

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

**ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA  
AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE FILGRASTIMA E  
CORRELAÇÃO COM ENSAIO BIOLÓGICO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Silvia Maria krug Masiero**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA  
AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE FILGRASTIMA E  
CORRELAÇÃO COM ENSAIO BIOLÓGICO**

**por**

**Silvia Maria Krug Masiero**

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

**Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

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

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

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

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

**ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO  
DE POTÊNCIA DE FILGRASTIMA E CORRELAÇÃO COM ENSAIO  
BIOLÓGICO**

elaborada por  
**Silvia Maria Krug Masiero**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

**Maria Teresa Ribela, Dr<sup>a</sup>.** (IPEN-USP)

**Clarice Madalena Bueno Rolin, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

Santa Maria, 23 de junho de 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis;

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

aos colegas e bolsistas dos Laboratórios de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos, em especial ao Técnico de Laboratório João Luiz Rizzi e a Médica Veterinária Silvana F. Vaccari pelo carinho, apoio, auxílio e amizade;

aos colegas e bolsistas do Centro de Bioequivalência, em especial Liberato Brum Júnior, Marcio Fronza, Paulo Renato de Oliveira e Thiago Barth, pelo carinho, apoio, auxílio e amizade;

aos meus pais, Rodolpho Krug Filho e Honorina Severo Krug, pelo amor, educação e incentivo na passagem de mais uma etapa;

ao meu marido, Jaime Masiero, e ao meu amado filho, Victor Krug Masiero pelo amor, apoio, incentivo e compreensão;

ao meu sogro, Santo Masiero e a minha sogra, Gladys A. N. Masiero, pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão;

à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

a todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a execução deste trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade!

## RESUMO

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

### **ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE FILGRASTIMA E CORRELAÇÃO COM ENSAIO BIOLÓGICO**

AUTORA: SILVIA MARIA KRUG MASIERO

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de junho de 2006.

O fator estimulador da colônia de granulócitos humanos é uma citocina hematopoiética que estimula e regula a proliferação e diferenciação de células precursoras de neutrófilos da medula óssea. O hormônio recombinante (rhG-CSF) sob a forma não-glicosilada, filgrastima, é usado para o tratamento de neutropenias. Realizou-se a identificação de filgrastima em produtos farmacêuticos por eletroforese, transferência e detecção com anticorpos específicos, demonstrando-se banda única na região de peso molecular de, aproximadamente, 18,8 kDa. Avaliou-se a atividade pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos da linhagem BALB/c, pré-tratados com ifosfamida. Desenvolveu-se e validou-se o método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR), utilizando coluna Júpiter C<sub>4</sub> 300 Å (250 mm x 4,6 mm, i.d.), mantida a temperatura ambiente. A fase móvel A foi constituída de água/acetoneitrila (90:10, V/V)/ 0,1% ácido trifluoroacético e a fase móvel B de água/acetoneitrila (20:80, V/V)/ 0,1% ácido trifluoroacético, eluída em gradiente na vazão de 0,5 mL/min com detecção no ultravioleta a 280 nm. A análise cromatográfica viabilizou a separação da filgrastima no tempo de retenção de 31,9 min, sendo linear na faixa de concentração de 10 – 300 µg/mL. Avaliaram-se os parâmetros de precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Estudou-se também a especificidade, através da determinação da pureza do pico da Substância biológica de referência de rhG-CSF, submetida à degradação sob condições oxidativas. O método proposto foi utilizado para análise de filgrastima em produtos farmacêuticos, determinando-se as formas de sulfóxidos e desamidados. Paralelamente, efetuaram-se avaliações de potência por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM), determinando as formas diméricas e de alta massa molecular. Amostras de produtos farmacêuticos foram submetidas a condições de agregação e degradação e, então, avaliadas pelo bioensaio da neutropenia em

camundongos, obtendo-se atividades biológicas de 14,60%, 13,47% e 15,63%, para os dímeros, substâncias de alta massa molecular e sulfóxidos/desamidados, respectivamente. Estudou-se a correlação entre métodos e demonstrou-se que as análises dos produtos farmacêuticos forneceram diferenças médias 2,04% menor por CL-FR, e significativa de 4,03% menor por CL-EM, em relação ao ensaio biológico. Devido à reduzida bioatividade das formas alteradas, conclui-se sugerindo a adoção do método por CL-EM para a avaliação de potência de filgrastima, em combinação com CL-FR. Desse modo, estabeleceu-se alternativa no contexto da substituição do uso de animais, contribuindo para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biológico.

Palavras-chave: fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante, neutropenia, validação, cromatografia líquida, filgrastima.

## **ABSTRACT**

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

### **STUDY OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR THE POTENCY EVALUATION OF FILGRASTIM AND CORRELATION WITH BIOLOGICAL ASSAY**

AUTHOR: SILVIA MARIA KRUG MASIERO

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, June 23, 2006.

The granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is a hematopoietic cytokine that stimulates and regulates the proliferation and differentiation of neutrophil precursor cells of the bone marrow. The recombinant hormone (rhG-CSF) non-glycosylated, filgrastim, is used to treat the neutropenia induced by chemotherapy and bone marrow transplantation. The identification and characterization was carried out by electrophoresis and western blotting, showing the typical band in the region of 18.8 kDa. The neutropenia mouse bioassay was standardized with the BALB/c strain, previously treated with ifosfamide and used for the potency assessment of pharmaceutical products. A gradient reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) was validated for the analysis of rhG-CSF in pharmaceutical formulations. The LC method was carried out on a Jupiter C<sub>4</sub> column 300 Å (250 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at ambient temperature. The mobile phase A consisted of water:acetonitrile (90:10, v/v) with 0.1% trifluoroacetic acid and the mobile phase B was water:acetonitrile (20:80, v/v) with 0.1% trifluoroacetic acid, run at a flow rate of 0.5 mL/min with detection at 280 nm. The chromatographic separation was obtained with the retention time of 31.9 minutes and the method was linear in the range of 10 – 300 µg/mL. Validation parameters such as sensitivity, precision, accuracy, detection limit, quantitation limit and robustness were evaluated giving results in the acceptable range. The specificity was evaluated by the peak purity of the rhG-CSF biological reference preparation subjected to oxidative conditions. The proposed method was applied for the analysis of filgrastim pharmaceutical products, evaluating the sulphoxides and deamidates forms as well. Moreover, the size-exclusion chromatography (SE-LC) was performed for the potency evaluation of

filgrastim, dimers and high-molecular-mass forms. Samples of pharmaceutical formulations were subjected to aggregation, degradation and then each one evaluated by the neutropenia mouse bioassay giving biological activities of 14.60%, 13.47% and 15.63%, for the dimers, high-molecular-mass substances and the sulphoxides/deamidates, respectively. The pharmaceutical samples were analysed by the chromatographic methods and compared to the bioassay showing mean difference between the estimated potencies of 2.04% lower for the RP-LC, and 4.03% lower for the SE-LC, with significant correlation ( $p > 0.05$ ). Due to the reduced bioactivity of the rhG-CSF-related proteins, the SE-LC is proposed in combination with the RP-LC as an alternative to the bioassay for the potency assessment of filgrastim in pharmaceutical dosage forms. The alternative established represents a contribution towards the replacement of the animals improving the quality control and assuring the safety and efficacy of the biological product.

Keywords: recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, neutropenia, validation, liquid chromatography, filgrastim.



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Estrutura primária da filgrastima, segundo Herman et al., 1996 .....  
22
- FIGURA 2 – Estrutura cristalina da filgrastima – Adaptada de Hill et al., 1993 ..... 23
- FIGURA 3 – Perfil em membrana de nitrocelulose com banda, obtida após detecção de filgrastima com anticorpos específicos e revelação com fosfatase alcalina. Coluna *M* – marcador de peso molecular, Coluna *P* – Substância biológica de referência de rhG-CSF, Colunas 1 a 11 – produtos farmacêuticos ..... 49
- FIGURA 4 – Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida em fase reversa na concentração de 200 µg/mL: (A) Substância biológica de referência de rhG-CSF: pico 1 – principal. (B) Substância biológica de referência de rhG-CSF, após oxidação: pico 1 – peróxido de hidrogênio, pico 2 – desamidados, pico 3 – sulfóxidos e pico 4 – principal. Condições cromatográficas: Coluna Júpiter C<sub>4</sub> 300 Å (250 mm x 4,6 mm); fase móvel A: água/acetonitrila (90:10, V/V)/ 0,1% TFA e fase móvel B: água/acetonitrila (20:80, V/V)/ 0,1% TFA; vazão: 0,5 mL/min; detecção: 280 nm ..... 53
- FIGURA 5 – Representação gráfica da curva de calibração da Substância biológica de referência de rhG-CSF obtida por cromatografia líquida em fase reversa, na faixa de 10 a 300 µg/mL (n = 3) ..... 54
- FIGURA 6 – Representação gráfica da avaliação comparativa de potência de filgrastima nos produtos farmacêuticos pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos e por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) ..... 62
- FIGURA 7 – Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida por exclusão molecular na concentração de 200 µg/mL: (A) Substância biológica de referência de rhG-CSF: pico 1 –

monômero e pico 2 – excipientes, (B) Produto farmacêutico: pico 1 – substâncias de a massa molecular, pico 2 – dímeros, pico 3 – monômero e pico 4 – excipientes. Condições cromatográficas: Coluna BioSep-SEC-S 2000 (300 mm x 7,8 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1 M pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; detecção: 214 nm ..... 63

FIGURA 8 – Representação gráfica da avaliação comparativa de potência de filgrastima nos produtos farmacêuticos pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos e por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) ..... 66

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 – Parâmetros do método analítico otimizado por cromatografia líquida em fase reversa .....   | 38 |
| TABELA 2 – Gradiente linear utilizado no método por cromatografia líquida em fase reversa .....   | 38 |
| TABELA 3 – Contagens de neutrófilos determinadas pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos no produto farmacêutico 1 de filgrastima e na Substância biológica de referência de rhG-CSF .....              | 50 |
| TABELA 4 – Potência, limites de confiança (P=0,95) e precisão das estimativas dos ensaios independentes e combinados, de filgrastima no produto farmacêutico 1, pelo bioensaio da neutropenia em camundongos .....  | 51 |
| TABELA 5 – Potência, limites de confiança (P=0,95) e precisão das estimativas, dos ensaios independentes e combinados dos produtos farmacêuticos de filgrastima, pelo bioensaio da neutropenia em camundongos ..... | 52 |
| TABELA 6 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da Substância biológica de referência de rhG-CSF, por cromatografia líquida em fase reversa .....   | 54 |
| TABELA 7 – Resultados da curva de calibração calculados pelo método dos mínimos quadrados .....   | 55 |
| TABELA 8 – Análise de variância das áreas dos cromatogramas obtidos na determinação da curva de calibração .....  | 55 |

|  |    |
|--|----|
| TABELA 9 – Determinação da precisão intradia do método de análise de filgrastima cromatografia líquida em fase reversa .....   | 56 |
| TABELA 10 – Determinação da precisão interdias do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa .....   | 56 |
| TABELA 11 – Determinação da precisão entre analistas do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa .....   | 57 |
| TABELA 12 – Determinação da exatidão do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa .....   | 57 |
| TABELA 13 – Resultados da avaliação da robustez do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa .....  | 58 |
| TABELA 14 – Resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico .....   | 59 |
| TABELA 15 – Determinação das percentagens do pico principal, e dos desamidados/sulfóxidos, obtidas na análise de filgrastima nos produtos farmacêuticos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) .....                  | 60 |
| TABELA 16 – Determinação comparativa de filgrastima em produtos farmacêuticos pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos e por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) .....                                      | 61 |
| TABELA 17 – Determinação das percentagens de monômero, dímeros e substâncias de alta massa molecular obtidas na análise de filgrastima nos produtos farmacêuticos por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) ..... | 64 |
| TABELA 18 – Avaliação comparativa de potência de filgrastima nos produtos farmacêuticos pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos e por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) .....                     | 65 |

|   |    |
|---|----|
| TABELA 19 – Determinação da atividade biológica das substâncias de alta massa molecular, dímeros, sulfóxidos/desamidados de filgrastima, analisados por cromatografia líquida por exclusão molecular e em fase reversa e submetidas ao ensaio biológico da neutropenia em camundongos ..... | 67 |
|---|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                |  |
|----------------|--|
| ACN            | Acetonitrila   |
| ANOVA          | Análise de variância   |
| CHO            | Células de ovário de hamster chinês                                      |
| CL             | Cromatografia líquida  |
| CL-EM          | Cromatografia líquida por exclusão molecular                             |
| CL-FR          | Cromatografia líquida em fase reversa                                    |
| CV%            | Coefficiente de variação percentual                                      |
| Da             | Dalton   |
| DAD            | Detector de arranjos de diodos   |
| DNA            | Ácido desoxiribonucléico   |
| DP             | Desvio padrão  |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA           | Ácido etilenodiaminotetracético  |
| EP             | Farmacopéia Européia   |
| FDA            | Food and Drug Administration   |
| G-CSF          | Fator estimulador da colônia de granulócitos                             |
| GL             | Graus de liberdade   |
| G-NSF-60       | Células da linhagem mielóide leucêmica de camundongo dependente de G-CSF |
| hG-CSF         | Fator estimulador da colônia de granulócitos humanos                     |
| HIV            | Vírus da Imunodeficiência Humana   |
| HL-60          | Células leucêmicas promielocíticas humanas                               |
| hs             | Horas  |
| ICH            | International Conference on Harmonisation                                |
| kDa            | Kilodalton   |
| kg             | Kilograma  |
| LD             | Limite de detecção   |
| LQ             | Limite de quantificação  |
| M              | Molaridade   |
| Met            | Metionina  |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| mg                      | Miligrama  |
| min                     | Minuto   |
| mL                      | Mililitro  |
| mm                      | Milímetro  |
| mM                      | Milimol  |
| N                       | Normalidade  |
| N°                      | Número   |
| NFS-60                  | Células da linhagem mielóide leucêmica de camundongos              |
| NIBSC                   | National Institute for Biological Standards and Control            |
| nm                      | Nanômetro  |
| NOMO-1                  | Célula de leucemia mielóide humana                                 |
| pg                      | Picograma  |
| r <sup>2</sup>          | Coefficiente de determinação                                       |
| rhG-CSF                 | Fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante  |
| SBR-rhG-CSF             | Substância biológica de referência de rhG-CSF                      |
| SDS-PAGE                | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio |
| TFA                     | Ácido trifluoroacético   |
| UFMS                    | Universidade Federal de Santa Maria                                |
| USP                     | Farmacopéia Americana  |
| UV                      | Ultravioleta   |
| WHO                     | Organização mundial da Saúde                                       |
| ° C                     | Grau centígrado  |
| µm                      | Micrômetro   |
| µg                      | Micrograma   |
| µL                      | Micro litro  |
| <sup>3</sup> H-timidina | Timidina tritiada  |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 18 |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | 21 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 30 |
| <b>3.1 MATERIAL</b> .....   | 31 |
| 3.1.1 Substância biológica de referência (SBR) e anticorpos .....               | 31 |
| 3.1.2 Produtos farmacêuticos comerciais .....                                   | 31 |
| 3.1.3 Solventes e reagentes .....   | 31 |
| 3.1.4 Equipamentos e acessórios .....   | 33 |
| 3.1.5 Animais de laboratório .....  | 34 |
| <b>3.2 MÉTODOS</b> .....  | 35 |
| 3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência e imunodeteção ..... | 35 |
| 3.2.1.1 Preparação do marcador de peso molecular .....                          | 35 |
| 3.2.1.2 Preparação da solução da SBR-rhG-CSF e das amostras não-reduzidas ..... | 35 |
| 3.2.1.3 Procedimento .....  | 35 |
| 3.2.2 Ensaio biológico da neutropenia em camundongos .....                      | 36 |
| 3.2.2.1 Preparação da solução tampão pH 7,4 com albumina .....                  | 36 |
| 3.2.2.2 Preparação da solução de ifosfamida .....                               | 36 |
| 3.2.2.3 Preparação da solução da SBR-rhG-CSF .....                              | 36 |
| 3.2.2.4 Preparação das amostras .....   | 36 |
| 3.2.2.5 Seleção dos animais e planejamento do ensaio .....                      | 37 |
| 3.2.2.6 Procedimento .....  | 37 |



|  |    |
|--|----|
| 3.2.2.7 Contagem de neutrófilos por microscopia .....                                      | 37 |
| 3.2.2.8 Análise estatística .....  |    |
| 3.2.3 Cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) .....                                  | 38 |
| 3.2.3.1 Preparação da fase móvel .....   | 39 |
| 3.2.3.2 Preparação da solução da SBR-rhG-CSF .....   | 39 |
| 3.2.3.3 Preparação das amostras .....  | 39 |
| 3.2.3.4 Validação do método analítico por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) .. | 39 |
| 3.2.3.4.1 Especificidade .....   | 40 |
| 3.2.3.4.2 Linearidade .....  | 40 |
| 3.2.3.4.3 Precisão .....   | 40 |
| 3.2.3.4.3.1 Repetibilidade .....   | 40 |
| 3.2.3.4.3.2 Precisão intermediária .....   | 41 |
| 3.2.3.4.3.2.1 Interdias .....  | 41 |
| 3.2.3.4.3.2.2 Entre analistas .....  | 41 |
| 3.2.3.4.3.3 Cálculos .....   | 41 |
| 3.2.3.4.4 Exatidão .....   | 42 |
| 3.2.3.4.4.1 Cálculos .....   | 42 |
| 3.2.3.4.5 Limite de deteção (LD) .....   | 43 |
| 3.2.3.4.6 Limite de quantificação (LQ) .....   | 43 |
| 3.2.3.4.7 Robustez .....   | 44 |
| 3.2.3.4.8 Teste de performance do sistema cromatográfico .....                             | 44 |
| 3.2.4 Avaliação de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) .....     | 44 |
| 3.2.4.1 Preparação das amostras .....  | 44 |
| 3.2.4.2 Preparação dos sulfóxidos/desamidados .....  | 44 |
| 3.2.4.2.1 Cálculos .....   | 45 |
| 3.2.5 Avaliação de filgrastima por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) .. | 45 |
| 3.2.5.1 Preparação da fase móvel .....   | 45 |
| 3.2.5.2 Preparação da solução da SBR-rhG-CSF .....   | 45 |
| 3.2.5.3 Preparação das amostras .....  | 46 |
| 3.2.5.4 Preparação dos dímeros .....   | 46 |
| 3.2.5.4.1 Cálculos .....   | 46 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.5.5 Preparação das substâncias de alta massa molecular .....  | 46        |
| 3.2.5.5.1 Cálculos .....  | 47        |
| 3.2.5.6 Procedimento .....  | 47        |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | <b>48</b> |
| 4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção com anticorpos específicos .....                   | 49        |
| 4.2 Avaliação de potência de filgrastima pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos .....      | 50        |
| 4.3 Validação do método analítico por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) .....               | 53        |
| 4.4 Determinação de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) .....                 | 59        |
| 4.5 Avaliação da potência de filgrastima por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) ..... | 63        |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....  | <b>68</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES</b> .....   | <b>72</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>74</b> |
| <b>8 ANEXOS</b> .....   | <b>81</b> |
| 8.1 Publicação científica .....   | 82        |

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

O fator estimulador da colônia de granulócitos humanos (hG-CSF) é uma citocina hematopoiética, produzida pelos macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, que atua nas células progenitoras granulocíticas, estimulando a proliferação, diferenciação e potencialização da atividade biológica dos neutrófilos maduros.

