

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

Francielle Santos da Silva

**AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE INTERFERON BETA - 1B POR
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS VALIDADOS E BIOENSAIO**

Santa Maria, RS
2017

Francielle Santos da Silva

**AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE INTERFERON BETA - 1B POR MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS VALIDADOS E BIOENSAIO**

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS
2017

Francielle Santos da Silva

**AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE INTERFERON BETA -1B POR MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS VALIDADOS E BIOENSAIO**

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

Aprovado em 27 de julho de 2017:

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

Lucélia Magalhães da Silva, PhD. (IFPR)

Melania Palermo Manfron, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar 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, Aléssio Braz da Silva e Isabel Medianeira Santos da Silva pelo amor, educação, incentivo e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa. Ao meu irmão Leonardo Santos da Silva pelo amor, amizade e companheirismo durante toda a minha vida. Ao meu noivo Jonas Perônio do Nascimento pelo amor, carinho, apoio e compreensão. Por fim, agradeço a todos os colegas e amigos dos Laboratórios CTEFAR e CEBIFAR, pelo enorme aprendizado, cumplicidade e apoio.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE INTERFERON BETA - 1B POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS VALIDADOS E BIOENSAIO

AUTORA: Francielle Santos da Silva

ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

O interferon é uma citocina que apresenta ação antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora, e influencia o metabolismo, crescimento e diferenciação das células. O interferon β 1b humano recombinante (rhIFN β -1b) não-glicosilado, é produzido por engenharia genética, e expresso em *Escherichia coli*. Estruturalmente possui 165 aminoácidos, massa molecular de 18,5 kDa e ponto isoelétrico de 9,2. O rhIFN β -1b é indicado clinicamente para o tratamento de esclerose múltipla. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM) para avaliação do rhIFN β -1b em formulações de produtos biofarmacêuticos. No método por CL-FR, foi utilizada coluna Jupiter C₄ (250 mm x 4,6 mm d.i), mantida a 30°C. A fase móvel A foi constituída de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) em água, e a fase móvel B por TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, eluídas em gradiente com fluxo de 1 mL/min. No método por CL-EM foi utilizada coluna BioSep-SEC-S 2000 (300 mm x 7,8 mm d.i), mantida a 25°C. A fase móvel foi constituída de tampão fosfato de potássio monobásico 1 mM, fosfato de sódio dibásico 8 mM e cloreto de sódio 200 mM, pH 7,4, eluída em vazão isocrática de 0,8 mL/min. Para ambos os métodos utilizou-se detector de arranjo de diodos (DAD) a 214 nm. A separação cromatográfica foi obtida nos tempos de 31,87 e 17,78 min, respectivamente, para os métodos por CL-FR e CL-EM. As curvas de calibração foram lineares na faixa de concentração de 1–200 μ g/mL (0,032–6,4 MUI/mL) ($r^2 = 0,9998$) e 0,50–200 μ g/mL (0,016–6,4 MUI/mL) ($r^2 = 0,9999$), respectivamente, para os métodos por CL-FR e CL-EM. Os limites de detecção e quantificação foram 0,47 e 1,57 μ g/mL, respectivamente, para o método por CL-FR e 0,10 e 0,34 μ g/mL por CL-EM. A especificidade foi avaliada em estudos de degradação, e também demonstrou-se que não houve interferência dos excipientes. A exatidão foi de 100,42 e 100,45% com bias inferiores a 0,69 e 0,82%, respectivamente. Além disso, realizou-se o teste de citotoxicidade *in vitro* das formas degradadas, as quais apresentaram diferença significativa em relação a forma intacta ($p < 0,05$). Os métodos propostos foram aplicados para avaliação da potência de rhIFN β -1b em formulações biofarmacêuticas, e os resultados foram comparados com bioensaio, observando-se diferenças das médias de teor/potência de 1,61 e 1,05% superiores para os métodos por CL-FR e CL-EM. Conclui-se que a pesquisa representa contribuição para estabelecer procedimentos, para monitorar a estabilidade e aprimorar o controle de qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biotecnológico.

Palavras-chave: Interferon β 1b humano recombinante. Cromatografia líquida em Fase Reversa. Cromatografia líquida por Exclusão Molecular. Validação. Bioensaio. Correlação.

ABSTRACT

POTENCY ASSESSMENT OF INTERFERON BETA – 1B BY VALIDATED CHROMATOGRAPHIC METHODS AND BIOASSAY

AUTHOR: FRANCIELLE SANTOS DA SILVA

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Interferon is a cytokine with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties that influences cell metabolism, growth and differentiation. The recombinant human interferon β 1b (rhIFN β -1b) is a non-glycosylated protein produced by the expression in *Escherichia coli* by the recombinant DNA technology. Structurally, it is a polypeptide chain containing 165 amino acids, molecular weight of 18.5 kDa and isoelectric point of 9.2. The rhIFN β -1b is clinically used to treat multiple sclerosis. In the present work, reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and size exclusion liquid chromatography (SE-LC) methods were developed and validated for the evaluation of rhIFN β -1b in biopharmaceutical formulations. The gradient RP-LC method was carried out on a Jupiter C4 column (250 mm x 4.6 mm i.d.) maintained at 30°C. The mobile phase A consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water and the mobile phase B was 0.1% (v/v) TFA in acetonitrile, run at a flow rate of 1.0 mL/min. The SE-LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.) maintained at 25°C. The mobile phase consisted of 1 mM monobasic potassium phosphate, 8 mM sodium phosphate dibasic and 200 mM sodium chloride buffer pH 7.4, run isocratically at a flow rate of 0.8 mL/min. Chromatographic separations were obtained with retention times of 31.87 and 17.78 min, and calibration curves were linear over the concentration range of 1-200 μ g/mL (0.032 – 6.4 MIU/mL) ($r^2 = 0.9998$) and 0.50-200 μ g/mL (0.016 – 6.4 MIU/mL) ($r^2 = 0.9999$), respectively, for RP-LC and SE-LC, with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The limits of detection and quantitation were 0.47 and 1.57 μ g/mL, respectively, for the RP-LC and 0.10 and 0.34 μ g/mL for the SE-LC. The specificities were established in degradation studies, which also showed that there was no interference from the formulation excipients. Equally, the accuracy was 100.42 and 100.45%, with bias lower than 0.69 and 0.82%, respectively. 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 rhIFN β -1b in biotechnology-derived products, giving higher mean differences of the estimated content/potencies of 1.61 and 1.05% for the RP-LC and SE-LC, related to the *in vitro* assay. It is concluded that represents a contribution to establish new alternatives to monitor stability, improve quality control and thereby assure therapeutic efficacy of the biotechnology-derived medicine.

Keywords: Recombinant human interferon β 1b. Reversed-phase liquid chromatography. Size-exclusion liquid chromatography. Validation. Bioassay. Correlation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da sequência de aminoácidos do rhIFN β -1b.....	16
Figura 2 – Representação da sinalização de IFN do tipo I	18
Figura 3 – Representação do processo de inflamação e mecanismos imunológicos na EM.....	19
Figura 4 – Representação da ação do IFN e IL na fisiopatologia da EM	20

3. PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

Figure 1 – Fig. 1 Representative RP-LC chromatograms showing: peak 1 = rhIFN β -1b; peak 2 = albumin; peaks 3 and 4 = related proteins; peak 5 = hydrogen peroxide. (a) Biological reference substance of BS-IFN β -1b. (b) Sample of biopharmaceutical formulation; and after: (c) degradation by hydrogen peroxide; (d) photodegradation; (e) placebo.....	52
Figure 2 – Fig. 2 Representative SE-LC chromatograms showing: peak 1 = rhIFN β -1b; peak 2 = albumin; peaks 3 and 4 = high molecular weight. (a) Biological reference substance of BS-IFN β -1b. (b) Sample of biopharmaceutical formulation; and after: (c) neutral hydrolysis; (d) placebo.....	53

LISTA DE TABELAS

3. PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

Table 1 – Accuracy of RP-LC and SE-LC for rhIFN β -1b in biopharmaceutical formulations.....	48
Table 2 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness test for the RP-LC method	49
Table 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness test for the SE-LC method	50
Table 4 – Comparative content/potency evaluation of rhIFN β -1b in biopharmaceutical formulations by the bioassay and the LC methods	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BRS-IFN β -1b	Standard Interferon Beta Ser17 Mutein, human rDNA derived
BS-IFN β -1b	In-house biological reference substance of rhIFN β -1b
Células NK	Células natural killer
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coeficiente de variação
CV%	Coeficiente de variação percentual
DAD	Detector de arranjo de diodos
d.i	Diâmetro interno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	Esclerose múltipla
EMA	European Medicines Agency
EMCV	Vírus da encefalomiocardite
EMRR	Esclerose múltipla recorrente-remitente
EP	Farmacopéia Européia
FDA	Food and Drug Administration
hIFN- β	Interferon β humano
HPLC	High performance liquid chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de interferon tipo I
IL	Interleucina
ISRE	Elemento de resposta estimulado por interferon
LC	Liquid chromatography
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
r ²	Coeficiente de determinação
Rec-IFN β -1b	Recombinant human biological reference substance of Interferon beta 1b
rhIFN β -1b	Interferon β 1b humano recombinante
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopeia Americana
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
VSV	Vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	27
4 DISCUSSÃO	56
5 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Interferons são proteínas naturais produzidas pelas células do sistema imune que apresentam atividade antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. O Interferon β humano (hIFN- β) é uma glicoproteína constituída por 166 aminoácidos, produzida pelos fibroblastos, que regula respostas imunes inata e adaptativa (KARPUSAS et al., 1997).

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a produção de novas macromoléculas biológicas de interesse terapêutico, através da transferência de genes de um organismo para outro e viabilizaram a produção de interferon β 1b humano recombinante (rhIFN β -1b) altamente purificado, em quantidades consideráveis. A biomolécula produzida por engenharia genética é composta por 165 aminoácidos e apresenta massa molecular de 18,5 KDa. Difere da proteína humana natural pela presença de serina em substituição à cisteína na posição 17 e ausência da metionina-1. Atualmente é usada para o tratamento de esclerose múltipla, reduzindo a taxa de progressão e as recidivas da doença (MARK et al., 1984; DENDROU et al., 2015).

Os ensaios biológicos têm sido usados para avaliação de potência de produtos biológicos, com avanços para bioensaios por cultura de células *in vitro*. Inicialmente, a atividade biológica do rhIFN β -1b foi avaliada pelos ensaios da atividade antiviral, baseados na inibição do efeito citopático das linhagens virais da estomatite vesicular (VSV) e da encefalomiocardite (EMCV), sobre as linhagens celulares MDBK (ATCC:CCL-22) e WISH (ATCC:CCL-25). Atualmente, tem sido usado ensaio baseado no efeito antiproliferativo do rhIFN β -1b na linhagem de células Daudi (ATCC:CCL-213) ou A-549 (ATCC:CCL-185), e avaliação das respostas com o corante MTT ou azul de alamar por espectrofotometria (BORDEN et al., 1982; MEAGER, 2002; BASU et al., 2006).

O rhIFN β -1b apresenta estrutura molecular complexa, heterogênea, e pode conter impurezas dos processos de expressão, purificação e produção. Além disso, estudos de estabilidade têm demonstrado alterações da integridade da molécula, com a presença de proteínas relacionadas e substâncias de alta massa molecular, que podem afetar sua bioatividade, causar imunogenicidade e toxicidade. Neste sentido, o estudo por métodos físico-químicos tem sido utilizado para demonstrar

estruturas correspondentes às formas ativas dos produtos biotecnológicos. Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM), com detecção no ultravioleta (UV), viabilizam a separação, identificação e avaliação do teor/potência de substâncias biológicas, além de constituir-se em método alternativo, aplicados juntamente com ensaios biológicos para monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas (SILVA et al., 2009; DALMORA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014; CARDOSO et al., 2017).

O desenvolvimento e validação de métodos para avaliação de produtos biofarmacêuticos é fundamental para assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos, para registro do uso terapêutico. Além disso, são importantes para viabilizar possíveis estudos de similaridade de biomoléculas ativas. Destaca-se que não existem referências nas Farmacopeias sobre o rhIFN β -1b e nem monografias disponíveis para o controle da qualidade (FDA, 2015; EP, 2017).

