within the desired range (21). Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision and robustness.

The results of the SE-HPLC method were compared statistically by analysis of the variance (ANOVA), to those obtained using validated RP-HPLC and CZE methods, showing significant correlation ($p > 0.05$), demonstrating the stability-indicating capability and the application of the method, able also to support biosimilarity studies of the biomolecule (22).

Conclusions

The results of the validation studies show that the SE-HPLC method is specific, sensitive with QL of 1.0 μg mL^{-1}, accurate and possesses significant linearity ($r^2 = 0.9996$) and precision characteristics without any interference from the excipients. Therefore, it represents an alternative to current methods which can be applied for quantitative analysis during the biotechnology process and through subsequent purification steps, to monitor its stability and to assure the quality of the bulk and finished biotechnology-derived medicine.

Acknowledgements

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

References

1. Kaye, J.A.; FDA licensure of NEUMEGA to prevent severe chemotherapy-induced thrombocytopenia; *Stem Cells*, (1998); 16(2): 207-223.

2. Baldo, B.A.; Side effects of cytokines approved for therapy; *Drug Safety*, (2014); 37(11): 921-43.

3. Liu, Y., Wang, Y., Gao, Y., Forbes, J.A.,, Qayyum, R., Becker, L., Cheng, L., Wang, Z.Z.; Efficient generation of megakaryocytes from human induced pluripotent stem cells using food and drug administration-approved pharmacological reagents; *Stem Cells Translational Medicine*, (2015); 4(4): 309-19.

4. Czupryn, M., Bennett, F., Dube, J., Grant, K., Scoble, H., Mccoy, J.M.; Alanine-scanning mutagenesis of human interleukin-11: identification of regions important for biological activity; *Annals of the New York Academy of Sciences***,** (1995); 762(2): 152-164.

5. Yin, T., Taga, T., Tsang, M.L., Yasukawa, K., Kishimoto, T., Yang, Y.; Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction; *Journal of Immunology*, (1993); 151(5): 2555-2561.

6. Souto, R.B., Stamm, F.P., Ribela, M.T.C.P., Bartolini, P., Calegari, G.Z., Dalmora, S.L.; Validation of a stability-indicating RP-LC method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with bioassay; *Analytical Science*, (2012); 28(3): 215-220.

7. Meager, A.; Measurement of cytokines by bioassays: Theory and application; *Methods*, (2006); 38: 237-252.

8. Bristow, A.F., Jeffcoate, S.L.; Analysis of therapeutic growth hormone preparations: report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies; *Biologicals*, (1992); 20: 221-231.

9. Stamm, F.P., Calegari, G.Z., Freitas, G.W., Souto, R.B., Porto, L.P., Cardoso, C. D. A., Dalmora, S.L; Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays; *Analyst*, (2013) 138: 1419-1426.

10. Wang, W., Nema, S., Teagarden, D.; Protein aggregation - Pathways and influencing factors; *International Journal of Pharmaceutics*, (2010); 390: 89-99.

11. Engelsman, J.D., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., Jiskoot, W.; Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development; *Pharmaceutical Research*, (2011); 28: 920-933.

12. Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.L., Guillarme, D.; Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014); 101: 161-173.

13. Garzon-Rodriguez, W., Koval, R.L., Chongprasert, S., Krishnan, S., Randolph, T.W., Warne, N.W., Carpenter, J.F.; Optimizing storage stability of lyophilized recombinant human interleukin-11 with disaccharide/hydroxyethyl starch mixtures; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2004); 93(3): 684-696.

14. Souto, R.B., Stamm, F.P., Schumacher, J.B., Cardoso Jr., C.D.A., Freitas, G.W., Perobelli, R.F., Dalmora, S.L.; Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with reversed-phase liquid chromatography and bioassay; *Talanta*, (2014); 123: 179-185.

15. ICH Q2(R1). Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology (2005).

16. FDA. *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics* (2015).

17. ICH Q5C. Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products (1995).

18. ICH Q1A(R2). Stability Testing of New Drugs Substance and Products (2003).

19. Ermer, J., Miller, J.H.Mcb.; Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice; *Wiley-VCH, Weinheim,Germany*, (2005); 101.

20. 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*, (2007); 30: 311-333.

21. 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*, (2007); 1158: 111–125.

22. Schellekens, H., Moors, E.; Clinical comparability and European biosimilar regulations; *Nature Biotechnology*, (2010); 28: 28-31.

Table I. Inter-days and between-analysts precision data of SE-HPLC for interleukin-11 in biopharmaceutical formulations

Inter-days				Between-analysts		
Sample	Day	Recovery[a] (mg)	RSD[b](%)	Analyst	Recovery[a] (mg)	RSD[b] (%)
	1	5.19		A	5.23	
1	2	5.22	0.64	B	5.15	0.86
	3	5.16		C	5.20	
	1	5.05		A	5.05	
2	2	5.02	1.20	B	4.97	0.78
	3	4.94		C	5.01	

[a]Mean of three replicates.
[b]RSD = Relative standard deviation.

Table II. Accuracy of SE-HPLC for interleukin-11 in formulations

Nominal concentration (μg mL^{-1})	Mean concentration found[a] (μg mL^{-1})	RSD[b] (%)	Accuracy (%)	Bias[c] (%)
40	39.83	1.30	99.58	-0.43
50	50.07	0.56	100.14	0.14
60	59.83	0.63	99.72	-0.28

[a]Mean of three replicates.
[b]RSD = Relative standard deviation.
[c]Bias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

Table III. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

Variable	Values	rhIL-11[a] (mg)	RSD[b] %	Optimized condition
Flow rate (mL min^{-1})	0.7	4.91	1.36	0.9
	0.9	5.00	0.63	
	1.1	4.97	1.22	
Injection volume (µL)	40	4.95	0.83	50
	50	5.01	0.30	
	60	4.98	0.91	
Temperature (ºC)	25	4.97	1.28	30
	30	5.02	0.75	
	35	5.07	1.34	
Mobile phase pH	5.5	4.86	1.44	6.0
	6.0	4.98	0.54	
	6.5	4.89	0.61	
Solution stability	Autosampler 24 h	4.86	0.96	-
	2-8ºC 24 h	4.98	0.41	-
	2-8ºC 48 h	4.97	1.13	-
Wavelength (nm)	210-320	-	-	220

[a]Mean of three replicates.
[b]RSD = Relative Standard Deviation.