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a clonagem e expressão do gene humano do G-CSF em células de mamíferos (células de ovário de hamster chinês-CHO) e em bactérias (*Escherichia coli*), entre outras. Desse modo, foi expresso o fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante (rhG-CSF), que se encontra disponível sob as formas não-glicosilada, denominada filgrastima, objeto do presente trabalho, e glicosilada, lenograstima. A ausência da cadeia O-glicosilada não tem influência sobre a atividade biológica (DEMETRI & GRIFFIN, 1991; WELTE et al., 1996; PEREIRA, 2002).

Estruturalmente, a filgrastima é constituída por uma cadeia polipeptídica de 174 aminoácidos, com duas pontes dissulfeto e uma metionina N-terminal adicional. O peso molecular é de, aproximadamente, 18,8 kDa.

A filgrastima foi clonada e purificada, na década de 80, sendo aprovada para uso clínico pela Agência Americana (FDA) em 1991, e se encontra disponível para uso terapêutico no Brasil (ZSEBO et al., 1986; JEONG & LEE, 2001; DEF, 2006). É indicada para promover a recuperação de neutrófilos em neutropenia induzida ou causada pela quimioterapia com mielossuppressores, no transplante e degeneração da medula óssea e em neutropenia associada com a síndrome mielodisplástica ou anemia aplástica (HERMAN et al., 1996; RUBENSTEIN, 2000).

A atividade biológica de rhG-CSF tem sido avaliada por ensaios *in vivo* baseados no uso de animais pré-tratados com fármacos anti-neoplásicos para indução da neutropenia e posterior contagem do número de neutrófilos (SHIMAMURA et al., 1987; MATSUZAKI et al., 1996). Além disso, têm sido pesquisados procedimentos baseados na cultura de células primárias e linhagens, entre as quais se destacam NFS-60 e G-NFS-60 dependente desse fator de crescimento. Porém, os ensaios *in vitro* necessitam de estudos adicionais de validação, para que possam constituir-se em alternativa para a avaliação de potência dos produtos

farmacêuticos (NISSEN et al., 1994; HAMMERLING et al., 1995; YAMAGUCHI et al., 1997; YUN et al., 2005).

É importante observar que a presença de formas degradadas ou relacionadas nas proteínas recombinantes de uso terapêutico pode causar efeitos indesejáveis e apresentar atividade farmacológica reduzida ou nula. Desse modo, devem ser submetidas a técnicas de controle da qualidade para determinar o conteúdo de cada forma, estabelecendo-se limites nos produtos farmacêuticos. Nesse sentido, encontram-se disponíveis diferentes metodologias analíticas para a avaliação da identidade, pureza e potência dos produtos farmacêuticos. A cromatografia líquida por exclusão molecular e em fase reversa viabiliza a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas, e tem sido utilizada para avaliação comparativa com os bioensaios que expressam a atividade biológica. Entretanto, diferentemente dos demais medicamentos, em geral é necessária a combinação de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos para monitorar a instabilidade física e química, e para sua completa caracterização. Convém acrescentar que, após o desenvolvimento do método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que o procedimento atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (FEDERICI, 1994; ICH, 1996; WANG, 1999).

Destaca-se que, após décadas de estudos com produtos biológicos, alcançou-se o estágio no qual a atividade de algumas proteínas pôde ser correlacionada com análises físico-químicas. Assim, atualmente as pesquisas direcionam-se no sentido de aprimorar os ensaios e substituir os animais em experimentos biológicos. Nesse contexto, as análises de correlação têm possibilitado avanços que resultaram no desenvolvimento de novas alternativas para o controle da qualidade (BRISTOW & JEFFCOATE, 1992; HENDRIKSEN et al., 2002).

O presente trabalho teve por objetivos: a) realizar a identificação de filgrastima por eletroforese e detecção com anticorpos específicos; b) avaliar a potência pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos; c) efetuar análise por cromatografia líquida por exclusão molecular; d) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa; e) determinar proteínas relacionadas e degradadas, avaliando sua atividade biológica; f) estudar correlação entre os métodos cromatográficos e biológico. Desse modo, pretende-se estabelecer alternativas no contexto da substituição dos animais, contribuindo para garantir a qualidade, segurança e eficácia terapêutica dos produtos biológicos.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A filgrastima é uma proteína hidrofóbica com peso molecular de, aproximadamente, 18,8 kDa, com cadeia polipeptídica de 174 aminoácidos, contendo duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições (Cis<sup>36, 42</sup> e Cis<sup>64, 74</sup>) com uma cisteína livre em sua forma reduzida (SH), na posição 17 e dois resíduos de triptofano nas posições 58 e 118. Seu ponto isoelétrico (pI) é de 6,2. A filgrastima produzida pela tecnologia do DNA recombinante apresenta seqüência de aminoácidos idêntica ao G-CSF humano, com uma metionina N-terminal adicional, e difere pela ausência de O-glicosilação que não é essencial para a atividade biológica da molécula. A estrutura primária está representada na Figura 1 (LU et al., 1989; OH-EDA et al., 1990; HERMAN et al., 1996; LU et al., 1999).

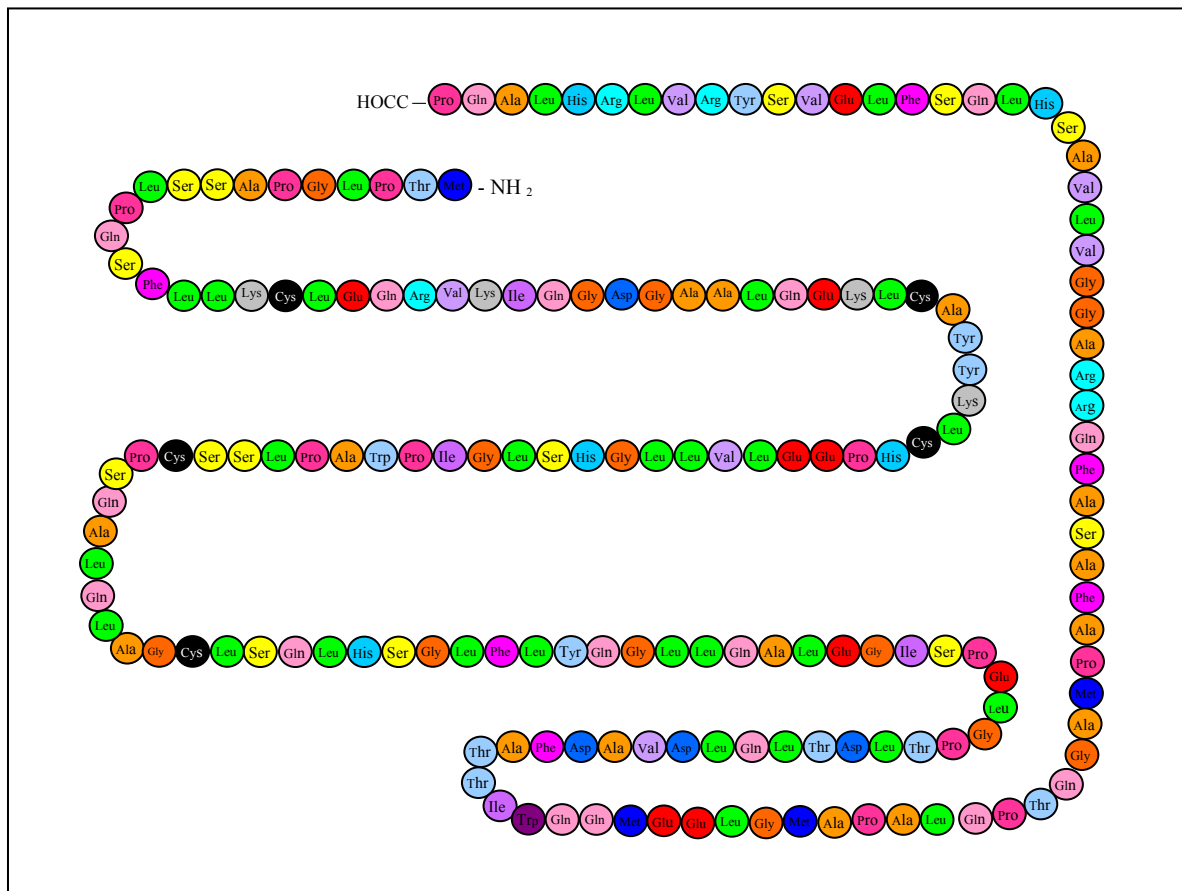


Figura 1 – Estrutura primária da filgrastima, segundo Herman et al., 1996.

A expressão do gene do G-CSF humano, que se localiza no cromossoma 17, foi realizada a partir do RNA mensageiro isolado do subclone 5637 da linhagem celular de carcinoma de vesícula biliar ou de linhagem de tumor de células CHU-2 e o cDNA do G-CSF clonado em *Escherichia coli*. Os autores efetuaram a purificação e caracterização, observando que a proteína recombinante apresentava atividade biológica semelhante ao hormônio humano (WELTE et al., 1985; NAGATA et al., 1986; NOMURA et al., 1986).

A estrutura tridimensional da filgrastima expressa em *E.coli* foi determinada por cristalografia de raios-X, demonstrando semelhança estrutural entre os fatores de crescimento, mesmo com diferenças nos aminoácidos. É composta por quatro hélices, denominadas A, B, C e D, como mostra a Figura 2. A hélice A forma-se entre os resíduos 11- 39, a B entre 71-91, a C entre 100-123 e a D entre 143-172 (HILL et al., 1993; RASO et al., 2005).

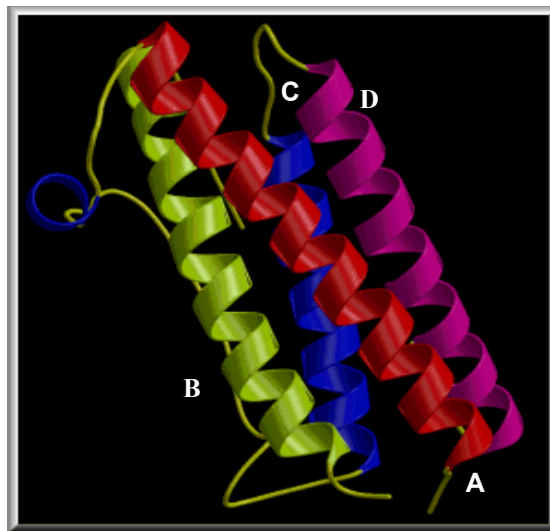


Figura 2 – Estrutura cristalina da filgrastima – Adaptada de Hill et al., 1993.

A filgrastima estimula a proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas e aumenta a atividade funcional de neutrófilos. Clinicamente, é indicada para reduzir a neutropenia após transplante de medula óssea, aumento de células para transplante e em terapia mielotóxica em infecção por HIV. Do mesmo modo, no tratamento de pacientes com doenças não-mielóides que recebem fármacos mielossupressores, para tratar enfermidades neutropênicas congênitas e idiopáticas, auto-enxerto e quimioterapia



(LIESCHKE & BURGESS, 1992; FRAMPTON et al., 1994; HERNANDEZ-BERNAL et al., 2005; RINGDÉN et al., 2005). O produto farmacêutico é usado por via intravenosa ou subcutânea com administrações diárias (HARDMAN et al., 2001).

Saito et al. (2002) investigaram a secreção de citocinas, especialmente as interleucinas-1, 6 e 8, pela linhagem de células NOMO-1 e monócitos isolados de sangue humano, previamente tratados com G-CSF e estimuladas por lipopolissacarídeos. Observaram efeito direto e modulador que poderia estar relacionado com a inibição de respostas imunológicas.

Os efeitos do rhG-CSF foram pesquisados em camundongos da linhagem BDF<sub>1</sub>, fêmeas com 7 semanas de idade, tratados no primeiro dia com o equivalente a 200 mg/kg de 5-fluoruracil por via intravenosa. Em seguida foram injetadas doses diárias de rhG-CSF e coletadas amostras de sangue no 5º, 7º, 9º, 11º e 13º dias. Realizaram a contagem de neutrófilos em sistema automático, observando recuperação mais rápida da neutropenia dos camundongos, relacionada com a dose administrada (SHIMAMURA et al., 1987).

Park et al. (1994) estudaram a atividade biológica de rhG-CSF em modelo de neutropenia animal induzida pela administração intraperitoneal da mistura de ciclofosfamida, vincristina e doxorubicina. Selecionaram camundongos, com 7 semanas de idade que foram injetados por via subcutânea durante cinco dias consecutivos. As coletas foram realizadas durante 14 dias, avaliando as alterações das células do sangue periférico, especialmente dos neutrófilos e dos leucócitos, observando respostas semelhantes.

Matsuzaki et al. (1996) investigaram a cinética do número de leucócitos, concentração de G-CSF no soro e a expressão dos receptores de G-CSF, após tratamento com rhG-CSF. Realizaram ensaio utilizando camundongos com 8 semanas de idade, previamente tratados com ciclofosfamida pela via intraperitoneal. Posteriormente, administraram 1 µg/Kg/dia e 100 µg/Kg/dia, de rhG-CSF, por oito e cinco dias, respectivamente. Seis horas após cada administração coletaram sangue, baço e medula óssea. Observaram aumento significativo do número de leucócitos do terceiro ao sexto dia após administração da concentração de 100 µg/Kg/dia. Os autores destacam a importância da correlação entre o nível sorológico de G-CSF e seus receptores para a compreensão da farmacocinética desse produto.

Bowen et al. (1999) realizaram experimentos em camundongos de diferentes linhagens com 6 a 10 semanas de idade, administrando por via subcutânea derivados recombinantes mutantes de G-CSF conjugados com polietilenoglicol. Demonstraram que a neutrofilia está relacionada com a dose e massa molecular do derivado peguilado. Avaliaram também a atividade usando a linhagem G-NFS-60, observando que o modelo *in vitro* é inadequado para

esses conjugados de alta massa molecular, pois mostra atividade reduzida diferentemente do que ocorre com o ensaio *in vivo*.

Kaneko et al. (1999) executaram experimentos em camundongos, fêmeas com 8 a 10 semanas de idade, previamente tratados com 200 mg/kg de ciclofosfamida. Estudaram os efeitos do produto natural *Hochu-ekki-to* administrado por via oral, em diferentes doses, e realizaram a contagem de leucócitos em hemocítômetro. Concluíram que o extrato acelerava a recuperação da leucopenia e investigaram o mecanismo dessa atividade.

Para avaliação da atividade *in vitro* foi desenvolvido bioensaio usando a linhagem de células mieloblásticas de camundongos NFS-60. Os autores demonstraram sua eficiência para dosagem de rhG-CSF em soro de pessoas saudáveis e portadoras de doenças hematológicas, e sugerem a aplicação em combinação com enzima-imunoensaio para análise de mecanismos normais e anormais de produção de neutrófilos (SHIRAFUJI et al., 1989).

Tohyama et al. (1989) estudaram a linhagem de células de carcinoma hepatocelular para o ensaio de G-CSF, avaliando as respostas de crescimento por método colorimétrico com sal de tetrazólio, sugerindo sua aplicação para análise de rhG-CSF.

Hammerling et al. (1995) desenvolveram bioensaio sensível baseado na proliferação da linhagem de células mielóide leucêmicas, NFS-60. Determinaram a faixa ideal para o ensaio quantitativo entre 4 – 60 pg/mL. As respostas foram avaliadas após reação com sais de tetrazólio em leitor de microplacas. Os ensaios foram planejados com três a cinco doses do padrão e das amostras. Sugerem a aplicação do bioensaio *in vitro* para a avaliação de potência de produtos farmacêuticos de rhG-CSF.