O presente trabalho teve por finalidade: a) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa para a avaliação de proteínas relacionadas e da forma não-alterada de rhIFN β -1b em produtos biofarmacêuticos; b) desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular para avaliação de potência, determinação de dímeros e agregados; c) executar o bioensaio da atividade antiproliferativa; d) avaliar a bioatividade e citotoxicidade das formas degradadas e de molécula íntegra; e) estudar correlação entre os métodos cromatográficos e o bioensaio por cultura de células. Desse modo, objetivou-se pesquisar metodologias que pudessem contribuir para a avaliação de identidade, pureza e teor/potência, aprimorando o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os interferons (IFNs) são citocinas naturais, produzidas por células do sistema imune em resposta a estímulos, incluindo antígenos de bactérias, micoplasmas, protozoários e ácidos nucleicos virais. Apresentam propriedades antivirais, antiproliferativas, antitumorais e imunomoduladoras (ISAACS; LINDENMANN, 1957; SÎRBU et al., 2017).

Com base nas propriedades estruturais e funcionais, os IFNs são classificados em tipo I, II e III. Em humanos, os IFNs do tipo I são identificados como α e β , devido suas propriedades imunogênicas e sequencia de aminoácidos. O IFN- α é produzido por leucócitos e pode ser induzido por células alogênicas, células infectadas por vírus, células tumorais, bactérias e envelopes virais que estimulam linfócitos B, células NK e macrófagos. O IFN- β , é induzido por ácidos nucleicos de vírus e outros microorganismos que infectam células como fibroblastos, células epiteliais e macrófagos. O IFN do tipo II, também denominado de IFN- γ ou IFN imune, é produzido principalmente por células T ativadas e células NK e induzido por linfócitos T estimulados e antígenos estranhos. Já o IFN tipo III (IFN- λ), foi descoberto mais recentemente e é produzido principalmente por células dendríticas e macrófagos após infecção viral ou bacteriana. Os IFN- λ desempenha papel importante em algumas infecções virais, sendo semelhante, nesse aspecto, aos IFN α ou β (PESTKA, 1983; FOSTER et al., 2003; WEERD et al., 2007; HERMANT; MICHIELS, 2014).

O interferon β humano (hIFN- β) é uma glicoproteína produzida pelos fibroblastos, que regula respostas imunes inata e adaptativa, diferenciação de células da micróglia, suprime a ativação de linfócitos T e B, impede a migração de células do sistema imunológico da periferia ao SNC, e é potencialmente neuroprotetora (MURARO et al., 2000; DENDROU et al., 2015).

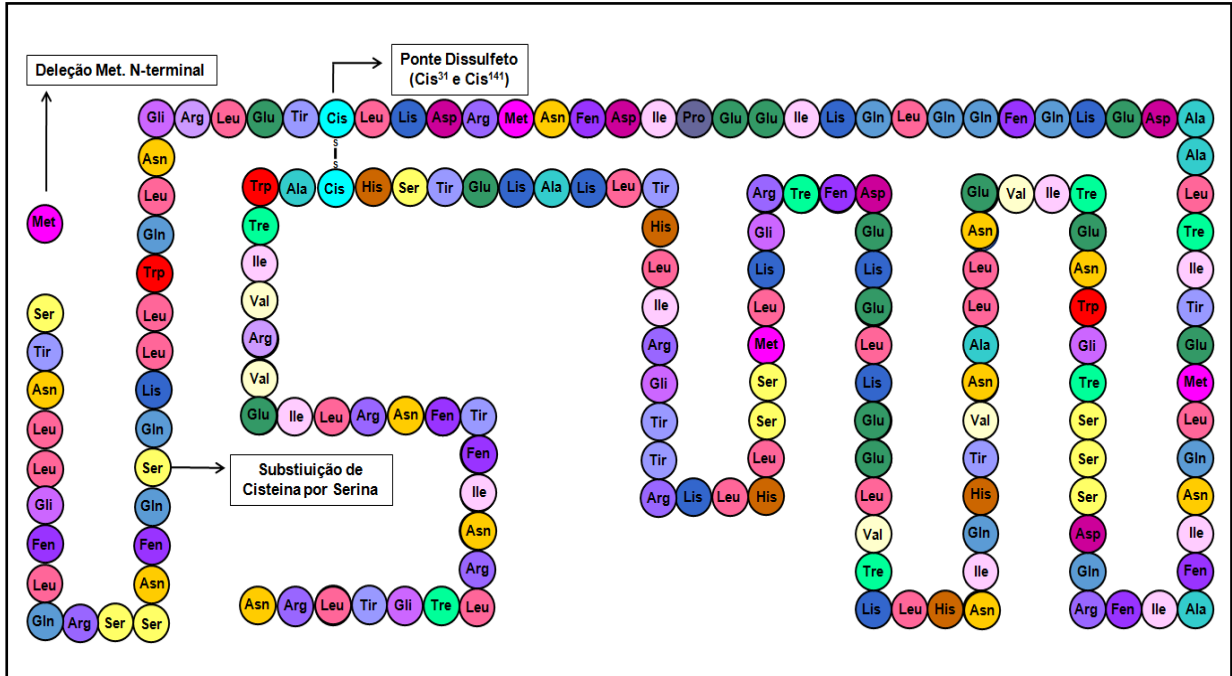
O hIFN- β possui três resíduos de cisteína, localizados nas posições dos aminoácidos 17, 31 e 141. Uma ou mais destas cisteínas podem estar envolvidas na formação da ponte dissulfeto intramolecular. Além disso, as três cisteínas podem interagir aleatoriamente originando três tipos de moléculas na célula, cada uma com as três possíveis pontes dissulfeto intramoleculares. Entretanto apenas uma dessas formas apresenta a conformação natural biologicamente ativa, sendo que as demais

formam dímeros e oligômeros inativos. A cisteína 31 está envolvida na ponte dissulfeto com a cisteína 141, sendo assim, a cisteína 17, que permanece livre, foi escolhida para ser substituída por uma serina (MARK et al., 1984).

A presença de uma serina na posição 17 preveniu a formação de pontes dissulfeto incorretas resultando em uma molécula de interferon humano recombinante estável e bioativa (RUNKEL et al., 1998).

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a produção de interferon β 1b humano recombinante (rhIFN β -1b) na forma não-glicosilada, produzido por engenharia genética e expresso em *Escherichia coli* (*E. coli*). Estruturalmente o rhIFN β -1b é uma proteína constituída por 165 aminoácidos, massa molecular de 18,5 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 9,2. Difere da proteína humana natural pela presença de serina em substituição à cisteína na posição 17 e ausência da metionina-1, conforme pode ser observado na Figura 1 (GOODKIN,1994).

Figura 1 - Representação da sequência de aminoácidos do rhIFN β -1b.



Fonte: Adaptação de BETA FERON, (2016).

O rhIFN- β 1b encontra-se disponível no Brasil como produto biofarmacêutico denominado Betaferon[®], sendo fabricado e distribuído no Brasil pelo laboratório Bayer Healthcare Pharmaceuticals, sob a forma farmacêutica de pó liófilo para solução injetável, na apresentação de 300 μ g (9,6 milhões de UI). A dose recomendada é de 250 μ g (8 milhões de UI), contida em 1 mL da solução reconstituída, devendo ser injetada por via subcutânea, em dias alternados. É clinicamente indicado para pacientes com um único evento clínico sugestivo de Esclerose Múltipla (EM) - para retardar a progressão à EM definida; Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente (EMRR) (BETAFERON, 2016).

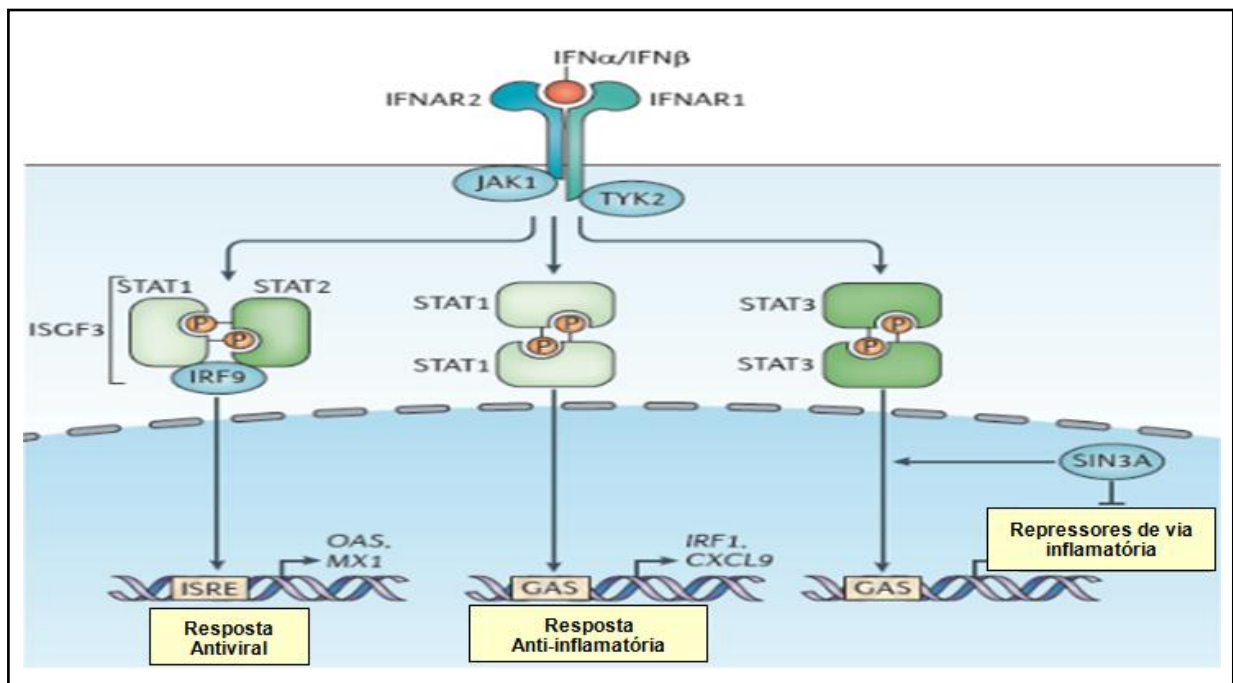
Destaca-se que os produtos biofarmacêuticos de IFNs, aprovados pela FDA para o tratamento da EM são: a) IFN- β -1a (Avonex[®] - 2002, Rebif[®] - 2009), proteína recombinante glicosilada produzida em células CHO (ovário de hamster chinês), com seqüência de aminoácidos idêntica à do INF- β humano; b) IFN- β 1b (Betaseron[®] - 1993), forma não glicosilada derivada de *E. coli*, contendo a mutação na serina 17; IFN- β -1b, biosimilar (Extavia[®] - 1993) derivado de *E. coli*; e d) peginterferon beta-1a (Plegridy[®] - 2014) conjugado com polietilenoglicol (INGWERSEN et al., 2016; EINARSON et al., 2017).

Os IFNs α e β possuem 30% de semelhança em suas seqüências de aminoácidos, portanto, se ligam a um receptor comum composto por duas cadeias distintas IFNAR1 e IFNAR2 (Receptor de interferon tipo I) (JAVED; REDER, 2006). Estes IFNs possuem a capacidade de ligar-se ao receptor com orientações diferentes, induzindo conformações distintas. Esse processo resulta no envolvimento de segundos mensageiros e consequente ativação de genes distintos, obtendo-se respostas biológicas específicas. Já o IFN- γ possui seu próprio receptor, composto por cadeias α e β (WALSH, 2004).

A ligação do IFN- β no receptor IFNAR, promove a dimerização das subunidades do receptor e a associação com as *Janus Kinases* (JAK), pertencente à família de proteína tirosina quinase (IVASHKIV; DONLIN, 2014). As subunidades IFNAR-1 e IFNAR-2 associam-se com as tirosinas quinases TYK2 e JAK1, respectivamente. Posteriormente ocorre uma fosforilação e ativação das tirosinas, e de seus resíduos, que promove a ligação direta entre um ou mais membros da família de proteínas citoplasmáticas STATs (transdutor de sinal e ativador de transcrição) nas fosfotirosinas específicas do receptor. Na seqüência, as STATs são fosforiladas e ativadas pelas JAKs, e posteriormente dissociam-se do receptor,

dimerizam e migram para o núcleo (ARDUINI et al., 1999). No núcleo, as STATs interagem com proteínas reguladoras de genes e regiões específicas chamadas de ISREs (elemento de resposta ao estímulo de interferon), que leva a indução ou ao aumento da expressão de genes específicos e início da transcrição. A seguir, esses genes são traduzidos para proteínas efetoras responsáveis pelos efeitos antiviral, antiproliferativo e imunomodulador, indução de citocinas e regulação do MHC (Figura 2) (TAKAOKA, YANAI, 2006).

