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

Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel

## ESTUDO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICO PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL RECOMBINANTE DENOSUMABE

Santa Maria, RS 2021

## **Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel**

## ESTUDO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICO PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL RECOMBINANTE DENOSUMABE

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Dumoncel, Rafaela Estudo de Métodos Físico-Químicos e Biológico para Caracterização e Avaliação do Anticorpo Monoclonal Recombinante Denosumabe / Rafaela Dumoncel.- 2021. 95 p.; 30 cm

Orientador: Sérgio Luiz Dalmora Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. Denosumabe 2. Anticorpo Monoclonal 3. Eletroforese Capilar 4. Cultura de Células RAW 264,7 5. Cromatografia Líquida I. Dalmora, Sérgio Luiz II. Título.

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

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

#### Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel

## ESTUDO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICO PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL RECOMBINANTE DENOSUMABE

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

Aprovada em 21 de outubro de 2021:

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

Carine Diana

Carine Viana Silva, Dra. (UFSM)

-Kisione Bajeshi

Lisiane Bajerski, Dra. (UNIPAMPA)

Maximiliano da Silva Sangoi, Dr. (UFRJ)

Rosmari Horner, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS 2021

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Leda e Mauro, com amor, dedico mais este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida, saúde e sabedoria para concluir este trabalho.

- aos meus pais, Mauro e Leda, por não medirem esforços para concretização dos meus objetivos.
- ao meu esposo, Luiz Augusto, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.
- ao meu orientador, Professor Sérgio, pela oportunidade, amizade e orientação;
- ao meu irmão, Julio, pela companhia durante grande parte desta trajetória;
- aos demais familiares e amigos, pelo incentivo;
- aos colegas do Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaios Farmacêuticos (CTEFAR), pelo auxílio, apoio e trabalho em equipe.
- aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos e colaboração;
- à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por viabilizar a execução deste trabalho;
- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Tecnologia e Ciência (FATEC), pelo apoio financeiro;

Por último, mas não menos importante, a todos aqueles que de alguma outra maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho.

"Para avançar, fique firme sob qualquer circunstância." Bertie Charles Forbes

#### **RESUMO**

## ESTUDO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICO PARA CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL RECOMBINANTE DENOSUMABE

## AUTORA: Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

O denosumabe (DmAb) é um anticorpo monoclonal (mAb) que inibe a proliferação e atividade de células osteoclásticas e encontra-se disponível comercialmente no Brasil como Prolia<sup>®</sup> e Xgeva<sup>®</sup>, para tratamento de doencas ósseas. Estruturalmente, apresenta duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, com massa molecular de 147 kDa. A região região do fragmento cristalizável (Fc) das cadeias pesadas apresenta sítios de N-glicosilação, onde se ligam estruturas com resíduos de ácido siálico. Neste trabalho, desenvolveu-se e validou-se método por eletroforese capilar de zona (ECZ) para a avaliação de DmAb e suas variantes de carga em produtos biofarmacêuticos. Foi utilizado capilar de sílica fundida não revestido (50 µm d.i., 56 cm) e solução eletrolítica composta de tampão ácido épsilon-aminocaproico (EACA) 300 mmol/L e trietilenotetramina (TETA) 2 mmol/L, pH 4,8, adicionado de Tween 20 0,03% (v/v). As amostras de DmAb foram analisadas na concentração de 5 mg/mL, adicionadas de padrão interno. Paralelamente, determinou-se o conteúdo de ácidos siálicos da biomolécula de DmAb por cromatografia líquida em fase reversa com detecção por fluorescência (CL-FR-F), utilizando coluna C18 Kinetex<sup>®</sup> EVO (5 μm d.i., 100 Å, 250 mm × 4,6 mm). Os resíduos de ácidos siálicos foram liberados da molécula de DmAb por reação com bissulfito de sódio 0,5 mol/L (80 °C, 20 min), seguida de derivatização com ortofenilenodiamina (OPD) 40 mg/mL (80 °C, 40 min). Além disso, o bioensaio in vitro foi validado utilizando células de macrófagos RAW 264,7 (ATCC<sup>®</sup> TIB-71<sup>TM</sup>) que se diferenciaram em osteoclastos. A potência do DmAb foi avaliada pela capacidade de inibir a formação osteoclástica induzida in vitro. A separação eletroforética foi obtida com tempo de migração de 18,1 min para o DmAb. O método por ECZ demonstrou-se específico, exato (101,61%) e robusto e foi então aplicado em conjunto com métodos por cromatografia líquida por exclusão molecular e em fase reversa (CL-EM e CL-FR), previamente validados, e com o bioensaio in vitro, para quantificação de DmAb em sete lotes de Prolia<sup>®</sup>, fornecendo valores médios de teores/potências entre 98,44% e 101,52%. Estes resultados foram comparados, demonstrando correlação significativa (r > 0.98). Os métodos analíticos também permitiram monitorar a presença de variantes de carga, proteínas de alta massa molecular e fragmentos de DmAb. No método por CL-FR-F, foram separados três picos cromatográficos referentes aos ácidos siálicos da biomolécula de DmAb, com tempos de retenção de 9,2, 10,9, e 12,0 min. Os produtos biofarmacêuticos Prolia<sup>®</sup> e Xgeva<sup>®</sup> apresentaram 0,16 e 0,17 µg ácidos siálicos/mg DmAb, respectivamente. Por fim, após estudos de validação, o bioensaio in vitro demonstrou-se específico, exato (102,33%) e robusto para avaliação de potência de DmAb e foi aplicado em conjunto com método por CL-EM para quantificação de DmAb em de seis lotes de Prolia®, fornecendo valores médios de teores/potências de 100,80% e 100,87%, respectivamente. Sendo assim, sugere-se que os métodos analíticos e o bioensaio in vitro sejam aplicados em conjunto para análise dos produtos biotecnológicos de DmAb, estabelecendo uma ferramenta analítica que assegurará a qualidade dos produtos e que servirá de base para futuros estudos de biossimilaridade de DmAb.

**Palavras-chave:** Denosumabe. Anticorpo Monoclonal. Eletroforese Capilar. Cultura de Células RAW 264,7. Cromatografia Líquida.

#### ABSTRACT

## STUDY OF PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL METHODS FOR THE CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF MONOCLONAL ANTIBODY DENOSUMAB

## AUTHOR: Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel ADVISER: Sérgio Luiz Dalmora

Denosumab (DmAb) is monoclonal antibody (mAb) that inhibits proliferation and activity of osteoclasts cells, that is commercially available in Brazil as Prolia® and Xgeva®, for treatment of bone diseases. Structurally, it is composed of two heavy chains and two light chains, having a molecular mass of 147 kDa. Fragment crystallizable (Fc) region of heavy chains contain N-glycosylation sites, where are linked structures with sialic acid residues. In this study, a capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed and validated to quantitate DmAb and its charge variants in biopharmaceutical products. Uncoated fused-silica capillaries (50 µm i.d., 56 cm effective length) were employed, and the background electrolyte (BGE) solution was a 300 mmol/L epsilon-aminocaproic acid (EACA) and 2 mmol/L triethylenetetramine (TETA) buffer at pH 4.8 and 0.03% (v/v) Tween 20. DmAb samples were analyzed at a concentration of 5 mg/mL, spiked with the internal standard. Equally, the sialic acids levels of DmAb were determined by an reversed-phase liquid chromatography method with fluorescence detection (RP-HPLC–F), with a Kinetex<sup>®</sup> EVO C18 column (5  $\mu$ m i.d., 100 Å, 250 mm × 4.6 mm). The sialic acids were released from DmAb biomolecules in a 0.5 mol/L sodium bisulfate solution (80 °C, 20 min), followed by derivatization reaction with the 40 mg/mL O-phenylenediamine (OPD) reagent (80 °C, 40 min). Besides, the in vitro bioassay was validated using RAW 264.7 macrophage cells (ATCC<sup>®</sup> TIB-71<sup>TM</sup>) that differentiated into osteoclasts. The DmAb potency were evaluated by its capacity of inhibits osteoclast cells proliferation induced in vitro. The CZE separation was obtained with a migration time approximately 11.3 min for DmAb. The CZE method demonstrated to be specific, accurate (101.61%) and robust, and were applied in conjunction with the size exclusion and reversed-phase liquid chromatographic (SE-HPLC and RP-HPLC) methods, previously validated, and with in vitro bioassay to quantitate DmAb in seven batches of Prolia<sup>®</sup>, giving mean values of content/potencies between 98.44% and 101.52%. These results were compared, demonstrating significant correlation (r > 0.98). The analytical methods enabled also to monitor charge variants, high-molecular-weight (HMW) proteins and fragments from DmAb. The RP-HPLC-F method showed three separated peaks related to sialic acids of the DmAb biomolecule, with retention times of 9.2, 10.9, e 12.0 min. Pharmaceutical products Prolia® and Xgeva® showed 0.16 and 0.17 µg sialic acids/mg DmAb, respectively. Finally, after validation studies, the in vitro bioassay demonstrated to be specific, accurate (102.33%) and robust to evaluation of DmAb potency and were applied in conjunction with the SE-HPLC method to quantitate DmAb in six batches of Prolia<sup>®</sup>, giving mean values of content/potencies of 100.80% e 100.87%, respectively. Therefore, it is suggested that the analytical methods and the *in vitro* bioassay can be applied in conjunction to analyze DmAb biotechnology-derived products, establishing analytical tools that will assure the quality of the products and basis for future studies of biosimilarity of DmAb.

Keywords: Denosumab. Monoclonal Antibody. Capillary Electrophoresis. RAW 264.7 Cells Culture. Liquid Chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Figura 1 –	Representação da estrutura do DmAb.	25
Figura 2 –	Ilustração do mecanismo de ação do DmAb	26

## **ARTIGO 1**

Figure 1 –	Capillary zone electrophoresis (CZE) electropherograms showing peaks 1 =
	aprotinin (APT); peaks 2 = basic variants; peak 3 = denosumab (DmAb);
	peaks 4 = acid variants. (a) Representative DmAb biological reference
	substance (BS-DmAb). (b) Pharmaceutical product. BS-DmAb following
	degradation under conditions of: (c) low pH, (d) high pH, (e) thermal, (f)
	photo and (g) oxidation. (h) Placebo. (i) Purified water 57
Figure 2 –	Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions

- investigated during robustness testing for the determination of DmAb by CZE method.
  Figure 3 Reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (RP–HPLC–F) chromatograms showing peaks 1, 2 and 3 = sialic

## **ARTIGO 2**

## LISTA DE TABELAS

## **ARTIGO 1**

Table 1 –	Variables selected as factors and levels investigated during the robustness	
	testing using the multi-variable-at-a-time (MVAT) procedure with the	
	capillary zone electrophoresis (CZE) method	53
Table 2 –	Accuracy and precision of CZE method for determining denosumab (DmAb)	
	in pharmaceutical products	54
Table 3 –	Analysis of DmAb in pharmaceutical products by CZE, size exclusion high- performance liquid chromatography (SE-HPLC) and reversed-phase high- performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods and bioassay	55
	•	

# ARTIGO 2

Table 1 –	Accuracy and precision of bioassay for determining denosumab (DmAb) in	
	pharmaceutical products	73
Table 2 –	Robustness of osteoclast antiproliferative bioassay for determining	
	denosumab (DmAb) in pharmaceutical products	74
Table 3 –	Analysis of DmAb in pharmaceutical products by bioassay and size-	
	exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) method	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	Aprotinina
BS–DmAb	Substância Biológica de Referência do DmAb
СНО	Ovário de hamster chinês
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-FR-F	Cromatografia líquida em fase reversa com detecção por fluorescência
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas no modo tandem
DAD	Detector de arranjo de diodos
d.i.	Diâmetro interno
DmAb	Denosumabe
DMO	Densidade mineral óssea
EACA	Ácido épsilon-aminocaproico
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
ECZ	Eletroforese capilar de zona
ELISA	Enzimaimunoensaio
EM-ESI-TOF	Espectrometria de massas por ionização por eletrospray com analisador do
	tipo tempo de voo
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
hPTH	Hormônio da paratireoide humano
IgG2	Imunoglobulina G Subclasse 2
kDa	Quilo Dalton
mAbs	Anticorpos monoclonais
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MEKC	Cromatografia eletrocinética capilar micellar
mg	Miligrama
mĹ	Mililitro
mm	Milímetro
NANA	Ácido N-acetilneuamínico
OPD	Ortofenilenodiamina
OPG	Osteoprotegerina
r	Coeficiente de correlação de Pearson
$r^2$	Coeficiente de determinação
RANK	Receptor do fator nuclear kappa β
RANKL	Ligante do receptor do fator nuclear kappa $\beta$
TETA	Trietilenotetramina
TFA	Ácido trifluoroacético
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	COMPOSIÇÃO ÓSSEA E CÉLULAS ESPECIALIZADAS	20
3.2	REMODELAÇÃO ÓSSEA	20
3.3	DOENÇAS OSTEOMETABÓLICAS	21
3.3.1	Osteoporose	22
3.3.2	Metástases ósseas	23
3.4	ANTICORPO MONOCLONAL DENOSUMABE	23
3.4.1	Estrutura, propriedades físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas	24
3.4.2	Ensaios biológicos e métodos físico-químicos para o Denosumabe	27
3.4.3	Tecnologias analíticas e bioensaios para caracterização de anticorpos	
	monoclonais	29
4	ARTIGO 1	34
5	ARTIGO 2	61
6	DISCUSSÃO	80
6.1	ARTIGO 1	81
6.1 6.2	ARTIGO 1 ARTIGO 2	81 82
6.1 6.2 <b>7</b>	ARTIGO 1 ARTIGO 2 CONCLUSÃO	81 82 86

## APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado apresenta-se de acordo com as orientações do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) do ano de 2015. O estudo compreende o desenvolvimento e validação de métodos físico-químicos por eletroforese capilar de zona (ECZ) e cromatografia líquida (CL) para a quantificação do anticorpo monoclonal Denosumabe (DmAb) em formulações biofarmacêuticas, bem como a validação de ensaio por cultura de células *in vitro* para avaliação da atividade biológica. Os resultados obtidos geraram dois artigos científicos, um dos quais (Artigo 1) já foi submetido para publicação e está sob revisão. As seções MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO encontram-se nos ARTIGOS CIENTÍFICOS, que apresentam na íntegra as pesquisas realizadas. As REFERÊNCIAS referem-se somente às citações nas seções INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO da Tese de Doutorado, pois as referências utilizadas para a elaboração dos artigos estão mencionadas nos mesmos.

INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são biofármacos recombinantes e constituem uma classe de produtos com destaque no mercado farmacêutico, pois viabilizam terapias com ação em alvos específicos. O uso terapêutico de mAbs representa inovação para a indústria biotecnológica pois esses produtos têm ampliado os tratamentos de doenças cancerígenas, ósseas e autoimunes que já não respondiam aos tratamentos convencionais. Além disso, estão entre as opções sob estudo até o momento para tratamento da COVID-19 (LAI; DONG, 2015; TAYLOR et al., 2021; THOMAS et al., 2016; WATIER; REICHERT, 2017; WINZER et al., 2016).

O denosumabe (DmAb) é um anticorpo monoclonal produzido pela tecnologia do DNA recombinante em linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO), que foi desenvolvido especificamente para ligar-se ao ligante do receptor do fator nuclear kappa  $\beta$  (RANKL) humano. É uma glicoproteína construída de 1326 aminoácidos e massa molecular de 147 kDa. O DmAb encontra-se disponível comercialmente no Brasil como Prolia<sup>®</sup> e Xgeva<sup>®</sup>, os quais são utilizados principalmente para o tratamento da osteoporose pósmenopáusica e da metástase óssea de tumores sólidos, respectivamente. O mecanismo de ação está direcionado a inibir a formação, função e sobrevivência das células osteoclásticas (FAIENZA et al., 2018; HANLEY et al., 2012; SINGH et al., 2015).

A estrutura dos mAbs é mais complexa quando comparada às substâncias químicas dos produtos farmacêuticos convencionais e para que estes possam interagir com o sítio de ação alvo, requerem alto grau de especificidade estrutural. Por esta razão, os guias internacionais e as farmacopeias ressaltam, nos métodos analíticos gerais, a necessidade da completa caracterização destas biomoléculas, através da combinação de métodos físico-químicos, imunológicos e ensaios biológicos (EP, 2021; USP 43, 2021).

Os métodos analíticos devem assegurar a avaliação das propriedades físico-químicas dos mAbs, bem como a quantificação, presença de formas alteradas e a determinação da pureza e de resíduos de ácidos siálicos. Alterações de qualidade nas biomoléculas podem afetar a conformação proteica, direcionamento, reconhecimento e ligação ao sítio alvo. Podem também ter impactos na estabilidade, atividade biológica e imunogenicidade e comprometer a segurança e eficácia terapêutica, inviabilizando o uso clínico. Tecnologias analíticas como a eletroforese capilar de zona (ECZ), a cromatografia líquida por exclusão molecular (CL–EM) e a cromatografia líquida em fase reversa (CL–FR) possibilitam quantificar os mAbs e monitorar seus agregados e formas relacionadas. Ainda assim, a combinação com os ensaios

biológicos *in vitro*, que avaliam a atividade biológica, é importante para uma análise completa dos atributos de qualidade (EMA, 2016).

As farmacopeias descrevem os métodos analíticos gerais necessários para controle de qualidade dos biofármacos. Especialmente sobre o DmAb, até o presente momento, não existe monografia e são poucas as publicações sobre procedimentos analíticos. Por sua vez, as empresas detentoras da patente de registro são também detentoras dos processos de produção e das metodologias analíticas para controle da qualidade lote a lote de seus produtos. O desenvolvimento de métodos analíticos específicos para os mAbs e os estudos de validação são necessários para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade das análises, possibilitando a aplicação no controle de qualidade do biofármaco. O uso de métodos eficientes e validados é fundamental para assegurar que os lotes sucessivos de produção apresentem qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos, durante o processo de registro (FDA, 2015; ICH, 2005).