A atividade do rhG-CSF foi também pesquisada utilizando células leucêmicas promielocíticas humanas, HL-60. No modelo, a proliferação celular foi inibida pela adição de dimetilsulfóxido ou ácido retinóico, e em seguida obtiveram-se respostas ao rhG-CSF com relação dose-dependente. Os autores compararam a atividade do rhG-CSF não glicosilado com glicosilado, produzidos em diferentes células hospedeiras, não detectando diferença entre as formas. Concluíram destacando que o bioensaio estudado poderia constituir-se em opção para a avaliação da atividade biológica (YAMAGUCHI et al., 1997).

Oh-eda et al. (1990) avaliaram a importância dos oligossacarídeos presentes no rhG-CSF, comparando as propriedades físico-químicas e biológicas das moléculas intacta e sob a forma deglicosilada. Demonstraram que a cadeia de carboidrato O-ligada contribui para a estabilidade da glicoproteína, evitando polimerização e/ou mudanças conformacionais, observando que essa diferença não é fundamental para a atividade biológica da molécula.

Niven et al. (1994) pesquisaram a estabilidade do rhG-CSF na forma de aerosol para nebulização. Analisaram os agregados não-covalentes por cromatografia líquida por exclusão molecular com fase móvel de tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6,9 a 4 °C. Utilizaram também método eletroforético para avaliar alterações químicas decorrentes do processo, detectando banda com maior mobilidade.

A oxidação das metioninas foi investigada com peróxido de hidrogênio e os estudos de cinética foram realizados por cromatografia líquida em fase reversa. Detectaram quatro produtos de oxidação que foram posteriormente analisados por espectrometria de massas. O comportamento do produto oxidado *in vitro* e *in vivo* não foi estudado (LÉON et al., 1998).

Léon et al. (1999) realizaram análises qualitativas e quantitativas por cromatografia líquida em fase reversa e acoplada à espectrometria de massas para avaliar a redução química e eletroquímica das pontes disulfeto do rh-met-G-CSF. Foram estudados os mecanismos envolvidos na redução das pontes disulfeto, observando que dependem do pH e podem alterar a estrutura terciária, influenciando a atividade biológica.

A influência de modificações químicas e mutagênese sítio-dirigida nas metioninas do rhG-CSF foi pesquisada por Lu et al. (1999), observando que a oxidação das metioninas Met<sup>122</sup> e Met<sup>127</sup> com peróxido de hidrogênio resultava em alterações da estrutura que afetava polaridade e estabilidade com perda da atividade. A substituição de metionina por leucina originou uma variante mais estável, mantendo a atividade biológica *in vitro* após oxidação. Avaliaram também a atividade pelo bioensaio da mitogênese de células da medula óssea de camundongos da linhagem BALB/c com leitura da resposta pela incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. Simultaneamente, executaram as análises por cromatografia líquida em fase reversa com coluna C<sub>4</sub> e fase móvel constituída de acetonitrila e ácido trifluoracético, eluída em gradiente. Concluíram que os dados obtidos juntamente com as propriedades moleculares indicam que as metioninas Met<sup>122</sup> e Met<sup>127</sup>, provavelmente não envolvidas na ligação ao receptor, são importantes para manter a conformação biologicamente ativa do G-CSF.

A cromatografia líquida em fase reversa tem sido usada extensamente para separar e quantificar proteínas oxidadas e desamidadas, e a influência sobre a atividade farmacológica do composto pela modificação de sua polaridade e/ou lipofilicidade. Um inconveniente desse método é que as proteínas são geralmente desnaturadas ou dissociadas quando adsorvidas à matriz da coluna e não é um método apropriado para estabelecer a potência dos produtos farmacêuticos que contêm oligômeros não covalentes e polímeros biologicamente inativos (RIGGIN et al., 1987; DALMORA et al., 1997; RIBELA et al., 2006).

Wang (1999) publicou estudo de revisão sobre os avanços na compreensão do comportamento de proteínas, incluindo o rhG-CSF, instabilidades e estabilização em meio líquido, importante no desenvolvimento das formulações. Paralelamente, destacou as formas degradadas e metodologias analíticas descritas na literatura, por cromatografia líquida, espectrometria de massas e eletroforese capilar usadas juntamente com os ensaios biológicos, para a caracterização e avaliação de proteínas.

Krishnan et al. (2002) investigaram a agregação do rhG-CSF por cromatografia líquida por exclusão molecular em coluna TSK-gel G2000SW, com fase móvel de tampão fosfato de sódio 100 mM e caracterização espectroscópica. Observaram que a forma monomérica nativa origina dímeros reversíveis sob condições fisiológicas que não participam do processo de agregação irreversível. Sugerem a sacarose, como estabilizante termodinâmico para inibir a agregação.

A análise de filgrastima em produtos farmacêuticos comerciais foi realizada pelo ensaio biológico em camundongos da linhagem CF<sub>1</sub> pré-tratados com ciclofosfamida. Paralelamente foram executados testes por eletroforese e detecção imunológica, endotoxinas bacterianas e toxicidade, preconizados para o controle de produtos biológicos, demonstrando sua qualidade (CODEVILLA et al., 2004a).

Codevilla et al. (2004b) desenvolveram método por cromatografia líquida por exclusão molecular isocrático, usando coluna TSK gel G2000 SW e fase móvel constituída de ácido fosfórico 0,1 M, pH 2,5. Validaram o procedimento, demonstrando sua especificidade para a separação das formas diméricas, de alta massa molecular e do monômero, bem como exatidão, precisão e robustez. Os autores aplicaram a metodologia para análise de rhG-CSF em formulações farmacêuticas.

Yin et al. (2005) usaram peróxido de hidrogênio para estudar a ação de diferentes excipientes sobre a oxidação das metioninas Met<sup>1</sup>, Met<sup>122</sup>, Met<sup>127</sup>, e Met<sup>138</sup> do G-CSF. Analisaram as formas alteradas por mapeamento tríptico e cromatografia líquida em fase reversa. Demonstraram que o EDTA pode proteger os resíduos de metioninas da oxidação através de ligação específica à proteína.

Raso et al. (2005) pesquisaram alterações conformacionais da forma monomérica relacionadas com a agregação do rhG-CSF, explorando mecanismos e condições envolvidas. Realizaram análises espectroscópicas e por cromatografia líquida por exclusão molecular para a caracterização. Concluíram que a 37 °C e pH 7,0, a forma nativa existe em equilíbrio com a conformação alterada, que é altamente propensa à agregação.

Recentemente, Hernández-Bernal et al. (2005) avaliaram a equivalência farmacocinética, farmacodinâmica e segurança de duas amostras de rhG-CSF em voluntários humanos. Os níveis de G-CSF no soro foram quantificados por enzima-imunoensaio. Realizaram a contagem de neutrófilos, de leucócitos e células CD34+, como variáveis farmacodinâmicas, até 120 horas. Paralelamente calcularam os parâmetros farmacocinéticos de concentração sanguínea máxima, tempo para alcançá-la e área sob a curva da relação concentração/tempo, de cada formulação, concluindo que são comparáveis clinicamente e bioequivalentes.

A eletroforese em gel de poliacrilamida é um método com alta resolução que tem sido utilizado para a separação de proteínas. A transferência e detecção com anticorpos específicos possibilita a identificação e caracterização do rhG-CSF. Essas técnicas tem sido amplamente adotadas para hormônios recombinantes, especialmente para o rhG-CSF nativo, formas degradadas e estudos de estabilidade (NIVEN et al., 1994; HAMMERLING et al., 1995; AUSUBEL et al., 1996; LU et al., 1999; YUN et al., 2005).

Os imunoenaios poderiam constituir-se em alternativa para a determinação de produtos biológicos. Entretanto, a principal restrição baseia-se na observação de que detectam moléculas ativas e inativas sem diferenciação, desse modo não expressando a atividade biológica e não podendo ser usados como indicadores da potência biológica. São aplicados para a dosagem clínica e, usados em combinação com outros modelos, podem fornecer importantes indicações da identidade e integridade da molécula (JEFFCOATE, 1992; MIRE-SLUIS et al., 1996).

Granger et al. (1999) desenvolveram enzima-imuno ensaio para a determinação de G-CSF de camundongo, utilizando anticorpos policlonais marcados com biotina. Efetuaram análises de G-CSF em diferentes amostras biológicas, incluindo tecidos homogeneizados, sugerindo o ensaio para avaliação de atividade, por sua especificidade, sensibilidade e exatidão.

Sommerville et al. (1999) aplicaram eletroforese capilar para a análise e caracterização de rhG-CSF não-glicosilado e glicosilado, este último contendo albumina de soro humano como estabilizante. Demonstraram diferenças nos tempos de migração e nas áreas dos picos dos eletroferogramas, viabilizando a caracterização das formas, e enfatizando o poder de resolução da técnica.

Zhou et al. (2004) analisaram rhG-CSF glicosilado e não-glicosilado por eletroforese capilar de zona. Selecionaram técnicas de eletroforese com focalização isoeétrica e espectrometria de massas, demonstrando que a combinação de métodos contribui para a

compreensão de efeitos potenciais de mudanças no processo de produção e expressão sobre o produto acabado e para a completa caracterização.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.1 MATERIAL**

#### **3.1.1 Substância biológica de referência (SBR) e anticorpos**

- Substância biológica de referência de rhG-CSF (SBR-rhG-CSF)<sup>1</sup>, contendo 300 µg/mL.
- Anticorpo policlonal de ovelha anti-G-CSF humano, NIBSC.
- Anticorpo monoclonal de coelho anti-IgG de ovelha, conjugado com fosfatase alcalina, Sigma<sup>®</sup>.

#### **3.1.2 Produtos farmacêuticos comerciais**

Utilizaram-se amostras de onze lotes de produtos farmacêuticos comerciais, de três laboratórios produtores, contendo 300 µg/mL de filgrastima, em seu prazo de validade. As amostras foram identificadas com números arábicos de 1 a 11.

#### **3.1.3 Solventes e reagentes**

- Acetonitrila, Merck<sup>®</sup>.
- Ácido acético glacial, Merck<sup>®</sup>.
- Ácido cítrico, Merck<sup>®</sup>.
- Ácido clorídrico fumegante, Merck<sup>®</sup>.
- Ácido fosfórico 85 %, Sigma<sup>®</sup>.
- Ácido trifluoroacético, Merck<sup>®</sup>.
- Acrilamida, Pharmacia Biotech<sup>®</sup>.
- Água purificada, Labconco<sup>®</sup>.
- Albumina de soro bovino, fração V, Sigma<sup>®</sup>.

---

<sup>1</sup> Gentilmente doado pelo NIBSC como Padrão do laboratório – Inglaterra



- Álcool isopropílico, Merck<sup>®</sup>.
- Azul de Bromofenol, Pharmacia Biotech<sup>®</sup>.
- Bis-acrilamida, Pharmacia Biotech<sup>®</sup>.
- Citrato de sódio, Merck<sup>®</sup>.
- Cloreto de magnésio, Merck<sup>®</sup>.
- Cloreto de sódio, Merck<sup>®</sup>.
- Corante Giemsa, Inlab<sup>®</sup>.
- Corante May-Grünwald, Inlab<sup>®</sup>.
- Dodecil sulfato de sódio, Bio-Rad<sup>®</sup>.
- Formaldeído 37 %, Merck<sup>®</sup>.
- Fosfato de potássio monobásico, Merck<sup>®</sup>.
- Fosfato de sódio dibásico, Merck<sup>®</sup>.
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado, Merck<sup>®</sup>.
- Glicerina, Merck<sup>®</sup>.
- Glicina, Pharmacia Biotech<sup>®</sup>.
- Hidróxido de amônio, Merck<sup>®</sup>.
- Hidróxido de sódio, Merck<sup>®</sup>.
- Ifosfamida, Asta Médica<sup>®</sup>.
- Leite em pó desnatado, Molico<sup>®</sup>.
- Marcadores de peso molecular para eletrofores, Pharmacia Biotech<sup>®</sup>.
- Metanol, Merck<sup>®</sup>.
- N,N dimetilformamida, Merck<sup>®</sup>.
- N,N,N',N' – tetrametilenodiamina, (TEMED), Pharmalife<sup>®</sup>.
- Nitrato de prata, Merck<sup>®</sup>.
- Nitro azul de tetrazólio, Sigma<sup>®</sup>.
- Peróxido de hidrogênio 30V, Merk<sup>®</sup>.
- Persulfato de amônio, Merck<sup>®</sup>.
- Sacarose, Sigma<sup>®</sup>.
- Solução fisiológica, Labormédica<sup>®</sup>.
- Tris-(hidroximetil) aminometano, Pharmacia Biotech<sup>®</sup>.
- Tween 20, Merck<sup>®</sup>.
- 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato, Sigma<sup>®</sup>.

#### **3.1.4 Equipamentos e acessórios**

- Agitador, tipo gangorra, (rocker), Finepcr<sup>®</sup>.
- Agitador orbital de tubos, modelo MA 162, Marconi<sup>®</sup>.
- Agitador orbital de microplacas, Ika Schüttler<sup>®</sup>.
- Autoclave, Nevoni<sup>®</sup>.
- Balança analítica, modelo 2462, Sartorius<sup>®</sup>.
- Balança de precisão, modelo AS5500, Marte<sup>®</sup>.
- Balão volumétrico 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1.000 e 2.000 mL, Pirex<sup>®</sup>.
- Banho de água termostaticado, Tecnal<sup>®</sup>.
- Destilador, Biomatic<sup>®</sup>.
- Bomba de vácuo, Tecnal<sup>®</sup>.
- Centrífuga refrigerada, Alc<sup>®</sup>.
- Coluna cromatográfica de exclusão molecular BioSep-SEC-S 2000, 300 mm x 7,8 mm, Phenomenex<sup>®</sup>.
- Coluna cromatográfica de fase reversa Júpiter 5 $\mu$  C<sub>4</sub> 300 Å, 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex<sup>®</sup>.
- Contador de células, Phonex<sup>®</sup>.
- Cromatógrafo líquido, Shimadzu<sup>®</sup>.
  - Bomba LC-10 AD<sub>VP</sub>.
  - Controlador SCL-10 A<sub>VP</sub>.
  - Degaseificador DGU-14 A.
  - Detector de arranjos de diodos (DAD) SPD-M10A<sub>VP</sub>.
  - Injetor automático SIL-10 AD<sub>VP</sub>.
  - Válvula quaternária FCV-10 AL<sub>VP</sub>.
  - Forno para colunas CTO-10 AD<sub>VP</sub>.
  - Software CLASS-VP 6.14.
- Cuba vertical para eletroforese, Life Technologies Inc<sup>®</sup>.
- Destilador, Biomatic<sup>®</sup>.
- Estante para tubos, Comlab<sup>®</sup>.
- Estufa para secagem e esterilização, Nova Ética<sup>®</sup>.
- Filtro estéril e descartável, modelo HV Millex com membrana durapore<sup>®</sup> de 13 mm de diâmetro e por 0,45  $\mu$ m, Millipore<sup>®</sup>.
- Fonte para eletroforese, Pharmacia Biotech<sup>®</sup>.
- Freezer – 40°C, Sanyo<sup>®</sup>.
- Freezer – 20°C, Consul<sup>®</sup>.

- Lâminas de vidro, Perfecta<sup>®</sup>.
- Membrana de nitrocelulose 0,45 µm, Bio-Rad<sup>®</sup>.
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, Whatman<sup>®</sup>.
- Microcomputador, Dell<sup>®</sup>.
- Microscópio, Nikon<sup>®</sup>.
- Micropipetas de volume ajustável P10, P20, P100, P200, P1000, P5000 e P10000, Gilson<sup>®</sup>.
- Microtubos estéreis, Eppendorf<sup>®</sup>.
- Papel filtro, Inlab<sup>®</sup>.
- pHmetro, CMS Labcraft<sup>®</sup>.
- Ponteiras descartáveis de 200, 1000, 5000 e 10000 µL, Brand<sup>®</sup>.
- Pré-coluna C<sub>4</sub> (Kit Security Guard Cartridges), Phenomenex<sup>®</sup>.
- Pré-coluna GCF-2000, Phenomenex<sup>®</sup>.
- Purificador de água, Labconco<sup>®</sup>.
- Refrigerador, Brastemp<sup>®</sup>.
- Seringa de vidro 50 µL, Hamilton<sup>®</sup>.
- Seringas descartáveis 1 e 5 mL, Becton Dickinson<sup>®</sup>.
- Sistema de filtração, Millipore<sup>®</sup>.
- Sistema para imunotransferência semi-seco, Bio-Rad<sup>®</sup>.
- Termômetro de imersão, Incotem<sup>®</sup>.
- Tubo capilar não heparinizado, Perfecta<sup>®</sup>.
- Tubos estéreis e apirogênicos, Corning<sup>®</sup>.

### 3.1.5 Animais de laboratório

Os camundongos da linhagem BALB/c, provenientes do Biotério Central da UFSM, foram mantidos em gaiolas à temperatura de  $22 \pm 2$  °C, com umidade relativa de 45 – 65%, iluminação artificial de 12 horas/dia, com livre acesso a água e ração.

Todos os animais permaneceram sob climatização e adaptação às condições do experimento por, no mínimo, quatro semanas.

## 3.2 MÉTODOS

### **3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência e imunodeteção**

Procedeu-se conforme descrito por Codevilla et al. (2004a).