Table IV. Comparative content/potency evaluation of rhIL-11 in biopharmaceutical formulations by SE-HPLC, RP-HPLC and CZE methods

Sample	Theoretical amount (mg)	SE-HPLC[a]		RP-HPLC[a]		CZE[a]	
		Monomer (mg)	HMM[b] (mg)	Main peak (mg)	Deamidated/Sulfoxides (mg)	Content (mg)	Degraded Forms (mg)
1	5	5.19	0.20	5.13	0.01	5.18	0.01
2	5	5.09	N.D.[d]	5.06	N.D.[d]	5.05	N.D.[d]
3	5	4.81	0.05	4.80	0.19	4.86	0.18
4	5	5.03	N.D.[d]	4.98	0.06	4.99	N.D.[d]
5	5	4.91	0.16	4.97	0.01	4.96	0.06
6	5	5.31	0.02	5.17	N.D.[d]	5.22	N.D.[d]
7	5	4.84	0.19	4.80	0.17	4.83	0.16
8	5	5.26	0.10	5.24	0.02	5.25	0.02
9	5	4.86	0.03	4.84	0.23	4.86	0.19
10	5	4.99	N.D.[d]	4.97	0.06	5.00	0.02
11	5	5.21	0.20	5.11	N.D.[d]	5.16	N.D.[d]
12	5	5.06	N.D.[d]	5.02	0.01	5.05	N.D.[d]
Mean	_	5.05	0.11	5.01	0.08	5.03	0.09
SD[c]	_	0.17	0.08	0.14	0.09	0.15	0.08
					ANOVA		F calculated[e]
					Between-methods		1.13

[a]Mean of three replicates.
[b]HMM = High Molecular Mass.
[c]SD = Standard deviation of the distribution.
[d]N.D. = Non detected.
[e]F critic for $p = 0.05$.

Figure caption

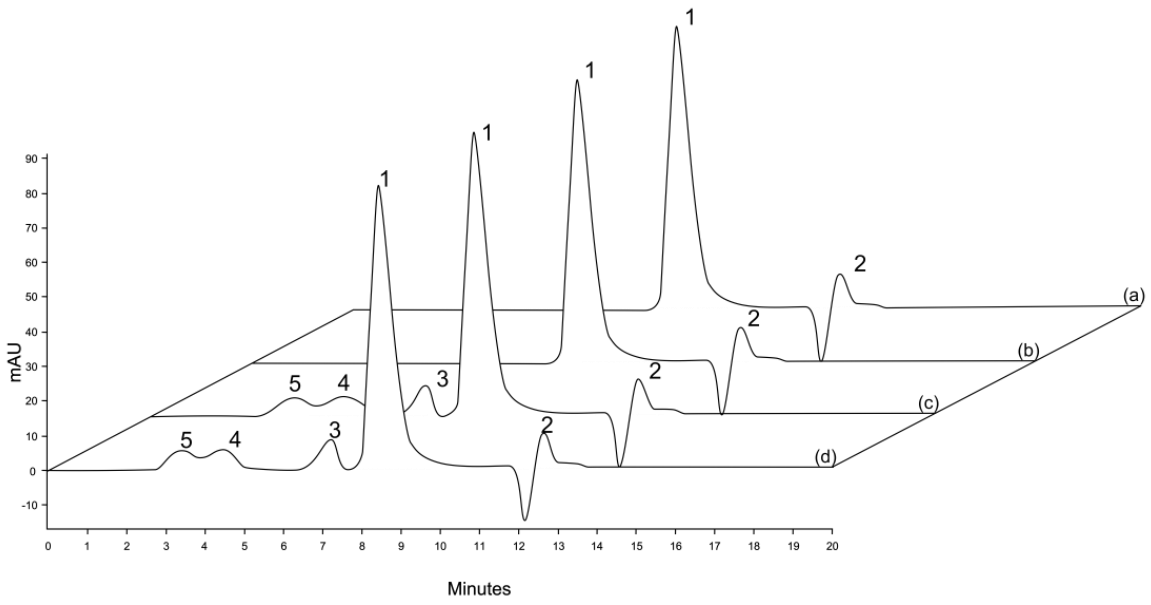

Figure 1. Representative SE-HPLC chromatograms showing peak 1 = rhIL-11, peak 2 = excipient (glycine), peak 3 = dimers and peaks 4, 5 = aggregate. (a) *BRS-rhIL-11*, (b) Sample of biopharmaceutical formulation. *BRS-rhIL-11* following degradation under: (c) forced mixing and (d) thermal conditions.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Com os avanços na área da biotecnologia, principalmente com a tecnologia do DNA recombinante, possibilitou-se grande aumento na produção de proteínas bioterapêuticas. O desenvolvimento e validação de métodos físico-químicos que possam ser usados em combinação com ensaios biológicos e imunológicos se fazem necessários para garantir a completa caracterização dos produtos biotecnológicos, através avaliação da identidade, pureza e teor/potência.