O DmAb, objeto deste estudo, encontra-se em uso clínico, e o registro de sua patente está previsto para expirar no ano de 2022 em países da União Europeia e 2025 nos Estados Unidos, o que tornará possível o estudo de biossimilares (BUSSE; LÜFTNER, 2019). Considerando a efetividade na melhora dos resultados de saúde e a extensão de usos clínicos desde que o DmAb foi registrado, é provável um movimento crescente em torno dos biossimilares da biomolécula. Neste contexto, o estudo de métodos para avaliar sua identidade, pureza, teor/potência e estabilidade representa inovação científica e tecnológica para a área biofarmacêutica, uma vez que contribuirá para o desenvolvimento de ferramentas analíticas necessárias para assegurar a qualidade destes produtos, garantindo sua eficácia e segurança clínica. No contexto atual, é oportuno acrescentar que o presente estudo servirá de base para viabilizar futuros estudos de comparabilidade do produto biotecnológico.

**OBJETIVOS** 

## **2 OBJETIVOS**

#### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar métodos físico-químicos e biológicos para caracterização, identificação, avaliação de teor/potência e pureza do anticorpo monoclonal DmAb, demonstrando os atributos de qualidade, que garantem a segurança e eficácia clínica.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e validar método por eletroforese capilar de zona (ECZ) com detecção por detector de arranjo de diodos (DAD) para identificação, quantificação e determinação de variantes de carga de DmAb em produtos biofarmacêuticos.
- b) Estudar e aplicar método por cromatografia líquida em fase reversa com detecção por fluorescência (CL-FR-F) para determinar o conteúdo de ácidos siálicos em produtos biofarmacêuticos de DmAb.
- c) Estudar e validar bioensaio por cultura de linhagem de células de macrófagos RAW
  264,7 *in vitro* para avaliação de potência de DmAb e suas formas modificadas.
- d) Otimizar e executar método previamente validado por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) com detecção por detector de arranjo de diodos (DAD) para identificação e quantificação do monômero e proteínas de alta massa molecular de DmAb em produtos biofarmacêuticos.
- e) Otimizar e executar método previamente validado por cromatografia líquida em fase reversa (CL–FR) com detecção por detector de arranjo de diodos (DAD) para identificação e quantificação da forma não alterada e fragmentos de DmAb em produtos biofarmacêuticos.
- f) Executar os métodos em conjunto, para análise de produtos biofarmacêuticos e avaliar correlação de resultados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Esta seção aborda o embasamento teórico utilizado para a sustentação do presente estudo, no que diz respeito a estrutura e composição do tecido ósseo, doenças ósseas e seus tratamentos, com foco no uso clínico do anticorpo monoclonal DmAb. Além disso, explora sua estrutura química, propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, bem como as técnicas e métodos analíticos para seu controle de qualidade. Por fim, descreve as metodologias analíticas gerais que têm sido empregadas para caracterização de produtos biofarmacêuticos que contém mAbs.

## 3.1 COMPOSIÇÃO ÓSSEA E CÉLULAS ESPECIALIZADAS

Os ossos são formados por tecido conjuntivo rígido e resistente. O esqueleto adulto é composto por dois tipos de ossos: trabecular (20%) e cortical (80%). O osso trabecular fornece suprimento inicial nos estados de deficiência mineral, enquanto o osso cortical fornece força mecânica e proteção, podendo participar de respostas metabólicas quando ocorre déficit mineral (WALSH, 2017). A matriz óssea é composta por frações inorgânica e orgânica. A fração orgânica é formada por colágeno do tipo I e proteoglicanos e a inorgânica por cristal de fosfato de cálcio (hidroxiapatita). O colágeno fornece força flexível à matriz, enquanto os componentes minerais (íons cálcio e fosfato) dão resistência (VANPUTTE et al., 2016).

As células ósseas são subdivididas em osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela diferenciação de pró-monócitos, originados na medula óssea, e reabsorvem a matriz óssea liberando cálcio para o sangue. Os osteoblastos são células mononucleares formadas a partir da diferenciação de células progenitoras mesenquimais da medula óssea, responsáveis pela produção do componente orgânico da matriz óssea (mineralização) e desempenham papel chave na secreção do mediador para a osteoclastogênese. Os osteócitos são as células mais numerosas, que se formam a partir dos osteoblastos, após completarem sua função (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; KATSIMBRI, 2017).

## 3.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA

Em condições fisiológicas normais, o tecido ósseo é destruído e outro é formado em seu lugar, em um processo contínuo e dinâmico, conhecido como remodelação óssea. Esta envolve a atividade dos osteoblastos, que secretam nova matriz óssea através da adição de minerais e fibras colágenas ao osso, dos osteoclastos, que removem minerais e fibras colágenas (reabsorção), e, também, do hormônio da paratireoide humano (hPTH), vitamina D, estrogênio e a calcitonina (KATCHBURIAN; ARANA, 2017).

Entre os reguladores da formação óssea, destacam-se o receptor do ativador do fator nuclear kappa  $\beta$  (RANK), seu ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG). O RANK é um receptor de membrana encontrado em células precursoras de osteoclastos e o RANKL é uma citocina pertencente à família dos fatores de necrose tumoral, expressa na superfície dos osteoblastos. A membrana celular dos osteoblastos contém receptores para o hPTH, o qual é secretado em resposta à queda dos níveis sanguíneos de cálcio. Com a ligação do hPTH, os osteoblastos deixam de produzir a matriz óssea e secretam fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), interleucinas e ligante da OPG. O M-CSF liga-se a receptores de células precursoras osteoclásticas e induz a expressão do RANK na superfície celular. O RANKL liga-se ao seu receptor RANK e estimula a diferenciação celular para osteoclastos maduros e ativados, que expressam, principalmente, metaloproteinases, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e receptores para calcitonina. Os osteoclastos ativados aproximam-se da superfície óssea e secretam ácidos e enzimas hidrolíticas que dissolvem o componente inorgânico e digerem parte orgânica da matriz, liberando cálcio, fósforo inorgânico e fragmentos de colágeno, levando a hipercalcemia. Por sua vez, o aumento do fluxo de íons cálcio para o sangue inibe a secreção do hPTH e estimula a secreção de calcitonina, que reduz a atividade dos osteoclastos, aumenta a atividade osteoblástica e a deposição de cálcio nos ossos, acarretando maior síntese óssea (MARTIN; SIMS, 2015; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

O estudo do mecanismo de formação e de atividade das células osteoclásticas viabilizou explorar a supressão da reabsorção óssea como estratégia terapêutica. A descoberta de que o RANKL é essencial na diferenciação, atividade e sobrevivência dos osteoclastos levou ao desenvolvimento do anticorpo monoclonal DmAb (LACEY et al., 2012).

## 3.3 DOENÇAS OSTEOMETABÓLICAS

A remodelação óssea é fundamental para renovar a microarquitetura óssea e conservar o conteúdo mineral. Desequilíbrios favorecendo o predomínio da reabsorção sobre a formação, caracterizam doenças como a osteoporose e são comuns também em metástases ósseas (JIN et al., 2015). Cirurgias ou medicamentos que interrompem a produção de estrogênio ou testosterona, utilizados para tratar pacientes com câncer de mama ou de próstata, também podem levar à perda óssea. Concentrações farmacológicas excessivas de glicocorticoides podem impedir a diferenciação e atividade dos osteoblastos e estimular a ação dos osteoclastos, levando à perda óssea ou osteoporose. Este último, também é evidente quando concentrações patológicas de glicocorticoides endógenos estão presentes, como na síndrome de Cushing (PROLIA, 2019; XGEVA, 2019).

## 3.3.1 Osteoporose

A osteoporose é uma doença sistêmica, crônica e assintomática. A doença envolve a destruição da microarquitetura óssea, que resulta em baixa densidade mineral óssea (DMO), com consequente fragilidade óssea, aumentando o risco de fraturas. A prevalência da doença em mulheres associa-se a pós-menopausa, devido à diminuição do hormônio estrogênio e em homens, é observada a partir dos 65 anos, podendo estar relacionada à idade ou ser idiopática. Com o aumento da expectativa de vida, a doença é, atualmente, de proporções epidêmicas e tornou-se um problema de saúde pública (EASTELL et al., 2016; WATTS; MANSON, 2017; WILLSON et al., 2015).

O tratamento com intervenções farmacológicas está direcionado a pacientes com alto risco de fraturas e consiste no uso de agentes anabólicos ou antirreabsortivos. Os agentes anabólicos restauram a massa óssea através do estímulo da atividade osteoblástica e os antirreabsortivos, que são os mais prescritos, visam inibir a reabsorção óssea osteoclástica (GRAHAM; RUSSEL, 2015). A suplementação de cálcio e vitamina D é o tratamento padrão na prevenção de fraturas e os bisfosfonatos orais são a primeira escolha no tratamento de osteoporose confirmada (BRASIL, 2014; COMPSTON et al., 2017). Dois mAbs estão disponíveis para tratamento da doença no Brasil, o DmAb e o romosozumabe (CHANG et al., 2018; FAIENZA et al., 2018; SHAKERI et al., 2020).

O DmAb foi o primeiro anticorpo monoclonal totalmente humano desenvolvido especificamente para tratar a osteoporose. Em pacientes com perda óssea ou osteoporose, o objetivo terapêutico é reduzir a reabsorção e a destruição óssea, tornando os ossos mais fortes e menos suscetíveis a fraturas. De acordo com as diretrizes brasileiras para tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, a escolha do DmAb está associada a falha, intolerância ou contraindicação aos bisfosfonatos orais e, em situações especiais, em primeira

linha de tratamento, como em pacientes com disfunção renal, pois não apresenta eliminação glomerular (RADOMINSKI et al., 2017). O Colégio Americano de Médicos recomenda o tratamento farmacológico com os bisfosfonatos orais alendronato, risedronato, ácido zoledrônico ou DmAb, para reduzir o risco de fraturas em mulheres com osteoporose (KANIS et al., 2018).

#### 3.3.2 Metástases ósseas

A metástase óssea é uma complicação frequente em pacientes com câncer em estágio avançado. Na maior parte dos casos, é do tipo osteolítica, mediada por fatores das células tumorais que atuam direta e indiretamente na diferenciação e ativação dos osteoclastos. O estímulo da reabsorção aumenta a proliferação de células ósseas tumorais, que promove a formação e atividade de osteoclastos, num ciclo que atrai e estimula mais células tumorais. Em consequência, ocasionam elevada absorção óssea nas áreas afetadas, provocando dor intensa, elevado risco de compressão medular e de fraturas (ESPOSITO et al., 2018).

Uma vez que o câncer se dissemine para os ossos, raramente é curável. O objetivo do tratamento é reduzir, bloquear ou retardar o crescimento dos tumores e melhorar a qualidade de vida (SINGH et al., 2015; WEIDLE et al., 2016). O tratamento envolve abordagem multidisciplinar, podendo incluir radiofármacos, quimioterápicos, terapia hormonal, bem como o uso de agentes capazes de inibir a reabsorção óssea osteoclástica, como os bisfosfonatos injetáveis (pamidronato, ácido zoledrônico) ou o anticorpo monoclonal DmAb, podendo incluir também procedimentos cirúrgicos. A escolha do tratamento com DmAb tem por objetivo reduzir ou retardar o crescimento celular e amenizar os sintomas relacionados à doença, onde o alívio da dor é o maior benefício obtido (LUENGO-ALONSO et al., 2019; MACEDO et al., 2017).

### 3.4 ANTICORPO MONOCLONAL DENOSUMABE

Os mAbs são imunoglobulinas produzidas pelo clone de um único linfócito secretor do anticorpo para um antígeno correspondente, geradas em laboratório para reconhecer e se ligar a um alvo celular de interesse, bloqueando interações com receptores celulares ou matando células alvo (JIANG et al., 2011; KENNEDY et al., 2018). Produtos biofarmacêuticos que contém mAbs têm sido empregados para o tratamento de diversos tipos de câncer, doenças inflamatórias, autoimunes e infecciosas e têm se mostrado promissores também para

tratamento da COVID-19 (BRASIL, 2021; HURT; WHEATLEY, 2021; KAPLON; REICHERT, 2021; TAYLOR et al., 2021; WATTS; MANSON, 2017).

O DmAb foi o primeiro anticorpo monoclonal para tratamento de doenças ósseas no Brasil. Está registrado como produtos Prolia<sup>®</sup> e Xgeva<sup>®</sup>, produzidos pelo laboratório Amgen, com venda sob prescrição médica. O Prolia<sup>®</sup> apresenta DmAb na concentração de 60 mg, em seringa preenchida de 1 mL e a posologia é de uma seringa a cada 6 meses, para adultos acima de 18 anos. O Xgeva<sup>®</sup> contém DmAb na concentração de 120 mg em frasco-ampola com volume de 1,7 mL e a posologia é de um frasco-ampola a cada 4 semanas, para uso adulto e pediátrico a partir de 12 anos (AMGEN, 2019a; AMGEN, 2019b). A administração dos produtos é por via subcutânea. A Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), que estabelece os medicamentos disponibilizados por meio de políticas públicas para tratamento de doenças que acometem a população brasileira, ainda não inclui o DmAb para tratamento de doenças ósseas (BRASIL, 2020).

No ano de 2010, o Prolia<sup>®</sup> foi aprovado pela Agência Reguladora de Medicamentos dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration (FDA)*, para tratamento de osteoporose em homens e mulheres na fase de pós-menopausa e para tratamento da perda óssea em homens sob terapia de supressão androgênica e mulheres que fazem uso de inibidores de aromatase, para terapia de cânceres de próstata não-metastático e mama, respectivamente. Paralelamente, o Xgeva<sup>®</sup> foi aprovado para uso em pacientes com metástases ósseas de tumores sólidos (PROLIA, 2019; XGEVA, 2019).

Logo após, no ano de 2011, o DmAb foi registrado no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como medicamento biológico novo, com os mesmos nomes comerciais e as mesmas indicações clínicas. Recentemente, no ano de 2018, a ANVISA aprovou o uso do Prolia<sup>®</sup> para tratamento de osteoporose associada à terapia sistêmica com glicocorticoides recém iniciada ou sustentada, em homens e mulheres sob risco aumentado de fratura. No mesmo período, o Xgeva<sup>®</sup> foi aprovado para uso em pacientes com mieloma múltiplo e hipercalcemia associada à malignidade refratária a bisfosfonatos intravenosos, e no ano de 2019, para tratamento de tumor de células gigantes do osso, que não pode ser tratado através de cirurgia ou quando a cirurgia não é a melhor opção, em adultos e adolescentes cujos ossos já pararam de crescer (PROLIA, 2019; XGEVA, 2019).

## 3.4.1 Estrutura, propriedades físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas

O DmAb é um anticorpo monoclonal completamente humano (IgG2), produzido através da clonagem e expressão em células CHO, pela tecnologia do DNA recombinante. É uma glicoproteína relativamente hidrofílica, com 1326 aminoácidos, ponto isoelétrico de 8,9, massa molecular de aproximadamente 147 kDa e fórmula química  $C_{6404}H_{9912}N_{1724}O_{2004}S_{50}$ . Estruturalmente, apresenta duas cadeias leves, compostas por 215 aminoácidos cada, e duas cadeias pesadas, compostas por 448 aminoácidos, cada. A região Fc das cadeias pesadas apresenta sítios de *N*-glicosilação na Asparagina 298, onde se ligam estruturas com resíduos de ácidos siálicos e galactose (Figura 1) (AMGEN, 2019a; AMGEN, 2019b; BOBALY et al., 2017; GOYON et al., 2017).





O DmAb é anticorpo monoclonal anti-RANKL, com ação análoga à OPG, porém mais específico. Conforme ilustrado na Figura 2, o DmAb atua no processo de remodelação óssea, de modo que seu mecanismo de ação baseia-se na capacidade de se ligar ao RANKL humano, impedindo sua ligação ao RANK na superfície das células osteoclásticas. A consequência desta ligação é a inibição da formação de osteoclastos multinucleados, bem como sua ativação e sobrevivência, com redução da sua função, que é a reabsorção óssea (HANLEY et al., 2012).



Figura 2 – Ilustração do mecanismo de ação do DmAb.

Fonte: Adaptação de Hanley et al. (2012, p. 1141).

Os produtos Prolia<sup>®</sup> e Xgeva<sup>®</sup> apresentam-se na forma farmacêutica de solução transparente, incolor à ligeiramente amarelada, formulada com pH 5,2, e devem ser armazenados sob refrigeração (entre 2 e 8 °C). Os excipientes presentes nas formulações incluem água para injetáveis, ácido acético glacial, hidróxido de sódio e sorbitol, com exceção do polissorbato 20, que está presente somente no Prolia<sup>®</sup> (AMGEN, 2019a; AMGEN, 2019b).

Estudos de farmacocinética foram realizados em indivíduos saudáveis e mulheres na pós-menopausa com osteopenia ou osteoporose por injeção intravenosa e subcutânea de DmAb (Prolia<sup>®</sup>), com doses que variaram entre 0,01 e 3 mg/kg, administradas de 3 a 6 meses, por até 4 anos. Os resultados demonstraram que o DmAb exibiu farmacocinética não linear com as doses (SUTJANDRA et al., 2011). Em relação à distribuição, nem acúmulo nem alteração da farmacocinética do DmAb foram observados com o passar do tempo após doses múltiplas de 60 mg por via subcutânea 1 vez a cada 6 meses. O DmAb é composto por carboidratos e aminoácidos e não se prevê que seja eliminado por meio de mecanismos metabólicos hepáticos. Baseado em dados não clínicos, prevê-se que sua eliminação siga as vias de eliminação de imunoglobulinas nativas, resultando em degradação a pequenos peptídeos e aminoácidos (PROLIA, 2019; XGEVA, 2019).