#### **3.2.1.1 Preparação do marcador de peso molecular**

Diluiu-se o conteúdo da ampola com 1 mL de água purificada. Distribuiu-se em alíquotas de 40  $\mu$ L em tubos eppendorf e armazenaram-se a -20 °C.

#### **3.2.1.2 Preparação da solução da SBR-rhG-CSF e das amostras não-reduzidas**

Transferiram-se alíquotas de 100  $\mu$ L da SBR-rhG-CSF e de cada amostra dos produtos farmacêuticos comerciais equivalentes a 1,7  $\mu$ g para tubos eppendorff, previamente identificados, e adicionaram-se 250  $\mu$ L de tampão da amostra não-reduzida. Utilizou-se a alíquota de 40  $\mu$ L do marcador de peso molecular e adicionou-se volume idêntico ao do tampão. Em seguida as soluções foram colocadas em banho termostatizado a 100 °C durante 5 minutos.

#### **3.2.1.3 Procedimento**

A separação eletroforética das amostras foi realizada em gel de poliacrilamida a 12%, em seguida realizada a transferência para membrana de nitrocelulose e detectadas as bandas de filgrastima com anticorpos específicos.

### **3.2.2 Ensaio biológico da neutropenia em camundongos**

Todos os procedimentos laboratoriais utilizando animais foram conduzidos de acordo com as leis nacionais de proteção e bem-estar animal (BRASIL, 1979). Além disso, o projeto

foi submetido à Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria, recebendo parecer favorável conforme registro sob nº 11/2005.

#### **3.2.2.1 Preparação da solução tampão pH 7,4 com albumina**

Pesaram-se 0,6 g de fosfato de potássio monobásico, 6,4 g de fosfato de sódio dibásico e 5,85 g de cloreto de sódio. Transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, contendo aproximadamente, 800 mL de água purificada. Homogeneizou-se. Acrescentou-se 1 g de albumina bovina fração V e, após dissolução, completou-se o volume com água destilada. Quando necessário, ajustou-se o pH com hidróxido de sódio 1 N. Armazenou-se a 4 °C, em geladeira por, no máximo, 4 dias.

#### **3.2.2.2 Preparação da solução de ifosfamida**

Pesaram-se 215 mg de ifosfamida e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL. Diluiu-se e completou-se o volume com solução fisiológica, obtendo-se a concentração de 8,6 mg/mL. Homogeneizou-se.

#### **3.2.2.3 Preparação da solução da SBR-rhG-CSF**

Diluiu-se a SBR-rhG-CSF com tampão pH 7,4 com albumina em tubo de ensaio, de modo a obter soluções com concentrações de 4, 12 e 36 µg/0,5mL, identificadas como padrão P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>, respectivamente. Homogeneizou-se. Preparou-se no momento do uso.

#### **3.2.2.4 Preparação das amostras**

O conteúdo de cada frasco-ampola de filgrastima foi diluído com tampão pH 7,4 com albumina, de modo a obter as soluções com concentrações de 4, 12 e 36 µg/0,5mL, identificadas como amostra A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>, respectivamente. Homogeneizou-se. Preparou-se no momento do uso.

#### **3.2.2.5 Seleção dos animais e planejamento do ensaio**

Os camundongos da linhagem BALB/c, foram pesados individualmente, selecionados na faixa de peso entre 20 – 24 g, distribuídos de acordo com a tabela de números aleatórios (MOSES & OAKFORD, 1963) e identificados para as doses respectivas do padrão, amostra e controle, utilizando 6 animais por dose.

### **3.2.2.6 Procedimento**

Os bioensaios foram realizados adaptando-se procedimento descrito por Codevilla et al. (2004a). No primeiro dia, realizou-se injeção de dose única na concentração de 4,3 mg de ifosfamida/0,5 mL/camundongo por via intraperitoneal. Nos 4 dias consecutivos, no mesmo horário, injetaram-se doses de 4, 12 e 36 µg/0,5 mL/camundongo das soluções da SBR-rhG-CSF, da amostra e do tampão pH 7,4 com albumina, no grupo controle. As coletas sanguíneas foram realizadas seis horas após a última administração, através do plexo venoso ocular, mediante anestesia dos animais com solução de uretana 25%. Foram preparados esfregaços sanguíneos e as lâminas coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa (GARTNER & HIATT, 1999).

### **3.2.2.7 Contagem de neutrófilos por microscopia**

Procedeu-se à contagem microscópica dos neutrófilos, calculou-se a percentagem para cada dose e os valores obtidos foram usados para a análise estatística do ensaio de filgrastima.

### **3.2.2.8 Análise estatística**

Realizou-se a análise estatística dos dados do bioensaio de acordo com FINNEY (1978), pelo método de retas paralelas (3 x 3), usando o programa do PLA 1.2 (Stegmann Systemberatung, Rodgau, Germany). A validade do ensaio foi avaliada pela análise de variância, demonstrando paralelismo sem desvio de linearidade e regressão linear significativa. Calculou-se então a potência e os limites de confiança ( $P = 0,95$ ) realizando, se necessária, a combinação de ensaios independentes para cumprir os parâmetros entre 80 – 125% e 64 – 156%, respectivamente (EP, 2005). A precisão foi expressa através da

ponderação calculada como a recíproca da variância do logaritmo das potências. Os resultados foram submetidos ao teste  $\chi^2$  ( $P=0,05$ ) e as estimativas homogêneas ( $P>0,05$ ) combinadas como médias geométricas ponderadas (FINNEY, 1978; GAINES & TYDEMAN, 1980).

### 3.2.3 Cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)

As condições experimentais estabelecidas para análise da filgrastima pelo método de CL-FR, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros do método analítico otimizado por cromatografia líquida em fase reversa.

| <b>Características</b> | <b>Descrição</b>  |
|------------------------|---|
| Coluna                 | Júpiter C <sub>4</sub> 300 Å (250 mm × 4,6 mm ) Phenomenex®     |
| Fase móvel             | Fase A: água/acetonitrila (90:10, V/V) e 0,1% TFA               |
| Vazão                  | Fase B: água/acetonitrila (20:80, V/V) e 0,1% TFA<br>0,5 mL/min |
| Temperatura da coluna  | ambiente  |
| Comprimento de onda    | 280 nm  |
| Volume de injeção      | 50 µL   |

A eluição foi realizada conforme gradiente linear descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Gradiente linear utilizado no método por cromatografia líquida em fase reversa.

| <b>Tempo<br/>(min)</b> | <b>Fase A<br/>%</b> | <b>Fase B<br/>%</b> |
|------------------------|---------------------|---------------------|
| 0                      | 34                  | 66                  |
| 35                     | 15                  | 85                  |
| 38                     | 34                  | 66                  |
| 48                     | 34                  | 66                  |

#### 3.2.3.1 Preparação da fase móvel

Em proveta graduada, diluíram-se 100 mL de acetonitrila em 900 mL de água purificada. Adicionou-se 1 mL de ácido trifluoroacético e homogeneizou-se. Denominou-se essa solução fase móvel A.

Em outra proveta, diluíram-se 200 mL de água purificada em 800 mL de acetonitrila. Adicionou-se 1 mL de ácido trifluoroacético e homogeneizou-se. Denominou-se essa solução fase móvel B. Ambas as fases foram filtradas, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro. Preparou-se no momento do uso.

### **3.2.3.2 Preparação da solução da SBR-rhG-CSF**

Transferiu-se alíquota de 400  $\mu\text{L}$  da SBR-rhG-CSF para tubo eppendorf e adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de água purificada de modo a obter a solução com concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Homogeneizou-se.

### **3.2.3.3 Preparação das amostras**

Reuniu-se o conteúdo de três frascos e transferiu-se alíquota de 400  $\mu\text{L}$  para tubo eppendorf. Adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de água purificada, de modo a obter a solução com concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Homogeneizou-se.

### **3.2.3.4 Validação do método analítico por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)**

A validação do método foi conduzida de acordo com procedimento preconizado pela literatura (ICH, 1996). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

#### **3.2.3.4.1 Especificidade**

A especificidade do método analítico foi determinada pelo estudo de degradação forçada da SBR-rhG-CSF, que foi submetida a condições oxidativas. Avaliaram-se, então, a



pureza do pico e a percentagem de área referente a filgrastima, utilizando programa CLASS VP 6.14.

#### **3.2.3.4.2 Linearidade**

Para preparar a curva de calibração, transferiram-se alíquotas de 0,02; 0,04; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mL, da SBR-rhG-CSF para tubos eppendorf. Adicionou-se água purificada para obter o volume final de 0,6 mL. As concentrações teóricas finais obtidas foram de 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As curvas foram preparadas e analisadas em triplicata durante três dias consecutivos. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, bem como calculada a análise de variância (ANOVA).

#### **3.2.3.4.3 Precisão**

Avaliou-se a precisão do método através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas aos testes de repetibilidade e precisão intermediária em relação à SBR-rhG-CSF na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ .

##### **3.2.3.4.3.1 Repetibilidade**

Preparou-se amostra na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  e realizaram-se seis determinações sucessivas no mesmo dia. Desse modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

##### **3.2.3.4.3.2 Precisão intermediária**

Avaliou-se a precisão intermediária através da análise executada por diferentes analistas e em diferentes dias, usando o mesmo método e lotes de amostras, na concentração de 200 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.2.3.4.3.2.1 Interdias

Prepararam-se, diariamente, duas amostras, na concentração de 200 µg/mL, e analisaram-se triplicatas em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

#### 3.2.3.4.3.2.2 Entre analistas

Prepararam-se três amostras na concentração de 200 µg/mL e analisaram-se triplicatas, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

#### 3.2.3.4.3.3 Cálculos

O teor de filgrastima nas amostras foi obtido através da seguinte expressão:

$$T\% = (Aa/Ap) \times 100 \quad (1)$$

Em que:

T% = teor de filgrastima em percentagem

Aa = média das áreas da amostra

Ap = média das áreas do padrão

#### 3.2.3.4.4 Exatidão

A exatidão foi verificada através da análise das concentrações de 160, 200 e 240 µg/mL de filgrastima. As determinações de cada concentração foram realizadas em triplicata.

#### 3.2.3.4.4.1 Cálculos

O teor de filgrastima nas amostras foi obtido através da seguinte expressão:

$$T = (Aa/Ap) \times (Cp/Ca) \times Pp \quad (2)$$

Em que:

T = teor de filgrastima

Aa = média das áreas da amostra

Ap = média das áreas do padrão

Cp = concentração do padrão

Ca = concentração da amostra

Pp = potência do padrão

A exatidão foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Exatidão \%} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (3)$$

#### 3.2.3.4.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 1996), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução que foi analisada em triplicata. A fórmula usada para o cálculo foi a seguinte:

$$\text{LD} = \frac{3,3 \cdot \sigma}{\text{IC}} \quad (4)$$

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

#### 3.2.3.4.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 1996), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução que foi analisada em triplicata. A fórmula usada para o cálculo foi a seguinte:

$$\text{LQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{\text{IC}} \quad (5)$$

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

#### 3.2.3.4.7 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: vazão de 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mL/min; volume de injeção: 30, 50 e 60  $\mu$ L; comprimento de onda: 210 a 320 nm; temperatura da coluna: 25, 30, 35 e 40 °C e estabilidade da solução analítica por 24 hs no injetor automático em temperatura ambiente. Para avaliar a influência desses fatores sobre os resultados do método, realizou-se a análise do teor da filgrastima.

#### **3.2.3.4.8 Teste de performance do sistema cromatográfico**

Para assegurar a performance do cromatógrafo líquido antes e durante a realização das análises, realizou-se o teste avaliando os seguintes parâmetros: simetria do pico, número de pratos teóricos, tempo de retenção e área do pico da substância biológica através do programa CLASS-VP 6.14. A repetibilidade das injeções foi determinada através de cinco replicatas da SBR-rhG-CSF na concentração 200  $\mu$ g/mL e do cálculo do coeficiente de variação percentual da área.

### **3.2.4 Avaliação de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)**

#### **3.2.4.1 Preparação das amostras**

Procedeu-se conforme descrito no item 3.2.3.3.

#### **3.2.4.2 Preparação dos sulfóxidos/desamidados**

Na amostra de produto farmacêutico de filgrastima foram adicionados 15  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio a 30%, durante 8 minutos, para produzir os sulfóxidos/desamidados artificialmente. Após, realizou-se a diluição, conforme o item 3.2.4.1.

O procedimento foi adotado para degradação da amostra 11, reduzindo porém, o volume de peróxido de hidrogênio para 3  $\mu$ L e o tempo para 4 minutos.

### 3.2.4.2.1 Cálculos

O teor de desamidados e sulfóxidos nas amostras foi obtido através da seguinte expressão:

$$\text{Desamidados/sulfóxidos \%} = \frac{(A_d + A_s)}{A_t} \times 100 \quad (6)$$

Em que:

$A_d$  = área dos desamidados

$A_s$  = área dos sulfóxidos

$A_t$  = área total

### 3.2.5 Avaliação de filgrastima por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM)

Adotou-se procedimento validado e publicado por Codevilla et al. (2004b).

#### 3.2.5.1 Preparação da fase móvel

Dissolveram-se 7,9 mL de ácido fosfórico em 800 mL de água purificada. Ajustou-se o pH 2,5 com hidróxido de sódio 10 N e transferiram-se para balão volumétrico de 1000 mL. Completou-se o volume com água purificada. Homogeneizou-se e filtrou-se, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . Preparou-se no momento do uso.

#### 3.2.5.2 Preparação da solução da SBR-rhG-CSF

Procedeu-se conforme descrito no item 3.2.3.2.

### 3.2.5.3 Preparação das amostras

Procedeu-se conforme descrito no item 3.2.3.3.

### 3.2.5.4 Preparação dos dímeros

As amostras de produtos farmacêuticos de filgrastima foram submetidas à agitação, durante 5 minutos, para produzir os dímeros artificialmente. Após realizou-se a diluição, conforme o item 3.2.4.1.

#### 3.2.5.4.1 Cálculos

O teor de dímeros nas amostras foi obtido através da seguinte expressão:

$$\text{Dímeros \%} = \text{Adi/At} \times 100 \quad (7)$$

Em que:

Adi = área dos dímeros

At = área total

### 3.2.5.5 Preparação das substâncias de alta massa molecular

As amostras de produtos farmacêuticos de filgrastima foram colocadas em banho de água termostaticado a 70 °C, durante 1 h, para produzir as substâncias de alta massa molecular artificialmente. Após, realizou-se a diluição, conforme o item 3.2.4.1.

### 3.2.5.5.1 Cálculos

O teor de substâncias de alta massa molecular nas amostras foi obtido através da seguinte expressão:

$$\text{Substâncias de alta massa molecular \%} = \text{Asb}/\text{At} \times 100 \quad (8)$$

Em que:

Asb = área das substâncias de alta massa molecular

At = área total

### 3.2.5.6 Procedimento

Utilizou-se aparelho de CL, equipado com detector UV, no comprimento de onda de 214 nm. Usou-se coluna BioSep-SEC-S 2000 (Phenomenex-Torrance, EUA) para exclusão molecular (300 mm x 7,8 mm i.d.) e pré-coluna GCF-2000 (Phenomenex). O sistema de CL foi operado isocraticamente em temperatura ambiente com vazão de 1,0 mL/min. Injetaram-se 50 µL da solução da SBR-rhG-CSF e da amostra, respectivamente. No início de cada análise injetaram-se na coluna 50 µL de albumina bovina (1 mg/mL) para reduzir a adsorção não específica. Calculou-se a potência, com base nas áreas dos cromatogramas das amostras em relação à SBR-rhG-CSF.



## **RESULTADOS**

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção com anticorpos específicos

A separação de proteínas com base em seu peso molecular foi padronizada em gel de poliacrilamida e adotada para a identificação de filgrastima nas amostras de produtos farmacêuticos 1 a 11, em relação à SBR-rhG-CSF e marcadores de peso molecular. A detecção das bandas transferidas para membrana de nitrocelulose foi realizada com anticorpos específicos, reveladas com fosfatase alcalina, viabilizando a identificação da filgrastima. Podem-se observar na Figura 3, os perfis obtidos especialmente na região aproximada de 18,8 kDa, correspondentes à filgrastima e à forma degradada da amostra 11.