Os bioensaios são fundamentais para a avaliação da atividade dos biofármacos, pois expressam sua potência biológica *in vivo* ou *in vitro*. Especialmente, para a rhIL-11 a potência biológica tem sido avaliada por bioensaios *in vitro*, entre os quais destaca-se o ensaio da atividade proliferativa de células da linhagem TF-1 (YIN et al., 1993; SOUTO et al., 2012), aplicado no presente trabalho.

Primeiramente, com o intuito de caracterizar a biomolécula de rhIL-11, executou-se teste de identificação por SDS-PAGE não-redutora e posterior transferência e detecção imunológica efetuada com anticorpos específicos em membrana de nitrocelulose. Obteve-se perfil eletroforético com banda relativa a rhIL-11 na região de 19 kDa, confirmada pelos marcadores moleculares e pelo padrão de referência na SDS-PAGE não-redutora e banda única na região de 19 kDa quando realizada a tranferência e imunodetecção (CZUPRYN et al. 1995; ZHANG et al., 2002; TAN et al., 2005).

Métodos eletroforéticos e cromatográficos têm sido aplicados para o controle de qualidade de diversas proteínas bioterapêuticas. Através desses métodos é possível obter informações qualitativas e quantitativas das biomoléculas durante os processos de expressão e purificação, formulação, e estabilidade do produto farmacêutico acabado. Nesse sentido, pretendeu-se pesquisar, desenvolver e validar método por ECZ e procedimento por CL-EM para a caracterização e avaliação de rhIL-11 e suas formas degradadas em produtos biotecnológicos .

A seguir é apresentada a discussão dos resultados desta tese, a qual está fundamentada nas publicações científicas identificadas como **ARTIGO 1** e **ARTIGO 2**.

Inicialmente, no primeiro estudo, apresentado no **ARTIGO 1**, desenvolveu-se e validou-se método por ECZ para caracterização e avaliação de rhIL-11. A separação eletroforética foi obtida no tempo de corrida de 10,31 min (Figura 3). A geração de picos adicionais, relativos a formas degradadas, realizada sob condições de estresse e a análise de

amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, conforme pureza do pico da rhIL-11 demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 1 a 300 µg/mL (r^2 = 0,9992). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV% inferiores a 1,42% o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV% menor ou igual a 2% (ICH, 2005; SHABIR, 2003). Na Tabela 2 podem ser observados os valores experimentais obtidos para o teste de exatidão, com média de 100,37%, confirmando a exatidão do método. Os teores/potências obtidos nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstra a Tabela 3. Por sua vez, parâmetros de adequabilidade do sistema foram avaliados, observando-se que os resultados obtidos cumpriram especificações preconizadas, além de CV% < 2, garantindo, assim, que as condições do método foram adequadas para assegurar a confiabilidade dos resultados (ICH, 2005; USP 38, 2015).

Após, aplicaram-se métodos previamente desenvolvidos por CL-FR e bioensaio *in vitro* da atividade proliferativa em células TF-1 (SOUTO et al., 2012), que forneceram os resultados apresentados na Tabela 4. A seguir, correlacionaram-se os resultados fornecidos pelas amostras selecionadas através de análises pelos métodos por ECZ, CL-FR e o bioensaio em células TF-1, observando que os teores/potências por ECZ foram em média 0,60% e 1,60% superiores em relação a CL-FR e ao bioensaio em células TF-1, respectivamente, com diferença não significativa, conforme calculado estatisticamente pela ANOVA (p> 0,05).

Adicionalmente, executou-se o ensaio de citotoxicidade *in vitro*, no qual foram utilizadas amostras de rhIL11 submetidas previamente a condições de estresse e amostras íntegras, tendo em vista avaliar a toxicidade de formas degradadas em comparação com a biomolécula intacta. Os resultados obtidos demonstraram médias de CI_{50} = 18,71 ± 0,26 µg/mL e CI_{50} = 22,23 ± 0,13 µg/mL, respectivamente, para as degradações formadas devido a condição de estresse ácida e fotolítica, com diferenças significativas comparadas à forma intacta da rhIL-11 que apresentou CI_{50} = 67,12 ± 0,06 µg/mL, conforme calculado pelo teste t de Student (p>0,05).

Posteriormente, no **ARTIGO 2**, desenvolveu-se e validou-se método por CL-EM para caracterização e avaliação de rhIL-11. A separação por cromatográfica foi obtida com tempo de retenção de 8,12 min (Figura 1). A geração de picos adicionais, relativos aos dímeros e agregados, obtidos sob condições de estresse e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, conforme pureza do pico

da rhIL-11 demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 1 a 200 µg/mL (r^2 = 0,9996). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV% inferiores a 1,20% o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV% menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Na Tabela 2 podem ser observados os valores experimentais obtidos no teste de exatidão, com média de 99,81%, confirmando a exatidão do método. Os teores/potências obtidos nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstra a Tabela 3. Os dados da verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura (CV% < 2) (ICH, 2005; USP 38, 2015).

Paralelamente, executou-se método por CL-FR e ECZ que forneceram os resultados apresentados na Tabela 4. Estudou-se então, a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos físico-químicos por CL-EM, CL-FR e ECZ com as amostras selecionadas, observando que os teores/potências por CL-EM foram em média 0,80% e 0,40% superiores em relação a CL-FR e a ECZ respectivamente, com diferença não significativa, conforme calculado estatisticamente pela ANOVA (p>0,05). Demonstrou-se, portanto, correlação significativa entre os métodos estudados.

Adicionalmente, avaliou-se a estabilidade de longa duração e de acompanhamento do produto farmacêutico de rhIL-11 através de análises para determinação de teor/potência e produtos de degradação por CL-FR, CL-EM e EC. Os testes foram realizados de acordo com a RDC nº 50, de 15 de maio de 2013 que dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos. Os teores/potências obtidos variaram de 107,03% (tempo 0) a 91,37% (tempo 24 meses); e os produtos de degradação obtidos foram de no mínimo 0,09% (tempo 0) e no máximo 4,38% (tempo 24 meses). Os resultados encontrados atendem as especificações farmacopeicas para avaliação de produtos biológicos por métodos físico-químicos, que recomendam teor/potência entre 90 a 110% e produtos de degradação no máximo 12% (USP 38, 2015; EP, 2014).