Figura 2 – Representação da sinalização de IFN do tipo I.



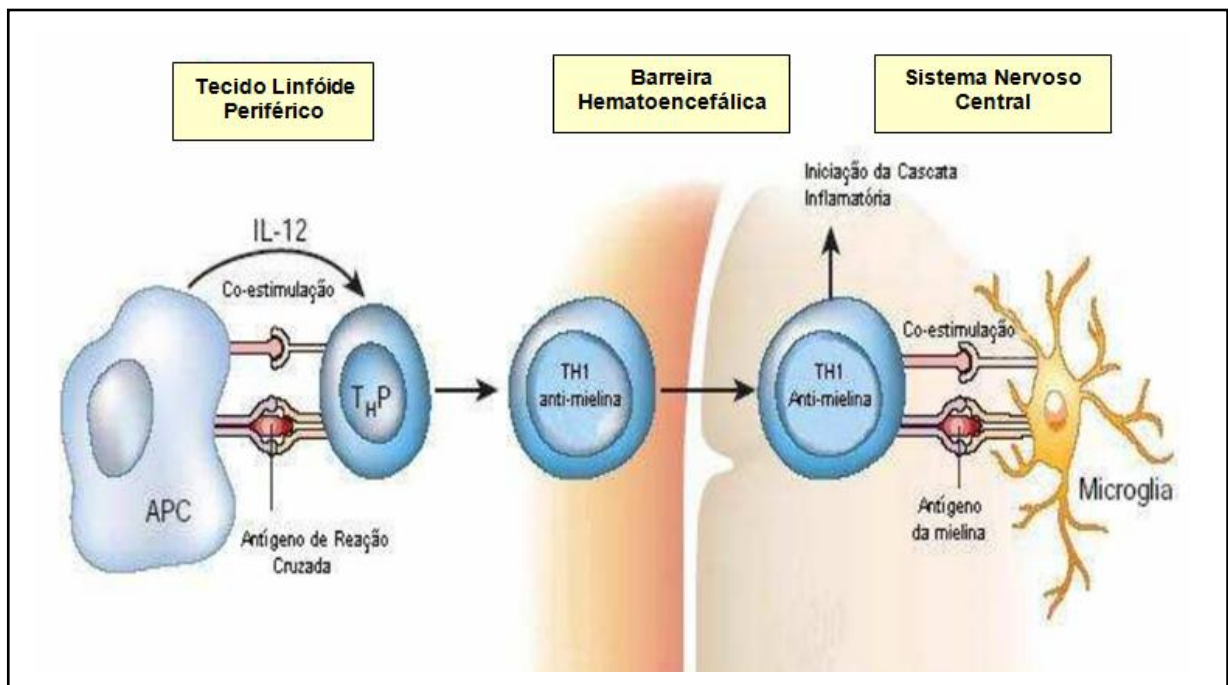
Fonte: adaptação de IVASHKIV; DONLIN, (2014).

A EM é caracterizada como doença autoimune, onde elementos do sistema imunológico principalmente Linfócitos T e macrófagos, atacam as proteínas da mielina levando à inflamação e desmielinização (FOX et al., 2006). É causada por uma interação de fatores genéticos e ambientais, prevalente em adultos jovens (20 a 30 anos), sendo duas vezes mais frequente em mulheres (SAWCER et al., 2014).

O processo de desmielinização ocorre quando células T precursoras (THP), são induzidas pela IL-12 à diferenciação em células TH1, reativas a mielina. As

células TH1 infiltram-se no sistema nervoso central (SNC) por meio da barreira hematoencefálica e reconhecem o antígeno específico unido às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) presentes nos astrócitos, ou células da micróglia. Assim, as células TH1 são novamente estimuladas para iniciar uma cascata inflamatória mediada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando a destruição da mielina (Figura 3) (WEINER; SELKOE, 2002; MOHR; PELLETIER, 2006; GRIGORIADIS; PESCH, 2015).

Figura 3 - Representação do processo de inflamação e mecanismos imunológicos na EM.

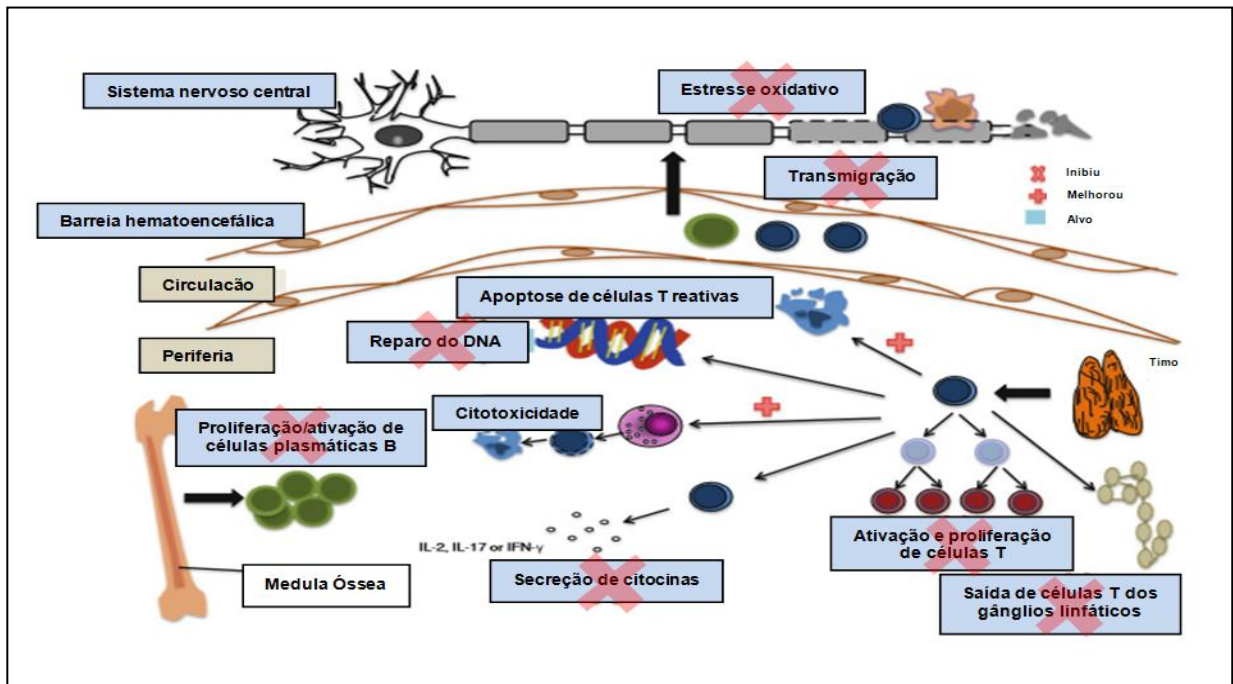


Fonte: adaptação de WEINER; SELKOE, (2002)

Embora o mecanismo de ação do rhIFN- β 1b na EM não esteja totalmente elucidado, sabe-se que suas propriedades alteram significativamente a progressão da doença. O rhIFN- β 1b diminui a expressão de MHC classe II pelas APC's (células apresentadoras de antígeno), inibe a ativação das células TH1, diminui a secreção de citocinas inflamatórias e reduz a permeabilidade da barreira hematoencefálica, conseqüentemente, há redução da penetração de leucócitos no SNC e diminuição do processo de desmielinização (Figura 4). Acredita-se que, somado a estas

características, o efeito terapêutico do biofármaco também esteja relacionado com a ativação das células T do tipo CD8, as quais se apresentam diminuídas na EM (JIANG et al., 1995; ANNIBALI et al., 2015).

Figura 4 – Representação da ação do IFN e IL na fisiopatologia da EM.



Fonte: adaptação de ALI, et al., (2013)

Jacobs e colaboradores (1986) realizaram estudo com 69 pacientes portadores de EM, para avaliar o efeito do IFN-β na terapia. Destes, 34 pacientes receberam as doses de IFN-β e 35 pacientes receberam o placebo. A redução média na taxa de exacerbação dos 34 pacientes que receberam IFN-β foi significativamente maior durante o estudo do que a de 35 pacientes que receberam o placebo. Observaram efeitos colaterais como dor de cabeça, náusea, mialgia e letargia.

Cheng e colaboradores (2014) investigaram através de ensaios *in vitro* e *in vivo* os efeitos do IFN-β na encefalomielite auto-imune experimental (EAE). Concluíram que, devido à propriedade de inibir o acúmulo de células T no SNC, o

IFN- β causou redução da expressão e atividade das quimiocinas, sugerindo seu uso para o tratamento ao longo do processo da EAE.

A atividade antiproliferativa dos interferons naturais α e β , foi comparada em 43 modelos de ensaios *in vitro*, com 25 linhagens humanas, incluindo as linhagens A-549 (ATCC:CCL-185) e Daudi (ATCC:CCL-213). Observaram efeitos variáveis de acordo com as linhagens, dando suporte à hipótese de que os interferons podem diferir em sua atividade biológica, regulação celular e efeitos clínicos. Em especial, o IFN- β demonstrou maior efeito antiproliferativo pelo aumento do tempo de incubação (BORDEN et al., 1982).

A avaliação de potência do IFN- β foi realizada por ensaios biológicos *in vitro*, baseados na inibição do efeito citopático das linhagens virais VSV e EMCV, sobre as linhagens celulares MDBK (ATCC:CCL-22) e WISH (ATCC:CCL-25), e determinação das respostas por leituras espectrofotométricas com corantes como MTT e azul de alamar (MEAGER et al., 2002).

Rao e colaboradores (2009), estudaram estratégias para o controle do processo de expressão em *E.coli*, fermentação e recuperação com pureza de 99%, do rhIFN- β 1b. Determinaram a qualidade por CL-FR com coluna ZORBAX 300SB C₁₈ (4,6 x 250 mm) sob fluxo de 0,5 mL/min e detecção a 214 nm, e por CL-EM com coluna TSK gel G 2000 SW (7,5 x 300 mm) e vazão de 0,5 mL/min. A atividade biológica foi avaliada pelo ensaio da atividade antiproliferativa em células A-549 e leitura dos resultados com brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

Bego e colaboradores (2012) desenvolveram bioensaio com a linhagem de célula modificada HEK293P (ATCC: CRL-1573) com ativação de promotor e expressão de marcadores enzimáticos como fosfatase alcalina aplicado para avaliação do IFN- β .

No estudo colaborativo do padrão glicosilado do rhINF β -1b foram realizados os bioensaios da atividade antiviral, antiproliferativa e da expressão gênica. Utilizaram as linhagens celulares e virais: A-549, Daudi, WISH, A-549/Mx-Luciferase e VSV, entre outras. Com base nos resultados obtidos em cada laboratório, foi estabelecido pela OMS o Padrão de Interferon Beta Ser 17 Mutein (Human rDNA derived - WHO 00/574), com a potência de 64.000 UI (MEAGER; DAS, 2005).

A estabilidade de longo prazo de formulação de hIFN- β foi avaliada por SDS-PAGE, CL-FR com coluna 214TP C₄ (250 x 4,6 mm d.i.) sob fluxo de 1,0 mL/min e

detecção a 214 nm, e pelo bioensaio da atividade antiviral. Demonstraram estabilidade das amostras armazenadas em temperaturas que variaram de -70°C a 4°C (GEIGERT et al., 1988).

Van Beers e colaboradores (2011) estudaram os efeitos da oxidação da estrutura e a imunogenicidade do IFN- β por CL-FR, CL-EM, e em camundongos transgênicos. No método por CL-FR foi utilizada coluna Jupiter C₄ (250 x 4.6 mm), fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 214 nm. Para CL-EM foi utilizada a coluna TSKgel Super SW2000 sob fluxo de 0,35 mL/min e detecção a 280 nm. Observaram que a agregação mediada pela oxidação aumentou significativamente a imunogenicidade causada pelo IFN- β .