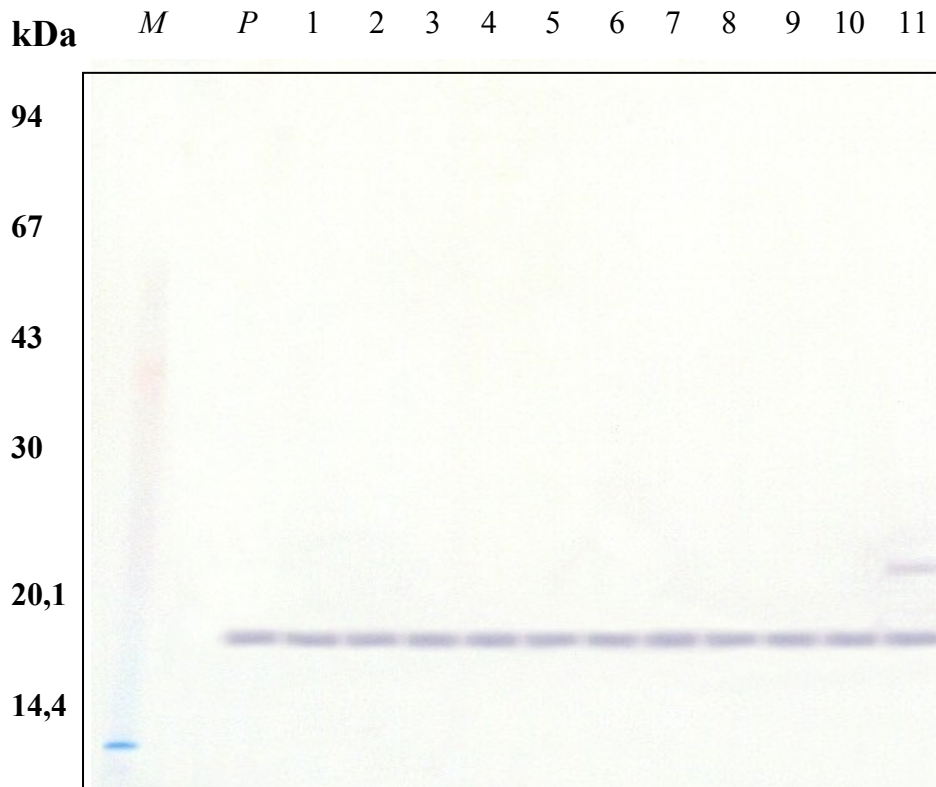


Figura 3 – Perfil em membrana de nitrocelulose com a banda obtida, após detecção de filgrastima com anticorpos específicos e revelação com fosfatase alcalina. Coluna *M* – marcador de peso molecular, Coluna *P* – Substância biológica de referência de rhG-CSF, Colunas 1 a 11 – produtos farmacêuticos.

#### 4.2 Avaliação de potência de filgrastima pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos

As doses com 4, 12 e 36 µg/0,5 mL/camundongo foram selecionadas com base na curva dose-resposta da linhagem BALB/c. Coletaram-se amostras de sangue e efetuaram-se as contagens de neutrófilos, exemplificadas na Tabela 3, com os valores fornecidos pela SBR-rhG-CSF e pelo produto farmacêutico 1, com CV inferiores a 15,85%.

Tabela 3 – Contagens de neutrófilos determinadas pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos no produto farmacêutico 1 de filgrastima e na Substância biológica de referência de rhG-CSF.

| Animal           | Doses em µg/camundongo |       |       |       |       |       |
|------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                  | P1                     | P2    | P3    | A1    | A2    | A3    |
| Nº               | 4                      | 12    | 36    | 4     | 12    | 36    |
| 1                | 23                     | 45    | 75    | 23    | 33    | 74    |
| 2                | 34                     | 47    | 55    | 30    | 40    | 57    |
| 3                | 27                     | 34    | 53    | 27    | 55    | 49    |
| 4                | 30                     | 36    | 60    | 34    | 42    | 68    |
| 5                | 28                     | 41    | 59    | 29    | 42    | 54    |
| 6                | 34                     | 43    | 48    | 26    | 39    | 58    |
| Média            | 29,33                  | 41,00 | 58,33 | 28,17 | 43,60 | 60,00 |
| CV% <sup>a</sup> | 14,57                  | 12,44 | 15,85 | 15,43 | 14,92 | 15,46 |

<sup>a</sup>CV% = coeficiente de variação percentual.

Os resultados foram submetidos à análise estatística de retas paralelas. Calculou-se então a potência, os limites de confiança e a precisão dos ensaios independentes e combinados, conforme a Tabela 4, na qual se destaca o ensaio nº 1, cujos valores experimentais encontram-se na Tabela 3.

Tabela 4 – Potência, limites de confiança (P=0,95) e precisão das estimativas dos ensaios independentes e combinados, de filgrastima no produto farmacêutico 1, pelo bioensaio da neutropenia em camundongos.

| Ensaio<br>N°      | Potência           |                     |       | Intervalos de<br>confiança<br>(P= 0,95) | Ponderação |
|-------------------|--------------------|---------------------|-------|---|------------|
|                   | Declarada<br>µg/mL | Encontrada<br>µg/mL | %     |   |            |
| 1                 | 300                | 306,0               | 102,0 | 82 – 127                                | 471        |
| 2                 | 300                | 309,9               | 103,3 | 74 – 146                                | 189        |
| 3                 | 300                | 311,7               | 103,9 | 81 – 134                                | 345        |
| Potência<br>Média | _____              | 308,1               | 102,7 | 90 – 116                                | 1005       |

Avaliou-se a atividade biológica dos produtos farmacêuticos identificados de 1 a 11, calculando-se a potência, os intervalos de confiança e expressando os resultados em percentagens relativas à potência declarada. A precisão dos ensaios independentes variou de 189 – 570, destacando-se que a Tabela 5 apresenta ensaios combinados, com valores de ponderação mais elevados.

Tabela 5 – Potência, limites de confiança (P=0,95) e precisão das estimativas, dos ensaios independentes e combinados dos produtos farmacêuticos de filgrastima, pelo bioensaio da neutropenia em camundongos.

| Produto farmacêutico | Potência           |                     |        | Intervalos de confiança<br>(P= 0,95) | Ponderação |
|----------------------|--------------------|---------------------|--------|--------------------------------------|------------|
|                      | Declarada<br>µg/mL | Encontrada<br>µg/mL | %      |                                      |            |
| 1***                 | 300                | 308,1               | 102,70 | 90 – 116                             | 1005       |
| 2**                  | 300                | 300,6               | 100,20 | 82 – 122                             | 551        |
| 3*                   | 300                | 295,2               | 98,40  | 71 – 136                             | 205        |
| 4*                   | 300                | 294,0               | 98,00  | 71 – 134                             | 442        |
| 5*                   | 300                | 309,3               | 103,10 | 79 – 134                             | 323        |
| 6*                   | 300                | 340,5               | 113,50 | 87 – 150                             | 294        |
| 7**                  | 300                | 297,6               | 99,20  | 77 – 127                             | 341        |
| 8*                   | 300                | 303,3               | 101,10 | 83 – 123                             | 570        |
| 9*                   | 300                | 378,3               | 126,10 | 103 – 156                            | 503        |
| 10*                  | 300                | 234,6               | 78,20  | 64 – 95                              | 320        |
| 11*                  | 300                | 262,5               | 87,50  | 72 – 106                             | 250        |

\* número de ensaios independentes.

#### 4.3 Validação do método analítico por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)

A especificidade do método analítico foi determinada através da degradação forçada da SBR-rhG-CSF que foi submetida à oxidação química com peróxido de hidrogênio. Podem-se observar na Figura 4 os cromatogramas obtidos por CL-FR com a presença do pico não-alterado, com tempo de retenção de 31,9 min, bem como dos desamidados e sulfóxidos com 28,9 e 30,7 min, respectivamente. Os cromatogramas mostraram o pico de filgrastima livre de picos co-eluídos, e além disso, utilizando detector de arranjos de diodos (DAD), verificou-se que a SBR-rhG-CSF permaneceu com elevada pureza, demonstrando a especificidade do método proposto para a análise em produtos farmacêuticos.

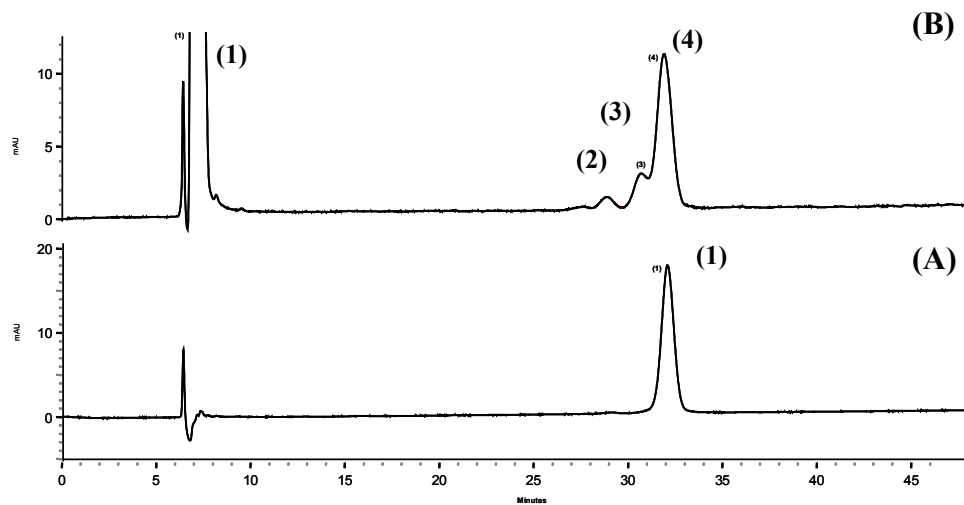


Figura 4 – Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida em fase reversa na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ : (A) Substância biológica de referência de rhG-CSF: pico 1 – principal. (B) Substância biológica de referência de rhG-CSF, após oxidação: pico 1 – peróxido de hidrogênio, pico 2 – desamidados, pico 3 – sulfóxidos e pico 4 – principal. Condições cromatográficas: Coluna Júpiter C<sub>4</sub> 300 Å (250 mm x 4,6 mm); fase móvel A: água/acetonitrila (90:10, V/V)/ 0,1% TFA e fase móvel B: água/acetonitrila (20:80, V/V)/ 0,1% TFA; vazão: 0,5 mL/min; detecção: 280 nm.

Os valores das áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração, apresentados na Tabela 6 foram plotados em relação a cada concentração respectiva, observando-se linearidade adequada na faixa de 10 a 300  $\mu\text{g/mL}$ , conforme ilustrado na Figura 5.

Tabela 6 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da Substância biológica de referência de rhG-CSF, por cromatografia líquida em fase reversa.

| Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Áreas absolutas |        |        | Média | CV% <sup>a</sup> |
|--------------------------------------|-----------------|--------|--------|-------|------------------|
|                                      | 1º dia          | 2º dia | 3º dia |       |                  |
|                                      |                 |        |        |       |                  |

|     |         |         |         |         |     |
|-----|---------|---------|---------|---------|-----|
| 10  | 19344   | 19444   | 20413   | 19734   | 1,5 |
| 20  | 55107   | 56230   | 62021   | 57786   | 1,1 |
| 50  | 171395  | 170344  | 167202  | 169647  | 1,3 |
| 100 | 343708  | 344321  | 355649  | 347893  | 1,9 |
| 150 | 536861  | 534543  | 540245  | 537216  | 0,5 |
| 200 | 726831  | 725741  | 721582  | 724718  | 0,4 |
| 250 | 895951  | 893467  | 909802  | 899740  | 1,0 |
| 300 | 1078402 | 1075027 | 1105425 | 1086285 | 1,5 |

<sup>a</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

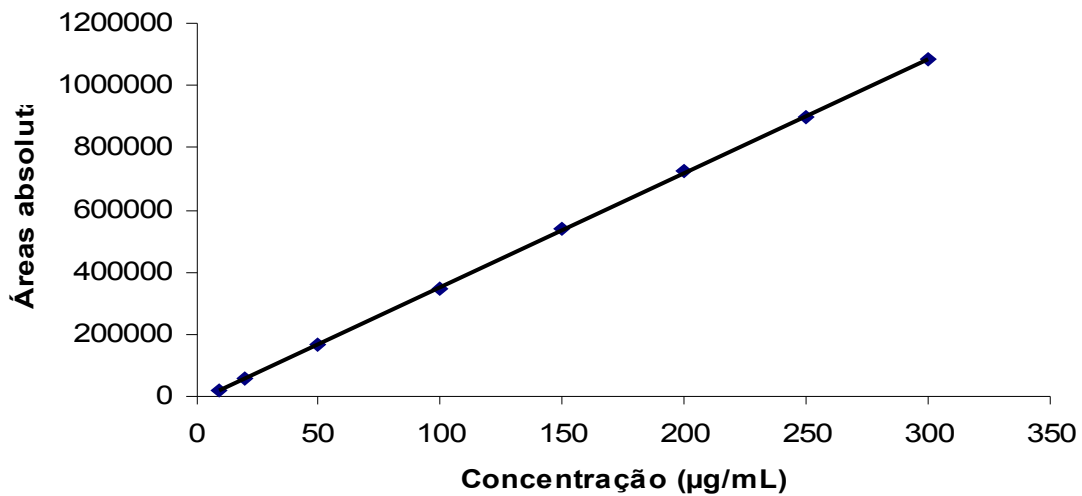


Figura 5 – Representação gráfica da curva de calibração da Substância biológica de referência de rhG-CSF obtida por cromatografia líquida em fase reversa, na faixa de 10 a 300 µg/mL (n = 3).

A equação calculada da reta foi:  $y = 3675,96x - 15876,88$ , com coeficiente de determinação  $r^2=0,9999$ , indicando linearidade significativa do método (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados da curva de calibração calculados pelo método dos mínimos quadrados.

| <b>Parâmetros</b>                     | <b>Resultados</b>         |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Faixa de linearidade                  | 10 – 300 µg/mL            |
| Equação: $y = bx + a$                 | $y = 3675,96x - 15876,88$ |
| Inclinação (b) ± desvio padrão        | $3675,96 \pm 37,61$       |
| Intercepto (a) ± desvio padrão        | $15876,88 \pm 812,7$      |
| Coeficiente de determinação ( $r^2$ ) | 0,9999                    |

Realizou-se também o cálculo da análise de variância (ANOVA), com base nos valores experimentais das áreas, observando-se na Tabela 8 parâmetros válidos com regressão linear significativa ( $P < 0,05$ ), sem desvio de linearidade ( $P > 0,05$ ).

Tabela 8 – Análise de variância das áreas dos cromatogramas obtidos na determinação da curva de calibração.

| Fontes de variação      | GL | Soma dos Quadrados     | Variância             | F         |
|-------------------------|----|------------------------|-----------------------|-----------|
| Entre                   | 8  | $3,332 \times 10^{12}$ | $4,17 \times 10^{11}$ | 7180,72   |
| - regressão linear      | 1  | $3,332 \times 10^{12}$ | $3,33 \times 10^{12}$ | 57442,50* |
| - desvio de linearidade | 7  | $1,88 \times 10^8$     | $2,69 \times 10^7$    | 0,46      |
| Resíduo                 | 15 | $8,70 \times 10^8$     | $5,80 \times 10^7$    |           |
| Total                   | 23 |                        |                       |           |

\*Significativo para  $p < 0,05$  em relação à Tabela F.  
GL = graus de liberdade.

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação percentual. A amostra preparada na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  foi submetida a seis análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram valor médio de 98,79% com CV de 0,36%, conforme demonstra a Tabela 9.

Tabela 9 – Determinação da precisão intradia do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa.

| Análise | Teor ( $\mu\text{g/mL}$ ) |            | Média <sup>a</sup><br>(%) | CV <sup>b</sup><br>(%) |
|---------|---------------------------|------------|---------------------------|------------------------|
|         | Declarado                 | Encontrado |                           |                        |
| 1       | 200                       | 197,14     | 98,79                     | 0,36                   |
| 2       | 200                       | 196,88     |                           |                        |
| 3       | 200                       | 197,14     |                           |                        |
| 4       | 200                       | 197,50     |                           |                        |
| 5       | 200                       | 198,12     |                           |                        |
| 6       | 200                       | 198,74     |                           |                        |

<sup>a</sup> média de seis determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de duas amostras, em três dias consecutivos, obtendo-se valores experimentais médios de 100,40 e 99,80%, com CV de 1,12 e 0,48%, respectivamente, conforme demonstra a Tabela 10.



Tabela 10 – Determinação da precisão interdias do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa.

| <b>Amostra</b> | <b>Dia</b> | <b>Teor<sup>a</sup> (%)</b> | <b>Média<sup>b</sup></b> | <b>CV<sup>c</sup> %</b> |
|----------------|------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1              | 1          | 101,20                      | 100,40                   | 1,12                    |
|                | 2          | 99,09                       |                          |                         |
|                | 3          | 100,84                      |                          |                         |
| 2              | 1          | 100,35                      | 99,80                    | 0,48                    |
|                | 2          | 99,74                       |                          |                         |
|                | 3          | 99,39                       |                          |                         |

<sup>a</sup> média de três determinações.

<sup>b</sup> média de três dias.

<sup>c</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

Para a determinação da precisão entre analistas, três amostras foram avaliadas por dois analistas, obtendo-se valores experimentais médios de 99,70; 101,13 e 99,88%, com CV de 1,40; 1,18 e 0,69%, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Determinação da precisão entre analistas do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa.

| <b>Amostra</b> | <b>Analista</b> | <b>Teor<sup>a</sup> (%)</b> | <b>Média<sup>b</sup> (%)</b> | <b>CV<sup>c</sup> %</b> |
|----------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1              | A               | 98,71                       | 99,70                        | 1,40                    |
|                | B               | 100,68                      |                              |                         |
| 2              | A               | 100,29                      | 101,13                       | 1,18                    |
|                | B               | 101,97                      |                              |                         |
| 3              | A               | 100,37                      | 99,88                        | 0,69                    |
|                | B               | 99,39                       |                              |                         |

<sup>a</sup> média de três determinações.

<sup>b</sup> média de dois analistas.

<sup>c</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

Determinou-se também a exatidão do método através da análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida e os resultados experimentais, que correspondem à percentagem média de 99,89%, encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Determinação da exatidão do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa.

| <b>Concentração de filgrastima (µg/mL)</b> | <b>Concentração determinada<sup>a</sup> (µg/mL)</b> | <b>Exatidão (%)</b> | <b>CV<sup>b</sup> (%)</b> |
|--|---|---------------------|---------------------------|
| 160  | 159,07  | 99,42               | 0,33                      |
| 200  | 200,75  | 100,37              | 0,08                      |
| 240  | 239,70  | 99,87               | 0,24                      |

<sup>a</sup> média de três determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

A sensibilidade do método cromatográfico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração detectada foi 0,73 µg/mL. Por sua vez, o LQ calculado foi 2,20 µg/mL.