Os procedimentos desenvolvidos e validados por ECZ e CL-EM cumpriram com os requisitos preconizados pelos compêndios oficiais, podendo ser empregados para caracterização e determinação de teor/potência da rhIL-11 em produtos biofarmacêuticos.

Até o presente momento, não existe monografia farmacopeica para a caracterização e avaliação da rhIL-11, e na literatura estão descritos alguns métodos analíticos para avaliação

da rhIL-11, porém não validados. Neste contexto, os métodos validados por ECZ e CL aplicados para rhIL-11 são os apresentados nesta tese e desenvolvidos por esse grupo de pesquisa. A validação de métodos é necessária no contexto da produção e caracterização de produtos biológicos recombinantes, sendo preconizada por órgãos reguladores na área de medicamentos (ICH 2005; FDA 2015a).

Observa-se que os métodos estudados foram aplicados para análise de sucessivos lotes do produto biotecnológico de rhIL-11 em uso terapêutico no Brasil. Desse modo, sugere-se, que os métodos desenvolvidos e validados por ECZ e CL-EM, sejam adotados em combinação com a CL-FR e o bioensaio em células TF-1 para a avaliação de teor/potência e pureza da rhIL-11, durante as etapas de expressão e purificação de novos lotes de produção, para o controle da qualidade do produto biofarmacêutico acabado e para viabilizar possíveis estudos de comparabilidade (BRASIL 2011a; BRASIL 2011b; EMA, 2014; FDA, 2015b).

Neste contexto, os resultados alcançados contribuem para aprimorar o controle da qualidade através da melhor caracterização da biomolécula, ampliando os procedimentos disponíveis e contribuindo para garantir a eficácia terapêutica e segurança do produto biotecnológico de rhIL11 disponível no país.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ Aplicou-se método por cromatografia líquida em fase reversa, previamente validado, que forneceu teor/potência dos produtos biotecnológicos selecionados, e foi adotado para viabilizar estudos de correlação.

- ✓ Adicionalmente, aplicou-se o bioensaio da atividade proliferativa em células TF-1 que mostrou a potência dos produtos biotecnológicos selecionados, e foi adotado para viabilizar estudos de correlação com os métodos físico-químicos.

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por eletroforese capilar de zona específico, preciso, exato e robusto para avaliação da interleucina-11 humana recombinante, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e avaliação de produtos de degradação e da forma não-alterada.

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular específico, preciso, exato e robusto para avaliação da interleucina-11 humana recombinante, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e avaliação de agregados, dímeros e monômero.

- ✓ Avaliou-se correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos validados por ECZ, CL-FR e o bioensaio em células TF-1 para as amostras selecionadas, observando-se correlação significativa ($p > 0,05$).

- ✓ Estudou-se a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos físico-químicos validados por CL-EM, ECZ, CL-FR para as amostras selecionadas, observando-se correlação significativa ($p > 0,05$).

- ✓ Recomenda-se a aplicação dos métodos físico-químicos validados para avaliação da interleucina-11 humana recombinante em combinação com o bioensaio da atividade proliferativa em células TF-1, pois representa contribuição para análise do produto farmacêutico, devido à determinação de formas relacionadas e proteínas de alta massa molecular, especificidade e tempo de execução em relação ao ensaio biológico *in vitro*.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, K.; PRASAD, R.; LUNDGREN, K.; SCHWARTZ, M. Z. Interleukin-11 enhances small intestine absorptive function and mucosal mass after intestinal adaptation. **Journal of Pediatric Surgery,** v. 35, n. 2, p. 371-374, 2000.

ALMEIDA, B. E.; DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J. E. ; DALMORA, S. L.; TORJESEN, P.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. **Analytical Methods**, v. 6, p. 6688-6694, 2014.

ALMEIDA, B. E.; OLIVEIRA J. E.; CARVALHO, C. M.; DAMOLRA, S. L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 53, n. 1, p. 90-97, 2010.

ALMEIDA, B. E.; OLIVEIRA, J. E. ; DAMIANI, R.; DALMORA, S. L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. A pilot study on potency determination of human follicle-stimulating hormone: A comparison between reversed-phase high-performance liquid chromatography method and the in vivo bioassay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 681-686, 2011.

AMARI, J. V.; MAZSAROFF, I. Analysis of recombinant human interleukin-11 fusion protein derived from *Escherichia coli* lysate by combined size-exclusion and reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 728, n. 1/2, p. 113-124, 1996.

ANNAMALAI, D.; CLIPSTONE, N. A. Prostaglandin F2α inhibits adipogenesis via an autocrine-mediated interleukin-11/glycoprotein 130/STAT1-dependent signaling cascade. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 7, p. 1308-1321, 2014.

AOYAMA, K.; UCHIDA, T.; TAKANUKI, F.; USUI, T.; WATANABE, T.; HIGUCHI, S.; TOYOKI, T.; MIZOGUCHI, H. Pharmacokinetics of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in healthy male subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology,** v. 43, n. 6, p. 571-578, 1997.

BALDO, B. A. Side effects of Cytokines approved for therapy. **Drug Safety**, v. 37, n. 11, p. 921-943, 2014.

BAZAN, J. F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 87, n. 18, p. 6934-6938, 1990.

BELLIDO, T.; STAHLL, N.; FARRUGGELLA, T. J.; BORBA, V.; YANCOPOULOS, G. D.; MANOLAGAS, S. C. Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. **Journal Clinical Investigation**, v. 97, n. 2, p. 431-437, 1996.