Fazeli e colaboradores (2011) estudaram os efeitos da adição do agente oxidante ácido iodosobenzóico e a renaturação no processo de expressão e fermentação do rhIFN- β 1b. Realizaram análises por CL-FR com coluna C₄ (Vydac 214T P54) mantida a 31°C. Observaram que baixas concentrações de ácido iodosobenzóico causavam pequeno aumento na produção de proteínas relacionadas.

Os efeitos da arginina sobre a etapa de pré-núcleo da agregação do rhIFN- β 1b, foi avaliada por aquecimento, oxidação ou precipitação, com a finalidade de entender os mecanismos envolvidos, monitorando os resultados por técnicas analíticas. As formas oxidadas foram analisadas por CL-FR com coluna C₄ (Vydac 214T P54) e vazão de 1mL/min. Para CL-EM foi usada a coluna Waters ACQUITY BEH450 SEC (150 mm x 4.6 mm) sob fluxo de 0,25 mL/min com detecção no UV por fluorescência. Demonstraram o efeito anti-agregante da arginina nas etapas iniciais do processo (FAZELI et al., 2014).

A influência da agregação proteica do rhIFN- β 1b sobre a memória imunológica foi pesquisada usando camundongos C57B1/6, transgênicos e imuno-tolerantes. Os agregados foram analisados por técnicas de espectroscopia no UV e SDS-PAGE. O método por CL-EM foi executado com coluna TSKgel SUPER SW2000 e vazão de 0,35 mL/min. Os animais foram injetados durante 3 semanas e a formação de anticorpos monitorada por ELISA. Observou-se a formação de anticorpos em níveis diferentes, de acordo com o grupo de animais selecionado, porém mais acentuado para os camundongos não-transgênicos (VAN BEERS et al., 2010).

Formulação de rhINF β -1b sem albumina foi desenvolvida e caracterizada por técnicas de eletroforese, CL-FR e CL-EM, entre outras, as quais foram aplicadas para avaliar o efeitos dos excipientes sobre a estabilidade. O método por CL-FR foi executado com coluna Jupiter C₄ (250 x 4,6 mm d.i.) e vazão de 1mL/min com detecção a 214nm. O método por CL-EM foi executado com coluna Waters AQUITY BEH 450 SEC (150 x 4,6 mm) com vazão de 0,25 mL/min e detecção a 210 nm. Concluiu-se que a formulação reduziu riscos de infecção viral, apresentou baixo potencial imunogênico em camundongos transgênicos e seria promissora para uso clínico (ABDOVAHAB et al., 2016a).

A capacidade dos agregados de rhINF β -1b, produzidos por oxidação com cobre e estresse térmico, de induzir imunogenicidade em camundongos transgênicos foi avaliada por ELISA, CL-FR e CL-EM, entre outros métodos, conforme descrito no tópico superior. Concluíram que a imunogenicidade está relacionada às características biofísicas dos agregados, envolvendo tamanho e estrutura (ABDOVAHAB et al., 2016b).

A caracterização e quantificação de agregados em rhIFN β -1b foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e CL-EM com coluna G2000 SW_{XL} (7,8 mm x 300 mm), combinada com métodos de microscopia. Os resultados demonstraram que os agregados da proteína e o conteúdo de partículas, são atributos de qualidade que podem induzir resposta imune (BARNARD et al., 2013).

O IFN- β também foi estudado observando-se que a proteína peguillada conservava a atividade antiviral, aprimorando os parâmetros farmacocinéticos, sendo sugerida sua adoção como modelo para teste de doenças humanas (ARDUINI et al., 2004).

As proteínas requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com o sítio de ação. Por esta razão, é enfatizada a caracterização físico-química para demonstrar estruturas correspondentes às formas biologicamente ativas dos produtos biotecnológicos. A cromatografia Líquida (CL), destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como método específico, sensível, robusto e reprodutível, com custo e duração de análise adequada (QIAN et al., 2008; DALMORA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014). As técnicas por cromatografia CL-FR e por CL-EM, baseadas na hidrofobicidade e no tamanho das moléculas, respectivamente, são empregadas com freqüência no controle de

qualidade de proteínas. Possibilitam avaliar alterações físico-químicas e modificações pós-traducionais na estrutura da molécula, 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. Estas modificações podem reduzir a bioatividade do biofármaco e causar imunogenicidade e toxicidade (PARNHAM et al., 2007; FEKETE et al., 2014; PINEDA et al., 2016).

Os procedimentos e especificações adotados para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005; FDA, 2015; USP 39, 2016). Os principais parâmetros a serem avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. Desse modo esses demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ROZET et al., 2007; SHABIR et al., 2007).

Por sua vez, as estruturas tridimensionais complexas de alta massa molecular dos biofármacos e sua heterogeneidade dependem do processo de produção de células vivas fazem com que as biomoléculas sejam diferentes dos fármacos clássicos. Assim, os métodos analíticos usuais não conseguem caracterizar estas moléculas suficientemente para confirmar a sua equivalência estrutural com o fármaco de referência. Consequentemente tem sido usada a combinação de métodos que representam a tecnologia do estado-da-arte para a caracterização e estudos de comparabilidade. Os guias oficiais e parâmetros de especificação têm sido avaliados e atualizados com destaque para o impacto na segurança e eficácia terapêutica (FDA, 2015; WEISE et al., 2014).

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

Francielle Santos da Silva², Maurício Elesbão Walter², Bruna Xavier², Rafaela Ferreira Perobelli², Guilherme Zanini Calegari¹, Douglas Franco Cardoso¹, Valquíria Guedes Perlin¹ and Sérgio Luiz Dalmora¹.

Content/potency Assessment of Recombinant Human Interferon Beta 1b by *in vitro* bioassay and validated LC methods. Artigo submetido para publicação em 30/06/2017.

Content/potency Assessment of Recombinant Human Interferon β 1b by Bioassay and Validated LC Methods

Francielle Santos da Silva², Maurício Elesbão Walter², Bruna Xavier², Rafaela Ferreira Perobelli², Guilherme Zanini Calegari¹, Douglas Franco Cardoso¹, Valquíria Guedes Perlin¹ and Sérgio Luiz Dalmora¹.

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

ABSTRACT

Recombinant human interferon β 1b (rhIFN β -1b) is clinically used to treat multiple sclerosis. Liquid chromatography (LC) methods were validated for the assessment of rhIFN β -1b. The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d.). The mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, and the mobile phase B was acetonitrile with 0.1% TFA run at a flow rate of 1.0 mL/min. The size exclusion liquid chromatography (SE-LC) method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.). The mobile phase consisted of 1 mM monobasic potassium phosphate, 8 mM sodium phosphate dibasic and 200 mM sodium chloride buffer pH 7.4, run isocratically at a flow rate of 0.8 mL/min. Retention times were 31.87 and 17.78 min, and calibration curves were linear over the concentration range of 1-200 μ g/mL (0.032 – 6.4 MIU/mL) ($r^2 = 0.9998$) and 0.50-200 μ g/mL (0.016 – 6.4 MIU/mL) ($r^2 = 0.9999$), respectively, for RP-LC and SE-LC, with detection at 214 nm. LC methods were employed in conjunction with the *in vitro* bioassay for the content/potency assessment of rhIFN β -1b, contributing to improve the quality control and to ensure the efficacy of the biotherapeutic.

Keywords: Biotechnology-derived medicine / Recombinant human Interferon β 1b / *In vitro* bioassay / Reversed-Phase Liquid Chromatography / Size-exclusion Liquid Chromatography

1 Introduction

Interferons (IFNs) are natural proteins produced by the cells of the immune system with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties. Human interferon β (hIFN- β) is a hydrophobic glycoprotein that contains 166 amino acids produced by fibroblasts. Recombinant human interferon β 1b (rhIFN β -1b), it is engineered as a non-glycosylated protein in *Escherichia coli* (*E. coli*), to carry a serine residue instead of a cysteine at the amino acid position 17, and also lacks the methionine at the N-terminus. The substitution at position 17 was made to eliminate the free sulfhydryl of cysteine to obtain a product that is more stable upon storage. The polypeptide structure is composed of 165 amino acids with a molecular mass of 18.5 kDa. It is currently being used worldwide to treat multiple sclerosis (MS) (Mark and others 1984; Dendrou and others 2015).

The biological potency of rhIFN β -1b has been assessed by *in vitro* bioassays using a variety of cells/virus systems, also used in the collaborative study that established the 3rd international standard. An *in vitro* cytopathic bioassay based on the effect of the VSV virus cell line against the sensitive WISH cell line (ATCC number CCL-25) has been widely used, evaluating the responses as viable protected cells stained with vital dyes such as alamar blue or tetrazolium salts. The antiproliferative assays using Daudi cell line (ATCC number CCL-213) or A-549 cell line (ATCC number CCI-185) were applied to evaluate the potency of the biomolecule, measuring the responses with MTT. A genetically modified cell line with promoter activation and expression of enzyme markers such as alkaline phosphatase was also developed (Borden and others 1982; Meager 2002; Meager and Das 2005; Basu and others 2006).

Physicochemical techniques cannot yet predict the biological activity, but can produce information about structure and composition and are applied to monitor content, purity, identity and chemical stability of the biotechnology-derived products. A combination of physicochemical, immunological and biological methods has been successfully applied in correlation studies in attempts to find methods for characterization and to monitor the stability of different biotherapeutics (Qian and others 2008; Dalmora and others 2012; Almeida and others 2014; Cardoso and others 2017). Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC), offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants or degradation products which may have reduced activity. Moreover, size-exclusion liquid chromatography (SE-LC) has been performed for quantification and to determine the native size of the protein and to reveal possible dimmers and aggregates which have no or reduced activity, and altered immunogenicity (Fekete and others 2014; Pineda and others 2016). A gradient RP-LC method was used to evaluate the long-term stability of hIFN- β with 214TP C₄ column with detection at 214 nm (Geigert and others 1988). An RP-LC method was performed on a Jupiter C₄ column, and together with a SE-LC method on a SEC UPLC column, with UV and fluorescence detection, to evaluate the effect of the excipients on the stability of the formulation, and to characterize and quantitate aggregates in preparations of rhIFN β -1b, correlating the biophysical characteristics with immunogenicity (Abdolvahab and others 2016a; Abdolvahab and others 2016b). An RP-LC method using a C₄ column and a SE-LC using a SEC UPLC column were applied to monitor the mechanism of aggregation of IFN β -1b by heating, oxidizing, or seeding of unformulated monomeric solution (Fazeli and others

2014). The SE-LC using a TSK G2000S column was applied for the characterization and quantitation of aggregates, evaluating potential link with immune response (Barnard and others 2013). At the moment, rhIFN β -1b is not included in any Pharmacopoeia, but the biotherapeutic should meet the specifications and acceptance criteria for biotechnology-derived proteins (FDA, 2015; E.P 2017).

The aim of this research was to validate specific and stability-indicating RP-LC and SE-LC methods for the content/potency assessment of rhIFN β -1b in biopharmaceutical formulations; to correlate the results with the *in vitro* bioassay, and to evaluate the bioactivity and the cytotoxicity of the related proteins and higher molecular weight forms; thus contributing to the development of alternative methods to improve quality control, and thereby assure the therapeutic efficacy.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

The standard Interferon Beta Ser17 Mutein, human rDNA derived (BRS-IFN β -1b), WHO 00/574, for bioassay, was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC (Hertz, UK) with 64,000 IU per vial. Recombinant human biological reference substance of Interferon beta 1b (Rec-IFN β -1b), for physicochemical assays, was supplied by United States Biological (Swampscott, Massachusetts, USA) with 2 μ g/mL. A total of six batches of Betaferon[®] Bayer HealthCare (São Paulo, Brazil), containing 300 μ g/vial (9.600.000 IU/vial = 9.6 MIU/vial) of rhIFN β -1b, were labeled from 1 to 6. The samples were acquired from commercial sources within their shelf life period.