Avaliou-se também a robustez através de pequenas modificações nos parâmetros do método, tais como: vazão, temperatura da coluna, volume de injeção, estabilidade da solução em 24 hs e mudança no comprimento de onda. Na execução de análises de produtos farmacêuticos, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 0,53%, comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados da avaliação da robustez do método de análise de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa.

| <b>Parâmetro</b>           | <b>Valor investigado</b> | <b>Teor<sup>a</sup> (%)</b> | <b>CV<sup>b</sup> (%)</b> | <b>Valor otimizado</b> |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------|
| Vazão (mL/min)             | 0,3                      | 101,98                      | 0,21                      | 0,5                    |
|                            | 0,5                      | 100,01                      | 0,43                      |                        |
|                            | 0,8                      | 101,25                      | 0,08                      |                        |
|                            | 1,0                      | 99,96                       | 0,34                      |                        |
| Temperatura da coluna (°C) | 25                       | 100,53                      | 0,18                      | 25                     |
|                            | 30                       | 101,20                      | 0,20                      |                        |
|                            | 35                       | 101,77                      | 0,12                      |                        |
|                            | 40                       | 102,10                      | 0,53                      |                        |

|  |           |        |      |      |
|--|-----------|--------|------|------|
| Volume de injeção<br>( $\mu\text{L}$ ) | 30        | 100,42 | 0,29 | 50   |
|  | 50        | 100,05 | 0,31 |      |
|  | 60        | 101,10 | 0,44 |      |
| Estabilidade da solução                | 24 hs     | 99,20  | 0,26 | ---- |
| Comprimento de onda<br>(nm)            | 210 – 320 | ----   |      | 280  |

<sup>a</sup> média de três determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

Verificou-se a performance do sistema cromatográfico pela análise quantitativa da filgrastima, através da simetria dos picos, número de pratos teóricos da coluna, tempo de retenção e área de filgrastima, conforme observado na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico.

| Parâmetro             | Mínimo | Máximo | CV <sup>a</sup> % | Situação |
|-----------------------|--------|--------|-------------------|----------|
| Simetria do pico      | 1,04   | 1,05   | 0,42              | Aprovado |
| Nº de pratos teóricos | 13075  | 13626  | 1,55              | Aprovado |
| Tempo de retenção     | 31,81  | 31,90  | 0,10              | Aprovado |
| Área                  | 878897 | 896292 | 0,85              | Aprovado |

<sup>a</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

#### 4.4 Determinação de filgrastima por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)

O método desenvolvido e validado por cromatografia líquida foi utilizado para determinação de filgrastima em produtos farmacêuticos. A Tabela 15 apresenta as percentagens obtidas do pico principal e dos desamidados e sulfóxidos, calculadas em relação à área total do cromatograma.

Tabela 15 – Determinação das percentagens do pico principal, e dos desamidados e sulfóxidos, obtidas na análise de filgrastima nos produtos farmacêuticos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR).

| <b>Produto<br/>Farmacêutico</b> | <b>CL-FR<sup>a</sup></b> |                               |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|                                 | <b>Pico principal</b>    | <b>Desamidados/sulfóxidos</b> |
|                                 | <b>(%)</b>               | <b>(%)</b>                    |
| 1                               | 99,88                    | 0,12                          |
| 2                               | 99,93                    | 0,07                          |
| 3                               | 99,90                    | 0,10                          |
| 4                               | 99,49                    | 0,51                          |
| 5                               | 100,00                   | 0,00                          |
| 6                               | 99,95                    | 0,05                          |
| 7                               | 99,58                    | 0,42                          |
| 8                               | 99,61                    | 0,39                          |
| 9                               | 99,81                    | 0,19                          |
| 10                              | 99,89                    | 0,11                          |

|                 |       |      |
|-----------------|-------|------|
| 11              | 95,68 | 4,32 |
| Média (%)       | 99,43 | 0,57 |
| DP <sup>b</sup> | 1,25  | 1,25 |

<sup>a</sup>média das três determinações.

<sup>b</sup>DP = desvio padrão.

Os resultados da determinação quantitativa de filgrastima, calculados em relação à SBR-rhG-CSF, são apresentados na Tabela 16 e ilustrados na Figura 6. Observa-se que as amostras de produtos farmacêuticos foram submetidas à análise em paralelo, pelo método cromatográfico por CL-FR e pelo ensaio biológico. Com base nos resultados da análise estatística, calcularam-se as médias fornecidas através de cada metodologia, determinando-se então a diferença de  $2,04\% \pm 2,67$  menor por CL-FR.

Tabela 16 – Determinação comparativa de filgrastima em produtos farmacêuticos pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos e por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR).

| Produto<br>Farmacêutico | Teor declarado |                  | Teor obtido           |                    |        |  |
|-------------------------|----------------|------------------|-----------------------|--------------------|--------|--|
|                         | µg/mL          | Ensaio biológico |                       | CL-FR <sup>a</sup> |        |  |
|                         |                | µg/mL            | %                     | µg/mL              | %      |  |
| 1                       | 300            | 308,10           | 102,70 <sup>***</sup> | 294,90             | 98,30  |  |
| 2                       | 300            | 300,60           | 100,20 <sup>**</sup>  | 289,59             | 96,53  |  |
| 3                       | 300            | 295,20           | 98,40 <sup>*</sup>    | 291,33             | 97,11  |  |
| 4                       | 300            | 294,00           | 98,00 <sup>*</sup>    | 282,75             | 94,25  |  |
| 5                       | 300            | 309,30           | 103,10 <sup>*</sup>   | 304,80             | 101,60 |  |
| 6                       | 300            | 340,50           | 113,50 <sup>*</sup>   | 334,50             | 111,50 |  |
| 7                       | 300            | 297,60           | 99,20 <sup>**</sup>   | 288,60             | 96,20  |  |
| 8                       | 300            | 303,30           | 101,10 <sup>*</sup>   | 294,57             | 98,19  |  |
| 9                       | 300            | 378,30           | 126,10 <sup>*</sup>   | 373,77             | 124,59 |  |

|                 |     |        |        |        |       |
|-----------------|-----|--------|--------|--------|-------|
| 10              | 300 | 234,60 | 78,20* | 250,62 | 83,54 |
| 11              | 300 | 262,50 | 87,50* | 251,40 | 83,80 |
| Média           | 300 | 302,18 | 100,73 | 296,07 | 98,69 |
| DP <sup>b</sup> | --- | 38,86  | 12,31  | 36,44  | 11,52 |

\* número de ensaios independentes.

<sup>a</sup> média de três determinações.

<sup>b</sup> DP = desvio padrão.

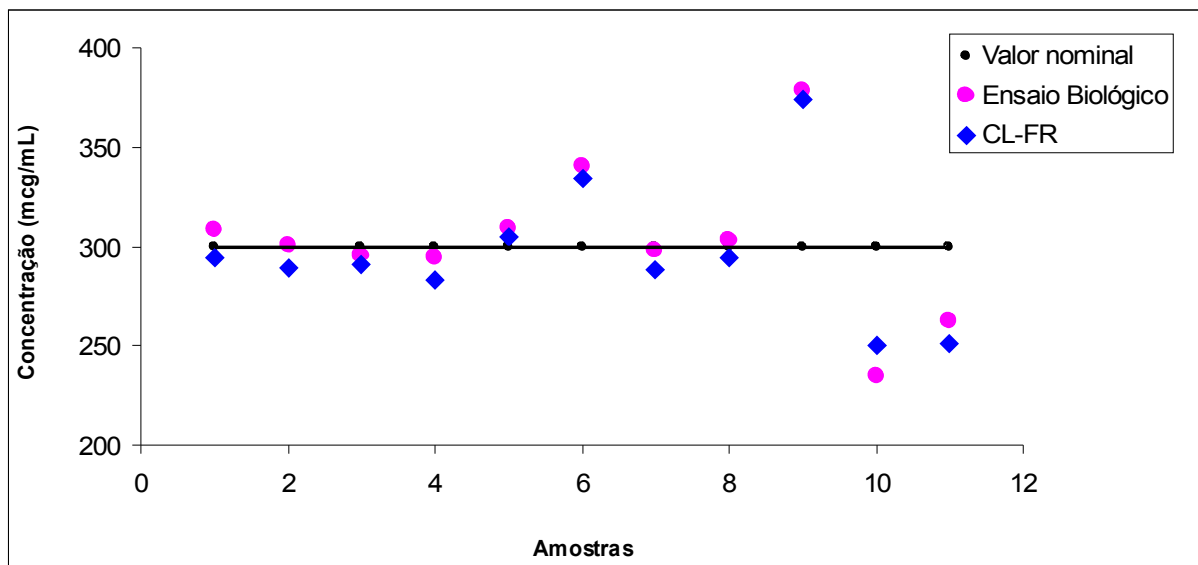


Figura 6 – Representação gráfica da avaliação comparativa de potência de filgrastima em produtos farmacêuticos pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos e por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR).

#### 4.5 Avaliação da potência de filgrastima por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM)

Avaliou-se a especificidade do método por CL-EM através da análise da SBR-rhG-CSF e de filgrastima em produto farmacêutico. Os cromatogramas apresentados na Figura 6 demonstram a separação dos picos de substâncias de alta massa molecular, dímeros, monômero e excipientes.

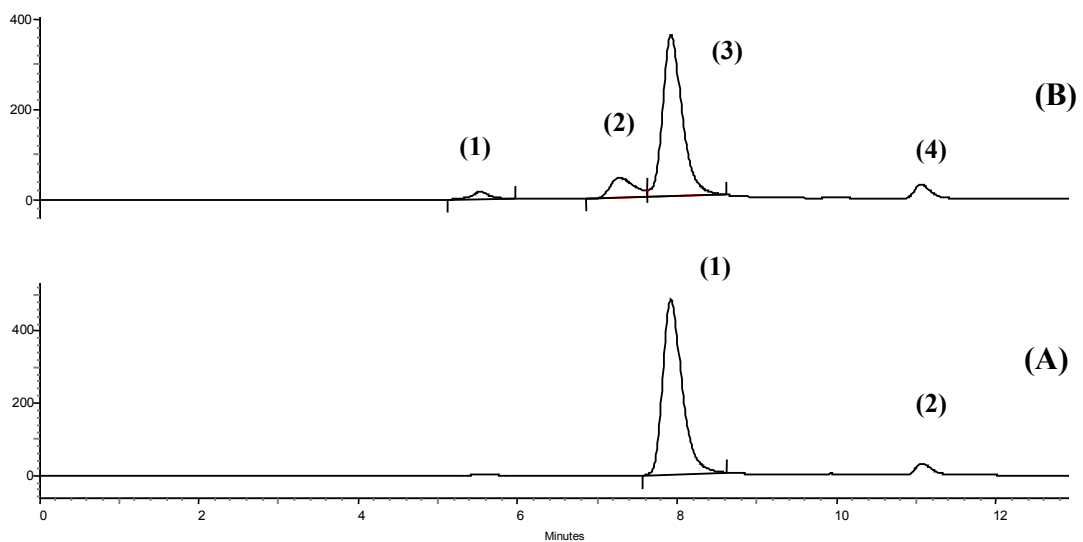


Figura 7 – Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida por exclusão molecular na concentração de 200 µg/mL: (A) Substância biológica de referência de rhG-CSF: pico 1 – monômero e pico 2 – excipientes, (B) Produto farmacêutico: pico 1 – substâncias de alta massa molecular, pico 2 – dímeros, pico 3 – monômero e pico 4 – excipientes. Condições cromatográficas: Coluna BioSep-SEC-S 2000 (300 mm x 7,8 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,1 M pH 2,5; vazão: 1,0 mL/min; detecção: 214 nm.

Realizou-se a análise de filgrastima nos produtos farmacêuticos por CL-EM e determinaram-se as percentagens médias de 98,17 para monômero, 1,15 para dímeros e 0,68 para substâncias de alta massa molecular, em relação à área total do cromatograma, apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 – Determinação das percentagens de monômero, dímeros e substâncias de alta massa molecular obtidas na análise de filgrastima nos produtos farmacêuticos por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM).

| Produto Farmacêutico | CL-EM <sup>a</sup> |             |   |
|----------------------|--------------------|-------------|---|
|                      | Monômero (%)       | Dímeros (%) | Substâncias de alta massa molecular (%) |
| 1                    | 99,26              | 0,18        | 0,56                                    |
| 2                    | 99,84              | 0,08        | 0,08                                    |
| 3                    | 99,78              | 0,22        | 0,00                                    |
| 4                    | 99,53              | 0,00        | 0,47                                    |
| 5                    | 99,34              | 0,00        | 0,66                                    |
| 6                    | 99,93              | 0,00        | 0,07                                    |
| 7                    | 99,34              | 0,00        | 0,66                                    |
| 8                    | 99,51              | 0,41        | 0,08                                    |
| 9                    | 99,78              | 0,00        | 0,22                                    |
| 10                   | 83,76              | 11,80       | 4,44                                    |



|                 |       |      |      |
|-----------------|-------|------|------|
| 11              | 99,81 | 0,00 | 0,19 |
| Média           | 98,17 | 1,15 | 0,68 |
| DP <sup>b</sup> | 4,79  | 3,53 | 1,27 |

<sup>a</sup>média de três determinações.

<sup>b</sup>DP = desvio padrão.

Os resultados da avaliação de potência de filgrastima em produtos farmacêuticos calculados em relação à SBR-hG-CSF são apresentados na Tabela 18 e ilustrados na Figura 8. Destaca-se que as amostras foram submetidas à análise em paralelo pelo método cromatográfico por CL-EM e pelo ensaio biológico, observando-se diferença média das potências estimadas de  $4,03\% \pm 1,32$  menor por CL-EM, com correlação significativa ( $P > 0,05$ ), sendo o maior valor 5,50%.

Tabela 18 – Avaliação comparativa de potência de filgrastima nos produtos farmacêuticos pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos e por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM).

| Produto<br>Farmacêutico | Teor declarado | Teor encontrado  |           |                    |        |
|-------------------------|----------------|------------------|-----------|--------------------|--------|
|                         | µg/mL          | Ensaio biológico |           | CL-EM <sup>a</sup> |        |
|                         |                | µg/mL            | %         | µg/mL              | %      |
| 1                       | 300            | 308,10           | 102,70*** | 291,60             | 97,20  |
| 2                       | 300            | 300,60           | 100,20**  | 287,43             | 95,81  |
| 3                       | 300            | 295,20           | 98,40*    | 283,50             | 94,50  |
| 4                       | 300            | 294,00           | 98,00*    | 279,06             | 93,02  |
| 5                       | 300            | 309,30           | 103,10*   | 297,66             | 99,22  |
| 6                       | 300            | 340,50           | 113,50*   | 330,00             | 110,00 |

|                 |     |        |         |        |        |
|-----------------|-----|--------|---------|--------|--------|
| 7               | 300 | 297,60 | 99,20** | 284,28 | 94,76  |
| 8               | 300 | 303,30 | 101,10* | 287,76 | 95,92  |
| 9               | 300 | 378,30 | 126,10* | 364,68 | 121,56 |
| 10              | 300 | 234,60 | 78,20*  | 224,40 | 74,80  |
| 11              | 300 | 262,50 | 87,50*  | 260,70 | 86,90  |
| Média           | 300 | 302,18 | 100,73  | 290,09 | 96,70  |
| DP <sup>b</sup> | --- | 38,86  | 12,31   | 37,42  | 11,84  |

\* número de ensaios independentes.

<sup>a</sup> média de três determinações.

<sup>b</sup> DP = desvio padrão.

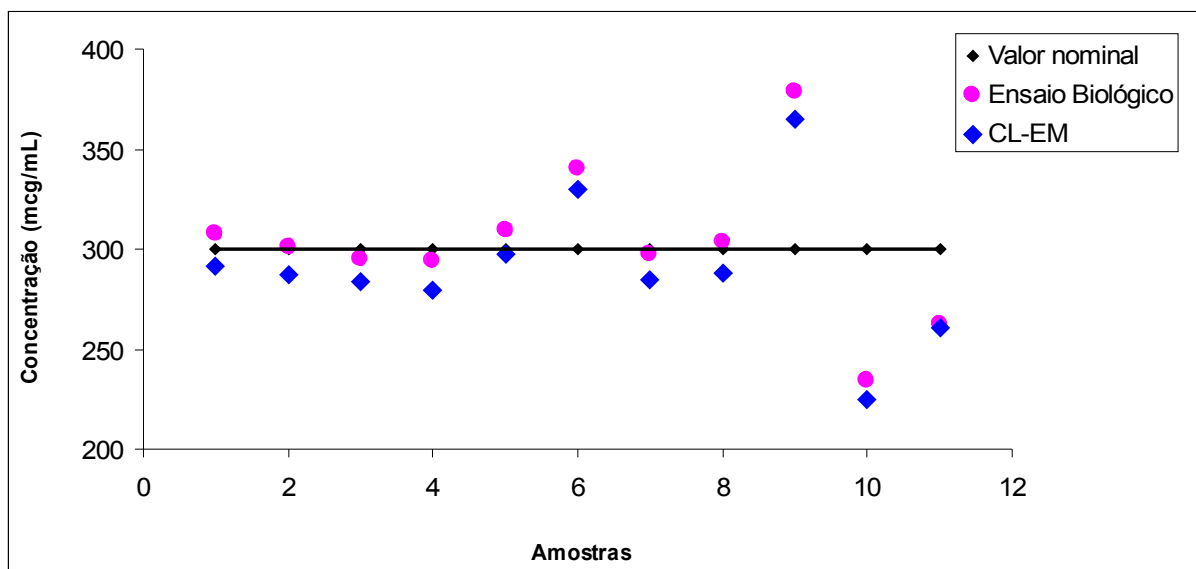


Figura 8 – Representação gráfica da avaliação comparativa de potência de filgrastima em produtos farmacêuticos pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos e por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM).