BERGER, L. C.; HAWLEY, T. S.; LUST, J. A.; GOLDMAN, S. J.; HAWLEY, R. G. Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 202, n. 1, p. 596-605, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 55, de 16 de Dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 dez. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Registro de Produtos Biológicos: Bases Legais e Guias - Coletânea, Brasília, DF, 2011a.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 50, de 20 de Setembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 set. 2011. Republicada com alterações em 15, mai. 2013.

CHAHADE, W. H. A reação inflamatória autoimune e possibilidades de seu controle (Parte 1). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 10, n. 2, p. 60-61, 2009.

CZUPRYN, M.; BENNETT, F.; DUBE, J.; GRANT, K.; SCOBLE, H.; MCCOY J.M. Alanine-scanning mutagenesis of human interleukin-11: identification of regions important for biological activity. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 762, n. 2, p. 152-164, 1995.

DALMORA, S. L.; BUTZGE, C. S; MACHADO, F. T.; WALTER, M. E.; DALMORA, M. E. A.; SOUTO, R. B. Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the

assessment of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its correlation with reversed-phase liquid chromatography method and bioassay. **Talanta,** v. 94, n. 5, p. 1-7, 2012.

DENIS, C. V.; KWACK, K.; SAFFARIPOUR, S.; MAGANTI, S.; ANDRÉ, P.; SCHAUB, R. G.; WAGNER, D. D.; Interleukin 11 significantly increases plasma von Willebrand factor and factor VIII in wild type and von Willebrand disease mouse models. **Blood Journal,** v. 97, n. 2, p. 465-472, 2001.

DRUG BANK, 2015. Disponível em: < http://www.drugbank.ca/drugs/DB00038>. Acesso em: 31 Ago. 2015.

DU X.; WILLIAMS D. A. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. **Blood**, v. 89, n. 11, p. 3897-3908, 1997.

ELLIS, M.; HEDSTROM, U.; FRAMPTON, C.; ALIZADEH, H.; KRISTENSEN, J.; SHAMMAS, F. V.; AL-RAMADI, B. K. Modulation of the systemic inflammatory response by recombinant human interleukin-11: a prospective randomized placebo controlled clinical study in patients with hematological malignancy. **Clinical Immunology**, v. 120, n. 2, p. 129-137, 2006.

EMA – European Medicines Agency. "**Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1)**". London, December 214.

EMA – European Medicines Agency. "**Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues**". London, July 215.

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

EUROPEAN Pharmacopoeia 8th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2014.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products**, August 2014.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics**, July 2015a.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Quality Consideration in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product**, April 2015b.

FEKETE, S.; BECK, A.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D.Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 161-173, 2014.

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

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 α-2a (PEGASYS). **Protein Expression and Purification,** v. 30, n. 1, p. 78-87, 2003.

FOURCIN, M.; CHEVALIER, S.; LEBRUN, J. J.; KELLY, P.; POUPLARD, A.; WIJDENES, J.; GASCAN, H. Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor. **European Journal of Immunology,** v. 24, n. 1, p. 277-280, 1994.

FUJIO, Y.; MAEDA, M.; MOHRI, T.; OBANA, M.; IWAKURA, T.; HAYAMA, A.; YAMASHITA, T.; NAKAYAMA, H.; AZUMA, J. Glycoprotein 130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 117, n. 4, p. 213-222, 2011.

GARZON-RODRIGUEZ, W.; KOVAL, R. L.; CHONGPRASERT, S.; KRISHNAN, S.; RANDOLPH, T. W.; WARNE, N. W.; CARPENTER, J. F. Optimizing storage stability of lyophilized recombinant human interleukin-11 with disaccharide/hydroxyethyl starch mixtures. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 3, p. 684-696, 2004.

GIANNINI, E. G. Review article: thrombocytopenia in chronic liver disease and pharmacologic treatment options. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics,** v. 23, n. 8, p. 1055-1065, 2006.

GIBSON, D. L.; MONTERO, M.; ROPELESKI, M. J.; BERGSTROM, K. S. B.; CAIXIA, M. A.; GHOSH, S.; MERKENS, H.; HUANG J.; MÅNSSON, L. E.; SHAM, H. P.; MCNAGNY, K. M.; VALLANCE, B. A. Interleukin-11 reduces TLR4-induced colitis in TLR2-deficient mice and restores intestinal STAT3 signaling. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1277-1288, 2010.

GIRASOLE, G.; PASSERI, G., JILKA, R. L.; MANOLAGAS, S. C. Interleukin-11: A new cytokine critical for osteoclast development**. The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 4, p. 1516-1524, 1994.

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

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

HAMMERLING, H; HENNINGSSON, A.; SJÖDIN, L.; Development and validation of a bioassay for Interleukin-2. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 10, n. 8, p. 547-553, 1992.

HARMEGNIES, D.; WANG, X. M.; VANDENBUSSCHE, P.; LEON, A.; VUSIO, P.; GROTZINGER, J.; JACQUES, Y.; GOORMAGHTIGH, E.; DEVREESE, B.; CONTENT, J. Characterization of a potent human interleukin-11 agonist. **Biochemical Journal,** v. 375, n. 1, p. 23-32, 2003.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 214-221, 2003.

HAYASHI, H.; BEPPU, T.; SHIRABRE, K.; MAEHARA, Y.; BABA, H. Management of thrombocytopenia due to liver cirrhosis: A review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 10, p. 2595-2605, 2014.

HERMANN, J. A.; HALL, M. A.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M. Important immunoregulatory role of interleukin-1 1 in the inflammatory process in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism,** v. 41, n. 8, p. 1388-1397, 1998.

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.