Monobasic potassium phosphate, sodium phosphate dibasic, sodium chloride, acetonitrile, trifluoroacetic acid (TFA), human serum albumin (HSA), mannitol were used as reagents or excipients and were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and alamarBlue™ cell viability reagent were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system from Millipore (Bedford, MA, USA). All solutions were degassed by ultrasonication Tecnal (São Paulo, Brazil) and filtered through a 0.22 µm Millex filter Millipore.

2.2 Apparatus

RP-LC and SE-LC analyses were carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, an LC-10 AD_{VP} pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD_{VP} autosampler, and an SPD-M10A_{VP} photodiode array (PDA) detector. Peak areas were automatically integrated in the computer by using a Shimadzu Class VP® V 6.14 software program. The absorbances of the *in vitro* cell culture bioassay were measured on a Varioskan Flash microplate reader Thermo Scientific® (Vantaa, Finland).

2.3 Samples and standard solutions

A commercial batch of Betaferon® with the label claim of 300 µg/vial equal to 9.6 MIU/vial, was calibrated against the BRS-IFNβ-1b and the Rec-IFNβ-1b, and used as an in-house biological reference substance of rhIFNβ-1b (BS-IFNβ-1b) for the LC methods. Stock solutions were prepared by diluting the BS-

IFN β -1b and samples of biopharmaceutical formulations in ultrapure water, to final concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ (1.6 MIU/mL) and 25 $\mu\text{g/mL}$ (0.8 MIU/mL), respectively for RP-LC and SE-LC; and to a range concentrations starting with 1000 IU/mL of BRS-IFN β -1b and of BS-IFN β -1b in culture medium DMEM containing 2% (v/v), fetal bovine serum, for the cell culture bioassay.

2.4 Procedures

2.4.1 Reversed-phase Liquid Chromatography (RP-LC)

The experiments were performed on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C₄ column (250 mm \times 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 μm and pore size of 300 \AA) maintained at 30°C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase A consisted of 0.1% TFA in water and mobile phase B was 0.1% TFA in acetonitrile, run as follows: time 0 to 0.01 min 38% of B; from 0.01 to 35 min linear up to 60% of B; from 35.1 to 38 min linear down to 38% of B maintained up to 42 min. The flow rate was 1 mL/min, with PDA detection at 214 nm. The injection volume was 50 μL .

2.4.2 Size-Exclusion Liquid Chromatography (SE-LC)

The experiments were accomplished on a size-exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm \times 7.8 mm i.d., with a particle size of 5 μm and pore size of 145 \AA) maintained at 25°C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 1 mM monobasic potassium phosphate, 8 mM sodium phosphate dibasic; 200 mM sodium chloride buffer, pH 7.4. The flow rate was 0.8 mL/min with PDA detection at 214 nm. The injection volume was 30 μL .

2.4.3 Antiproliferative assay

The bioassay was performed as described elsewhere (Basu and others 2006), adjusted. The A-549 cell line of human alveolar adenocarcinoma (ATCC number CCL-185) was maintained in DMEM culture medium supplemented with 10% (v/v) FBS in 75 cm² flasks. The cells were seeded in 96-well microplates BD Biosciences (San Jose, CA, USA) at a density of 1×10^4 cells/mL and dosed upon seeding with four concentrations (nine-fold dilution series) range starting with 1000 IU/mL of rhIFN β -1b. The BRS-IFN β -1b was used as standard, also to calibrate the BS-IFN β -1b, and the control was DMEM. Briefly, the plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 120 h. Then 20 μ L of alamarBlue was added per well, and the plates were incubated for a further 4 h. The response was calculated as the difference between the absorbances measured at 570 and 600 nm. The biological activity was calculated by the parallel line statistical method by using the CombiStatsTM software developed by the European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM) of the Council of Europe (Strasbourg, France).

2.3.4 *In vitro* Cytotoxicity Test

The assay was performed as described elsewhere (Maldaner and others 2017) based on the neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC clone 929 cell line of mammalian fibroblasts (ATCC number CCL-1) to the intact molecule, and altered samples of rhIFN β -1b. The pH of the samples was adjusted to 7.0. The BS-IFN β -1b was used as standard and the control was DMEM. The NRU assay was performed on the 96-well microplates maintained at 37°C in a CO₂ incubator for 24 h, with a cell suspension density of

approximately 3.5×10^5 cells/mL. The neutral red released was evaluated by the addition of extractant solution, and the absorbance was measured at 540 nm.

2.5 Validation of LC methods

Validation of both RP-LC and SE-LC methods was performed by using samples of biopharmaceutical formulation with a label claim of 300 µg/vial (9.6 MIU/vial). Specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness and system suitability test, were assessed following the guidelines (ICH, 2005; FDA, 2015).

2.5.1 Specificity

The specificity of the RP-LC method was assessed by subjecting a BS-IFNβ-1b solution and a sample of the biopharmaceutical formulation (300 µg/mL) to a photodegradation exposing the sample to 200 Wh/m² near-UV light in a photostability chamber for 24 h. Also, the oxidative condition induced by hydrogen peroxide 3% for 3 h was studied. Then, the solutions were diluted with ultrapure water to a final concentrations of 50 µg/mL. For the SE-LC, a BS-IFNβ-1b solution and a sample of biopharmaceutical formulation (300 µg/mL) were subjected to a neutral hydrolysis (60°C for 2h) and shaken for 30 min. Solutions were then diluted with ultrapure water to the final concentrations of 25 µg/mL. In addition, possible interference from excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by analyzing a sample that contained placebo (in-house mixture of formulation excipients) only. The

specificity of the LC methods was established by determining the peaks purity with a PDA detector.

2.5.2 Linearity

The linearity of the RP-LC and SE-LC methods was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight concentrations of the BS-IFN β -1b solution, over the 1-200 μ g/mL (0.032 – 6.4 MIU/mL) and 0.50-200 μ g/mL (0.016 – 6.4 MIU/mL) range, respectively. Three replicate of 50 μ L and 30 μ L injections of the reference solutions were prepared to verify the repeatability of the detector response. The peak areas were plotted against the respective concentrations of BS-IFN β -1b solution to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate the calibration equation and the determination coefficient.

2.5.3 Precision and accuracy

Precision was determined by means of repeatability (intra-day) and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of a sample of rhIFN β -1b, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the methods was assessed by analysis of two samples of the biopharmaceutical formulations on three different days (inter-days) and also by submitting the samples to analysis by other analysts in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was assessed by applying the proposed methods to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the biomolecules, to obtain solutions at concentrations of 40, 50 and

60 µg/mL for the RP-LC, and 20, 25 and 30 µg/mL for the SE-LC methods, equivalent to 80, 100 and 120% of the working concentration solutions, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation; it was expressed as the percentage relative error (bias%).

2.5.4 Limits of detection and quantitation

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

2.5.5 Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected in the robustness by small and deliberate variations in method parameters; it provides an indication of its reliability for routine analysis. The robustness of the RP-LC and SE-LC methods was determined by analyzing the same samples containing 50 µg/mL and 25 µg/mL, respectively, under one-variable-at-a-time (OVAT) conditions: mobile phase concentration (mM), mobile phase pH, flow rate (mL/min) and wavelength (nm). To assess the stability of the rhIFNβ-1b samples, analysis was performed after their storage at 2-8°C for 24 and 48h, and also placed into the auto sampler, at room temperature, for 24 h. To study the stability of these solutions, the experiment was run and any

changes in the chromatographic pattern as compared with the freshly prepared solutions were recorded.

2.5.6 System Suitability Test

A system suitability test was also carried out to evaluate the symmetry and repeatability of both the RP-LC and SE-LC methods. Five replicate injections of 50 µg/mL and 25 µg/mL BS-rhIFNβ-1b, were used. The peak area, retention time, theoretical plates, and tailing factor (peak symmetry) were measured using CLASS-VP® V 6.12 software.

2.6 Analysis of rhIFNβ-1b in biopharmaceutical formulations

For the quantitation of rhIFNβ-1b, commercial biopharmaceutical samples available for clinical use, with the potency claimed expressed in µg/mL and MIU/mL, were identified in comparison with the Rec-IFNβ-1b. For the RP-LC and SE-LC methods, the respective solutions were diluted to appropriate concentration of 50 e 25 µg/mL in ultrapure water, injected in triplicate, and the percentage recoveries calculated against the BS-IFNβ-1b.

3 Results and discussion

3.1 Development and optimization of chromatographic conditions

For the RP-LC method, tests were carried out to determine which mobile phase would lead to satisfactory selectivity and sensitivity within a short separation time. TFA in water and TFA in acetonitrile resulted in higher sensitivity related to phosphate buffer and lower retention time compared to sodium phosphate buffer. Resolution was improved, using as mobile phase containing 0.1% TFA in

water and 0.1% TFA in acetonitrile. For the SE-LC method, 1 mM monobasic potassium phosphate, 8 mM sodium phosphate dibasic buffer and 200 mM sodium chloride resulted in higher sensitivity compared to phosphate buffer and phosphate buffered saline. Optimum wavelength was selected using a PDA detector. The optimized conditions for the LC methods were used to obtain the typical chromatograms, demonstrating the resolution of the symmetrical peaks corresponding to rhIFN β -1b with retention times of 31.87 min, and 17.78, respectively, as shown in Figs. 1 (a,b) and 2 (a,b).

3.2 Methods validation

Specificity of the RP-LC method for the biological product was evaluated under oxidative conditions and photodegradation generating the main peak at 31.87, and additional peaks of related proteins with retention times at 27.74 and 28.62 min (Fig. 1c), and 27.44 and 30.07 min (Fig. 1d) respectively. Specificity of the SE-LC method was evaluated by degradation under neutral hydrolysis. The results indicated that, beside the main peak of the monomer detected at 17.78 min, and additional peaks, high molecular weight (HMW), with retention times at 16.58 and 17.69 min (Fig. 2c). Moreover, the injection of a sample containing only the in-house mixture of the formulation excipients showed only one peak of HSA with a retention time at 9.78 min. Then, the specificity of RP-LC and SE-LC methods was established by determining the purity of the rhIFN β -1b with a PDA detector. The studies showed that the peaks of rhIFN β -1b in the BS-IFN β -1b and in the samples peaks were free of any co-eluting peak, with the peak purity index higher than 0.9999-1, thus demonstrating that

the proposed methods are specific for the analysis of rhIFN β -1b in biopharmaceutical formulations.

The linearity was determined for the RP-LC method by constructing the analytical curves for rhIFN β -1b, that were linear over the range of 1-200 μ g/mL (0.032 – 6.4 MIU/mL). The value of the determination coefficient was calculated as $r^2 = 0.9998$, $y = (31936 \pm 919.76) x - (11051 \pm 8647.04)$, where x is concentration and y is the peak absolute area, indicating the linearity of the analytical curve for the method. Equally, for the SE-LC method, the analytical curves were found to be linear over the range of 0.50-200 μ g/mL (0.016 – 6.4 MIU/mL). The value of the determination coefficient was calculated as $r^2 = 0.9999$, $y = (231645 \pm 165037.74) x - (2182 \pm 1001.77)$, indicating the linearity of the analytical curve for the method.

The precision of the RP-LC and SE-LC methods was studied by calculating the relative standard deviation (RSD %) for six analyses at a concentration of 50 μ g/mL and 25 μ g/mL, respectively, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD values were 0.10% and 0.04%. To assess the intermediate precision two samples were analyzed on three different days (inter-days), giving RSD values of 0.40 and 0.71%, respectively for the RP-LC and 0.83 and 0.94%, for the SE-LC methods. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD after analysis of two samples by three analysts; the mean values were found to be 0.57 and 1.19%, respectively, for the RP-LC and 0.25 and 0.35%, for the SE-LC methods.

The accuracy of the RP-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 40, 50 and 60 μ g/mL. In addition,

the accuracy of the SE-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 20, 25 and 30 µg/mL, respectively. The absolute means were obtained with a mean value of 100.42 and 100.45% and a bias lower than 0.69 and 0.82% (Table 1), respectively, showing that the methods are accurate within the desired ranges.

The LOD and LOQ of the LC methods 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 0.47 and 1.57 µg/mL, for the RP-LC and 0.10 and 0.34 µg/mL, for the SE-LC. The evaluated experimental LOQ with a precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$ (Shabir and others 2007) was found to be 1 µg/mL (0.032 MIU/mL) and 0.50 µg/mL (0.016 MIU/mL), respectively, suitable for the quality control analysis of biopharmaceutical formulations.