Algumas amostras de produtos farmacêuticos foram degradadas artificialmente e analisadas pelo método validado por CL-FR e, então, submetidas ao ensaio biológico da neutropenia em camundongos. Para os sulfóxidos e desamidados, a média de atividade biológica obtida foi de  $15,63 \pm 5,73\%$  ( $n=3$ ), calculados em relação a SBR-rhG-CSF. Por sua

vez, os dímeros e as substâncias de alta massa molecular analisados por CL-EM, forneceram atividades biológicas médias de  $14,60 \pm 3,81\%$  (n=3) e  $13,47 \pm 5,22\%$  (n=3), respectivamente, como demonstra a Tabela 19.

Tabela 19 – Determinação da atividade biológica das substâncias de alta massa molecular, dímeros, sulfóxidos/desamidados de filgrastima, analisados por cromatografia líquida por exclusão molecular e em fase reversa e submetidas ao ensaio biológico da neutropenia em camundongos.

| <b>Produto<br/>Farmacêutico</b> | <b>Atividade Biológica</b>                         |                        |                                       |
|---------------------------------|--|------------------------|---------------------------------------|
|                                 | <b>Substâncias de alta<br/>massa molecular (%)</b> | <b>Dímeros<br/>(%)</b> | <b>Sulfóxidos/desamidados<br/>(%)</b> |
| 1                               | 13,40  | 14,10                  | 16,20                                 |
| 2                               | 12,80  | 15,20                  | 14,60                                 |
| 3                               | 14,20  | 14,50                  | 16,10                                 |
| Média (%)                       | 13,47  | 14,60                  | 15,63                                 |
| CV <sup>a</sup> (%)             | 5,22   | 3,81                   | 5,73                                  |

<sup>a</sup>CV% = coeficiente de variação percentual.

## **DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

---

A produção de proteínas e glicoproteínas de interesse terapêutico tem evoluído significativamente nos últimos anos, devido à tecnologia do DNA recombinante. Nesse contexto, o controle da qualidade é fundamental para a determinação da identidade, pureza e potência dos medicamentos para uso clínico. Nesse sentido, é necessária a combinação de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos para a completa caracterização dos produtos biológicos.

A análise de filgrastima nos produtos farmacêuticos por eletroforese foi executada sob condições não-redutoras, a fim de avaliar possíveis formas diméricas ou de alta massa molecular. A transferência e detecção com anticorpos específicos, apresentou perfil típico com banda única na região de 18,8 kDa, mostrada na Figura 3, correspondente à sua massa molecular.

Os produtos farmacêuticos foram submetidos ao ensaio biológico da neutropenia em camundongos, previamente descrito por Codevilla et al. (2004a). O ensaio foi otimizado, com pré-tratamento dos camundongos BALB/c por ifosfamida, menos tóxica em relação às demais substâncias testadas e executado com base na curva dose-resposta (MATSUZAKI et al., 1996). Com base nas contagens de neutrófilos, realizou-se a análise de variância, demonstrando a validade dos ensaios, e em seguida, os cálculos de potência e intervalos de confiança, para cada produto, conforme a Tabela 5. Sugere-se a adoção da especificação de potência entre 80 e 125% com intervalos entre 64 e 156%, respectivamente, seguindo parâmetros preconizados para produtos biológicos (ICH, 1999; EP, 2005; USP, 2005). Pode-

se notar que, de acordo com o lote, os produtos cumprem ou não as especificações, destacando também que a amostra identificada como 11 foi previamente submetida a condições de degradação e a amostra 10, por sua vez, já apresentava o teor determinado de formas agregadas. A precisão calculada pela ponderação, para cada ensaio independente, apresentou o valor médio de 355, que pode ser adotado como parâmetro desse ensaio biológico.

Realizou-se o desenvolvimento e a validação do método por cromatografia líquida em fase reversa e testou-se a especificidade sob condições oxidativas que originaram picos adicionais relativos aos desamidados e sulfóxidos (Figura 4). Os estudos com o detector de PDA mostraram o pico de filgrastima livre de picos co-eluídos, confirmando a especificidade do método proposto para a análise de produtos farmacêuticos. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV inferiores a 1,40% (Tabelas 9, 10 e 11) o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Pode ser observado na Tabela 12 o valor médio experimental de 99,88% do teste de exatidão, demonstrando exatidão significativa. Por sua vez, os valores determinados para LD e LQ indicam a capacidade significativa do método para detectar e quantificar com confiabilidade filgrastima nos produtos farmacêuticos. Os teores obtidos na execução das análises não apresentaram diferenças significativas, com coeficientes de variação inferiores a 0,53%, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstra a Tabela 13. Por sua vez, os dados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico (Tabela 14) mostraram que o equipamento e as condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados (ICH, 1996).

Sucessivamente, foram efetuadas determinações de sulfóxidos e desamidados por CL-FR, expressando os teores em percentagens relativas à área total (Tabela 15). Com base na literatura de produtos biológicos (EP, 2005), sugere-se o estabelecimento do limite de 6%. Paralelamente, efetuaram-se coletas dessas formas que foram submetidas ao bioensaio, apresentando atividade biológica reduzida como mostra a Tabela 19. Do mesmo modo realizaram-se determinações de produtos farmacêuticos em relação à SBR-rhG-CSF, expressando os resultados em percentagens relativas à potência declarada, obtendo a média de 98,69%. Destaca-se a desvantagem da aplicação desse método para proteínas que são geralmente desnaturadas ou dissociadas pelos solventes orgânicos quando adsorvidas à matriz da coluna, conforme descrito pela literatura (DALMORA et al., 1997; WANG, 1999).

Efetuarão-se também determinações de dímeros e substâncias de alta massa molecular por CL-EM, expressando os teores em percentagens relativas à área total do cromatograma (Tabela 17). Sugere-se que seja estabelecido o limite de 6% para os produtos acabados, pois essas formas podem causar respostas imunológicas (BRISTOW, 1991). Executou-se também, a avaliação da potência das mesmas amostras de produtos farmacêuticos por CL-EM em relação à SBR-rhG-CSF, conforme a Tabela 18, expressando os resultados em percentagens relativas à potência declarada, obtendo a média de 96,70%.

Avaliou-se a correlação entre os resultados fornecidos pela execução dos métodos cromatográficos e biológico nas amostras selecionadas. As potências por CL-FR foram em média  $2,04\% \pm 2,67$  menores em relação ao ensaio biológico, exceto para a amostra 10 que, devido às formas diméricas e de alta massa molecular, não separadas por esse procedimento e avaliadas na Tabela 17, mostrou valor 5,34% superior à potência biológica (Figura 6). Além disso, a CL-EM apresentou potências médias  $4,03\% \pm 1,32$  menores em comparação ao bioensaio, com a maior diferença de 5,50%, mas com correlação significativa, conforme calculada pelo teste *t* de Student ( $P > 0,05$ ) (Figura 8). Convém, porém, destacar que os parâmetros podem alterar-se em função do conteúdo de formas agregadas e degradadas de filgrastima em cada produto farmacêutico. Assim, é fundamental que seja realizada a avaliação da identidade e pureza das amostras por CL-FR, antes da determinação quantitativa da potência pelo método por CL-EM.

A filgrastima não está descrita na literatura oficial e não há nenhuma correlação publicada entre métodos físico-químicos e ensaio biológico, o que é altamente recomendado no contexto da substituição dos bioensaios (HENDRIKSEN et al., 2002). Demonstrou-se reduzida atividade biológica dos sulfóxidos e desamidados, bem como dos dímeros, substâncias de alta massa molecular, não separados por CL-FR. Além disso, destaca-se a correlação entre os resultados do ensaio biológico da neutropenia em camundongos e da cromatografia líquida por exclusão molecular. Sugere-se, portanto, que o método por CL-EM seja adotado como alternativa ao bioensaio para a avaliação de potência de filgrastima, porém em combinação com CL-FR, podendo ser aplicado durante as etapas do processo de purificação e para o controle da qualidade do produto farmacêutico acabado.

## **CONCLUSÕES**

---



## 6 CONCLUSÕES

---

- ✓ Efetuou-se a identificação de filgrastima em produtos farmacêuticos por eletroforese e detecção com anticorpos específicos.
- ✓ Otimizou-se o ensaio biológico da neutropenia em camundongos e realizou-se a avaliação biológica de potência de amostras de filgrastima em produtos farmacêuticos.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa para determinação de sulfóxidos e desamidados, e análise de filgrastima em produtos farmacêuticos, sugerindo sua aplicação para a área de controle da qualidade.
- ✓ Submeteram-se as formas de sulfóxidos e desamidados, dímeros e substâncias de alta massa molecular, à avaliação pelo ensaio biológico da neutropenia em camundongos, demonstrando atividade biológica reduzida.
- ✓ Executou-se a avaliação de potência de filgrastima em produtos farmacêuticos pelo método analítico por cromatografia líquida por exclusão molecular, bem como a determinação de dímeros e substâncias de alta massa molecular.
- ✓ Demonstrou-se correlação entre os resultados dos métodos por cromatografia líquida em fase reversa e por exclusão molecular com o ensaio biológico.

- ✓ Sugere-se a aplicação do método por cromatografia líquida por exclusão molecular para a avaliação de potência de filgrastima em produtos farmacêuticos, como alternativa ao ensaio biológico da neutropenia em camundongos, combinado com a cromatografia líquida em fase reversa para a avaliação das formas de sulfóxidos e desamidados.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1996. v.3.

BOWEN, S. et al. Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mutein. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 425-432, 1999.

BRASIL. Lei nº 6.638, de 10 de outubro de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DF, 10 out. 1979. Disponível em: <<http://www.imepa.org.br/lei6638.html>>. Acesso em: 06 maio 2005.

BRISTOW, A.F. The current status of therapeutic peptides and proteins. In: \_\_\_\_\_. **Polypeptide and protein drugs production, characterization and formulation**. Sussex: Ellis Horwood, 1991. cap. 3, p. 54-69.

BRISTOW, A.F.; JEFFCOATE, S.L. Analysis of therapeutic growth hormone preparations: report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies. **Biologicals**, v. 20, p. 221-231, 1992.

CODEVILLA, C.F. et al. Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. **Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, p. 37-41, 2004a.

CODEVILLA, C.F. et al. Validation of an SE-HPLC method for the analysis of rhG-CSF in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, p. 2681-2690, 2004b.

DALMORA, S.L. et al. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **Journal Chromatography A**, v. 782, p. 199-210, 1997.

DEMETRI, G. D.; GRIFFIN, J. D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. **Blood**, v. 78, n. 11, p. 2791-2808, 1991.

DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas. 34<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: JBM, 2005-2006.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 4. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.

FEDERICI, M. The quality of biotechnology products. **Biologicals**, v. 22, p. 151-159, 1994.

FINNEY, J.D. Statistical methods in biological assay. Charles Griffin. London: 1978.

FRAMPTON, J. E.; LEE, C. R.; FAULDS, D. Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. **Drugs**, v. 48, p. 731-760, 1994.

GAINES, D.R.E.; TYDEMAN, M.S. Iterative weighted regression analysis of logit responses. A computer program for the analysis of bioassays and immunoassays. **Comput Programs Biomed**, v. 15, p.13-22, 1980.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia : em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GRANGER, J. et al. A sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay for measurement of picogram quantities of murine granulocyte colony-stimulating factor. **Journal of Immunological Methods**, v. 225, p. 145-156, 1999.

HAMMERLING, U.; KROON, R.; SJÖDIN, L. *In vitro* bioassay with enhanced sensitivity for human granulocyte colony-stimulating factor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 9-20, 1995.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Professional, 2001.

HENDRIKSEN, C.; CUSSLER, K.; HALDER, M. ECVAM's role in the implementation of the three rs concept in the field of biologicals. In *Alternatives to animal experiments: progress made and challenges ahead*. v. 30, s. 2, p. 41-46, 2002.

HERMAN, A.C.; BOONE, T.C.; LU, H.S. Characterization, formulation, and stability of Neupogen® (Filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. In *Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs*; Pearlman, R.; Wang, Y.J., Eds.; Plenum Press: New York, p. 303-326, 1996.

HERNÁNDEZ-BERNAL, F. et al. Bioequivalence of two recombinant granulocyte colony-stimulating factor formulations in healthy male volunteers. **Bio pharmaceutics & Drug Disposition**, v. 26, p. 151-159, 2005.

HILL, C.P.; OSSLUND, T.D.; EISENBERG, D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factor. **Biochemistry**, v. 90, p. 5167-5171, 1993.

ICH – International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, 1999.

ICH – International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use: Guideline on validation of analytical procedures: Methodology, 1996.

JEFFCOATE, S. L. New biotechnologies: challenges for the regulatory authorities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 191-194, 1992.

JEONG, K. J.; LEE, S. Y. Secretory production of human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli*. **Protein Expression Purification**, v. 23, p. 311-318, 2001.

KANEKO, M. et al. Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leukopenia in mice administered a japanese ethical herbal drug, *Hochu-ekki-to*. **Immunopharmacology**, v. 44, p. 223-231, 1999.

KRISHNAN, S. et al. Aggregation of granulocyte colony stimulating factor under physiological conditions: Characterization and thermodynamic inhibition. **Biochemistry**, v. 41, p. 6422-6431, 2002.

LÉON, J. et al. Oxidation of recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 283-289, 1998.

LÉON, J. et al. Reduction of Cys<sup>36</sup> – Cy<sup>42</sup> and Cys<sup>64</sup> – Cy<sup>74</sup> disulfide bonds in recombinant human granulocyte colony stimulating factor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 837-845, 1999.

LIESCHKE, G. J.; BURGESS, A. W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, p. 28-35, 1992.

LU, H. S. et al. Disulfide and secondary structure of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 268, p. 81-92, 1989.

LU, H.S. et al. Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effect on stability and biological activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 362, p.1-11, 1999.

MATSUZAKI, G.; LI, X.Y.; OHYAMA, Y.; NOMOTO, K. Kinetics of serum granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) concentration and G-CSF receptor expression during G-CSF treatment of cyclophosphamide-treated mice. **International Journal Immunopharmacology**, v. 18, p. 363-369, 1996.

MIRE-SLUIJS, A.R. et al. Biological assays: Their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. **Biologicals**, v. 24, p. 351-362, 1996.

MOSES, L. E.; OAKFORD, R. V. Tables of random permutations. London : George Allen & Unwin, 1963.

NAGATA, S.; TSUCHIYA, M.; ASANO, S. et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). **Nature**, v. 319, p. 415-418, 1986.

NISSEN, C. et al. *In vitro* comparison of the biological potency of glycosylated versus nonglycosylated rG-CSF. **Drugs Investigation**, v. 7, p. 346-352, 1994.

NIVEN, R.W. et al. Protein nebulization: I. stability of lactate dehydrogenase and recombinant granulocyte-colony stimulating factor to air-jet nebulization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 109, p.17-26, 1994.

NOMURA, H. et al. Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). **The Embo Journal**, v. 5, p. 871-876, 1986.

OH-EDA, M. et al. O-linked sugar chain of human granulocyte colony stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p.11432-11435, 1990.

PARK, J. B. et al. Recovery effects of DA-3030, a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, on neutropenia induced by anticancer agents in mice. **Korean Journal of BRM**, v. 4, n. 2, p. 307-318, 1994.

PEREIRA, O.A. **Substâncias Farmacêuticas Comerciais**. Rio de Janeiro: ABIQUIF, 2002. 500p.

RASO, S.W. et al. Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state. **Protein Science**, v. 14, p. 2246-2257, 2005.

RIBELA, M.T. et al. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 103-126, 2006.

RIGGIN, R. M. et al. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. **Analytical biochemistry**, v. 167, p. 199-209, 1987.

RINGDÈN et al., Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in allografts: uses, minuses, misconceptions, and future applications. **Experimental hematology**, v. 33, p. 505-512, 2005.

RUBENSTEIN, E.B. Colony stimulating factor in patients with fever and neutropenia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 117-121, 2000.

SAITO, M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 1115-1123, 2002.

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

SHIMAMURA, M. et al. Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic injury in mice induced by 5-fluorouracil. **Blood**, v. 69, p. 353-355, 1987.

SHIRAFUJI, N. et al. A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders. **Experimental Hematology**, v. 17, p. 116-119, 1989.

SOMERVILLE, L.E. et al. Discrimination of granulocyte colony-stimulating factor isoforms by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 732, p. 81-89, 1999.

TOHYAMA, K. et al. Detection of granulocyte colony-stimulating factor produced by a newly established human hepatoma cell line using a simple bioassay system. **Cancer Research**, v. 80, p. 335-340, 1989.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 28 ed. Rokville, United States Convention, 2005.

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

WELTE, K. et al. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. **Blood**, v. 88, n. 6, p. 1907-1929, 1996.

WELTE, K. et al. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony stimulating factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 1526-1530, 1985.