#### 3.4.2 Ensaios biológicos e métodos físico-químicos para o Denosumabe

Kostenuik e colaboradores (2009) avaliaram a atividade biológica do DmAb e da OPG por ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*. Células murinas de macrófagos (RAW 264,7) foram mantidas em cultivo e estimuladas a diferenciar-se em osteoclastos pela adição de M–CSF e RANKL humano (30 ng/mL). Posteriormente, foram tratadas com DmAb ou OPG e a resposta foi determinada pela quantificação do biomarcador de reabsorção óssea TRAP, por leitura espectrofotométrica. O DmAb apresentou maior capacidade em inibir a proliferação celular em relação a OPG. Paralelamente, camundongos com 4 semanas de idade foram tratados com duas injeções diárias de RANKL durante 4 dias, para indução de hipercalcemia. Observou-se aumento nas concentrações sanguíneas de cálcio ionizado, que foram reduzidas pelas injeções de DmAb ou OPG.

Helas e colaboradores (2009) utilizaram camundongos geneticamente modificados pela inserção do RANKL humano para avaliar o efeito do DmAb (10 mg/kg), administrado duas vezes por semana, sobre a calcificação vascular da aorta. A prednisolona (2,1 mg/kg/dia) induziu aumento da reabsorção óssea, que elevou os teores de fosfato e cálcio na aorta, reduzidos pelo tratamento com DmAb durante 4 semanas.

Hofbauer e colaboradores (2009) avaliaram a eficácia do DmAb em camundongos geneticamente modificados pela inserção do RANKL humano com osteoporose induzida por glicocorticoide. A perda óssea foi associada com aumento da reabsorção óssea e supressão da formação de ossos vertebrais, confirmada pelo aumento de células osteoclásticas, através do biomarcador TRAP. O DmAb preveniu a perda óssea induzida pela administração de prednisolona durante 4 semanas, em relação ao placebo.

Arthur e colaboradores (2012), simulando condições fisiológicas *in vitro*, determinaram a ligação estequiométrica do DmAb ao RANKL, por espectrometria de massas por ionização por eletrospray com analisador do tipo tempo de voo (EM–ESI–TOF) e por técnicas de separação por tamanho molecular (CL–EM com detector de espalhamento de luz estática e velocidade de sedimentação com ultracentrifugação). Foram testadas diferentes concentrações, demonstrando que a ligação de 3 moléculas de DmAb com 2 trímeros do RANKL é a mais estável.

Chen e colaboradores (2018) realizaram estudo randomizado em voluntários humanos para avaliar a farmacocinética, farmacodinâmica, segurança e tolerância de dose única de DmAb. Os resultados demonstraram que o produto foi bem tolerado e não houve registro de novos efeitos de toxicidade. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados no soro por enzimaimunoensaio (ELISA) com limite de quantificação de 20 ng/mL.

Método de imunoafinidade com adição de proteína de ligação foi desenvolvido e aplicado em conjunto com cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas no modo tandem (CL–EM/EM) com analisador híbrido triplo quadrupolo íon trap linear para quantificação de DmAb em soro de macacos, após reações de desnaturação e digestão. A região linear foi determinada entre 0,1 e 30  $\mu$ L. Os resultados foram comparados demonstrando haver correlação com os fornecidos por método de ELISA (WANG et al., 2017).

Shida e colaboradores (2018) desenvolveram e validaram método utilizando proteína G imobilizada para extração de DmAb do soro de pacientes em tratamento de câncer, seguida de digestão com tripsina. As análises foram realizadas por CL–EM/EM com analisador híbrido triplo quadrupolo íon trap linear, com tempo de corrida de 8 min. A concentração média de DmAb no soro foi de 27,2 µg/mL, comparada por ELISA. O método estudado apresentou limitação para analisar DmAb em soro de pacientes em tratamento para osteoporose.

Método por CL–FR para análise de DmAb em formulação biofarmacêutica foi desenvolvido e validado, utilizando coluna C18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm d.i., 5 } \mu \text{m}$ ) mantida à temperatura ambiente, fase móvel composta de metanol, água e OPA (90:10:01, v/v) e eluição isocrática, com detecção no comprimento de onda de 233 nm. O tempo de retenção do DmAb foi de 3,64 min (SWAMULU et al., 2012).

Onami e colaboradores (2014) desenvolveram e validaram método por CL–EM/EM, na região linear de 3,13–200 ng/mL. Camadas magnéticas foram ligadas em placa com o anticorpo comercial e a região Fc anti-humana, para capturar o complexo imune antígenoanticorpo (RANKL–DmAb) em plasma de camundongo, com subsequente quantificação do antígeno derivado da digestão tríptica. O método foi adotado para quantificar o RANKL total na presença de DmAb em estudo de farmacocinética em camundongos.

Métodos por CL–EM e CL–FR foram desenvolvidos e validados para quantificação do DmAb e para determinação de proteínas de alta massa molecular e fragmentos em produtos biofarmacêuticos. No método por CL–EM utilizou-se coluna TSKGel G2000SW<sub>XL</sub> (300 mm × 7,8 mm d.i.), mantida a 25 °C e fase móvel composta de solução tampão fosfato de potássio monobásico 1 mM, fosfato de potássio dibásico 8 mM e cloreto de sódio 200 mM, pH 7,4. No método por CL–FR, foi utilizada coluna Vydac 214TP C4 (250 mm × 4,6 mm d.i.) mantida a 60 °C e fase móvel constituída de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) em água e TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com eluição por gradiente. Paralelamente, foi desenvolvido bioensaio por cultura de células RAW 264,7 *in vitro*, que foi adotado para a avaliação da atividade biológica do DmAb. Os métodos por cromatografia líquida (CL) desenvolvidos cumpriram os requisitos de validação preconizados pelos compêndios oficiais, e foram empregados em conjunto com o bioensaio *in vitro* para quantificação de DmAb em produtos biofarmacêuticos. As potências foram comparadas, demonstrando correlação significativa (PEROBELLI et al., 2018).

#### 3.4.3 Tecnologias analíticas e bioensaios para caracterização de anticorpos monoclonais

Durante as fases de desenvolvimento, produção e controle de qualidade lote a lote dos mAbs, sejam eles inovadores ou biossimilares, é necessário dispor de ferramentas analíticas desenvolvidas e validadas para a determinação da concentração e atividade biológica/potência, bem como para caracterização físico-química, avaliando propriedades como estrutura proteica, pureza, padrão de glicosilação e estabilidade (XU et al., 2018; EBBERS et al., 2020).

As cadeias polipeptídicas dos mAbs estão suscetíveis a modificações químicas e degradação em todos os estágios de produção dos produtos farmacêuticos, e também durante o transporte e armazenamento. As degradações dependem das propriedades intrínsecas de cada biomolécula e podem ocorrer por vias químicas e físicas, incluindo: agregação, oxidação e formação de variantes de carga, entre outras. As moléculas devem ser bem caracterizadas

pois estas modificações podem inviabilizar o uso clínico, uma vez que podem afetar as funções efetoras, a conformação proteica, o transporte, assim como o direcionamento, reconhecimento e ligação ao sítio alvo, além de induzir imunogenicidade (CHIRINO; MIRE-SLUIS, 2004).

A glicosilação com ácidos siálicos terminais destaca-se entre as modificações químicas. O representante mais abundante em mAbs expressos em células CHO é o ácido *N*-acetilneuramínico (NANA), presente em níveis raramente excedendo 5% (AMBROGELLY et al., 2018; STADLMANN et al., 2010; WEI et al., 2017). A oxidação da metionina é uma reação comum em moléculas proteicas e pode ser induzida sob condições térmicas, de oxidação ou de estresse leve, levando a formação de formas alteradas com hidrofobicidade reduzida. A presença de variantes de carga é também observada em mAbs de uso terapêutico. Muitas modificações podem levar a sua formação, por alterar a carga líquida da biomolécula ou por modificar a estrutura proteica e o pKa dos resíduos carregados. A desamidação é uma das modificações que conferem heterogeneidade de carga aos mAbs (AN et al., 2014).

A agregação é uma alteração comum e geralmente irreversível, e pode ser exacerbada em mAbs formulados em altas concentrações, como para administração subcutânea. A formação de agregados pode ser influenciada por fatores como pH, temperatura e agitação. As imunoglobulinas produzidas para administração via intravenosa podem apresentar nível de agregados limitado a 5% (RATANJI et al., 2014; WANG et al, 2007; WANG et al., 2009; WU et al., 2014).

Entre as técnicas analíticas de separação, a CL destaca-se devido aos diferentes princípios físico-químicos de separação que podem ser empregados. A CL–EM é utilizada para avaliação qualitativa e quantitativa dos mAbs intactos e das proteínas de alta e baixa massa molecular. A separação depende da ausência de qualquer interação entre o analito e a fase estacionária integrada na coluna e está baseada no tamanho molecular em solução. Convém destacar o estudo de métodos por CL–EM para avaliação de mAb em formulação biofarmacêutica, bem como para avaliar os efeitos da degradação fotolítica sobre a agregação de cinco mAbs em uso clínico e também para estudo de estabilidade de soluções diluídas de formulação para administração por via intravenosa (FARJAMI et al., 2019; HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2016; HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2018; PAUL et al., 2012).

A CL–FR é usada para confirmar a identidade da proteína, determinar o perfil da impureza e quantificar modificações pós-translacionais. A técnica explora as propriedades hidrofóbicas das moléculas e permite a separação de formas oxidadas e desamidadas da forma não alterada (AN et al., 2014; FEKETE et al., 2013a). Quando utilizada para análise de mAbs,

apresenta peculiaridades nas condições analíticas dos métodos, que são fundamentais para eficiência da separação. A composição da fase móvel geralmente inclui TFA, com eluição no modo gradiente e colunas cromatográficas que possam ser mantidas sob alta temperatura (60–90 °C) (FEKETE et al., 2012; FEKETE et al., 2013b). Métodos por CL–FR com DAD foram validados para quantificação de mAbs em formulações biofarmacêuticas sob uso em condições hospitalares e posteriormente utilizados em estudos de estabilidade de longa duração (MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2016; NAVAS et al., 2013). Adicionalmente, método com detecção por fluorescência foi desenvolvido e validado para determinação de anticorpo monoclonal em sistema nanoparticulado (SOUSA et al., 2017). Métodos analíticos por CL–FR–F, EC com detecção de fluorescência induzida por laser e CL–EM/EM tem sido utilizados para avaliação da glicosilação, uma vez que os glicanos não são bem detectados por absorção UV (PARR et al., 2016; VREEKER; WUHRER, 2017; ZHANG et al., 2016).

Em comparação com os métodos por CL, a eletroforese capilar (EC) tem se tornando uma das principais técnicas de separação nos conceitos de química analítica verde. Entre suas vantagens, destaca-se: alta eficiência e resolução e o consumo mínimo de amostra e solventes orgânicos (nanolitros). A ECZ tem sido utilizada para a identificação e determinação de variantes de carga de proteínas, uma vez que apresenta capacidade para separar macromoléculas carregadas eletricamente (VOETEN et al., 2018). Métodos analíticos por cromatografia eletrocinética capilar micelar (MEKC) e ECZ tem sido desenvolvidos para análise de impurezas e para avaliação de variantes de carga de mAbs (ANDRASI et al., 2014; ESPINOSA-DE LA GARZA et al., 2013; HE et al., 2010; HE et al., 2011; MORITZ et al., 2015; MORITZ et al., 2017; SHI et al., 2012; SUBA et al., 2016; TURNER; SCHIEL, 2018; ZHANG et al., 2010).

Para aplicar ECZ para análise de variantes de carga de mAbs, algumas peculiaridades devem ser observadas durante a escolha das condições analíticas, pois os mAbs tendem a se adsorverem na superfície de capilares convencionais de sílica fundida. A composição e o pH da solução eletrolítica são fundamentais para assegurar a separação, sendo comumente uma combinação de ácido épsilon-aminocaproico (EACA) em pH 5,7, podendo variar de acordo com o anticorpo monoclonal em estudo. Se for utilizado capilar de sílica fundida não revestido, é essencial criar um revestimento dinâmico em sua superfície através do uso de aditivos na solução eletrolítica. A combinação de um modificador orgânico, comumente trietilenotetramina (TETA), e de agentes para aumentar a viscosidade da solução, Tween 20 ou hidroxipolimetilcelulose, é recomendada para reduzir interações do analito com a parede do capilar (KAHLE; WÄTZIG, 2018).

Os bioensaios *in vivo* ou *in vitro*, utilizando linhagem celular específica, têm sido utilizados para avaliação da atividade biológica (que é expressa pela potência), e devem ser desenvolvidos de acordo com o mecanismo de ação de cada produto (EMA, 2016). Os bioensaios também devem ser sensíveis para detectar o impacto de modificações físicas e químicas sobre a bioatividade da molécula, que pode ou não ser correlacionada com a potência, dependendo dos sítios de modificação (WANG et al., 2018).

Os guias internacionais e as farmacopeias, nos métodos gerais, recomendam a quantificação e caracterização dos mAbs através da combinação de ensaios físico-químicos, imunológicos e biológicos. A quantificação das formas degradadas nos produtos também é importante para avaliar os atributos de qualidade da biomolécula (CERUTTI et al., 2019; EP, 2021; USP 43, 2021).

Assim como acontece para o DmAb, as empresas detentoras da patente de registro dos biofármacos, em geral multinacionais, são também detentoras dos processos de produção e das metodologias analíticas para controle da qualidade lote a lote de seus produtos (BRASIL, 2011; EMA, 2017). Para que um método analítico seja recomendado para esta finalidade é fundamental demonstrar, por meio de ensaios experimentais validados, que apresenta capacidade de separar, detectar e quantificar a biomolécula, bem como impurezas e degradações garantindo a execução de ensaios reprodutíveis e a obtenção de resultados confiáveis. Os parâmetros de validação e os critérios de aceitação preconizados estão disponíveis em guias oficiais e em teses e dissertações já desenvolvidas no Laboratório de Produtos Biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), bem como nos artigos científicos desta Tese de doutorado, disponíveis a seguir. Acrescenta-se também que a avaliação comparativa dos resultados fornecidos por diferentes métodos analíticos constitui-se em avanço para aprimorar a determinação de identidade, formas degradadas e estabilidade dos produtos farmacêuticos, aplicáveis ao controle de qualidade para garantir a eficácia terapêutica (BRASIL, 2017; FDA, 2015; ICH 2005; MALDANER, 2017; PEROBELLI, 2017; ROZET, et al., 2007; SHABIR, 2003; SOUTO, 2015).

ARTIGO 1

## 4 ARTIGO 1

# ANALYSIS OF DENOSUMAB BY A VALIDATED CZE METHOD AND DETERMINATION OF SIALIC ACIDS BY THE RP–HPLC METHOD

Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel<sup>1</sup>, Bruna Xavier<sup>1</sup>, Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior<sup>1</sup>, Francielle Santos da Silva<sup>1</sup>, Luís Gustavo Jung Motta<sup>1</sup>, Thaís Neuhaus Cavalheiro<sup>2</sup> and Sérgio Luiz Dalmora<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria 97105–900, Brazil.

<sup>2</sup>Industrial Pharmacy Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria 97105– 900, Brazil.

\*Correspondence: sdalmora@terra.com.br; Tel.: +55–55–3220–8952

Abstract: A capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed and validated to quantitate the monoclonal antibody denosumab (DmAb) and its charge variants in pharmaceutical products, demonstrating excellent precision, linearity and accuracy. Separations were obtained with migration times of 11.3 min for DmAb and the calibration curve was linear in the range of 0.95–20 mg/mL. The analytical comparability of seven batches of Prolia<sup>®</sup> showed mean differences of the estimated content/potencies of 1.87% lower, and 0.84% and 1.21% higher compared to the size exclusion and reversed-phase liquid chromatography (SE-HPLC and RP-HPLC) methods and the osteoclast antiproliferative bioassay, respectively, with non-significant differences (p > 0.05). An RP– HPLC method with fluorescence detection (RP-HPLC-F), performed on a Kinetex® EVO  $C_{18}$  column (5 µm, 100 Å, 250 mm × 4.6 mm), was optimized to determine the levels of sialic acids of DmAb biomolecules, giving mean concentrations of 0.16 and 0.17 µg Nacetylneuraminic acid (NANA)/mg DmAb for Prolia<sup>®</sup> and Xgeva<sup>®</sup> pharmaceutical products, respectively. The results demonstrated the capability of each one of the methods, and their use in combination constitutes a strategy to monitor instability, thereby assuring the quality and the batch-to-batch consistency of the biotechnology-derived medicine.

**Keywords:** denosumab; charge variants; capillary electrophoresis; sialic acids; liquid chromatography; bioassay; monoclonal antibody.
# **1** Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are immunoglobulins produced by a single B cell clone. Recombinant technology enabled the construction of fully human products that play a significant role as therapeutic medicines, and their applications have advanced for the therapy of chronic inflammatory diseases, cancer and bone diseases [1].

Denosumab (DmAb) is a fully human monoclonal therapeutic antibody heterotetramer of the IgG2 subclass structurally composed of 2 identical heavy chains (447 amino acids per chain) and 2 identical light chains (215 amino acids per chain), connected through several interchain and intrachain disulfide bonds at their hinge region. It is considered relatively hydrophilic, and has an approximate molecular weight of 147 kDa with an isoelectric point (pI) of 8.9. Each heavy chain contains an *N*-linked glycan at the asparagine 298. DmAb is genetically engineered in Chinese hamster ovary (CHO) cells by a biotechnology process [2–4].

Clinically, DmAb is a targeted therapeutic agent indicated for treatment and prevention of diseases of bone loss and cancer-induced bone destruction. Functionally it targets and selectively binds with high affinity and specificity to the receptor activator of nuclear factor– $\kappa\beta$  (RANK) ligand (RANKL), thereby mimicking the natural action of osteoprotegerin, which is an endogenous RANKL inhibitor. RANK is a member of the tumour necrosis factor receptor superfamily, and its activation by the RANKL promotes the maturation of preosteoclasts into osteoclasts. DmAb prevents the RANK/RANKL interaction from occurring, which inhibits the formation, function and survival of activated osteoclasts, thereby inducing a rapid suppression of bone resorption and increasing bone strength and mass [5–7].