The results and the experimental range of the selected variables evaluated in the robustness by OVAT approach are given in Tables 2 and 3, together with the optimized values, demonstrating that they are within the acceptable deviation ($RSD \leq 2\%$), with non-significant differences ($p > 0.05$), as calculated by analysis of the variance. The stability of sample solutions was assessed, and data showed the stability for 24 h in autosampler and for 48 h when maintained at 2-8°C.

A system suitability tests was performed and RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.01, 0.40 and 1.96%, respectively for the RP-LC and 0.04, 0.28 and 0.22%, for the SE-LC methods. The number of theoretical plates was about 107554, with a RSD of 0.81% and

9579, with a RSD of 0.88%, respectively. The parameters tested were within an acceptable range (RSD < 2%).

3.3 Application of the methods

The validated LC methods were applied to the determination of rhIFN β -1b in biopharmaceutical formulations, giving the content/potencies shown in Table 4, with mean values 1.61% and 1.05% higher for the RP-LC and SE-LC, respectively, compared to the *in vitro* bioassay, with significant correlation ($p < 0.05$). In addition, samples subjected to photodegradation, oxidative degradation and neutral hydrolysis were evaluated by the same methods, showing significant effects ($p < 0.05$) on the content/potencies (Table 4), which demonstrated their capacity and application, also to support biosimilarity studies of the biomolecule (Kálmán-Szekeres and others 2012). Biopharmaceutical samples artificially degraded, as described under the specificity tests were analyzed by the LC methods, and subjected to the *in vitro* bioassay, showing for the sulphoxides/deamidated and higher molecular weight forms, bioactivities reduced by $6.50\% \pm 3.40$ ($n=3$) and $44.30\% \pm 2.15$ ($n=3$) respectively, excluding the oxidative condition due to the possible interference of H₂O₂. The results show the capability of each method, and that the combination may represent an improvement, in attempts to develop alternative assays.

3.4 Cytotoxicity Evaluation

The cytotoxicity test was performed on the degraded forms giving mean IC₅₀ = 8.68 ± 0.71 MIU/mL, IC₅₀ = 12.17 ± 0.20 MIU/mL, for photolytic and neutral hydrolysis conditions, respectively. Differences calculated by the Student's *t*-test

($p < 0.05$) were significant as compared to the intact molecule, which gave IC_{50} of 6.89 ± 0.13 MIU/mL. Such evaluations are now necessary, mainly due to the recent concerns about possible human undesirable effects resulting from the instability of the samples during storage (Singh and others 2015).

4 Conclusions

The results of the validation studies show that RP-LC and SE-LC methods are specific, accurate, and sensitive with mean values of the estimated content/potency 1.61 and 1.05% higher, compared to those of the *in vitro* bioassay, respectively. The LC methods represent an improvement that can be applied in combination with the bioassay, during the biotechnology process, to monitor the stability, improve quality control, and to assure the batch-to-batch consistency of the bulk and finished biotechnology-derived medicine.

5 Acknowledgments

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

6 References

Abdolvahab MH, Fazeli A, Halim A , Sediq AS, Fazeli MR, Schellekens H. 2016a. Immunogenicity of Recombinant Human Interferon Beta-1b in Immune-Tolerant Transgenic Mice Corresponds with the Biophysical Characteristics of Aggregates. *J. Interferon Cytokine Res* 36(4):1-11.

Abdolvahab MH, Fazeli A, Radmalekshahi M, Nejadnik MR, Fazeli MR, Schellekens H. 2016b. An Albumin-Free Formulation for *Escherichia coli*-Derived Interferon Beta-1b with Decreased Immunogenicity in Immune Tolerant Mice. *J. Interferon Cytokine Res* 36(3):192-203.

Almeida BE, Damiani R, Oliveira JE, Dalmora SL, Torjesen PA, Bartolini P, Ribela MTCP. 2014. Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. *Anal. Methods* 6:6688-6694.

Barnard JG, Babcock K, Carpenter JF. 2013. Characterization and Quantitation of Aggregates and Particles in Interferon- β Products: Potential Links Between Product Quality Attributes and Immunogenicity. *J. Pharm. Sci* 102(3):915-928.

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

Borden EC, Hogan TF, Voelkel JG. 1982. Comparative Antiproliferative Activity in Vitro of Natural Interferons α and β for Diploid and Transformed Human Cells. *Cancer Res* 42:4948-4953.

Cardoso CDA, Perobelli RF, Xavier B, Maldaner FPS, da Silva FS, Dalmora SL. 2017. Analysis of streptokinase by validated liquid chromatography methods and correlation with an in vitro bioassay. *J Sep Sci* 40:407-414.

Dalmora SL, dos Santos BC, Machado FT, Walter ME, Dalmora MEA, Souto RB. 2012. 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* 94:1-7.

Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. 2015. Immunopathology of Multiple Sclerosis. *Nat Rev Chem* 15:545-558.

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

Fazeli, A, Abdolvahab MH, Shojaosadati SA, Schellekens H, Khalifeh K, Moosavi-Movahedi AA, Fazeli MR. 2014. Effect of Arginine on Pre-nucleus Stage of Interferon Beta-1b Aggregation. *AAPS PharmSciTech* 15(6):1619-1629.

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

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

Geigert J, Panschar BM, Fong S, Huston HN, Wong DE, Wong DY, Taforo C, Pemberton M. 1988. The Long-Term Stability of Recombinant (Serine-17) Human Interferon- β . *J. Interferon Cytokine Res* 8:539-547.

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.

Kálmán-Szekeres Z, Olajos M, Ganzler K. 2012. Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs. *J Pharm Biomed Anal* 69:185-195.

Maldaner FPS, Perobelli RF, Xavier B, Remuzzi GL, Walter ME, Dalmora SL. 2017. Evaluation of recombinant human parathyroid hormone by CZE method and its correlation with in vitro bioassay and LC methods. *Talanta* 162:567-573.

Mark DF, Lu SD, Creasey AA, Yamamoto R, Lin LS. 1984. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81:5662-5666.

Meager A. 2002. Biological assays for interferons. *J. Immunol. Methods* 261:21-36.

Meager A, Das RG. 2005. Biological standardization of human interferon beta: Establishment of a replacement world health organization international biological standard for human glycosylated interferon beta. *J. Immunol. Methods* 306:1-15.

Pineda C, Hernández GC, Jacobs IA, Alvarez DF, Carini C. 2016. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. *BioDrugs* 30:195-206.

Qian J, Tang Q, Cronin B, Markovich R, Rustum A. 2008. Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of Human Serum Albumin in a lyophilized formulation of Interferon alfa-2b. *J. Chromatogr. A* 1194:48-56.

Shabir GA, Lough WJ, Arain SA, Bradshaw TK. 2007. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 30:311333.

Singh DK, Sahu A, Handa T, Narayanem M, Singh S. 2015. Study os the forced degradation behavior of prasugrel hydrochloride by liquid chromatography with mass spectrometry and liquid chromatography with NMR detection and prediction of the toxicity of the characterized degradation products. *J. Sep. Sci* 38:2995-3005.

TABLE 1. Accuracy of RP-LC and SE-LC for rhIFN β -1b in biopharmaceutical formulations

Method	Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean concentration measured ^a ($\mu\text{g/mL}$)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
RP-LC	40	40.00	0.03	99.99	-0.01
	50	50.30	0.85	100.59	0.59
	60	60.41	0.50	100.69	0.69
SE-LC	20	20.16	0.08	100.80	0.82
	25	25.04	0.06	100.16	0.16
	30	30.12	0.19	100.40	0.40

^aMean of three replicates. ^bRSD = Relative standard deviation. ^cBias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] \times 100.

TABLE 2. Chromatographic conditions and range investigated during robustness test for the RP-LC method

Variable	Range investigated	rhIFN β -1b ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
TFA (%)	0.05	98.97	1.08	0.10
	0.10	100.16	0.94	
	0.15	99.13	1.24	
Temperature (°C)	28	99.35	0.23	30
	30	100.16	0.04	
	32	99.35	0.36	
Flow rate (mL/min)	0.9	99.79	0.19	1.0
	1.0	99.39	0.14	
	1.1	99.31	0.28	
Solution stability	Autosampler 24 h	100.47	0.56	–
	2-8 °C 24 h	100.05	0.16	–
	2-8 °C 48 h	100.68	0.83	–
Wavelength (nm)	190 – 320	–	–	214

^aMean of three replicates. ^bRSD = Relative standard deviation.

TABLE 3. Chromatographic conditions and range investigated during robustness test for the SELC method

Variable	Range investigated	rhIFN β -1b ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
Mobile phase pH	7.0	99.27	1.33	7.4
	7.4	99.30	0.60	
	7.8	100.55	1.21	
Monobasic Potassium Phosphate (mM)	0.9	99.25	1.20	1.0
	1.0	99.59	0.78	
	1.1	100.03	0.85	
Sodium Phosphate Dibasic (mM)	7.5	99.56	0.89	8.0
	8.0	100.33	0.78	
	8.5	98.24	0.84	
Sodium Chloride(mM)	180	99.86	0.94	200
	200	100.10	0.54	
	220	100.22	1.09	
Flow rate (mL/min)	0.7	99.95	0.90	0.8
	0.8	99.99	0.78	
	0.9	99.94	0.89	
Solution stability	Autosampler 24 h	99.46	1.06	–
	2-8 °C 24 h	99.35	0.59	–
	2-8 °C 48 h	99.45	0.91	–
Wavelength (nm)	190 – 320	–	–	214

^aMean of three replicates. ^bRSD = Relative standard deviation.

TABLE 4. Comparative content/potency evaluation of rhIFN β -1b in biopharmaceutical formulations by the bioassay and the LC methods

Sample	Theoretical Amount (μ g)	Bioassay ^a		RP-LC ^a		SE-LC ^a	
		Potency (%)	Confidence intervals (P = 0.95)	Main peak (%)	Deamidated/sulfoxides (%)	Monomer (%)	HMW (%)
1	300	99.70	(94.20 – 105.60)	102.83	0.81	100.58	0.68
2	300	100.20	(94.20 – 106.70)	100.41	0.59	100.12	0.49
3	300	98.80	(92.90 – 105.00)	100.31	0.46	100.98	0.39
4	300	102.40	(96.90 – 108.10)	104.05	0.36	103.90	0.47
5	300	98.70	(93.30 – 104.50)	99.87	0.78	99.16	0.89
6	300	95.60	(90.20 – 101.30)	97.57	0.99	96.96	0.84
Mean	–	99.23	–	100.84	0.73	100.28	0.68
SD ^b	–	2.22	–	2.29	–	2.27	–
2 ^c	–	93.70	(85.60 – 102.50)	89.34	7.36	–	–
2 ^d	–	55.90	(50.80 – 61.60)	–	–	65.40	11.36
2 ^e	–	Nt ^f	–	72.08	25.47	–	–

^aMean of three replicates. ^bSD = Relative standard deviation. Content of altered samples: ^cUVdegraded. ^dNeutral hydrolysis. ^eOxidative condition. ^fNt = Not tested.

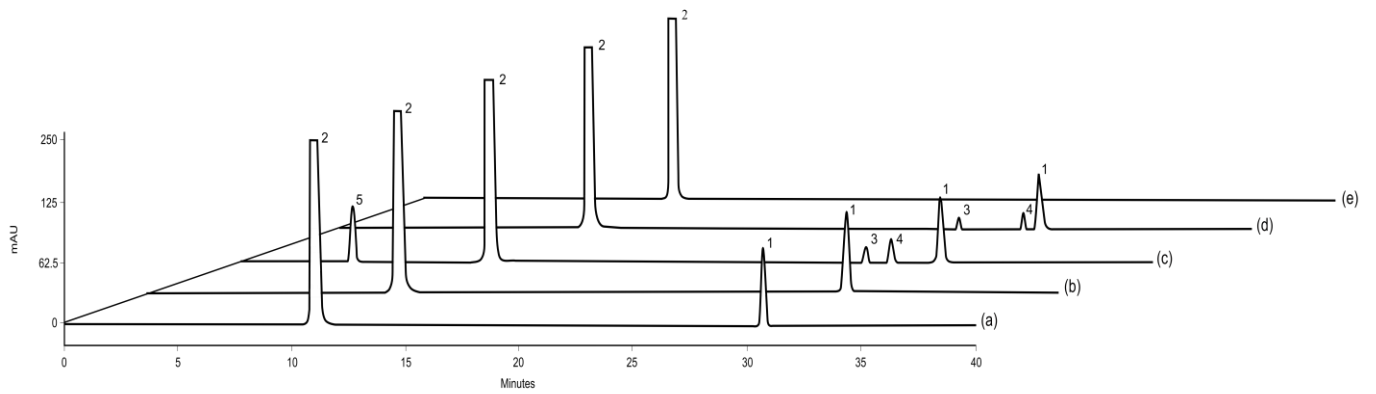


Fig. 1 Representative RP-LC chromatograms showing: peak 1 = rhIFN β -1b; peak 2 = albumin; peaks 3 and 4 = related proteins; peak 5 = hydrogen peroxide. (a) Biological reference substance of BS-IFN β -1b. (b) Sample of biopharmaceutical formulation; and after: (c) degradation by hydrogen peroxide; (d) photodegradation; (e) placebo.