HILTON, D. J.; HILTON, A. A.; RAICEVIC, A.; RAKAR, S.; HARRISON-SMITH, M.; GOUGH, N.M.; BEGLEY, C. G.; METCALF, D.; NICOLA, N. A.; WILLSON, T. A. Cloning of a murine IL-11 receptor α-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. **The EMBO Journal,** v. 13, n. 20, p. 4765-4775, 1994.

HUDSON, K. R.; VERNALLIS, A. B.; HEATH, J. K. Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 271, n. 20, p. 11971-11978, 1996.

HUNTER, C. J.; De PLAEN, I. G. Inflammatory signaling in NEC: Role of NF-κB, cytokines and other inflammatory mediators**. Pathophysiology**, v. 21, n. 1, p. 55-65, 2014.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products**, 1999**.**

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

INJAC, R.; BOSKOVIC, M.; KOCEVAR, N.; VOVK, T. Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. **Analytica Chimica Acta,** v. 620, n. 1/2, p. 150-161, 2008.

JUNG, Y.; AHN, H.; KIM, D.; HWANG, Y. R., HO, S.; KIM J.; KIM, S.; MA, S.; KIM, S. Improvement of biological and pharmacokinetic features of human interleukin-11 by site-directed mutagenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, n. 3, p. 399-404, 2011.

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

KAYE, J. A. FDA licensure of NEUMEGA to prevent severe chemotherapy-induced thrombocytopenia. **Stem Cells**, v. 16, n. 2, p. 207-223, 1998.

KELLER, D. C.; DU, X. X.; SROUR, E. F.; HOFFMAN, R.; WILLIAMS, D. A. Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. **Blood Journal,** v. 82, n. 5, p. 1428-1435, 1993.

KIMURA, R.; MAEDA, M.; ARITA, A.; OSHIMA, Y.; OBANA, M.; ITO, T.; YAMAMOTO, Y.; MOHRI, T.; KISHIMOTO, T.; KAWASE, I.; FUJIO, Y.; AZUMA, J. Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine. **Cytokine,** v. 38, n. 2, p. 107-115, 2007.

KRESSE, G. B. Biosimilars-science, status, and strategic perspective. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 72, n. 3, p. 479-486, 2009.

LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques** (2. Protein Analysis by Capillary Electrophoreis), Taylor & Francis Group, v. 3, p. 80-83, 2008.

LAWITZ, E. J.; HEPBURN, M. J.; CASEY, T. J. A pilot study of interleukin-11 in subjects with chronic hepatitis C and advanced liver disease nonresponsive to antiviral therapy. **The American Journal of Gastroenterology,** v. 99, n. 12, p. 2359-2364, 2004.

LIU, Y.; WANG, Y.; GAO, Y.; FORBES, J. A.; QAYYM, R.; BECKER, L.; CHENG, L.; WANG, Z. Z. Efficient generation of megakaryocytes from human induced pluripotent stem cells using food and drug administration-approved pharmacological reagents. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 4, n. 4, p. 309-319, 2014.

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.
MANNING, M. C.; CHOU, D. K.; MURPHY, B. M.; PAYNE R. W.; KATAYAMA, D. S. Stability of protein pharmaceuticals: an update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p. 544-575, 2010.

McCoy, E. M.; HONG, H.; PRUITT, H. C.; FENG, X. IL-11 produced by breast cancer cells augments osteoclastogenesis by sustaining the pool of osteoclast progenitor cells. **BMC Cancer**, v. 13, n. 16, p. 1-11, 2013.

MEERVELD, B. G. V.; VENKOVA, K.; KEITH, JR., J. C. Recombinant human interleukin-11 restores smooth muscle function in the jejunum and colon of human leukocyte antigen-b27 rats with intestinal inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 299, n. 1, p. 58-66, 2001.

MIRE-SLUIS, A. R. Cytokines: from technology to therapeutics. **Trends in Biotechnology**, v.8, n. 17, p. 319-325, 1999.

MIYAJIMA, A.; KITAMURA, T.; HARADA, N.; YOKOTA, T.; ARAI, K. Cytokine receptors and signal transduction. **Annual review of immunology**, v. 10, p. 295-331, 1992.

MORELAND, L.; GUGLIOTTI, R.; KING, K.; CHASE, W.; WIESMAN, M.; GRECO, T.; FIFE, R.; KORN, J.; SIMMS, R.; TESSER, J.; HILLSON, J.; CALDWELL, J.; SCHNITZER, T.; LYONS, D.; SCHWERTSCHLAG, U. Results of a phase-I/II randomized, masked, placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in the treatment of subjects with active rheumatoid arthritis. **Arthritis Research,** v. 3, n. 4, p. 247-252, 2001.

NEUMEGA®: Pó liófilo injetável. Responsável técnico Edina S. M. Nakamura. Itapevi, São Paulo – Brasil. Wyeth Indústria Farmacêutica, 2004. Bula de remédio.

NGUYEN, P. M.; PUTOCZKI, T. L.; ERNST, M. STAT3-Activating cytokines: a therapeutic Opportunity for inflammatory bowel disease?. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 5, p. 340-350, 2015.

NICHOLS, T. C.; DILLOW, A. M.; FRANCK, H. W. G.; MERRICKS, E. P.; RAYMER, R. A.; BELLINGER, D. A.; ARRUDA, V. R.; HIGH, K. A. Protein replacement therapy and gene transfer in canine models of hemophilia a, hemophilia b, von willebrand disease, and factor vii deficiency. **National Institutes of Health,** v. 50, n. 2, p. 144-167, 2009.

NOGUEIRA-SILVA, C.; PIAIRO, P.; CARVALHO-DIAS, E.; VEIGA, C.; MOURA, R. S.; CORREIA-PINTO, J. The role of glycoprotein 130 family of cytokines in fetal rat lung development. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67607, 2013.