Bioactivity was assessed using an *in vivo* assay evaluating the ability of human RANKL (hRANKL) to bind murine RANK and to stimulate bone resorption in mice, expressing an extracellular fragment of hRANKL in a way that could be inhibited by DmAb. *In vitro* bioassays, based on the DmAb capability to inhibit the effect of hRANKL to stimulate the formation of osteoclasts derived from murine RAW 264.7, by the addition of hRANKL and macrophage colony stimulating factor (M–CSF), were developed. The results were assessed by quantification of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACTP) or viable cells using absorbance measurements [8,9].

Therapeutic mAbs are a class of glycoproteins, and their overall characterization poses many challenges due to their inherent molecular complexity; separation techniques based on diverse principles are required [10,11]. However, they may be quite sensitive to changes in the manufacturing processes, and the *N*-glycosylation is an important parameter to monitor

and represents one of the main sources of micro-heterogeneity in each individual chain, which is critical to the patient's safety. Glycosylation variants arising from different levels of sialylation can impact pharmacodynamic and pharmacokinetic behaviour [12–16]. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP–HPLC) with detection by diode array detector (DAD) is a highly accurate technique and was used for the analysis of fragments and quantitation of mAbs [17]. The RP–HPLC with fluorescence detection (RP–HPLC–F) showed selectivity and sensitivity for the quantification of mAb in human serum and in nanoparticles, as well as the ability to determine sialic acids in glycoproteins [18–20]. Size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE–HPLC) was applied to assess the stability of diluted solutions and to monitor the aggregation induced by photodegradation in commercial therapeutic mAbs [21,22]. A combination of RP–HPLC and SE–HPLC validated methods was applied for the quantitation of DmAb in biotechnology-derived medicine, and the results were correlated with those of the *in vitro* bioassay [9].

In addition to high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) has proven its effectiveness for monitoring critical quality attributes of biologicals with major advantages, including the ability to obtain separations within minutes while maintaining suitable separation efficiency resolving the main isoforms, demonstrating the applicability as alternatives for the pharmaceutical Industry [23–27]. A capillary sodium dodecyl sulfate electrophoresis method was qualified to evaluate a mAb under reduced and non-reduced conditions, showing potential use for quality control analysis [28]. Besides, a capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed as a two-phase-four-step approach to investigate intact and digested mAb as a protein model [29]. Moreover, CZE methods were studied to evaluate charge variants of mAbs and antibody-drug conjugates demonstrating the potential to be used in manufacturing process development, formulation, and characterization of biopharmaceuticals [30–36].

The purpose of the present work was to develop and validate a specific CZE method for the quantitative analysis of DmAb and its charge variants in biotechnology-derived medicines, to correlate the results with validated SE–HPLC and RP–HPLC methods and an *in vitro* bioassay; and to analyse the sialic acid residues by RP–HPLC–F. Thus, this research will enable the establishment of procedures to improve the characterization of therapeutic DmAb, thus helping to ensure quality and efficacy.

#### **2** Experimental

#### 2.1 Reagents and instrumentation

## 2.1.1 Chemicals and reagents

Pharmaceutical lots of Xgeva<sup>®</sup> and Prolia<sup>®</sup> from Amgen (São Paulo, Brazil), with a label claiming 120 mg/1.7 mL and 60 mg/mL of DmAb, respectively, within the expiry date, were obtained from commercial sources. Triethylenetetramine (TETA), Tween 20, potassium phosphates, sodium chloride, sodium hydroxide (NaOH), sodium acetate, sorbitol, hydrochloric acid (HCl), acetic acid, 30% (v/v) hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and HPLC grade solvents trifluoroacetic acid (TFA), acetonitrile, tetrahydrofuran (inhibited with BHT) and 1-butylamine were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Epsilon-aminocaproic acid (EACA), aprotinin (APT), O-phenylenediamine (OPD), sodium bisulfate (NaHSO<sub>4</sub>), *N*-acetylneuraminic acid (NANA), neuraminidase, foetal bovine serum (FBS) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). AlamarBlue<sup>TM</sup> cell viability reagent was obtained from Thermo Scientific (Vantaa, Finland), hRANKL was obtained from ABCAM (San Francisco, CA, USA) and GM–CSF was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) (Herts, UK). Purified water was obtained using Milli–Q A10 system from Millipore (Bedford, MA, USA).

#### **2.1.2 Instrumentation**

CZE experiments were performed using an Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) <sup>3D</sup>CE System equipped with a temperature-controlling system, a power supply, a DAD and CE ChemStation data acquisition software. Chromatographic separations were accomplished using an HPLC system from Shimadzu (Kyoto, Japan) equipped with a system controller, quaternary pump, degasser, autosampler, column oven, DAD and fluorescence detector. The LC Solution Version 1.22 SP1 software was used for instrument operation control, data collection and analysis. *In vitro* bioassays were accomplished using a Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA) Water Jacketed CO<sub>2</sub> incubator and Thermo Scientific Varioskan<sup>®</sup> Flash microplate reader.

#### 2.2 CZE procedure

Uncoated fused-silica capillaries (Agilent Technologies) with an effective length of 56 cm (total length of 64.5 cm  $\times$  50 µm) were employed and were thermostated at 25 °C. The background electrolyte (BGE) solution was a 300 mmol/L EACA and 2 mmol/L TETA buffer at pH 4.8 (adjusted with 20% (v/v) acetic acid) and 0.03% (v/v) Tween 20. Prior to its first use, the capillary was conditioned with the following sequence of rinses: 0.1 mol/L HCl for

10 min and BGE for 10 min; and applying a voltage 30 kV for 5 min. Sample solutions were injected by pressure (50 mbar) for 5 s. A voltage of 30 kV (approximately 40  $\mu$ A current) was applied during the electrophoretic separations, and UV absorbance at 200 nm was employed for detection. To improve the efficiency, selectivity and reproducibility between injections and to remove possible adsorbed substances, the capillary was rinsed with 0.1 mol/L HCl for 2 min and BGE for 2 min and applying a voltage 30 kV for 2 min and the BGE was replaced with fresh solution after every three injections.

# 2.2.1 Reference and sample preparations

Aliquots of three vials of Xgeva<sup>®</sup> were daily pooled and used as the representative DmAb biological reference substance (BS–DmAb). Samples were prepared by diluting the BS–DmAb and pharmaceutical products (Prolia<sup>®</sup>) in purified water to obtain concentrations of 5 mg/mL. The stock solution of APT internal standard (IS) was prepared to a concentration of 10 mg/mL in purified water, and then diluted with purified water to contain 5 mg/mL.

# 2.2.2 CZE method validation

The analytical performance of the developed CZE method was evaluated using pharmaceutical products with a label claiming 60 mg/mL. The following validation parameters were determined following specific guidelines: system suitability test, specificity, linearity, detection limit (DL), quantitation limit (QL), robustness, accuracy, and precision [37,38].

#### 2.2.2.1 Specificity

Specificity was evaluated by analysing a BS–DmAb solution and a pharmaceutical product (10 mg/mL) stressed at low and high pH and under thermal, photodegradation, and oxidation conditions [11]. Solutions prepared in 0.1 mol/L HCl and in 0.1 mol/L NaOH were used for low and high pH degradation, respectively, by incubating them at room temperature for 15 min. For the thermal condition, solutions were heated at 45 °C for 3 h followed by agitation for 1 h. Photodegradation was induced by exposing the solutions to 200 W h/m<sup>2</sup> near–UV light for 20 h in a photostability chamber, and oxidation was induced by treating the solutions with 3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 45 min at ambient temperature and protected from light. Then, the solutions were diluted with purified water to final concentrations of 5 mg/mL and spiked with the IS. Moreover, possible interference from formulation excipients and matrix

was determined by analysing a placebo (in-house mixture of sorbitol, acetate, polysorbate 20, and NaOH to adjust to pH 5.2) and purified water samples [3,4].

#### 2.3 RP-HPLC-F determination of sialic acids in DmAb samples

#### 2.3.1 Standard and sample preparations

An analytical curve with seven concentrations of the sialic acids reference substance (NANA) solution, ranging from 1.0 to 15.0  $\mu$ g/mL, was constructed and diluted to volume with purified water. Sample solutions of DmAb were prepared by mixing 125  $\mu$ L of Prolia<sup>®</sup> or Xgeva<sup>®</sup> with 125  $\mu$ L purified water. A DmAb sample solution (Xgeva<sup>®</sup>) was also incubated with 1 U/mL neuraminidase in 0.1 mol/L acetate buffer pH 5 at 37 °C for 6 h, to cleave terminal NANA. Hydrolysis was accomplished by mixing 250  $\mu$ L of the respective solutions with 100  $\mu$ L 0.5 mol/L NaHSO<sub>4</sub> in 1.8 mL cryogenic vials, then heating at 80 °C for 20 min. For derivatization, 300  $\mu$ L OPD reagent (40 mg/mL in 0.25 mol/L NaHSO<sub>4</sub>) was added, then solutions were heated again at 80 °C for 40 min. After cooling, the samples were microcentrifuged at 7000 rpm for 5 min, and the supernatants were transferred to injection vials.

# 2.3.2 RP-HPLC-F procedure

Analyses were carried out by adjusting previously published methods [19,39]. The analytical method was performed on a Kinetex<sup>®</sup> EVO C<sub>18</sub> column (5  $\mu$ m, 100 Å, 250 mm × 4.6 mm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA), which was held at 45 °C. Mobile phase A was a mixture of 0.15% (v/v) 1-butylamine, 0.5% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, and 1% (v/v) tetrahydrofuran in water and mobile phase B consisted of mobile phase A in acetonitrile (50:50, v/v). Sialic acids were isocratically eluted with 5% mobile phase B for 15 min. The sample volume injected was 75  $\mu$ L. The following gradient flow rate was used: from 0.01–4.00 min: 1.8 mL/min; from 4.01–5.00 min: 1.8 to 0.8 mL/min; from 5.00–12.00 min: 0.8 mL/min and from 12.01–15 min: 1.8 mL/min. The wavelengths were set to 230 nm (excitation) and 425 nm (emission). To ensure reproducibility between runs, the column was rinsed with 100% mobile phase B for 9 min, and then equilibrated by subjecting it to the optimized conditions over 8 min.

#### 2.4 SE–HPLC and RP–HPLC procedures

The methods were performed as described elsewhere [9]. The SE–HPLC method was accomplished on a TSKGel G2000SW<sub>XL</sub> column (5  $\mu$ m, 125 Å, 300 mm  $\times$  7.8 mm) held at 25

°C. The mobile phase was a mixture of 1 mmol/L potassium phosphate monobasic, 8 mmol/L potassium phosphate dibasic and 200 mmol/L sodium chloride, pH 7.4, run isocratically at a flow rate 1.0 mL/min with DAD set at 214 nm. The sample injection volume was 50  $\mu$ L of a solution containing 50  $\mu$ g/mL, and the retention time for DmAb was 7.6 min.

The RP–HPLC experiments were performed on a Vydac 214TP C<sub>4</sub> column (5  $\mu$ m, 300 Å, 250 mm × 4.6 mm), and the column oven was kept at 60 °C. The mobile phase was a combination of 0.1% (v/v) TFA in water and 0.1% (v/v) TFA in acetonitrile. The elution was performed at a flow rate 1.0 mL/min with DAD set at 214 nm. The following gradient program was used: 0–0.1 min, 0% B; 0.1–10 min linear gradient to 40% B; 10–20 min hold at 40% B; 20–25 min re-equilibrate at 0% B. The sample injection volume was 50  $\mu$ L of a solution containing 100  $\mu$ g/mL, and the retention time for DmAb was 18.1 min.

#### 2.5 Osteoclast antiproliferative bioassay

The *in vitro* bioassay was carried out in triplicate by adjusting the procedure described elsewhere [9], based on the ability of DmAb to inhibit the effect of hRANKL to stimulate the formation of osteoclasts which were derived from murine macrophage cells. The RAW 264.7 cells (ATCC<sup>®</sup> TIB–71<sup>TM</sup>) were used between passages 4 and 20 after reaching 65%–75% confluency. Then, 2–5 days post-passage, they were seeded in 96-well flat-bottom plates at an initial density of  $6 \times 10^3$  viable cells/mL and were incubated with hRANKL peptide and M–CSF (30 ng/mL) for 4 days to stimulate the formation of osteoclasts cells. Following the incubation, five concentration ranges starting with 10 µg/mL of DmAb and BS–DmAb were added in triplicate and incubated again for 2 days. Then, 20 µL alamarBlue<sup>TM</sup> reagent was added, followed by a further 4 h incubation period. All cultures were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% (v/v) CO<sub>2</sub> and 95% air throughout this study. The bioassay responses of the 96 wells were quantified in absorbance mode with a microplate reader. The CombiStats<sup>TM</sup> software developed by the EDQM was used to calculate the biological activity by the parallel-line statistical method.

# 2.6 Analysis of DmAb in pharmaceutical products

To quantitate DmAb in pharmaceutical products, seven batches of Prolia<sup>®</sup>, available for clinical use, were labelled from 1 to 7 and evaluated. In addition, batch 2 was randomly selected and subjected to the described forced degradation conditions. The analyses were performed by CZE, SE–HPLC and RP–HPLC methods, in addition to the *in vitro* bioassay,

calculating the results as percentage recoveries against BS–DmAb and executing analytical comparability of the obtained data.

#### **3 Results**

#### 3.1 Optimization of the electrophoretic conditions

Initially, this CZE method was studied on an uncoated fused-silica capillary with 50 µm i.d. and a total length of 64.5 cm (effective length of 56 cm), maintained at 25 °C and detected by DAD at 200 nm, using a pharmaceutical product of DmAb at 5 mg/mL. Sample solutions were injected by pressure (50 mbar) for 5 s. Migration times and peaks areas were chosen as output parameters to evaluate CZE performance accepting relative standard deviation (%RSD) values  $\leq$  2%. BGE solution composed of 400 mmol/L EACA pH 5.7 and 0.03% (v/v) Tween 20 was tested. Parameters like EACA pH and concentration and capillary length were evaluated to optimize DmAb separation. Then, the concentration of the BGE solution with 2 mmol/L TETA and 0.03% (v/v) Tween 20 was evaluated at 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, and 800 mmol/L, and the 300 mmol/L solution was chosen due to a non-significant increase of the migration time and higher sensitivity and optimal ionic strength. Then, 300 mmol/L EACA and 2 mmol/L TETA solutions at pH values between 4.8 and 5.7 were assayed, and selecting the pH value of 4.8 due to acceptable peaks resolution. The pH value of the BGE was chose carefully since the charge isoforms are separated by their charge differences. In addition, ribonuclease, ovalbumin, APT, conalbumin, and gamma globulin were tested as IS; APT, with a migration time approximately 11.3 min, was selected and used in order to compensate for shifts in the retention/migration times. Capillary length was tested as 40, 56 and 72 cm, and the 56 cm was selected due to resolution between internal standard and DmAb, with run time of 20 min. Finally, the detection wavelength was examined from 190 to 400 nm, with the observations that the buffers usually exhibit a minimum background throughout the entire ultraviolet (UV) region and that a wavelength of 200 nm allowed better sensitivity. Characteristic electropherograms of BS-DmAb solution and pharmaceutical product, with a migration time of approximately 18.1 min for DmAb, are illustrated in Figures 1(a) and 1(b), respectively.

#### **3.2 CZE method validation**

Prior to the main validation approach, the suitability test was performed with the final electrophoretic conditions by six replicates injections of a BS–DmAb solution (5 mg/mL). The %RSD calculated with respect to repeatability of migration time and peak area were

0.16%, and 0.22%, respectively. The number of theoretical plates was calculated as 104923.33. All the limits were according to the recommendations [40].

Specificity of the CZE method for DmAb was demonstrated by analysis of non-degraded and degraded samples of DmAb formulations, placebo and purified water. The profiles obtained for BS–DmAb and the pharmaceutical product showed similarity with respect to the content and distribution of charge variants, with a main isoform and minor amounts of basic and acidic variants, Figures 1 (a) and (b). The low pH condition and the high pH condition caused a decrease of 17% and 40% in the DmAb peak areas, respectively, as shown in Figures 1(c) and 1(d). The photodegradation and the oxidation exhibited 23% and 30% decrease of the DmAb areas, as illustrated in Figures 1(f) and 1(g). These stress conditions resulted in changes in charge variants profiles of DmAb and generated the additional peaks in the electropherograms. Furthermore, no detectable peaks were found for the placebo or the purified water, indicating that no detectable interferents were present in the sample matrix (Figures 1(h) and 1(i)). The total carryover of the method was confirmed to be negligible based on no detectable signal for a blank injection immediately following a sample injection. Therefore, this CZE method is stability indicating and may be used to quantify changes in charge variant distribution of the DmAb.

The linearity was tested by analysing BS–DmAb concentrations (n = 8) spiked with IS at 5 mg/mL in triplicate and three calibration curves were drawn, taking the analytes DmAb concentrations on *X*-axis and their peak areas on *Y*-axis. The least-squares linear regression method was used for the statistical evaluation using the STATGRAPHICS Centurion Software Version 18.1.12 (Warrenton, VA, USA). The linear range was verified to be from 0.95–20 mg/mL, calculated from the equation  $y = (843.681 \pm 44.99) x - (411.517 \pm 80.43)$ , and the determination coefficient ( $r^2$ ) was 0.999. The *y*-intercept was significantly different from zero (p < 0.05), and could affect the method accuracy due to possible matrix effect. This was investigated, showing that there was no interference of other substances in the response. Besides, the slope also differed significantly from zero (p < 0.05).

The DL and the QL were estimated based on the slope and the standard deviation of the *y*-intercept of analytical curves described above, giving values of 0.31 and 0.95 mg/mL, respectively. The QL was also experimentally determined as 0.62 mg/mL, with an accuracy within  $\pm$  5% [37,38].