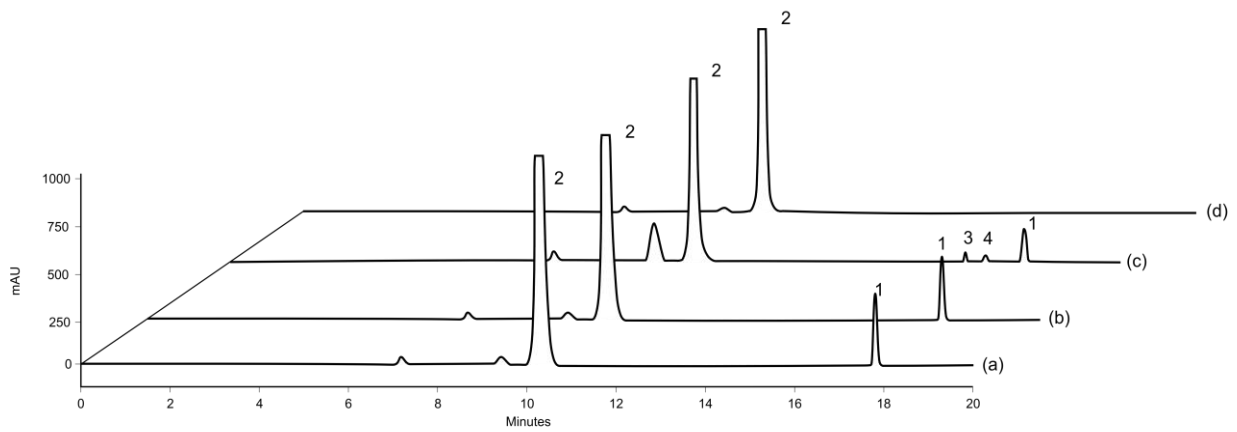


Fig. 2 Representative SE-LC chromatograms showing: peak 1 = rhIFN β -1b; peak 2 = albumin; peaks 3 and 4 = high molecular weight. (a) Biological reference substance of BS-IFN β -1b. (b) Sample of biopharmaceutical formulation; and after: (c) neutral hydrolysis; (d) placebo.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

O domínio das técnicas de engenharia genética viabilizou avanços na expressão e produção de proteínas de interesse terapêutico em larga escala, entre as quais se destaca o rhIFN β -1b não glicosilado, que apresenta atividade biológica comparada ao hormônio natural glicosilado. A não glicosilação contribui para aumentar a estabilidade da molécula. Nesse contexto, é importante desenvolver métodos para a avaliação de identidade, pureza, potência e estabilidade, que tem sido realizada pela combinação de técnicas biológicas, físico-químicas e imunológicas, para a completa caracterização do produto biotecnológico de uso clínico.

Os ensaios biológicos expressam a atividade biológica e sua execução é essencial para a avaliação da potência de biomoléculas, para as quais em geral não se dispõem de metodologias analíticas para o controle de qualidade. Especialmente para o rhIFN β -1b, a potência biológica tem sido determinada por bioensaios *in vitro*, entre os quais atualmente destaca-se o ensaio da atividade antiproliferativa com a linhagem de células A-549 otimizado e adotado no presente trabalho, com base em observações prévias da literatura (BORDEN et al., 1982).

Por sua vez, os métodos cromatográficos têm sido usados para diferentes produtos biológicos recombinantes nas etapas de expressão, purificação, análise qualitativa, quantitativa, e para estudos de correlação com os bioensaios *in vitro*. Desse modo, optou-se por pesquisar e validar procedimentos por cromatografia líquida em fase reversa e por exclusão molecular para a determinação de rhIFN β -1b, suas proteínas relacionadas e formas de alta massa molecular em produtos biofarmacêuticos.

Observa-se que não se dispõe de Padrão Internacional para métodos físico-químicos. Deste modo, optou-se por utilizar lote comercial de rhIFN β -1b com potência expressa em 300 μ g/frasco (9.600.000 UI/frasco = 9.6 MUI/frasco), que foi submetido ao bioensaio em relação ao Padrão de Interferon Beta Ser 17 Mutein (Human rDNA derived - WHO 00/574), para confirmar a potência declarada. O lote foi então usado para as análises por cromatografia líquida expressando os resultados em microgramas.

No método por CL-FR, a separação foi alcançada com tempo de corrida de 31,87 min (Figura 1). Os picos adicionais relativos aos desamidados e sulfóxidos, foram obtidos por tratamento de amostras sob condições oxidativas e análise dos excipientes da formulação, confirmando a especificidade do método. A pureza dos picos do rhIFN β -1b foi avaliada com detecção de arranjo de diodos (DAD), que forneceu valores ($> 0,9999$), comprovando a ausência de substâncias interferentes e a especificidade do método. O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 1 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (0,032 - 6,4 MUI/mL) ($r^2=0,9998$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV inferiores a 0,10%, o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza $CV \leq 2\%$ (SHABIR, 2003). Na tabela 1 podem ser observados também os valores experimentais obtidos, com média de 100,42%, confirmando exatidão significativa. Além disso, foi executado o teste de robustez que forneceu as potências descritas na tabela 2, com diferenças não-significativas nas condições analisadas, comprovando a robustez do método proposto. Por sua vez, os dados da verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostram que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, pois os valores de CV% foram inferiores a 2% (ICH, 2005; USP 39, 2016).

O método por CL-EM também foi estudado e propiciou a separação com tempo de retenção, de aproximadamente, 17,78 min (Figura 2). A geração de picos adicionais, atribuídos provavelmente a proteínas de alto peso molecular, foi realizada sob condições de aquecimento e agitação, bem como, análise de amostra preparada somente com os excipientes da formulação, que confirmaram a especificidade do método. A pureza dos picos do rhIFN β -1b foi demonstrada pela análise com detector de arranjo de diodos (DAD), que forneceu valores ($> 0,9999$), comprovando assim a especificidade do método. O método por CL-EM apresentou também regressão linear significativa na faixa de 0,50 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (0,016 - 6,4 MUI/mL) ($r^2=0,9999$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV inferiores a 0,04%, demonstrando a precisão do método. Na tabela 1 podem ser observados os valores experimentais obtidos, com média de 100,45%, confirmando exatidão significativa. Por sua vez, no teste de robustez, as potências obtidas não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, de acordo com a tabela 3. Além disso, os dados da

verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições dos métodos são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, pois os valores de CV% foram inferiores a 2% (ICH, 2005; USP 39, 2016).

Demonstrou-se, portanto, que os métodos propostos forneceram parâmetros que cumprem os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregados para análise de rhIFN β -1b em produtos biofarmacêuticos.

Estudou-se então, a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e o bioensaio em células A-549 com as amostras selecionadas, conforme demonstrado na tabela 4. Observou-se que os teores/potências por CL-FR e por CL-EM foram em média 1,61% e 1,05% superiores, em relação ao bioensaio da cultura de células, respectivamente, com diferença não significativa, conforme calculado pelo teste t de Student ($p > 0,05$).

Realizou-se também análises por CL-FR para determinar proteínas relacionadas, se presentes nas amostras, e proteínas de alta massa molecular por CL-EM, respectivamente. Calcularam-se os resultados pela soma das áreas dos picos com tempo de retenção menor que o principal, em relação à área total. Os valores foram expressos em percentagem com valor máximo encontrado de 0,73% para desamidados/sulfóxidos e 0,68% para proteínas de alta massa molecular. Observa-se que geralmente as farmacopéias preconizam limite máximo de 12% para os desamidados/sulfóxidos, e de 6% para os compostos de alta massa molecular nas amostras de proteínas recombinantes, porém os dados aqui demonstrados constituem-se em contribuição para o estabelecimento destes limites, ainda não preconizados para o rhIFN β -1b (BP, 2015; USP 39, 2016).

Acrescenta-se que amostras de produtos biofarmacêuticos foram submetidas à condições de degradação forçada, analisadas por CL-FR e por CL-EM, respectivamente, e avaliadas pelo bioensaio *in vitro*. Os resultados obtidos para desamidados/sulfóxidos e compostos de alta massa molecular demonstram, respectivamente, diminuição significativa da atividade biológica de $6,50\% \pm 3,40$ ($n=3$) e $44,30\% \pm 2,15$ ($n=3$), em relação à forma intacta do rhIFN β -1b, conforme calculado pelo teste t de Student ($p < 0,05$). Convém observar que os resultados do bioensaio foram comparáveis aos obtidos com os métodos físico-químicos.

Os produtos biotecnológicos podem apresentar degradações devido à sua estabilidade durante as etapas do processo de produção, transporte e/ou

armazenamento, razão pela qual se avaliou também a citotoxicidade *in vitro*. As amostras foram analisadas por CL-FR e CL-EM, estabelecendo-se o teor de degradação de cada forma, conforme descrito na especificidade. As amostras foram então preparadas nesta condição e o ensaio realizado comparativamente com a molécula íntegra. Os resultados obtidos apresentam médias de $IC_{50} = 8,68 \pm 0,71$ MUI/mL e $IC_{50} = 12,17 \pm 0,20$ MUI/mL, respectivamente, para proteínas relacionadas e proteínas de alta massa molecular, com diferenças significativas em relação à forma intacta do rhIFN β -1b que apresentou $IC_{50} = 6,89 \pm 0,13$ MUI/mL, conforme calculado pelo teste t de Student ($p < 0,05$). Observa-se que as degradações não aumentaram a citotoxicidade da molécula.

Até o presente momento, o rhIFN β -1b não está descrito em nenhuma farmacopéia. Além disso, não há métodos cromatográficos validados publicados, o que é necessário no contexto da produção e caracterização de produtos biológicos recombinantes. Sugere-se, então, que os métodos por CL-FR e CL-EM sejam adotados em combinação com o bioensaio da atividade antiproliferativa, para avaliação de potência/teor do rhIFN β -1b, com intuito de estabelecer métodos alternativos. Além disso, os procedimentos aqui estudados podem ser usados durante as etapas do processo de expressão e purificação, para monitorar variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica (KAISER et al., 1997).

Os resultados alcançados contribuem para aprimorar o controle da qualidade através da melhor caracterização da biomolécula, garantindo sua eficácia terapêutica e segurança. Além disso, estabelece tecnologias analíticas e bases para sucessivos estudos de comparabilidade do biofármaco.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa específico, preciso, exato e robusto para avaliação do interferon β 1b humano recombinante, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação, avaliação de proteínas relacionadas e da forma não-alterada.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular específico, preciso, exato e robusto que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para avaliação do interferon β 1b humano recombinante, e de suas proteínas de alta massa molecular.
- ✓ Estudou-se a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e o bioensaio da atividade antiproliferativa em células A-549, para as amostras selecionadas. Observou-se que os teores/potências por CL-FR e por CL-EM foram em média 1,61% e 1,05% superiores, em relação ao bioensaio, respectivamente.
- ✓ Demonstrou-se que as formas degradadas ou agregadas, identificadas pelos métodos cromatográficos, apresentam atividade biológica reduzida.
- ✓ Sugere-se a aplicação dos métodos cromatográficos para avaliação do interferon β 1b humano recombinante, em combinação com o bioensaio, pois representa contribuição para aprimorar a caracterização do produto biotecnológico, viabilizando a determinação de proteínas relacionadas e das formas de alta massa molecular.
- ✓ 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, em especial do interferon β 1b humano recombinante, disponíveis ou em pesquisa no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLVAHAB, M. H.; FAZELI, A.; RADMALEKSHAHI, M.; NEJADNIK, M. R.; FAZELI, M. R.; SCHELLEKENS, H. An Albumin-Free Formulation for Escherichia coli-Derived Interferon Beta-1b with Decreased Immunogenicity in Immune Tolerant Mice. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 3, n. 36, p. 192-203, 2016a.