OBANA, M.; MAEDA, M.; TAKEDA, K.; HAYAMA, A.; MOHRI, T.; YAMASHITA, T.; NAKAOKA, Y.; KOMURO, I.; TAKEDA, K.; MATSUMIYA, G.; AZUMA, J.; FUJIO. Y. Therapeutic Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Interleukin-11 Ameliorates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction. **Circulation,** v. 121, n. 5, p. 684-691, 2010.

OPAL, S. M.; DePALO, v. a. Anti-imflammatory cytokines. **American College of Chest Physicians**, v. 117, n.4, p. 1162-1172, 2000.

PANAYOTATOS, N.; RADZIEJEWSKA, E.; ACHESON, A.; SOMOGYI, R.; THADANI, A.; HENDRICKSON, W. A.; MCDONALD, N. Q. Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related

epitope topography among helical cytokines. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 270, n. 23, p. 14007-14014, 1995.

PAUL, S. R.; BENNETT, F.; CALVETTI, J. A.; KELLEHER K.; WOOD, C. R.; O'HARA, JR., R. M.; LEARY, A. C.; SIBLEY, B.; CLARK, S. C.; WILLIAMS, D. A.; YANG, Y. C. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 87, n 19, p. 7512-7516, 1990.

PAUL, S. R.; YANG, Y. C.; DONAHUE, R. E.; GOLDRING, S.; WILLIAMS, D. A. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. **Blood Journal,** v. 77, n. 8, p. 1723-1733, 1991.

PLAQUEMAX®: Pó liófilo injetável. Responsável técnico Geisa Acetto Cavalari. Itapevi, São Paulo – Brasil. Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo, 214. Bula de remédio.

RAGNI, M. V.; JANKOWITZ, R. C.; JAWORSKI, K.; MERRICKS, E. P.; KLOOS, M. T.; NICHOLS, T. C. Phase II prospective open-label Trial of recombinant interleukin-11 in women with mild von Willebrand disease and refractory menorrhagia. **Thrombosis Haemostasis**, v. 106, n. 4, p. 641-645.

ROSENBERG, A. S. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. **American association of Pharmaceutical Scientists**, v. 8, n. 3, p. E501-E507, 2006.

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.

SAITOH, M.; TAGUCHI, K.; MOMOSE, K.; SUGA, K.; OGAWA, Y.; YASUDA, S.; MIYATA K. Kinetic analysis of megakaryopoiesis induced by recombinant human interleukin 11 in myelosuppressed mice. **Cytokine**, v. 13, n. 5, p. 287-294, 2001.

SANDS, B. E.; BANK, S.; SNINSKY, C. A.; ROBINSON, M.; KATZ, S.; SINGLETON, J. W.; MINER, JR., P. B.; SAFDI, M. A.; GALANDIUK, S.; HANAUER, S. B.; VARILEK, G. W.; BUCHMAN, A. L.; RODGERS, V. D.; SALZBERG, B.; CAI, B.; LOEWY, J.; DEBRUIN, M. F.; ROGGE, H.; SHAPIRO, M.; SCHWERTSCHLAG, U. S. Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active crohn's disease. **Gastroenterology,** v. 117, n. 1, p. 58-64, 1999.

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

SCHLERMAN, F. J.; BREE, A. G.; KAVIANI, M. D.; NAGLE, S. L.; DONNELLY, L. H.; MASON, L. E.; SCHAUB, R. G.; GRUPP, S. A.; GOLDMAN, S. J. Thrombopoietic activity of recombinant human interleukin 11 (rhuil-11) in normal and myelosuppressed nonhuman primates. **Stem Cells,** v. 14, n. 5, p. 517-532, 1996.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1/2, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. L.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,** v. 30, n. 3, p. 311-333, 2007.

SIDDIQUI R, A.; YANG, Y. C. Interleukin-11 induces phosphatidic acid formation and activates MAP kinase in mouse 3T3-L1 cells. **Cellular Signalling,** v. 7, n. 3, 247-259, 1995.

SOMMER, J.; EFFENBERGER, T.; VOLPI, E.; WAETZING, G. H.; BERNHARDT, M.; SUTHAUS, J.; GARBERS, C.; ROSE-JOHN, S.; FLOSS, D. M.; SCHELLER, J. Constitutively active mutant gp130 receptor protein from inflammatory hepatocellular adenoma is inhibited by an anti-gp130 antibody that specifically neutralizes interleukin 11 signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 17, p. 13743-13751, 2012.

SOUTO, R. B. **Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida em fase reversa para avaliação de interleucina-11 humana recombinante**. **Correlação com o bioensaio.** 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SOUTO, R. B.; STAMM, F. P.; RIBELA, M. T. C. P.; BARTOLINI, P.; CALEGARI, G. Z.; DALMORA, S. L. Validation of a Stability-indicating RP-LC Method for the Assessment of Recombinant Human Interleukin-11 and Its Correlation with Bioassay. **Analytical Science**, v. 28, n. 3, p. 215-220, 2012.

SOUTO, R. B.; STAMM, F. P.; SCHUMACHER, J. B.; Cardoso Jr., C.D.A.; FREITAS, G. W.; PEROBELLI, R. F.; DALMORA, S. L. Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with reversed-phase liquid chromatography and biossay. **Talanta,** v. 123, p. 179-185, 2014.

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

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

TAKAGI, A.; MASUDA, H.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Disposition characteristics of recombinant human interleukin-11 after a bolus intravenous administration in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 275, n. 2, p. 537-543, 1995.

TAKAGI, A.; YABE, Y.; OKA, Y.; SAWAI, K.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Renal disposition of recombinant human interleukin-11 in the isolated perfused rat kidney. **Pharmaceutical Research,** v. 14, n. 1, p. 86-90, 1997.