The robustness was examined by analysing samples of 5 mg/mL BS–DmAb solution with the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach. The chosen procedure was a fractional factorial design at 2 levels (eight experiments) carried out with the selection of four factors, as presented in Table I. The data thus obtained were analysed using the Minitab 14 Software (State College, PA, USA) to evaluate the significance of the effects, as depicted by the Pareto charts, Figure 2, which shows the variables tested, demonstrating that they were not statistically significant ( $\alpha > 0.05$ ), confirming the robustness of the method. The DmAb solution stability was tested and shown to be stable for 24 h with 99.08% recovery in the autosampler at room temperature (%RSD 0.25), and for 48 h at 2–8 °C (99.49%, %RSD 0.54), with non-significant differences comparative to the freshly prepared samples.

Accuracy was determined by spiking the placebo with known amounts of BS–DmAb to obtain solutions at concentrations ranging from 4 to 6 mg/mL, which corresponded to 80–120% of the working concentration (5 mg/mL). Precision was studied in terms of repeatability and intermediate precision. Repeatability was demonstrated as intraday precision by evaluating DmAb solutions at three different concentrations, as described above. Intermediate precision study was carried out by evaluating two samples by two independent analysts (between-analysts) and on three consecutive days (inter-days). The data for accuracy and precision studies were presented in Table II.

#### **3.3 RP-HPLC-F determination of sialic acids in DmAb samples**

To optimize the RP–HPLC–F method for DmAb samples, tests were carried out to determine which chromatographic conditions would lead to satisfactory selectivity, sensitivity and resolution for sialic acids peaks. As can be seen, in almost all methods a  $C_{18}$  reversed-phase column is used for separation [41]. Then, two different  $C_{18}$  stationary phases (internal diameter and pore size) Zorbax<sup>®</sup> 300–SB  $C_{18}$  (5 µm, 300 Å, 150 mm × 4.6 mm) and a Kinetex<sup>®</sup> EVO  $C_{18}$  (5 µm, 100 Å, 250 mm × 4.6 mm) columns were tested. The Kinetex<sup>®</sup> EVO  $C_{18}$  column was selected, due to better separation. As the column temperature strongly and positively affects the peak elution, resolution and symmetry, it was tested at 25, 40 and 45 °C, and then maintained at 45 °C. The separation time or speed of analysis was evaluated and the run time was adjusted to 15 min with no clustering of peaks.

Samples of DmAb (expressed in CHO cell lines), which contain NANA, and the reference substance were analysed by the RP–HPLC–F method showing typical chromatograms (Figures 3(a), (b) and (c)), and demonstrating three resolved and symmetrical peaks with retention times of 9.2, 10.9, and 12.0 min. In addition, a sample incubated with neuraminidase showed 57% decrease in total area of the peaks, as shown in Figure 3(d), indicating cleavage of terminal NANA. The degraded sample was also subjected to *in vitro* bioassay on the RAW 264.7 cell line, giving non-significant difference in biological activity

(data not shown). In addition, possible interference from formulation excipients was determined by analysing a sample that contained only placebo, and no peak was detected (Figure 3(e)). The analytical curve generated for NANA was found to be linear over the range of 1–15 µg/mL, calculated from y = (2506906) x - (1444863), and the  $r^2$  was 0.999. Then, the RP–HPLC–F method was applied to assess the levels of sialic acids in Prolia<sup>®</sup> (11.54 mg/mL) and Xgeva<sup>®</sup> (13.57 mg/mL) DmAb formulations, giving concentrations of 0.16 and 0.17 µg NANA/mg DmAb, respectively.

# 3.4 Application of the methods to pharmaceutical samples

Initially, DmAb was analysed by the CZE method, using seven manufacturing lots of pharmaceutical product (Prolia®). The mean estimated content/potency was compared to those obtained using validated SE-HPLC and RP-HPLC methods, as well as the in vitro bioassay, giving mean differences of 1.87% lower, and 0.84% and 1.21% higher, respectively (Table III, 1–7). The experimental results were statistically compared by analysis of variance (ANOVA), which showed non-significant differences (p > 0.05). In this context, since a single method is not sufficient to resolve and characterize a protein, the multi-method strategy enabled the exhibition of similarity/quality between production batches of DmAb, as also demonstrated by Pearson's correlation coefficient (r) > 0.98, which was calculated independently for each method described and combined to the CZE method. Besides, forced degradation studies, that allow a side-by-side comparison of process production batches within a short time period, were performed generating relatively high levels of degradations for better comparison of charge variants, high-molecular-weight (HMW) proteins and fragments from DmAb. Pharmaceutical samples were degraded as described, and were analysed by the CZE and HPLC methods and subjected to in vitro bioassay, which revealed significant (p < 0.05) effects on the potencies (Table III,  $2^c - 2^g$ ).

# **4** Discussion

The number of approved mAbs in the pharmaceutical area and the biosimilars potentially entering the market are increasing nowadays, and the need of analytical techniques for detailed characterization has also increased. Intrinsic micro-heterogeneity is a major concern with mAbs and should be critically evaluated, because differences in the process or productrelated impurities and types of chemical modifications, could lead to serious health implications and influence the bioactivity. If the potential impact on efficacy and safety cannot be inferred only from the physicochemical methods, additional studies are recommended. Thus, a wide range of analytical methods was carried out to achieve this examination for DmAb, including the CZE often classified as a "green" separation method.

MAbs have a tendency to adsorb onto the negatively charged surface of conventional fused-silica capillaries, and many approaches were described to reduce protein adsorption, including permanent or dynamic capillary coatings, use of extreme pH and high ionic strength [10]. However, no coatings totally eliminate protein adsorption, and the separation performances are also dependent of BGE composition and BGE pH [42]. Then, as no permanently coated capillary was used, the additives EACA, TETA and Tween 20 were added to the BGE to form a dynamic coating, which were essential to avoid interactions with the capillary wall. The uncoated capillary provided good selectivity, without changes in the electrophoretic resolution and no peak broadening was observed. It is worth to mention that the research was performed including the use of a IS, which improves the precision of the results, procedure not always followed in some publications [29,30]. Moreover, the CZE method was validated, demonstrating excellent precision, linearity and accuracy to quantitate DmAb and its charge variants in pharmaceutical products.

Moreover, from the perspectives of product quality, glycosylation is a relevant structure to maintain mAb stability and *N*-glycosylation is one of the main contributors to the heterogeneity of mAbs, mentioned at levels rarely exceeding 5% on the conserved Fc-glycans [11]. Because *N*-linked glycans are not well detected by UV/Vis absorption detectors, they were separated by RP–HPLC–F and detected by fluorescence, which is a robust and sensitive method for their analysis, necessary to select and monitor any variation in expression cells during the manufacturing and to ensure consistency in quality, safety, and effectiveness. The analysis of sialic acids by the proposed method can be useful in monitoring batch-to-batch variation, which could be critical for the bioactivity, and it is also of particular interest for comparability studies.

The analytical comparability of seven batches of Prolia<sup>®</sup> showed non-significant differences of the estimated content/potencies compared to the SE–HPLC and RP–HPLC methods and the osteoclast antiproliferative bioassay. In this context, for the first time a CZE method was validated for the analysis of DmAb formulations, and applied in conjunction with HPLC methods and bioassay, evaluating correlations of the results. This strategy constitutes an important advance to improve the characterization of DmAb, which could be also used for the evaluation of future biosimilar product.

# **5** Conclusion

The potential demonstrated by the proposed CZE method will be useful to quantify DmAb and its charge variants without prior separation of the excipients of the formulation, with the added advantages of small sample volumes, no consumption of organic solvents, and a shortened analysis time. Moreover, the analysis of the levels of sialic acids constitutes an important advance to improve the characterization of the DmAb because of the possible impact on the biological activity. In this context, the capability demonstrated for each one of the methods in the correlation studies represents an advance in terms of the quality, safety and efficacy of bulk and finished biotechnology-derived medicine, contributing to ensure batch-to-batch consistency and to support future biosimilarity studies.

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

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

# References

- Shepard, H.M.; Phillips, G.L.; Thanos, C.D.; Feldmann, M.; Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins; *Clinical Medicine*, (2017); 17: 220–232.
- Goyon, A.; Excoffier, M.; Janin-Bussat, M.C.; Bobaly, B.; Fekete, S.; Guillarme, D.; Beck, A.; Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies; *Journal of Chromatography B*, (2017); 1065: 119–128.
- Amgen. (2019). PRODUCT MONOGRAPH Xgeva<sup>®</sup> (denosumab) 120 mg/1.7mL solution for injection. (accessed March 23, 2021).
- Amgen. (2019). PRODUCT MONOGRAPH Prolia<sup>®</sup> (denosumab) 60 mg/mL solution for injection. (accessed March 23, 2021).
- 5. Hanley, D.A.; Adachi, J.D.; Bell, A.; Brown, V.; Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes; *International Journal of Clinical Practice*, (2012); 66: 1139–1146.
- 6. Singh, A.S.; Chawla, N.S.; Chawla, S.P.; Giant-cell tumor of bone: treatment options and role of denosumab; *Biologics: Targets & Therapy*, (2015); 9: 69–74.
- Faienza, M.F.; Chiarito, M.; D'amato, G.; Colaianni, G.; Colucci, S.; Grano, M.; Brunetti, G.; Monoclonal antibodies for treating osteoporosis; *Expert Opinion on Biological Therapy*, (2018); 18: 149–157.
- Kostenuik, P.J.; Nguyen, H.Q.; McCabe, J.; Warmington, K.S.; Kurahara, C.; Sun, N.; Chen, C.; Li, L.; Cattley, R.C.; Van, G.; Scully, S.; Elliott, R.; Grisanti, M.; Morony, S.; Tan, H.L.; Asuncion, F.; Li, X.; Ominsky, M.S.; Stolina, M.; Dwyer, D.; Dougall, W.C.; Hawkins, N.; Boyle, W.J.; Simonet, W.S.; Sullivan, J.K.; Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL; *Journal of Bone and Mineral Research*, (2009); 24: 182–195.
- Perobelli, R.F.; Xavier, B.; Da Silveira, A.R.; Remuzzi, G.L.; Motta, L.G.J.; Dalmora, S.L.; Quantitation of the monoclonal antibody Denosumab by bioassay and validated LC methods; *International Journal of Biological Macromolecules*, (2018); 119: 96–104.
- Fekete, S.; Gassner, A.L.; Rudaz, S.; Schappler, J.; Guillarme, D.; Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies; *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2013); 42: 74–83.

- Ambrogelly, A.; Gozo, S.; Katiyar, A.; Dellatore, S.; Kune, Y.; Bhat, R.; Sun, J.; Li, N.; Wang, D.; Nowak, C.; Neill, A.; Ponniah, G.; King, C.; Mason, B.; Beck, A.; Liu, H.; Analytical comparability study of recombinant monoclonal antibody therapeutics; *MAbs*, (2018); 10: 513–538.
- Harris, R.J.; Kabakoff, B.; Macchi, F.D.; Shen, F.J.; Kwong, M.; Andya, J.D.; Shire, S.J.; Bjork, N.; Totpal, K.; Chen, A.B.; Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody; *Journal of Chromatography B*, (2001); 752: 233–245.
- Khawli, L.A.; Goswami, S.; Hutchinson, R.; Kwong, Z.W.; Yang, J.; Wang, X.; Yao, Z.; Sreedhara, A.; Cano, T.; Tesar, D.; Nijem, I.; Allison, D.E.; Wong, P.Y.; Kao, T.; Quan, C.; Joshi, A.; Harris, R.J.; Nijem, I.; Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats; *MAbs*, (2010); 2: 613–624.
- 14. Reusch, D.; Tejada, M.L.; Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes; *Glycobiology*, (2015); 25: 1325–1334.
- Zhang, L.; Luo, S.; Zhang, B.; Glycan analysis of therapeutic glycoproteins; *MAbs*, (2016); 8: 205–215.
- Higel, F.; Seidl, A.; Sörgel, F.; Friess, W.; N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2016); 100: 94–100.
- Martínez-Ortega, A.; Herrera, A.; Salmerón-García, A.; Cabeza, J.; Cuadros-Rodríguez, L.; Navas, N.; Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study; *International Journal of Biological Macromolecules*, (2018); 116: 993–1003.
- Damen, C.W.; Derissen, E.J.; Schellens, J.H.; Rosing, H.; Beijnen, J.H.; The bioanalysis of the monoclonal antibody trastuzumab by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after immuno-affinity purification from human serum; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2009); 50: 861–866.
- Machado, F.T.; Maldaner, F.P.; Perobelli, R.F.; Xavier, B.; Bartolini, P.; Ribela, M.T.; Dalmora, S.L.; Evaluation of an in vitro cell culture assay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin; *Alternatives to Laboratory Animals*, (2016); 44: 113–120.

- Sousa, F.; Gonçalves, V.M.; Sarmento, B.; Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the quantification of monoclonal antibody bevacizumab from polyester-based nanoparticles; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2017); 142: 171–177.
- Paul, M.; Vieillard, V.; Jaccoulet, E.; Astier, A.; Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab; *International Journal of Pharmaceutics*, (2012); 436: 282–290.
- Hernández-Jiménez, J.; Salmerón-García, A.; Cabeza, J.; Vélez, C.; Capitán-Vallvey, L.F.; Navas, N.; The effects of light-accelerated degradation on the aggregation of marketed therapeutic monoclonal antibodies evaluated by size-exclusion chromatography with diode array detection; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2016); 105: 1405–1418.
- 23. He, Y.; Isele, C.; Hou, W.; Ruesch, M.; Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary; *Journal of Separation Science*, (2011); 34: 548–555.
- 24. Shi, Y.; Li, Z.; Qiao, Y.; Lin, J.; Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb; *Journal of Chromatography B*, (2012); 906: 63–68.
- Espinosa-de la Garza, C.E.; Perdomo-Abúndez, F.C.; Padilla-Calderón, J.; Uribe-Wiechers, J.M.; Pérez, N.O.; Flores-Ortiz, L.F.; Medina-Rivero, E.; Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, (2013); 34: 1133–1140.
- Moritz, B.; Schnaible, V.; Kiessig, S.; Heyne, A.; Wild, M.; Finkler, C.; Christians, S.; Mueller, K.; Zhang, L.; Furuya, K.; Hassel, M.; Hamm, M.; Rustandi, R.; He, Y.; Solano, O.S.; Whitmore, C.; Park, S.A.; Hansen, D.; Santos, M.; Lies, M.; Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies; *Journal of Chromatography B*, (2015); 983: 101–110.
- Wang, X.; An, Z.; Luo, W.; Xia, N.; Zha, Q.; Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development; *Protein Cell*, (2018); 9: 1–12.
- Zhang, J.; Burman, S.; Gunturi, S.; Foley, J.P.; Method development and validation of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for the characterization of a monoclonal antibody; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2010); 53: 1236–1243.

- Suba, D.; Urbányi, Z.; Salgó, A.; Method development and qualification of capillary zone electrophoresis for investigation of therapeutic monoclonal antibody quality; *Journal of Chromatography B*, (2016); 1032: 224–229.
- He, Y.; Lacher, N.A.; Hou, W.; Wang, Q.; Isele, C.; Starkey, J.; Ruesch, M.; Analysis of Identity, Charge Variants, and Disulfide Isomers of Monoclonal Antibodies with Capillary Zone Electrophoresis in an Uncoated Capillary Column; *Analytical chemistry*, (2010); 82: 3222–3230.
- Andrasi, M.; Gyemant, G.; Gaspar, A.; Analysis of Rituximab, A Therapeutic Monoclonal Antibody by Capillary Zone Electrophoresis; *Journal of Chromatography* & Separation Techniques, (2014); 6: 1–8.
- Kubota, K.; Kobayashi, N.; Yabuta, M.; Ohara, M.; Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.; Validation of capillary zone electrophoretic method for evaluating monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates; *Chromatography*, (2016); 37: 117–124.
- Moritz, B.; Locatelli, V.; Niess, M.; Bathke, A.; Kiessig, S.; Entler, B.; Finkler, C.; Wegele, H.; Stracke, J.; Optimization of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of biopharmaceuticals using enhanced method development principles; *Electrophoresis*, (2017); 38: 3136–3146.
- Goyon, A.; Francois, Y.N.; Colas, O.; Beck, A.; Veuthey, J.L.; Guillarme, D.; Highresolution separation of monoclonal antibodies mixtures and their charge variants by an alternative and generic CZE method; *Electrophoresis*, (2018); 39: 2083–2090.
- Kahle, J.; Wätzig, H.; Determination of protein charge variants with (imaged) capillary isoeletric focusing and capillary zone electrophoresis; *Electrophoresis*, (2018); 39: 2492–2511.
- Turner, A.; Schiel, J.E.; Qualification of NISTmAb charge heterogeneity control assays; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2018); 410: 2079–2093.
- ICH. (2005) 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).
- FDA. (2015) Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics.
- Anumula, K.R.; Rapid quantitative determination of sialic acids in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with a sensitive fluorescence detection; *Analytical biochemistry*, (1995); 230: 24–30.

- 40. 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*, (2003); 987: 57–66.
- 41. Vreeker, G.C.M.; Wuhrer, M. Reversed-phase separation methods for glycan analysis; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2017); 409: 359–378.
- 42. Gahoual, R.; Beck, A.; Leize-Wagner, E.; François, Y.N.; Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products; *Journal of Chromatography B*, (2016); 1032: 61–78.

# Table 1

Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing using the multi-variable-at-a-time (MVAT) procedure with the capillary zone electrophoresis (CZE) method.

Factor	Optimal	Low level	High level
EACA solution pH	4.8	4.7	4.9
EACA concentration (mmol/L)	300	290	310
Time injection (s)	5	4	6
Tween 20 concentration (%)	0.03	0.02	0.04

# Table 2

Precision Accuracy Inter-days<sup>a</sup> Repeatability<sup>a</sup> Between-analysts<sup>a</sup>  $\overline{\mathsf{RSD}^b}$  $\overline{\mathsf{RSD}^b}$ Nominal concentration Accuracy<sup>*a*</sup>  $\overline{\mathsf{RSD}^b}$ Bias<sup>c</sup> (mg/mL) (%) (%) (%) Sample (%) (%) 100.73 0.12 0.89 4 0.73 1.90 1 102.59 2.59 0.17 0.86 1.81 5 2 101.51 1.51 1.60 6

Accuracy and precision of CZE method for determining denosumab (DmAb) in pharmaceutical products.

a = Mean of three replicates.