ABDOLVAHAB, M. H.; FAZELI, A.; HALIM, A.; SEDIQ, A. S.; FAZELI, M. R.; SCHELLEKENS, H. J. Immunogenicity of Recombinant Human Interferon Beta-1b in Immune-Tolerant Transgenic Mice Corresponds with the Biophysical Characteristics of Aggregates. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 4, n. 36, p. 1-11, 2016b.

ALI, R.; NICHOLAS, R. S. J.; MURARO, P.A. Drugs in Development for Relapsing Multiple Sclerosis. **Drugs**, v. 73, n. 7, p. 625-50, 2013.

ALMEIDA, B. E.; DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J. E.; DALMORA, S. L.; TORJESEN, P. A.; BARTOLINIA, 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.

ANNIBALI, V.; MECHELLI, R.; ROMANO, S.; BUSCARINU, M. C.; FORNASIERO, A.; UMETON, R.; RICIGLIANO, V. A. G.; ORZI, F.; COCCIA, E. M.; SALVETTI, M.; RISTORI, G. IFN- β and multiple sclerosis: From etiology to therapy and back. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, p. 221–228, 2015.

ARDUINI, R. M.; STRAUCH, K. L.; RUNKEL, L. A.; CARLSON, M. M.; HRONOWSKI, X.; FOLEY, S. F.; YOUNG, C. N.; CHENG, W.; HOCHMAN, P. S.; BAKER, D. P. Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon- β and its receptor chains. **Protein Science**, v. 8, p. 1867–1877, 1999.

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

BARNARD, J. G.; BABCOCK, K.; CARPENTER, J. F. Characterization and Quantitation of Aggregates and Particles in Interferon- β Products: Potential Links Between Product Quality Attributes and Immunogenicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 102, p. 915-928, 2013.

BASU, A.; YANG, K.; WANG, M.; LIU, S.; CHINTALA, R.; PALM, T.; ZHAO, H.; PENG, P.; WU, D.; ZHANG, Z.; HUA, J.; HSIEH, M. C.; ZHOU, J.; PETTI, G.; LI, X.; JANJUA, A.; MENDEZ, M.; LIU, J.; LONGLEY, C.; ZHANG, Z.; MEHLIG, M.; BOROWSKI, V.; VISWANATHAN, M.; FILPULA, D. Structure-Function Engineering of Interferon- β for Improving Stability, Solubility, Potency, Immunogenicity, and

Pharmacokinetic Properties by Site-Selective Mono-PEGylation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 17, p. 618-630, 2006.

BEGO, M. G.; MERCIER, J.; COHENA, E. A. Virus-Activated Interferon Regulatory Factor 7 Upregulates Expression of the Interferon-Regulated BST2 Gene Independently of Interferon Signaling. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3513-3527, 2012.

BETAFERON: Interferon beta 1b. São Paulo: Bayer Schering Pharma, 2016. Bula de remédio.

BORDEN, E. C.; HOGAN, T. F.; VOELKEL, J. G. Comparative Antiproliferative Activity in Vitro of Natural Interferons α and β for Diploid and Transformed Human Cells. **Cancer research**, v. 42, p. 4948-4953, 1982.

BRITISH Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2015.

CARDOSO, C. D. A.; PEROBELLI, R. F.; XAVIER, B.; MALDANER, F. P. S.; SILVA, F. S.; DALMORA, S. L. Analysis of streptokinase by validated liquid chromatography methods and correlation with an in vitro bioassay. **Journal of Separation Science**, v. 40, p. 407-414, 2017.

CHENG, W.; ZHAO, Q.; XI, Y.; LI, C.; XU, Y.; WANG, L.; NIU, X.; WANG, Z.; CHEN, G. IFN- β inhibits T cells accumulation in the central nervous system by reducing the expression and activity of chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Molecular Immunology**, v. 64, p. 152-162, 2014.

DALMORA, S. L.; BUTZGE, C. B.; 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, p.1-7, 2012.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of Multiple Sclerosis. **Nature Reviews Chemistry**, v. 15, p. 545-558, 2015.

EINARSON, T. R.; BEREZA, B. G.; MACHADO, M. Comparative effectiveness of interferons in relapsing-remitting multiple sclerosis: a meta-analysis of real-world studies. **Current Medical Research and Opinion**, v. 33, p. 579-593, 2017.

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

FAZELI, A.; SHOJAOSADATI, S. A.; FAZELI, M. R.; ILKA, H. Effect of parallel feeding of oxidizing agent and protein on fed-batch refolding process of recombinant interferon beta-1b. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 796-800, 2011.

FAZELI, A.; ABDOLVAHAB, M. H.; SHOJAOSADATI, S. A.; SCHELLEKENS, H.; KHALIFEH, K.; MOVAHEDI, A. A.; FAZELI, M. R. Effect of Arginine on Pre-nucleus Stage of Interferon Beta-1b Aggregation. **The AAPS Journal**, v. 15, p. 1619-1629, 2014.

FDA.Guidance for industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. 2015.

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.

FOSTER, W.; LI, Y.; USAS, A.; SOMOGYI, G.; HUARD, J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. **Journal of Orthopaedic Research**,v. 21, n. 5, p. 798–804, 2003.

FOX, R. J.; BETHOUX, F.; GOLDMAN, M. D.; COHEN, J. A. Multiple sclerosis advances in understanding diagnosing and treating the underlying disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.73, n. 1, p. 91-102, 2006.

GEIGERT, J.; PANSCHAR, B. M.; FONG, S.; HUSTON, H. N.; WONG, D. E.; WONG, D. Y.; TAFORO, C.; PEMBERTON, M. The Long-Term Stability of Recombinant (Serine-17) Human Interferon- β . **Journal of Interferon & Cytokine Research** , v. 8, p. 539-547, 1988.

GOODKIN, D. E. Interferon beta-1b. **The Lancet**, v. 344, p. 1057-1060, 1994.

GRIGORIADIS, N.; PESCH, V. V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. **European Journal of Neurology**, v. 22, n. 2, p. 3-13, 2015.

HERMANT, P.; MICHIELS, T. Interferon- λ in the Context of Viral Infections: Production, Response and Therapeutic Implications. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, p. 563–574, 2014.

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.

INGWERSEN, J.; AKTAS, O.; HARTUNG, H-P. Advances in and Algorithms for the Treatment of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **Neurotherapeutics**, v. 13, p. 47-57, 2016.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J. Virus interference: I. The interferon. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, **Biological Sciences**, v. 147, p. 258-267, 1957.

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nature**, v. 14, p. 36-49, 2014.

JACOBS, L.; HERNDON, R.; FREEMAN, A.; CUETTER, A.; SMITH, W. A.; SALAZAR, A. M.; REESE, P. A.; JOSEFOWICZ, R.; HUSAIN, F.; EKES, R.; O'MALLEY, J. Multicentre Double-Blind Study of Effect of Intrathecally Administered Natural Human Fibroblast Interferon on Exacerbations of Multiple Sclerosis. **The Lancet**, v. 328, p. 8521–8522, 1986.

JAVED, A.; REDER, A. T. Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis. **Pharmacology & Therapeutics**, p. 110, v. 1, p. 35-56, 2006.

JIANG, H. J.; MILO, R.; SWOVELAND, P.; JOHNSON, K. P.; PANITCH, H.; DHIB-JALBUT, S. Interferon P-Ib reduces interferon γ -induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 61, p. 17-25, 1995.

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

KARPUSAS, M.; NOLTE, M.; BENTON, C. B.; MEIER, W.; LIPSCOMB, W. N.; GOELZ, S. The crystal structure of human interferon b at 2.2-Å resolution. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 11813–11818, 1997.

MARK, D. F.; LU, S. D.; CREASEY, A. A.; YAMAMOTO, R.; LIN, L. S. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 5662-5666, 1984.

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

MEAGER, A.; DAS, R. G. Biological standardization of human interferon beta: Establishment of a replacement world health organization international biological standard for human glycosylated interferon beta. **Journal of Immunological Methods**, v. 306, p. 1-15, 2005.

MOHR, D. C.; PELLETIER, D. A temporal framework for understanding the effects of stressful life events on inflammation in patients with multiple sclerosis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 20, n. 1, p. 27-36, 2006.

MURARO, P. A.; LEIST, T.; BIELEKOVA, B.; McFARLAND, H. F. VLA-4/CD49d downregulated on primed T lymphocytes during interferon- β therapy in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 111, p. 186-194, 2000.

PARNHAM, M.J.; SCHINDLER-HORVAT, J.; KOZLOVIC, M. Non-Clinical safety studies on biosimilar recombinant human erythropoietin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 100, p. 73-83, 2007.

PESTKA, S. The Human Interferons-From Protein Purification and Sequence to Cloning and Expression in Bacteria: Before, Between, and Beyond. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 221, n. 1, p. 1-37, 1983.

PINEDA, C.; HERNÁNDEZ, G. C.; JACOBS, I. A.; ALVAREZ, D. F.; CARINI, C. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. **BioDrugs**, v. 30, p. 195-206, 2016.

QIAN, J.; TANG, Q.; CRONIN, B.; MARKOVICH, R.; RUSTUMA, A. Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of Human Serum Albumin in a lyophilized formulation of Interferon alfa-2b. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, p. 48–56, 2008.

RAO, D. V. K.; RAMU, C. T.; RAO, J. V.; NARASU, M. L.; RAO, A. K. S. B. Cloning, High Expression and Purification of Recombinant Human Interferon- β -1b in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 158, p. 140-154, 2009.

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.

RUNKEL, L.; MEIER, W.; PEPINSKY, R.B.; KARPUSAS, M.; WHITTY, A.; KIMBALL, K.; BRICKELMAIER, M.; MULDOWNY, C.; JONES, W.; GOELZ, S. E. Structural and Functional Differences Between Glycosylated and Non-glycosylated Forms of Human Interferon- β (IFN- β). **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 641-664, 1998.

SAWCER, S., FRANKLIN, R.J., BAN, M. Multiple sclerosis genetics. **The Lancet Neurology**. 13,700–709, 2014.

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. J.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311333, 2007.

SILVA, L. M.; SOUTO, R. B.; SANGOI, M. S.; ALCORTE, M. D.; DALMORA, S. L. Validation of na RP-LC Method for the Determination of Interferon- α 2a in Pharmaceutical Formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, p. 370-382, 2009.

SÎRBU, C. A.; DRĂGOI, C. M.; NICOLAE, A. C.; PLEȘA, C. F. History of Interferon Treatments in Multiple sclerosis – 60 years of progress. **FARMACIA**, v. 65, n. 1, p. 14-18, 2017.

TAKAOKA, A.; YANAI, H. Interferon signalling network in innate defence. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 907-922, 2006.

USP, The United States Pharmacopeia, 39 ed., Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2016.

VAN BEERS, M. M. C.; SAUERBORN, M.; GILLI, F.; BRINKS, V.; SCHELLEKENS, H.; JILSKOOT, W. Aggregated Recombinant Human Interferon Beta

Induces Antibodies but No Memory in Immune-Tolerant Transgenic Mice. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 1812-1824, 2010.

VAN BEERS, M. M. C.; SAUERBORN, M.; GILLI, F.; BRINKS, V.; SCHELLEKENS, H.; JILSKOOT, W. Oxidized and aggregated recombinant human interferon beta is immunogenic in human interferon beta transgenic mice. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 1-10, 2011.

WALSH, G. Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology, 2^a ed., Ireland: Wiley; 2004.

WEERD, N. A.; SAMARAJIWA, S. A.; HERTZOG, P. J. Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20053-20057, 2007.

WEINER, H. L.; SELKOE, D. J. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. **Nature**, v. 420, p. 879-884, 2002.

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