TAKAGI, A.; YABE, Y.; YOSHIDA, M.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Hepatic disposition characteristics of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in the perfused rat liver. **Biological & Pharmaceutical Bulletin,** v. 21, n. 12, p. 1364-1366, 1998.

TAKAGI, A.; YAMASHITA, N.; YOSHIOKA, N.; TAKAISHI, Y.; NAKANISHI, K.; TAKEMURA, S.; MAEDA, A.; SAITO, K.; TAKAMURA Y.; HASHIDA M. Incorporation into a biodegradable hyaluronic acid matrix enhances *in vivo* efficacy of recombinant human interleukin 11 (rhIL11). **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 2, p. 134-139, 2006.

TAKAGI, A.; YAMASHITA, N.; YOSHIOKA, T.; TAKAISHI, Y.; SANO, K.; YAMAGUCHI, H.; MAEDA, A.; SAITO, K.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA M. Enhanced pharmacological activity of recombinant human interleukin-11 (rhIL11) by chemical modification with polyethylene glycol. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 3, p. 271-278, 2007.

TENNEY, R.; STANSFIELD, K.; PEKALA, P. Interleukin 11 signaling in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 202, n. 1, p. 160-166, 2005.

THE UNITED States Pharmacopeia. 38. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2015.

TREPICCHIO, W. L.; BOZZA, M.; PEDNEAULT, G.; DORNER, A. J. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory

cytokine release and nitric oxide production. **Journal of Immunology,** v. 157, n. 8, p. 3627-3634, 1996.

TREPICCHIO, W. L.; WANG, L.; BOZZA M., DORNER, A. J. IL-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-kappaB. **Journal of Immunology,** v. 159, n. 11, p. 5661-5670, 1997.

UCHIDA, T.; AOYAMA, K.; MORI, K.; USUI, T.; WATANABE, T.; TAKARIKI, Y.; ASAHARA, N.; HIROSE, M.; KIMURA, T.; TATEISHI, M.; HIGUCHI, S. Pharmacokinetics of [125I]-recombinant human interleukin-11: 2. Placental transfer and excretion into milk after subcutaneous administration to rats. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics,** v. 23, n. 3, p. 411-416, 1998.

UNDERHILL-DAY, N.; McGOVERN, L. A.; KARPOVICH, N.; MARDON, H. J.; BARTON, V. A.; HEATH, J. K. Functional characterization of W147A: a high-affinity interleukin-11 antagonist. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3406-3414, 2003.

USUKI, K.; URABE, A.; IKEDA, Y.; OHASHI, Y.; MIZOGUCHI, H.; TAKAKU, F.; JAPAN IL-11 STUDY GROUP. A multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled late-phase II/III study of recombinant human interleukin 11 in acute myelogenous leukemia. **International Journal of Hematology,** v. 85, n. 1, p. 59-69, 2007.

WAN, B.; ZHANG, H.; FU, H.; CHEN, Y.; YANG, L.; YIN, J.; WAN, Y.; SHI, Y. Recombinant human interleukin-11 (IL-11) is a protective factor in severe sepsis with thrombocytopenia: A case-control study. **Cytokine**, v.76, n. 2, p. 138-143, 2015.

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

WANG, X. Y.; FUHRER, D. K.; MARSHALL, M. S.; YANG, Y. C. Interleukin-11 induces complex formation of Grb2, Fyn, and JAK2 in 3T3L1 cells. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 270, n. 47, p. 27999-28002, 1995.

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

WHITE, U. A.; STEPHENS, J. M. The gp130 receptor cytokine family: regulators of a adipocyte development and function. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 4, p. 340-346, 2011.

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

YAN, D.; Kc, R.; CHEN, D.; XIAO, G.; IM, H. J. Bovine lactoferricin-induced anti-inflammation is, in part, via up-regulation of interleukin-11 by secondary activation of STAT3 in human articular cartilage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 44, p. 31655-31669, 2013.

YANAKA, S.; SANO, E.; NARUSE, N.; MIURA, K.; FUTATSUMORI-SUGAI, M.; CAAVEIRO, J. M.; TSUMOTO, K. Non-core region modulates interleukin-11 signaling activity: generation of agonist and antagonist variants. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 286, n. 10, p. 8085-8093, 2011.

YIN, T.; MIYAZAWA, K.; YANG, Y. C. Characterazation of interlukin-11 receptor and protein tyrosine phosphorylation induced by interluekin-11 in mouse 3T3-L1 cells. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 267, n. 12, p. 8347-8351, 1992.

YIN, T.; TAGA, T.; TSANG, M. L.; YASUKAWA, K.; KISHIMOTO, T.; YANG, Y. "Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction," **Journal of Immunology**, v. 151, n. 5, p. 2555-2561, 1993.

YIN, T.; YASUKAWA, K.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.; YANG, Y. C. Identification of a 130-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein induced by interleukin-11 as JAK2 tyrosine kinase, which associates with gp130 signal transducer. **Experimental Hematology,** v. 22, n. 5, p. 467-472, 1994.

YOKOTA, H.; KISHIMOTO, M.; SAITO, H.; SAKAI, T.; YOKOTA, S.; KOJIMA, S. Quantitative *in vitro* bioassay for recombinat human interleukin-11. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 5, p. 1053-1057, 2000b.

YOKOTA, H.; SAITO, H.; MASUOKA, K.; KANIWA, H.; SHIBANUMA, T. Reversed phase HPLC of Met^{58} oxidized rhIL-11: oxidation enhanced by plastic tubes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 24, n. 2, p. 317-324, 2000a.

ZHANG, W.; CZUPRYN, M. J.; BOYLE, P. T.; AMARI, J. Characterization of asparagines deamidation and aspartate isomerization in recombinant human interleukin-11. **Pharmaceutical Research**, v.19, n. 8, p. 1223-1231, 2002.