 $^{b}$  = RSD, Relative standard deviation.

 $^{c} = \text{Bias} = [(\text{Measured concentration} - \text{Nominal concentration})/\text{Nominal concentration}] \times 100.$ 

# Table 3

		$CZE^{a}$		SE-HPLC <sup>a</sup>		RP-HPLC <sup>a</sup>		In vitro bioassay <sup>a</sup>				
	Theoretical		Charge		High-molecular-weight	Main			Confidence			
	amount	Found	variants	Monomer	proteins	peak	Fragments	Potency	intervals			
Sample	(mg/mL)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(P = 0.95)			
1	60	100.57	6.19	102.49	0.69	99.98	0.05	99.50	91.40-108.80			
2	60	98.98	5.04	101.10	0.84	97.87	0.04	97.20	89.80-108.10			
3	60	94.23	6.10	95.98	0.36	93.90	0.12	92.80	85.20-101.00			
4	60	106.06	8.44	108.12	0.74	105.33	0.11	104.40	97.60-111.70			
5	60	100.08	6.52	101.97	0.27	99.54	0.12	99.90	93.20-107.10			
6	60	101.79	7.84	102.90	0.92	100.96	0.06	99.80	93.50-106.60			
7	60	95.84	5.11	98.11	0.68	94.12	0.18	95.50	88.50-103.00			
Mean	_	99.65	6.46	101.52	0.64	98.81	0.10	98.44	_			
$\mathrm{SD}^b$	_	3.90	1.28	3.85	0.24	4.00	0.05	3.71	_			
ANOVA between methods: $F$ calculated = 0.88												
$2^c$	_	83.63	6.02	86.11	1.14	81.30	1.23	78.70	68.00–91.10			
$2^d$	_	60.88	7.44	63.54	3.42	58.33	2.54	57.90	49.00-68.20			
$2^e$	_	85.92	6.01	86.13	2.14	83.95	0.94	81.00	70.70-92.90			
$2^{f}$	_	76.73	5.91	79.10	1.97	73.98	1.57	70.90	61.30-81.80			
$2^g$	_	69.85	4.62	71.99	2.63	64.22	2.37	Nt <sup>h</sup>	_			

Analysis of DmAb in pharmaceutical products by CZE, size exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods and bioassay.

<sup>*a*</sup> = Mean of three replicates. <sup>*b*</sup> = SD, Standard deviation. <sup>*c*</sup> = Low pH. <sup>*d*</sup> = High pH. <sup>*e*</sup> = Thermal. <sup>*f*</sup> = Photolytic condition <sup>*g*</sup> = Oxidation. <sup>*h*</sup> = Nt, Not tested.

# **Legends to Figures**

**Figure 1** Capillary zone electrophoresis (CZE) electropherograms showing peaks 1 = aprotinin (APT); peaks 2 = basic variants; peak 3 = denosumab (DmAb); peaks 4 = acid variants. (a) Representative DmAb biological reference substance (BS–DmAb). (b) Pharmaceutical product. BS–DmAb following degradation under conditions of: (c) low pH, (d) high pH, (e) thermal, (f) photo and (g) oxidation. (h) Placebo. (i) Purified water.

**Figure 2** Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during robustness testing for the determination of DmAb by CZE method.

**Figure 3** Reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (RP–HPLC–F) chromatograms showing peaks 1, 2 and 3 = sialic acids. (a) 5  $\mu$ g/mL *N*-acetylneuraminic acid (NANA). (b) Prolia<sup>®</sup> (11.54 mg/mL) and (c) Xgeva<sup>®</sup> (13.57 mg/mL) DmAb formulations. (d) Incubation of Xgeva<sup>®</sup> (13.57 mg/mL) with neuraminidase. (e) Placebo. (f). Blank.













**ARTIGO 2** 

# 5 ARTIGO 2

# EVALUATION OF MONOCLONAL ANTIBODY DENOSUMAB BY VALIDATED BIOASSAY AND SE–HPLC METHOD

Rafaela Ferreira Perobelli Dumoncel<sup>1</sup>, Bruna Xavier<sup>1</sup>, Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior<sup>1</sup>, Francielle Santos da Silva<sup>1</sup> and Sérgio Luiz Dalmora<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria 97105–900, Brazil.

<sup>2</sup>Industrial Pharmacy Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria 97105– 900, Brazil.

\*Correspondence: sdalmora@terra.com.br; Tel.: +55–55–3220–8952

**Abstract:** Denosumab (DmAb) is a biotechnology-derived monoclonal antibody (mAb) that inhibits the osteoclastogenesis, and it is clinically used to treat bone loss. An *in vitro* RAW 264.7 cell-based bioassay was validated for the potency assessment of DmAb, demonstrating excellent linearity, precision, and accuracy. The assay was utilized to assess the bioactivity of DmAb in manufactured formulations, giving mean estimated potency of 100.80%. These results were compared with those obtained by the size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE–HPLC) method, which enabled mean potency 0.07% higher, related to the bioassay. The validated *in vitro* bioassay offers a powerful tool for the potency assessment of DmAb, and provides valuable information, to improve the quality control, and to assure the efficacy and safety of the biotechnology-derived products.

**Key-words:** Denosumab; Monoclonal antibody; RAW 264.7 cell culture bioassay; validation; Size-exclusion high-performance liquid chromatography.

## **1. Introduction**

Denosumab (DmAb) is a tetrameric glycoprotein having a molecular mass of approximately 147 kDa, composed of two heavy chains and two light chains, inter-linked by several disulfide bridges, and having *N*-linked-glycan located in the asparagine 298 [1,2].

DmAb is a fully human monoclonal antibody (mAb) against receptor activator of nuclear factor–kappa  $\beta$  (RANK) ligand (RANKL). It prevents RANKL from binding to its receptor, RANK, on the surface of osteoclasts, thereby blocking their maturation, function, survival, and activity, resulting in a decrease of bone resorption [3]. In terms of therapeutic applications, DmAb is approved for various indications, including multiple myeloma, giant cell tumor of bone, osteoporosis, bone loss in men being treated for prostate cancer and women being treated for breast cancer [4,5].

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are composed by complex structures and due to the developing processes (cell culture, purification, formulation, and storage), an indepth analysis is necessary [6]. Such as DmAb, most of the mAbs are produced in mammalian cells where the cellular machinery can conduct complex post-translational modifications (PTMs), and they have many surface-exposed areas that are prone to modifications. These events are the leading causes of structural heterogeneities. Characterization and control of these PTMs are critical to ensure antibody quality and to define any potential effects on the ultimate safety and potency of mAbs therapeutics. The PTMs can affect biological function, efficient secretion, efficacy, and stability [7].

The biopharmaceutical industry currently uses different tools to analyze the quality attributes individually, which requires substantial time and resources [8]. Basic cornerstones are the analysis of charge-heterogeneity, the determination of the protein structure and glycosylation profiling, the detection and characterization of aggregation, and oxidation of amino acid residues [9,10]. In addition, bioactivity is another critical and relevant attribute measured by the bioassay [11]. Then, analytical methods are of utmost importance during all steps of the manufacturing process and a combination of various analytical techniques for characterization needs to be applied [12,13]. An useful method to analyze aggregates is the size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE–HPLC) [14].

Therapeutic mAbs have been show a rapid development in the treatment of various diseases [15,16]. Currently, there are two commercially available formulations of DmAb; Xgeva<sup>®</sup> and Prolia<sup>®</sup> [1,2]. Considerable works have been performed to characterize mAbs in order to ensure their quality [17–19]. Less information is available for DmAb proteins, and individual method development and validation will usually be necessary, as a general

standardized protocol for DmAb analysis is currently not available [20,21]. Moreover, as some patents of mAbs products are expiring, the development of similar biotherapeutic products is becoming more popular and the establishment of an efficient platform for quality analysis is critical development [22].

In this context, the aim of this work was to validate an antiproliferative RAW 264.7 cell-based bioassay for the potency assessment of DmAb in pharmaceutical formulations, and to correlate the results with those of the SE–HPLC method. Thus, contribute to the establishment of methodologies to improve evaluation of quality attributes, during formulation development and for quality control of marketed products.

#### 2. Material and methods

#### 2.1 Chemicals and reagents

Commercial samples of Prolia<sup>®</sup> and Xgeva<sup>®</sup> from Amgen (São Paulo, Brazil), with a label claiming 60 mg/mL and 120 mg/1.7 mL of DmAb, respectively, within the expiry date, were acquired from commercial sources. AlamarBlue<sup>TM</sup> cell viability reagent was obtained from Thermo Scientific (Vantaa, Finland), macrophage colony stimulating factor (M–CSF) was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) (Herts, UK) and human RANKL was obtained from ABCAM (San Francisco, CA, USA). Foetal bovine serum (FBS) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium chloride, sodium hydroxide (NaOH), potassium phosphates and sorbitol were privided by Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained using Merck Millipore (Bedford, MA, USA) Milli–Q A10 system.

# 2.2 Apparatus

*In vitro* bioassays were accomplished using a Thermo Scientific Water Jacketed CO<sub>2</sub> incubator and Thermo Scientific Varioskan<sup>®</sup> Flash microplate reader. SE–HPLC experiments were performed using a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC system equipped with a photodiode array detector and LC Solution Version 1.22 SP1 data acquisition software.

#### 2.3 Reference and sample solutions

All reference solutions of DmAb were prepared from the medicine Xgeva<sup>®</sup>, that was used as the representative DmAb biological reference substance (BS–DmAb). BS–DmAb and

samples of Prolia<sup>®</sup> were diluted in water for injection to 1 mg/mL for the *in vitro* bioassay, and in purified water to a final concentration of 5 mg/mL for the SE–HPLC method.

#### 2.4 Antiproliferative RAW 264.7 in vitro bioassay

The antiproliferative bioassay was accomplished in triplicate, in 96-plates, following the procedure described elsewhere [21], to determine the bioactivity of DmAb on human RANKL induced osteoclast differentiation. RAW 264.7 macrophage cells (ATCC<sup>®</sup> TIB–71<sup>TM</sup>) were seeded a density of  $6 \times 10^3$  cells per well and were incubated with 30 ng/mL human RANKL peptide and 30 ng/mL M–CSF for 4 days, to differentiate into functional osteoclasts. Following the incubation, five concentration ranges of BS–DmAb and DmAb, starting with 10 µg/mL, were added and the bioassay plates were incubated for 2 days. Finally, 20 µL per well alamarBlue<sup>TM</sup> reagent was added, followed by 4 h incubation. The cells were kept in an atmosphere of 95% (v/v) air and 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, at 37 °C, during this study. The responses were quantified in absorbance mode with a microplate reader. The CombiStats<sup>TM</sup> software developed by the EDQM was used to assess the potencies, by the parallel-line statistical method. The assays were valid with respect to parameters required by the software, i.e. regression, linearity and parallelism, and yielded highly consistent results.

# 2.4.1 Validation of the bioassay

The performance of the *in vitro* bioassay was investigated using pharmaceutical products of Prolia<sup>®</sup> and Xgeva<sup>®</sup>. The validation parameters were determined following specific guidelines: specificity, linearity, robustness, accuracy, and precision [23–25].

#### 2.4.1.1 Specificity

To determine the bioassay specificity, the biopharmaceutical samples were independently spiked with known amounts of ramucirumab (10 mg/mL), certozulimab pegol (200 mg/mL), recombinant human growth hormone (4 IU/mL) and interleukin-11 (5 mg/mL). Interference from the formulation excipients was determined by using a sample containing only a placebo (in-house mixture of sorbitol, acetate, polysorbate 20, and NaOH to adjust to pH 5.2) [1,2].

#### 2.4.1.2 Linearity

Linearity was determined by the dose-response curve, constructed over the  $1.0-1,000 \mu g/mL$  range. The results were subjected to regression analysis by the least squares method, to calculate the calibration equation and determination coefficient.

# 2.4.1.3 Precision and accuracy

Bioassay precision was determined by means of repeatability (intra-days) and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of the same DmAb concentrations, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision was assessed by analysis of two samples (1 and 2) on two different days (interday), and also by two different analysts, in the same laboratory (between-analysts). The bioassay accuracy was evaluated by recovering known amounts of BS–DmAb, that was added in an inhouse mixture of excipients, to obtain solutions at concentrations of 0.8–800  $\mu$ g/mL, 1.0–1,000  $\mu$ g/mL and 1.2–1,200  $\mu$ g/mL, equivalent to 80, 100, 120% of the nominal concentrations, respectively. Accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation; it was expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and the added concentrations.

#### 2.4.1.4 Robustness

The bioassay robustness was determined by analyzing a DmAb sample under a variety of conditions of the bioassay parameters: FBS concentration, cell concentration, incubation time with AlamarBlue, and time of exposure to DmAb. To assess the stability of DmAb samples, analyses were performed after their storage at 2–8 °C for 24 and 48 h. The experiments were performed, and any changes in potency assessment were registered, as compared with freshly prepared solutions.

# 2.5 SE-HPLC procedure

Analyses were accomplished by adjusting previously published method [21]. The method carried out on a TSKGel G3000SW<sub>XL</sub> column (300 mm  $\times$  7.8 mm, 5 µm, 125 Å) kept at 25 °C. The mobile phase composition was 200 mmol/L sodium chloride, 8 mmol/L potassium phosphate dibasic, and 1 mmol/L potassium phosphate monobasic, pH 7.4. The flow rate was 1.0 mL/min and the detector operating at 214 nm. Injection volume was 1 µL of a solution containing 5 mg/mL DmAb.

# 2.6 Analysis of pharmaceutical products

Six batches of pharmaceutical products of DmAb, available for clinical use, were selected and labelled from 1 to 6, and subjected to the validated *in vitro* bioassay and the SE-HPLC method.

#### 3. Results and discussion

#### 3.1 Optimization of the RAW 264.7 cell line in vitro bioassay

As previously observed in an *in vitro* assay, treatment of the RAW 264.7 macrophage cells (ATCC<sup>®</sup> number TIB–71<sup>TM</sup>) with different concentrations of DmAb resulted in reduction of the cell proliferation [20]. Then, the inhibition of osteoclast cells proliferation and the bioactivity of DmAb were investigated on RAW 264.7 cells, showing high inhibition of cells proliferation in a dose-dependent manner. Thus, the RAW 264.7 cell line of macrophages, that serves as osteoclast precursors, was selected and the bioassay was developed based on the mechanism of action associated with DmAb. The incubation with M–CSF and human RANKL stimulates osteoclastogenesis and lead to formation of functional osteoclasts [21]. The bioassay conditions were optimized under parameters described in the robustness (Table 2), which include days of exposure to human RANKL peptide and M–CSF, and time of exposure to DmAb.

# 3.2 Validation of the RAW 264.7 in vitro bioassay

The bioassay was validated with Xgeva<sup>®</sup> as a reference, and samples of pharmaceutical product Prolia<sup>®</sup>. The assays were performed with the doses in triplicate. The spiked pharmaceutical samples were evaluated showing non-significant differences between the potencies, which confirmed the specificity of the bioassay (p > 0.05). The dose-response curves of the bioassay were found to be linear over the range 10–1,000 µg/mL. The determination coefficient ( $r^2$ ), calculated from  $y = -0.0874 \ x + 0.7479$ , was  $r^2 = 0.9996$  and confirmed the linearity.

The repeatability was studied from six assays and the obtained relative standard deviation (RSD%) was 6.21%. The RSD% values for intermediate precision were found to be 0.82% and 0.43% for interday precision and 0.42% and 0.76%, for between-analysts precision, as demonstrated in Table 2. The accuracy of the bioassay was assessed and the absolute means obtained, with a value of 102.33% and with bias lower than 3.60% (Table 2), confirmed that the bioassay will accurately capture the biological activity of DmAb products.

The results of the robustness and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 2, together with the optimized values. There were no significant changes in the potencies calculated, when modifications were introduced into the experimental conditions, thus showing the bioassay to be robust. The stability of the DmAb sample solutions was assessed and the data obtained showed non-significant changes (RSD < 2%), relative to freshly prepared samples, as recommended, after maintained at 2–8 °C for 48 h.

# 3.3 Potency assessment by SE-HPLC method and validated bioassay

The SE–HPLC method was optimized performing the experiments with higher analytic concentration (5 mg/mL), as close as clinically used for DmAb, with less dilution steps. The lower injection volume (1  $\mu$ L) enabled these optimizations without effects in detector saturation and with no clustering of peaks. The TSKGel 3000SW<sub>XL</sub> column (separation range of 10 up to around 500 kDa) was selected due to the detection and assessment of dimmers (300 kDa) and the monomer peak of DmAb (150 kDa). The retention times of high molecular weight (HMW) proteins and monomer (DmAb) were 7.3 and 8.6 min, respectively, and run time of 15 min. Typical chromatograms obtained by the analyses of DmAb by the new SE–HPLC method were demonstrated in Figure 1, showing the similarity of the products tested, with comparable retention time, and percent of monomer area. Then, six pharmaceutical samples of DmAb were subjected to the SE–HPLC analysis giving estimated content potency of 100.87%, with differences of 8.34% between the lots manufactured. HMW proteins were also evaluated showing mean values of 1.32%, with differences of 1.56% between the batches, demonstrating comparable content of HMW proteins (Table 3).

The validated RAW 264.7 *in vitro* bioassay was used to assess the potency of the same batches of DmAb pharmaceutical products, giving the results demonstrated in Table 3, with differences of 11.70% between the lots manufactured. Besides, the bioassay enabled estimated potencies 0.07% lower related to the SE–HPLC method. The correlation between the bioassay and SE–HPLC method were demonstrated by Pearson's correlation coefficient (*r*), which showed value of 0.96.

It is convenient to mention that the bioassay measures the activity of the product, which is an important quality attribute, and ensures the integrity of the mAb with respect to its higher order structure, especially when the direct assessment of the structure is challenging. The bioassay can also provide useful information when a drug substance has more than one form and a manufacturing change shifts the distribution of forms, determination of the bioactivity of the various forms may be of value in assessing the impact of the change [7,11].

The advances enabled by the biotechnology resulted in new products available for clinical use. Innovator's product information remains proprietary and is not widely available. Therefore, the biosimilar manufacturer begins with only the final product and must work to develop a process to produce the biosimilar product [22]. Then, in general, the identity, heterogeneity, impurity content, and activity of each new batch of mAb has to be investigated before release, and the analytical technologies by biological, physicochemical and immunological methods are necessary [8].

#### 4. Conclusion

The RAW 264.7 cell culture bioassay was validated and demonstrated the accuracy, precision and specificity for the potency assessment of DmAb pharmaceutical formulations. Moreover, the reported methodologies and the results achieved, contribute to establish a series of tools forming a favorable analysis platform, that can be used to define well-characterized the biotechnology-derived medicine, monitoring the bioactivity, aggregation, oxidation, charge variants and sialylation of DmAb. Besides, the combination of the methods would be essential to analyze DmAb formulations and they may also be relevant for future biosimilarity studies of the biomolecule.

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

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

# References

- [1] Amgen, PRODUCT MONOGRAPH Prolia<sup>®</sup> (denosumab) 60 mg/mL solution for injection, Canada Inc., Mississauga, Ontario, 2019a. Available online: https://www.amgen.ca/products/~/media/1e79aee7d94340df88c3d97f5bb897c3.ashx.
- [2] Amgen, PRODUCT MONOGRAPH Xgeva<sup>®</sup> (denosumab) 120 mg/1.7mL solution for injection, Canada Inc., Mississauga, Ontario, 2019b. Available online: https://www.amgen.ca/products/~/media/e06e33ed57d8457c8bc1509ceced41d9.ashx.
- [3] HANLEY, D. A. et al. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes.International Journal of Clinical Practice, v. 66, n. 12, p. 1139–1146, 2012.
- [4] LEWIECKI, E. M. New and emerging concepts in the use of denosumab for the treatment of osteoporosis. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, v. 10, n. 11, p. 209–223, 2018.
- [5] LUENGO-ALONSO, G. et al. Denosumab treatment for giant-cell tumor of bone: a systematic review of the literature. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, v. 139, n. 10, p. 1339–1349, 2019.
- [6] XU, Y. et al. Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies. In: MAbs, v. 11, n. 2, p. 239–264, 2018.
- [7] AMBROGELLY, A. et al. Analytical comparability study of recombinant monoclonal antibody therapeutics. **In: MAbs**, v. 10, n. 4, 513–538, 2018.
- [8] CERUTTI, M. L. et al. Physicochemical and biological characterization of RTXM83, a new rituximab biosimilar. BioDrugs, v. 33, n. 3, p. 307–319, 2019.
- [9] KAHLE, J.; WÄTZIG, H. Determination of protein charge variants with (imaged) capillary isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis. Electrophoresis, v. 39, n. 20, p. 2492–2511, 2018.
- [10] EBBERS, H. C. et al. Batch-to-Batch Consistency of SB4 and SB2, Etanercept and Infliximab Biosimilars. BioDrugs, v. 34, p. 225–233, 2020.
- [11] WANG, X. et al. Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. Protein & Cell, p. 1–12, 2018.
- [12] GROTEFEND, S. et al. Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 71, p. 127–138, 2012.

- [13] WANG, D. et al. Analytical artifacts in characterization of recombinant monoclonal antibody therapeutics. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 183, p. 1–9, 2020.
- [14] FARJAMI, A. et al. Stability-Indicating Size Exclusion Chromatography Method for the Analysis of IgG mAb-Cetuximab. Chromatographia, v. 82, n. 4, p. 767–776, 2019.
- [15] KAPLON, H.; REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2021. In MAbs, v. 13, n. 1, p. 1–34, 2021.
- [16] TAYLOR, P. C. et al. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19.Nature Reviews Immunology, v. 21, p. 382–393, 2021.
- [17] MARTÍNEZ-ORTEGA, A. et al. Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab. Journal of Pharmaceutical Analysis, v. 6, n. 2, p. 117–124, 2016.
- [18] HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ J. et al. Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles. International Journal of Biological Macromolecules, v. 118, p. 511–524, 2018.
- [19] TURNER, A.; SCHIEL, J. E. Qualification of NISTmAb charge heterogeneity control assays. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 410, n. 8, p. 2079–2093, 2018.
- [20] KOSTENUIK, P. J. et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. Journal of Bone and Mineral Research, v. 24, n. 2, p. 182–195, 2009.
- [21] PEROBELLI, R. F. et al. Quantitation of the monoclonal antibody Denosumab by bioassay and validated LC methods. International Journal of Biological Macromolecules, v. 119, p. 96–104, 2018.
- [22] MOORKENS, E.; VULTO, A. G.; HUYS, I. An overview of patents on therapeutic monoclonal antibodies in Europe: are they a hurdle to biosimilar market entry? In MAbs, p. 1743517, 2020.
- [23] ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1). November 2005.
- [24] FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. July 2015.
[25] USP, United States Pharmacopeia, 43 ed., Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2021.

## Table 1

Accuracy and precision of bioassay for determining denosumab (DmAb) in pharmaceutical products.

	Accuracy		Precision			
			Repeatability <sup>a</sup>	Sample	Between-analysts <sup><i>a</i></sup>	Inter-days <sup>a</sup>
Nominal concentration	Accuracy <sup>a</sup>	Bias <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup>		RSD <sup>c</sup>	RSD <sup>c</sup>
$(\mu g/mL)$	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)
0.8-800	102.88	2.87	6.21	1	0.42	0.82
1.0–1,000	103.60	3.60		2	0.76	0.43
1.2–1.200	100.50	0.50				

a = Mean of three replicates.

 $^{b}$  = Bias = [(Measured concentration – Nominal concentration)/Nominal concentration] × 100.

 $^{c}$  = RSD, Relative standard deviation.

# Table 2

Robustness of osteoclast antiproliferative bioassay for determining denosumab (DmAb) in pharmaceutical products.

Variable	Range investigated	DmAb potency	Confidence interval	Optimized value
		(%)	(p = 0.95)	
Cell number	5.5	97.40	83.40-113.90	6
(×10 <sup>3</sup> )	6.0	103.00	86.60-122.40	
	6.5	102.40	94.20–111.30	
Incubation time with AlamarBlue reagent	3.0	98.00	88.10–109.00	4
(h)	4.0	101.00	86.30–118.20	
	5.0	108.70	95.70–118.90	
FBS	0	102.70	86.80–121.40	2
(%)	2.0	97.80	85.30-112.10	
	4.0	105.80	90.20-124.10	
Time of exposure to DmAb	46	108.00	95.20–122.60	48
(h)	48	100.30	85.10-118.20	
	50	104.60	93.50-117.00	
Batches of FBS	1.0	96.50	85.00–109.60	_
	2.0	103.40	88.80-120.30	
	3.0	105.00	89.60-122.90	
Batches of AlamarBlue reagent	1.0	100.80	82.90-122.60	_
	2.0	96.80	81.20–115.40	

DmAb solution stability	Room temperature, 24h	93.20	84.00–103.40 –
	Room temperature, 48h	92.10	92.10–100.80
	Refrigerator, 24h	115.30	106.60–124.80
	Refrigerator, 48h	100.00	93.30–107.20

a = Mean of three replicates.

 $^{b}$  = RSD, Relative standard deviation.

## Table 3

		In vitro Bio	In vitro Bioassay <sup>a</sup>		SE–HPLC <sup>a</sup>	
Sample	Theoretical amount	Potency	Confidence intervals	Monomer	HMW <sup>c</sup> proteins	
	(mg/mL)	(%)	(P = 0.95)	(%)	(%)	
1	60	97.50	87.90 - 108.20	97.88	1.43	
2	60	99.60	88.00 - 112.70	98.83	0.47	
3	60	107.40	97.80 - 117.80	105.21	1.98	
4	60	95.70	86.70 - 105.60	96.87	2.03	
5	60	101.50	94.40 - 109.10	102.15	1.46	
6	60	103.10	92.80 - 114.60	104.28	0.57	
Mean	_	100.80	_	100.87	1.32	
$SD^{b}$	_	4.19	_	3.50	0.67	

Analysis of DmAb in pharmaceutical products by bioassay and size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) method.

<sup>*a*</sup> Mean of three replicates; <sup>*b*</sup> SD, Standard deviation; <sup>*c*</sup> HMW, High molecular weight.

### Legend to Figure

**Figure 1.** SE–HPLC chromatograms of the medicines Xgeva<sup>®</sup> and Prolia<sup>®</sup> injecting 1  $\mu$ L at concentrations of 5 mg/mL, showing: peak 1 = high molecular weight (HMW) proteins; peak 2 = denosumab (DmAb). (a) Medicinal product Xgeva<sup>®</sup>, used as representative DmAb biological reference substance (BS–DmAb). (b) Medicinal product Prolia<sup>®</sup>.





DISCUSSÃO

### 6 DISCUSSÃO

Os avanços científicos na área de biotecnologia possibilitaram a produção dos mAbs, e seu uso clínico tem aumentado progressivamente. Os processos biotecnológicos são complexos, mas a eficácia e segurança dos produtos, combinadas com resultados positivos no tratamento de doenças que não respondiam a tratamentos convencionais, estão impulsionando as ações das Indústrias Farmacêuticas, observando-se neste momento, o início de uso de mAbs no tratamento da COVID-19 (BRASIL, 2021).

Algumas empresas internacionais, e também as nacionais, estão envolvidas em projetos biotecnológicos em parceria com o Ministério da Saúde, com foco predominantemente, na produção de biossimilares (SALERNO et al., 2018). Mas, para que estes possam ser produzidos e aprovados para uso na área clínica, necessitam de tecnologias analíticas que demonstrem estrutura, eficácia e segurança semelhantes às do produto biológico novo (BRASIL, 2010, BRASIL, 2011). Os processos de produção e as metodologias analíticas para controle da qualidade lote a lote dos produtos são geralmente de domínio das empresas detentoras da patente de registro, em geral multinacionais (EMA, 2017).

No Brasil, a área Farmacêutica ainda é dominada por produtos importados, com elevado custo de produção e consequentemente de comercialização. A patente do DmAb está prevista para expirar no ano de 2022 em alguns países da União Europeia e 2025 nos Estados Unidos (BUSSE; LÜFTNER, 2019). Considerando a efetividade dos produtos na melhora dos resultados de saúde, bem como a extensão de seus usos clínicos desde que foi registrado, é provável um movimento crescente em torno dos biossimilares da biomolécula. As referências científicas descrevem trabalhos relacionados ao desenvolvimento de metodologias analíticas para mAbs, utilizando métodos e equipamentos específicos, mas observa-se a ausência de trabalhos que apresentem modelos ou ferramentas de aplicação para controle de qualidade do DmAb, imprescindíveis para que os biossimilares sejam aceitos pela ANVISA, ou até mesmo em nível internacional. Além disso, ainda não existem monografias farmacopeicas para sua análise.

A eficácia clínica dos mAbs, e especialmente do DmAb, pode ser muito influenciada por pequenas variações estruturais e pelo processo de produção, tornando necessário o desenvolvimento de métodos que possam contribuir para a completa caracterização da biomolécula. Neste contexto, foram realizados estudos de métodos por ECZ e CL–FR–F, bem como a validação do bioensaio *in vitro*, complementando os métodos por CL–EM e CL–FR,

previamente estudados (PEROBELLI et al., 2018). A discussão a seguir está baseada nas pesquisas apresentadas nos Artigos 1 e 2 (Seções 4 e 5), nos quais estão detalhados os métodos estudados e os resultados experimentais encontrados.

#### 6.1 ARTIGO 1

Conforme apresentado, neste trabalho foi desenvolvido e validado método por ECZ para quantificação de DmAb em produtos biofarmacêuticos e para avaliação de suas variantes de carga. As estratégias analíticas adotadas para estabelecer as condições do método asseguraram a separação das variantes de carga do DmAb em capilar de sílica fundida convencional. As variantes básicas e ácidas migraram antes e após o pico do DmAb, respectivamente, que apresentou tempo de migração de 18,1 min, conforme ilustrado nas Figuras 1. Para assegurar a precisão entre as injeções, a aprotinina (APT) foi utilizada como padrão interno, com tempo de migração de 11,3 min, motivo pelo qual o tempo de análise do método foi mais longo que o convencional. Como não existe padrão internacional para o DmAb e há dificuldade para obtenção de substância ativa certificada junto a fornecedores qualificados, optou-se pelo uso do produto comercial Xgeva<sup>®</sup> 120 mg/1,7 mL como substância de referência (BS–DmAb) para a validação do método analítico e análise dos produtos acabados Prolia<sup>®</sup>.

A validação do método foi realizada avaliando os seguintes parâmetros: adequabilidade do sistema, especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. Os resultados obtidos durante a avaliação da adequabilidade do sistema eletroforético cumpriram todas as especificações preconizadas, além de desvio padrão relativo (DPR) inferior a 1%. Deste modo, as condições analíticas estabelecidas garantem resultados confiáveis (SHABIR, 2003). Os estudos de degradação forçada demonstraram o perfil de degradação do DmAb e das variantes de carga frente a condições de estresse ácido, básico, fotolítico, oxidativo e térmico. A especificidade foi confirmada também pela avaliação da interferência dos excipientes da formulação e da água utilizada para diluição das amostras.

A curva de calibração foi linear na faixa de concentração de 0,95–20 mg/mL ( $r^2 = 0,999$ ). A análise estatística foi realizada com o software STATGRAPHICS, ao nível de confiança de 5%. Os limites de detecção e quantificação foram 0,31 e 0,95 mg/mL, respectivamente. A aplicação de pequenas modificações nos parâmetros analíticos (através de um planejamento multivariado) confirmaram a robustez. A exatidão média foi de 101,61% com "bias" inferior a 2,59%. Os valores de DPR inferiores a 1,90% confirmaram a precisão,

uma vez que a literatura preconiza valores menores ou iguais a 2% (SHABIR, 2003). Por fim, o método por ECZ cumpriu os requisitos preconizados para os parâmetros validação, de acordo com os guias internacionais (FDA, 2015; ICH, 2005) e foi então empregado para quantificação de DmAb.

Sete lotes de produtos biofarmacêuticos de DmAb, com teor declarado de 60 mg/mL, foram analisados pelos métodos validados por ECZ, CL–FR, CL–EM e pelo bioensaio *in vitro* (Tabela 3). Observou-se que os teores/potências de DmAb determinados nos produtos pelo método por ECZ foram em média 1,87% menores e 0,84% maiores, em relação aos métodos por CL–EM e CL–FR, respectivamente, e 1,21% maiores quando comparados ao bioensaio em células, com diferenças não significativas (p > 0,05), calculadas pela análise de variância (ANOVA). Os valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) foram calculados e indicaram correlação significativa entre os métodos (r > 0,98). As condições de degradação forçada foram aplicadas para o lote 2 do produto, e os efeitos sobre a atividade biológica foram demonstrados através do bioensaio *in vitro*.

Paralelamente a técnica por ECZ, foi desenvolvido método por CL-FR-F para determinar o conteúdo de ácidos siálicos da biomolécula de DmAb. O ácido siálico presente em IgGs endógenas é o NANA, presente também na região Fc das cadeias pesadas de mAbs expressos em células CHO, incluindo o DmAb (AMBROGELLY et al., 2018). A ferramenta proposta por Anumula (1995) para determinação de ácidos siálicos em glicoproteínas e adaptada pelo grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2016) para eritropoietina, foi estudada e otimizada para as formulações biofarmacêuticas de DmAb (Xgeva® e Prolia®). Os cromatogramas da análise das formulações demonstraram três picos com tempos de retenção de 9,2, 10,9, e 12,0 min (Figura 3c), identificados como ácidos siálicos da biomolécula de DmAb, confirmados pela análise da substância de referência NANA (Figura 3a). Amostras de água ultrapurificada (utilizada para diluição das amostras) e de placebo (mistura dos excipientes da formulação) foram também analisadas, demonstrando não interferir nas determinações. Uma curva de calibração do NANA na faixa de concentração de 1-15 µg/mL foi construída (y =  $(5.258.297,08) x - (2.218.335,94), r^2 = 0,999$ , regressão linear significativa) e foi utilizada para determinar a quantidade de ácidos siálicos em um lote das formulações Prolia<sup>®</sup> e Xgeva<sup>®</sup>. As concentrações obtidas foram de 0,16 e 0,17 µg ácido siálico/mg DmAb, respectivamente.

#### 6.2 ARTIGO 2

O estudo de um único método não é suficiente para analisar um produto biotecnológico, e a validação é essencial para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Por este motivo, o bioensaio previamente estudado (PEROBELLI et al., 2018) foi submetido a um protocolo de validação de acordo com as recomendações dos guias internacionais. A validação foi realizada avaliando parâmetros de especificidade, precisão, exatidão e robustez. A especificidade foi confirmada pela avaliação da interferência dos excipientes da formulação. A região linear da curva dose resposta foi na faixa de concentração de 10–1000  $\mu$ g/mL ( $r^2 = 0,9996$ ). A exatidão média foi 101,61% com bias inferior a 2,59%, e os valores de DPR inferiores a 1,90% confirmaram a precisão. A aplicação de pequenas modificações nos parâmetros do bioensaio confirmaram a robustez. Nesse contexto, o bioensaio cumpriu os requisitos preconizados para os parâmetros validação, de acordo com as recomendações da Farmacopeia Americana (USP 43, 2021).

O método por CL–EM (PEROBELLI et al., 2018) foi otimizado, passando-se a utilizar volume de injeção de 1  $\mu$ L e concentração de análise do DmAb de 5 mg/mL. A coluna cromatográfica TSKGel 3000SW<sub>XL</sub> Tosoh Bioscience (300 mm × 7,8 mm, 5  $\mu$ m, 125 Å, separação de biomoléculas entre 10 a 500 kDa) foi mantida a 25°C e é adequada para separação do DmAb (147 kDa) e suas proteínas de alta massa molecular, evitando a exclusão de outros possíveis componentes. O tempo de análise foi mantido em 15 min, com tempo de retenção das proteínas de alta massa molecular em 7,3 min e do DmAb em 8,6 min.

Sete lotes de produtos biofarmacêuticos de DmAb, com teor declarado de 60 mg/mL, foram analisados pelo bioensaio *in vitro* validado e pelo método por CL–EM otimizado (Tabela 3). Observou-se que os teores/potências de DmAb determinados nos produtos pelo biensaio foram em média 1,87% menores em relação ao método por CL–EM, com diferenças não significativas (p > 0,05), calculadas pelo Teste *t* de Student. Os valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) foram calculados e indicaram correlação significativa entre os métodos (r > 0,96).

Por sua vez, com os avanços alcançados nos estudos dos métodos analíticos para mAbs, percebeu-se que o método por CL–FR para análise de DmAb e seus fragmentos (PEROBELLI et al., 2018) também poderia ser aprimorado. O método por CL–FR foi então modificado, utilizando a coluna Zorbax<sup>®</sup> 300–SB C18 (5 μm, 300 Å, 150 mm × 4,6 mm) Agilent, que apresenta estabilidade em pH baixo e em altas temperaturas (até 90 °C), adequada ao uso de fases móveis compostas por TFA e que permitiu a execução do método a 80 °C. Essas alterações viabilizaram aumento na eficiência de separação, com redução da viscosidade da fase móvel e da pressão gerada no equipamento. O tempo de análise foi

reduzido de 25 min para 15 min, com tempo de retenção do DmAb em 5,1 min. A utilização de volume de injeção de 1 µL viabilizou manter a concentração de análise dos produtos biofarmacêuticos em 5 mg/mL. As modificações nos métodos cromatográficos foram importantes para identificação e caracterização do anticorpo monoclonal alvo em concentrações de análise o mais próximas possíveis daquelas utilizadas na prática clínica, para o DmAb 60 mg/mL (Prolia<sup>®</sup>) e 70,59 mg/mL (Xgeva<sup>®</sup>). A saturação do detector e a resolução das proteínas relacionadas serviram como parâmetro para as escolhas (dados não mostrados).

Portanto, as pesquisas realizadas demonstram a eficiência dos métodos para avaliação de DmAb em produtos biofarmacêuticos, destacando-se a especificidade da técnica por ECZ para monitorar as variantes de carga, a capacidade de separação e quantificação de proteínas de alto ou baixo peso molecular por CL–EM, a avaliação de fragmentos por CL–FR e a determinação dos resíduos de ácidos siálicos por CL–FR–F. No mesmo sentido, o bioensaio por cultura de células *in vitro* para avaliação da atividade biológica. Este conjunto de tecnologias possibilita identificar a integridade da biomolécula nas formulações biofarmacêuticas disponíveis para uso clínico, bem como avaliar as modificações e degradações que podem ocorrer durante sua produção, condições de transporte e armazenamento. A combinação dos métodos eletroforético, cromatográficos e o bioensaio constitui-se em importante contribuição que pode ser aplicada nas etapas do processo de produção, purificação, formulação e para os produtos acabados, garantindo os atributos de qualidade e segurança. Por fim, a pesquisa estabelece bases para a área Farmacêutica avançar no estudo de biossimilares de DmAb.

CONCLUSÃO

### 7 CONCLUSÃO

- a) Desenvolveu-se e validou-se método por ECZ que forneceu resultados de acordo com os requisitos preconizados, para quantificação de DmAb em produtos biotecnológicos, bem como para avaliação de variantes de carga.
- b) Otimizou-se método por CL-FR-F para quantificação dos resíduos de ácidos siálicos nas moléculas de DmAb em produtos biofarmacêuticos.
- c) Otimizou-se e validou-se o bioensaio antiproliferativo da osteoclastogênese por cultura de células RAW 264,7 *in vitro*, que forneceu resultados de acordo com os requisitos preconizados, para avaliação da atividade biológica do DmAb.
- d) Otimizou-se e aplicou-se o método por CL–EM para quantificação do DmAb e avaliação de proteínas de alta massa molecular em formulações biofarmacêuticas.
- e) Otimizou-se e aplicou-se o método por CL-FR para quantificação do DmAb e a avaliação de fragmentos em formulações biofarmacêuticas.
- f) Recomenda-se a avaliação de DmAb em formulações biofarmacêuticas através do uso em conjunto dos métodos físico-químicos apresentados, em combinação com o bioensaio por cultura de células *in vitro*, pois viabiliza a determinação de variantes de carga, proteínas de alta massa molecular, fragmentos, resíduos de ácidos siálicos e atividade biológica de DmAb, e representa contribuição importante para complementar a caracterização da biomolécula.
- g) Os métodos estudados nesta tese de doutorado estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos e contribuem para aprimorar o controle da qualidade na área de produtos biotecnológicos disponíveis e em pesquisa no País.

REFERÊNCIAS

### REFERÊNCIAS

AMBROGELLY, A. et al. Analytical comparability study of recombinant monoclonal antibody therapeutics. **In: MAbs,** v. 10, n. 4, 513–538, 2018.

AMGEN. Prolia Product Monograph, 2019a.

AMGEN. Prolia<sup>®</sup> (denosumab) Product Information. 2015.

AMGEN. Xgeva Product Monograph, 2019b.

AN, Y. et al. A new tool for monoclonal antibody analysis: application of IdeS proteolysis in IgG domain-specific characterization, **In MAbs**, v. 6, p. 879–893, 2014.

ANDRASI, M.et al. Analysis of Rituximab, A Therapeutic Monoclonal Antibody by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Chromatography & Separation Techniques**, v. 6, n. 259, p. 2, 2014.

ANUMULA, K. R. Rapid quantitative determination of sialic acids in glycoproteins by highperformance liquid chromatography with a sensitive fluorescence detection. **Analytical Biochemistry**, v. 230, n. 1, p. 24–30, 1995.

ARTHUR, K. K. et al. *In vitro* stoichiometry of complexes between the soluble RANK ligand and the monoclonal antibody denosumab. **Biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 795–806, 2012.

BOBALY, B. et al. Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. II–enzymatic and chemical sample preparation. **Journal of Chromatography B**, v. 1060, p. 325–335, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa autoriza uso emergencial de novo medicamento para Covid-19**. 2021. Disponível em: <u>https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-autoriza-uso-emergencial-de-novo-medicamento-para-covid-19</u> acesso em 31 de agosto de 2021.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 55, de 16 de dezembro de 2010. **Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências.** 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 224, de 26 de março de 2014. **Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose.** 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME.** 2020. BUSSE, A.; LÜFTNER, D. What does the pipeline promise about upcoming biosimilar antibodies in oncology?. Breast Care, v. 14, n. 1, p. 10–16, 2019.

CERUTTI, M. L. et al. Physicochemical and Biological Characterization of RTXM83, a New Rituximab Biosimilar. **BioDrugs**, v. 33, n. 3, p. 307–319, 2019.

CHANG, B. et al. Treatment of osteoporosis, with a focus on 2 monoclonal antibodies. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 24, p. 8758–8766, 2018.

CHEN, Q. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of single-dose denosumab in healthy Chinese volunteers: A randomized, single-blind, placebo-controlled study. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. 1–13, 2018.

CHIRINO, A. J.; MIRE-SLUIS, A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1383–1391, 2004.

COMPSTON, J. et al. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. **Archives of Osteoporosis,** v. 12, n. 1–2, p. 1–24, 2017.

EASTELL, R. et al. Postmenopausal osteoporosis. **Nature Reviews Disease Primers,** v. 2, p. 1–16, 2016.

EBBERS, H. C. et al. Batch-to-Batch Consistency of SB4 and SB2, Etanercept and Infliximab Biosimilars. **BioDrugs**, v. 34, p. 225–233, 2020.

EMA, European Medicines Agency: Guideline on development, production, characterization and specification for monoclonal antibodies and related products. 2016.

EMA, European Medicines Agency: Medicamentos biossimilares na UE. 2017.

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

ESPINOSA-DE LA GARZA, C. E. et al. Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 34, n. 8, p. 1133–1140, 2013.

ESPOSITO, Mark; GUISE, Theresa; KANG, Yibin. The biology of bone metastasis. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 8, n. 6, p. 1–16, 2018.

FAIENZA, M. F. et al. Monoclonal antibodies for treating osteoporosis. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 18, n. 2, p. 149–157, 2018.

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

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

FEKETE, S. et al. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 74–83, 2013a.

FEKETE, S. et al. High resolution reversed phase analysis of recombinant monoclonal antibodies by ultra-high pressure liquid chromatography column coupling. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 83, p. 273–278, 2013b.

FEKETE, S. et al. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: theory and applications. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 69, p. 9–27, 2012.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

GOYON, A. et al. Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies. **Journal of Chromatography B**, v. 1065, p. 119–128, 2017.

GRAHAM G.; RUSSELL, R. Pharmacological diversity among drugs that inhibit bone resorption. **Current Opinion in Pharmacology,** v. 22, p. 115–130, 2015.

HANLEY, D. A. et al. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. **International Journal of Clinical Practice,** v. 66, n. 12, p. 1139–1146, 2012.

HE, Y. et al. Analysis of identity, charge variants, and disulfide isomers of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in an uncoated capillary column. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 8, p. 3222–3230, 2010.

HE, Y. et al. Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 5, p. 548–555, 2011.

HELAS, S. et al. Inhibition of receptor activator of NF-κB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 2, p. 473–478, 2009.

HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ J. et al. Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 511–524, 2018.

HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ J. et al. The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography with Diode Array Detection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 4, p. 1405–1418, 2016.

HOFBAUER, L. C. et al. Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL. Arthritis & Rheumatology, v. 60, n. 5, p. 1427–1437, 2009.

HURT, A. C.; WHEATLEY, A. K. Neutralizing Antibody Therapeutics for COVID-19. Viruses, v. 13, n. 4, p. 628–643, 2021.

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

JIANG, X. et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 2, p. 101–111, 2011.

JIN, Z. et al. Minireview: Nuclear receptor regulation of osteoclast and bone remodeling. **Molecular Endocrinology,** v. 29, n. 2, p. 172–186, 2015.

KAHLE, J.; WÄTZIG, H. Determination of protein charge variants with (imaged) capillary isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 39, n. 20, p. 2492–2511, 2018.

KANIS J. A. et al. Guideline of the American College of Physicians on the treatment of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 29, n. 7, p. 1505–1510, 2018.

KAPLON, H.; REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2021. **In MAbs**, v. 13, n. 1, p. 1–34, 2021.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 4<sup>a</sup> edição. Guanabara Koogan, 2017.

KATSIMBRI, P. The biology of normal bone remodelling. **European Journal of Cancer** care, v. 26, n. 6, p. 1–5, 2017.

KENNEDY, P. J. et al. Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 394–408, 2018.

KOSTENUIK, P. J. et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. Journal of Bone and Mineral Research, v. 24, n. 2, p. 182–195, 2009.

LACEY, D. L. et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 5, p. 401–419, 2012.

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

LUENGO-ALONSO, G. et al. Denosumab treatment for giant-cell tumor of bone: a systematic review of the literature. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 139, n. 10, p. 1339–1349, 2019.

MACEDO, F. et al. Bone metastases: an overview. **Oncology Reviews,** v. 11, n. 1, p. 43–49, 2017.

MACHADO, F. T. et al. Validation of an Alternative Cell Culture Bioassay for the Potency Assessment of Recombinant Human Erythropoietin. Alternatives to Laboratory Animals – ATLA, v. 44, p. 113–120, 2016.

MALDANER, F. P. S. **Avaliação da potência do hormônio da paratireoide humano recombinante por bioensaio, métodos cromatográficos e eletroforético.** 2017. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

MARTIN, T. J.; SIMS, N. A. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 2, p. 131–139, 2015.

MARTÍNEZ-ORTEGA, A. et al. Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab. **Journal of Pharmaceutical Analysis,** v. 6, n. 2, p. 117–124, 2016.

MORITZ, B. et al. Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies. **Journal of Chromatography B**, v. 983, p. 101–110, 2015.

MORITZ, B. et al. Optimization of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of biopharmaceuticals using enhanced method development principles. **Electrophoresis**, v. 38, n. 24, p. 3136–3146, 2017.

NAVAS, N. et al. Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP) HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 29, p. 9351–9363, 2013.

ONAMI, I. et al. A versatile method for protein-based antigen bioanalysis in non-clinical pharmacokinetics studies of a human monoclonal antibody drug by an immunoaffinity liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1334, p. 64–71, 2014.

PARR, M. K. et al. Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 130, p. 366–389, 2016.

PAUL, M. et al. Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 282–290, 2012.

PEROBELLI, R. F. **Estudo de Métodos Cromatográficos e Ensaio Biológico para Avaliação do Anticorpo Monoclonal Denosumabe.** 2017. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

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

PROLIA<sup>:</sup> denosumabe. Taboão da Serra: Amgen Biotecnologia do Brasil Ltda, 2019. Bula de remédio.

RADOMINSKI, S. C. et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, p. 452–466, 2017.

RATANJI, K. D. et al. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. **Journal of Immunotoxicology,** v. 11, n. 2, p. 99–109, 2014.

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. Journal of Chromatography A, v. 1158, n. 1–2, p. 111–125, 2007.

SALERNO, M. S. et al. Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento. 2018.

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.

SHAKERI, A. et al. Romosozumab (sclerostin monoclonal antibody) for the treatment of osteoporosis in postmenopausal women: A review. **Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. e25–e31, 2020.

SHI, Y. et al. Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb. **Journal of Chromatography B**, v. 906, p. 63–68, 2012.

SHIDA, H. et al. LC–MS/MS method for denosumab quantitation in human serum with rapid protein digestion using immobilized trypsin. **Bioanalysis**, v. 10, n. 18, p. 1501–1510, 2018.

SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. **Physiology**, v. 31, n. 3, p. 233–245, 2016.

SINGH, A. S. et al. Giant-cell tumor of bone: treatment options and role of denosumab. **Biologics: Targets & Therapy**, v. 9, p. 69–74, 2015.

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

SOUTO, R. B. Estudos analíticos para caracterização e avaliação de interleucina–11 humana recombinante. 2015. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

STADLMANN, J. et al. Analytical and functional aspects of antibody sialylation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 1, p. 15–19, 2010.

SUBA, D. et al. Method development and qualification of capillary zone electrophoresis for investigation of therapeutic monoclonal antibody quality. **Journal of Chromatography B**, v. 1032, p. 224–229, 2016.

SUTJANDRA, L. et al. Population pharmacokinetic meta-analysis of denosumab in healthy subjects and postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 50, n. 12, p. 793–807, 2011.

SWAMULU, K. et al. Validated RP-HPLC Method for the Estimation of Denosumab in Formulation. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, v. 1, n. 1, p. 66–73, 2012.

TAYLOR, P. C. et al. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. **Nature Reviews Immunology,** v. 21, p. 382–393, 2021.

THOMAS, A. et al. Antibody–drug conjugates for cancer therapy. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 6, p. e254–e262, 2016.

TURNER, A.; SCHIEL, J. E. Qualification of NISTmAb charge heterogeneity control assays. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 8, p. 2079–2093, 2018.

USP, United States Pharmacopeia, 43 ed., Rockville: **The United States Pharmacopeia Convention**, 2021.

VANPUTTE, C. et al. Anatomia e Fisiologia de Seeley. 10<sup>a</sup> edição. McGraw Hill Brasil, 2016.

VOETEN, R. L. C. et al. Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 1464–1481, 2018.

VREEKER, G. C. M.; WUHRER, M. Reversed-phase separation methods for glycan analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 2, p. 359–378, 2017.

WALSH, J. S. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. **Surgery-Oxford International Edition**, v. 36, n. 1, p. 1–6, 2017.

WANG, Q. et al. Novel strategy using tryptic peptide immunoaffinity-based LC–MS/MS to quantify denosumab in monkey serum. **Bioanalysis**, v. 9, n. 19, p. 1451–1463, 2017.

WANG, W. et al. Antibody structure, instability, and formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 1, p. 1–26, 2007.

WANG, X. et al. Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. **Protein & Cell,** p. 1–12, 2018.

WANG, X. et al. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. **MAbs**, v. 1, n. 3, p. 254–267, 2009.

WATIER, H.; REICHERT, J. M. Evolution of Antibody Therapeutics. **Protein Therapeutics**, p. 25–49, 2017.

WATTS, N. B.; MANSON, J. E. Osteoporosis and fracture risk evaluation and management: shared decision making in clinical practice. **Jama**, v. 317, n. 3, p. 253–254, 2017.

WEI, B. et al. Glycation of antibodies: Modification, methods and potential effects on biological functions. **In: MAbs,** v. 9, n. 4, 586–594, 2017.

WEIDLE, U. H. et al. Molecular mechanisms of bone metastasis. Cancer Genomics-Proteomics, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2016.

WILLSON, T. et al. The clinical epidemiology of male osteoporosis: a review of the recent literature. **Clinical Epidemiology**, v. 7, p. 65–76, 2015.

WINZER, M. et al. Antibodies for the Treatment of Bone Diseases: Clinical Data. In **Principles of Osteoimmunology**, p. 239–255, 2016.

WU, H. et al. Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. **FEBS Letters,** v. 588, n. 6, p. 936–941, 2014.

XGEVA: denosumabe. Taboão da Serra: Amgen Biotecnologia do Brasil Ltda, 2019. Bula de remédio.

XU, Y. et al. Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies. **In: MAbs**, v. 11, n. 2, p. 239–264, 2018.

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

ZHANG, L. et al. Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. **In MAbs**, v. 8, n. 2, p. 205–215, 2016.