YAMAGUCHI, T. et al. Bioassay of human granulocyte colony-stimulating factor using human promyelocytic HL-60 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n. 9, p. 943-947, 1997.

YIN, J. et al. Effects of excipients on the hydrogen peroxide-induced oxidation of methionine residues in granulocyte colony-stimulating factor. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p.141-147, 2005.

YUN et al. Reproducible preparation and effective separation of PEGylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor with novel "PEG-pellet" PEGylation mode and ion-exchange chromatography. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 67-74, 2005.

ZHOU, G. et al. Characterization of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rHuG-CSF) by capillary zone electrophoresis, capillary isoelectric focusing electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 425-432, 2004.

ZSEBO, K. M. et al. Recombinant human granulocyte colony stimulating factor: molecular and biological characterization. **Immunobiology**, v. 172, p. 175-184, 1986.



**ANEXOS**

---

## 8 ANEXOS

---

### 8.1 Publicação científica

DALMORA, S.L.; MASIERO, S.M.K.; OLIVEIRA, P.R.; BRUM JUNIOR, L.; SANGOI, M.S. Validation of an RP-LC Method and Assessment of rhG-CSF in Pharmaceutical Formulations by Liquid Chromatography and Biological Assay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 1753-1767, 2006.

*Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*<sup>®</sup>, 29: 1753–1767, 2006  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN 1082-6076 print/1520-572X online  
DOI: 10.1080/10826070600716900

## **Validation of an RP-LC Method and Assessment of rhG-CSF in Pharmaceutical Formulations by Liquid Chromatography and Biological Assay**

**Sergio Luiz Dalmora**

Department of Industrial Pharmacy, Health Science Centre,  
Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

**Silvia Maria Krug Masiero**

Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science  
Centre, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

**Paulo Renato de Oliveira, Maximiliano da Silva Sangoi,  
and Liberato Brum Junior**

Department of Industrial Pharmacy, Health Science Centre,  
Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

**Abstract:** Gradient reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) was validated for the analysis of rhG-CSF in pharmaceutical formulations. The LC method was carried out on a Jupiter C<sub>4</sub> column (250 mm × 4.6 mm I.D.), the mobile phase A consisted of water:acetonitrile (90:10, v/v) with 0.1% TFA and the mobile phase B was water:acetonitrile (20:80, v/v) with 0.1% TFA, run at a flow rate of 0.5 mL/min and detection at 280 nm. Validation parameters were evaluated and the method was linear in the range of 10–300 µg/mL. The dimers, high molecular mass forms, sulphoxides, and deamidates were analysed by the LC methods and then subjected to independent neutropenia mouse bioassay, giving overall biological activities within 13.47% and 15.63%. The pharmaceutical samples were analysed by the chromatographic methods and compared to the bioassay, showing mean difference between the estimated potency of 2.04% lower for the RP-LC, and 4.03% lower for the SE-LC, with significant correlation ( $P > 0.05$ ). Due to the bioactivity of the rhG-CSF-related proteins, the SE-LC is

Address correspondence to Sergio Luiz Dalmora, Department of Industrial Pharmacy, Health Science Centre, Federal University of Santa Maria, 97.105-900–Santa Maria-RS, Brazil. E-mail: sdalmora@ccs.ufsm.br

1754

S. L. Dalmora et al.

proposed in combination with the RP-LC as an alternative to the bioassay for the potency assessment, improving the quality control of rhG-CSF in pharmaceutical dosage forms.

**Keywords:** Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF), Neutropenia mouse bioassay, Size-exclusion chromatography, Reversed-phase chromatography, Validation

## INTRODUCTION

The recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) is now currently available in two forms: non-glycosylated and glycosylated. The non-glycosylated form of the hG-CSF gene has been cloned and the recombinant protein produced in genetically engineered *Escherichia coli*. The hydrophobic protein is a 175 aminoacids chain containing an extra methionine at its N-terminus. Current clinical uses of rhG-CSF include promoting the recovery of neutrophil count in various conditions, such as neutropenia due to anticancer chemotherapy, neutropenia due to bone marrow transplantation, and neutropenia associated with the myelodysplastic syndrome or aplastic anemia.<sup>[1-4]</sup>

The biological activity of rhG-CSF can be assessed by the *in vivo* assays based on the evaluation of the neutrophils number of mice, leukocyte numbers after rhG-CSF treatment of cyclophosphamide treated mice, or 5-fluorouracil treated mice.<sup>[5-8]</sup> Growth factor dependent cell line assays using NFS-60 or G-NFS-60 cells, were used to determine the proliferative activity of the G-CSF molecule.<sup>[9-11]</sup>

The bioassays are useful to assess the quality, safety, and efficacy of those proteins, which could not be adequately characterized only by physicochemical tests. There have been decades of research on biologicals to reach a stage where the biological activity of proteins could be correlated with physicochemical analysis. The rhG-CSF is not described in any official literature and there is no correlation published between physicochemical methods and biological assays, that is highly recommended in the context of the reduction, refinement, and replacement of the bioassays.<sup>[12,13]</sup>

The chemical and physical instabilities of pharmaceutical proteins have been investigated and correlated to the biological properties of such forms. Chemical degradations include, at least, reduction, deamidation, and oxidation, that has been recognized to be an important cause of inactivation of therapeutic proteins and peptides, including rhG-CSF.<sup>[14,15]</sup> Protein aggregation may be induced by a variety of physical factors, and may result from chemical degradations or modifications as well, and may also have no or reduced activity, and altered immunogenicity.<sup>[16,17]</sup>

Today, many analytical techniques are available to monitor the purity, the chemical stability, and the potency of pharmaceutical proteins obtained through recombinant technology, but no single technique can satisfactorily provide sufficient information about a protein. Thus, a combination of

**Validation of an RP-LC Method**

1755

physicochemical, immunological, and biological method is recommended for the characterization and to monitor protein instability.<sup>[3,17]</sup> The size exclusion liquid chromatography (SE-LC) method was validated for the analysis of rhG-CSF in pharmaceutical formulations, demonstrating it to be able to detect and separate the dimers, related substances of higher molecular mass (HMM), and the intact protein.<sup>[18]</sup> The aggregation of rhG-CSF was investigated under physiological and native-like conditions.<sup>[16,19]</sup> Furthermore, the RP-LC has been widely used to separate and quantitate oxidized and deamidated proteins, and most likely influence the pharmacological activity of the compound by changing its polarity and/or lipophilicity. One drawback of this technique is that proteins are usually denatured or dissociated as they are adsorbed to the column matrix, and, thus, was found not to be an appropriate technique for establishing the potency of preparations that contain biologically inactive, non-covalent oligomers and polymers. The oxidation of rhG-CSF has been investigated, demonstrating that the RP-LC is also stability indicating.<sup>[20–22]</sup>

The aim of this paper, was to develop and validate a sensitive and specific RP-LC method that could be used in combination with the SE-LC for the analysis of the non-glycosylated rhG-CSF in pharmaceutical formulations, evaluating the correlation between the physicochemical methods and the biological assay, seeking for alternatives that can contribute to replace the bioassay, and to improve the quality control of this biological medicine.

**EXPERIMENTAL****Chemicals and Reagents**

The rhG-CSF reference substance was an in-house reference preparation generously supplied by the National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC, UK). A total of eleven batches of rhG-CSF (filgrastim) sample preparations containing 300 µg of active substance per millilitre were obtained from commercial sources and used within their shelf life period, and were identified by Arabic numbers from 1 to 11. Hydrogen peroxide 30% in aqueous solution was from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC grade acetonitrile, sodium hydroxide, potassium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium chloride, trifluoroacetic acid, and phosphoric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ifosfamide was from Asta Medica, Brazil, and May-Grünwald and Giemsa stains were from Inlab, Brazil. For all analyses, ultrapure water (Labconco, Kansas City, USA) filtered through a 0.22 µm membrane filter was used.

**Laboratory Animals**

Male 7-8-week-old BALB/c mice were housed in air conditioned controlled conditions (room temperature  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and relative humidity of 65%;

1756

S. L. Dalmora et al.

artificial illumination, 12 h per day), and they were used weighting between 19 and 24 g. They were given food and water ad libitum.

### Biological Assay

The animals were allocated to sample, standard, and control groups in a fully randomised order and identified by color code for the assay, usually with 6 mice per treatment group. Standard and test samples were diluted to the concentrations with 4, 12, and 36  $\mu\text{g}$  per mL with phosphate buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin. A single dose of 200 mg of ifosfamide/0.5 mL per mouse was injected intraperitoneally into the respective animal on day 0. Multiple injections of 0.5 mL rhG-CSF per mouse were injected, to the ifosfamide treated mice, from day 1 to day 4. Six hours after the last rhG-CSF injection peripheral blood was collected from the orbital venous sinus. Smears were prepared on glass slides and stained by the May-Grünwald-Giemsa method, and the white cells counted and expressed as percentage of the total number of neutrophils.

### Statistical Analysis

Statistical analyses of the bioassay data were carried out according to Finney<sup>[23]</sup> by parallel line methods ( $3 \times 3$ ), using a PLA 1.2 Program (Stegmann Systemberatung, Rodgau, Germany). Analysis of variance was performed for each assay, and the assumption of linearity and parallelism of the log dose-log response lines was tested ( $P < 0.05$ ). Statistical weights were computed as the reciprocal of the variance of the log potency. Estimates of log potency were examined for heterogeneity using a  $\chi^2$  test ( $P = 0.05$ ) and were combined as weighted geometric means of homogeneous estimates ( $P > 0.05$ ).<sup>[24]</sup>

### Apparatus and Chromatographic Conditions

A Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used equipped with an SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, DGU-14A degasser, CTO-10A<sub>VP</sub> column oven, SIL-10AD<sub>VP</sub> autosampler, and an SPD-M10A<sub>VP</sub> photodiode array (PDA) detector. The detector was set at 214 nm for size exclusion and 280 nm for reversed phase, and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP<sup>®</sup> V 6.12 software program.

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

The experiments were carried out on a size exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm  $\times$  7.8 mm I.D.).

**Validation of an RP-LC Method****1757**

A GCF-2000 Kit Security Guard Cartridge (Phenomenex) was used to protect the analytical column. The LC system was operated isocratically at controlled ambient temperature (25°C), using a mobile phase of phosphoric acid 0.1 M, pH 2.5 adjusted with sodium hydroxide 3 M. This was filtered through a 0.22 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA), and run at a flow rate of 1.0 mL/min. At the beginning of each experiment, 50 µL bovine albumin (1 mg/mL) was injected onto the column to reduce non-specific adsorption. The injection volume was 50 µL for both standard and samples.<sup>[18]</sup>

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

The experiments were carried out on a reversed phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C<sub>4</sub> column (250 mm × 4.6 mm I.D., with a pore size of 300 Å) and a C<sub>4</sub> Kit Security Guard Cartridge was used to protect the analytical column. The LC system was operated at controlled ambient temperature (25°C). The elution was performed by a fast gradient at a constant flow rate of 0.5 mL/min. Mobile phase A consisted of water:acetonitrile (90:10, v/v) containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and mobile phase B consisted of water:acetonitrile (20:80, v/v) containing 0.1% TFA. The applied gradient was as follows: 0.1 min 66% of B, from 0.1–35 min linear to 85% of B, from 35.1–38 min linear back to 66% and 38.1–48 min 66% of B. The mobile phases were filtered through a 0.22 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA). The injection volume was 50 µL for both standard and samples.

**Procedure****Samples and Standard Solutions**

Working standard and sample solutions of rhG-CSF were prepared daily by diluting the reference standard and the sample of pharmaceutical formulation in water to a final concentration of 200 µg/mL for the LC methods, and with phosphate buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin, to appropriate concentrations for the bioassay.

**Dimers and HMM Solutions**

The dimers and HMM were artificially produced subjecting the sample of pharmaceutical formulations at a concentration of 300 µg/mL, under strong mixing during 5 min, and maintaining the sample in water bath at 70°C during 1 h, respectively. The samples were analysed by SE-LC and used for the biological activity assessment.

1758

S. L. Dalmora et al.

### **Sulphoxide and Deamidate Solutions**

The sulphoxide and deamidate related proteins were produced by adding 15  $\mu\text{L}$  of hydrogen peroxide 30% during 8 min, to the sample of pharmaceutical formulations, at a concentration of 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The degraded samples were analysed by RP-LC and used for the biological activity evaluation.

### **Validation of the RP-LC Method**

Once the chromatographic and the experimental conditions were established, the method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, robustness, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), and system suitability tests, following the ICH guidelines.<sup>[25]</sup>

#### **Specificity**

Specificity of the method towards the drug was established through the determination of the peak purity of samples of pharmaceutical formulation of rhG-CSF, subjected to degradation by oxidative conditions and analysed by the RP-LC method using a PDA detector.

#### **Linearity**

The range of linearity was determined by constructing three calibration curves. For the construction of each calibration curve, eight standard concentrations of rhG-CSF in the range of 10–300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were prepared. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 45 min with the mobile phase flowing through the system. Each measurement was carried out in three replicates of 50  $\mu\text{L}$  injection for the standard solution to verify the repeatability of the detector response at each concentration. The peak areas of the chromatograms were plotted against the concentrations of rhG-CSF to obtain the calibration curve. The eight concentrations of the standard solution were subjected to regression analysis to calculate calibration equation and correlation coefficients.

#### **Precision**

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). Repeatability was determined by performing six repeated analysis of the same samples of rhG-CSF, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-day) and, also, by another analyst performing the analysis in the same laboratory (between-analysts).



**Validation of an RP-LC Method****1759****Accuracy**

The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the formulation excipients with known amounts of the reference drug, corresponding to the concentrations of 80, 100, and 120%. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix.

**Robustness**

The robustness was assessed by altering the following experimental conditions such as: changing the flow rate from 0.3 to 1.0 mL/min, the injection volume from 30 to 60  $\mu$ L, the wavelength in the range of 210 to 320 nm, the temperature of the column between 25 to 40°C, and stability of the analytical solution in the autosampler at controlled ambient temperature (25°C).

**Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ)**

For the calculation of the LOD and the LOQ, a calibration equation was generated by using the mean values of the three independent calibration curves. The LOD and the LOQ were obtained by using the mean of the slope and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as defined by ICH.<sup>[25]</sup>

**System Suitability**

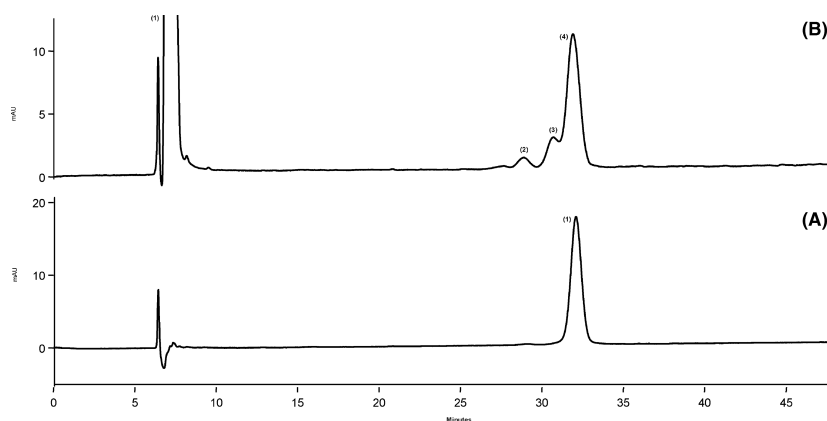
To ensure the validity of the analytical procedure, data from five injections of 50  $\mu$ L of the working standard solution containing 200  $\mu$ g/mL were used for the evaluation of the system suitability parameters like asymmetry, number of theoretical plates, and retention time and area, through the CLASS-VP<sup>®</sup> V 6.12 software.

**RESULTS AND DISCUSSION****Validation of the RP-LC Method**

A typical chromatogram was obtained by the proposed RP-LC method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to rhG-CSF with the retention time of 31.9 min, and no interfering peaks due to the excipients is shown in Figure 1. The specificity of the analytical method was indicated, by the oxidative conditions that generated additional peaks

1760

S. L. Dalmora et al.



**Figure 1.** RP-LC chromatograms of rhG-CSF. (A) Reference substance (200 µg/mL): peak 1–main peak. (B) degraded pharmaceutical sample: peak 1–hydrogen peroxide, peak 2–deamidates, peak 3–sulphoxides, and peak 4–main peak.

with retention times of 28.9 and 30.7 min, of deamidates and sulphoxides. The studies with the PDA detector showed that the rhG-CSF peak was free from any coeluting peak, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of rhG-CSF.

The calibration curves for rhG-CSF were constructed by plotting the area of the peaks versus concentration. Linearity was observed in a concentration range from 10 to 300 µg/mL. The value of the determination coefficient ( $r^2 = 0.9999$ ,  $y = 3773.4x - 16617.9$ ) indicated significant linearity of the calibration curve for the method.

The precision of an analytical method was studied as the repeatability, by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the concentration of 200 µg/mL. The mean of the determinations of rhG-CSF in the samples of pharmaceutical formulation was 98.79%, with the RSD calculated as 0.36%.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-day, Table 1); the RSD values obtained were 1.12 and 0.48%, respectively. Between analysts, precision was determined by calculating the RSD for the analysis of three samples of the pharmaceutical formulation by two analysts; the values were found to be 1.40, 1.18, and 0.69%, respectively (Table 2).

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 160, 200, and 240 µg/mL. The absolute means obtained were 99.42, 100.37, and 99.87% respectively, with a mean value of 99.90% and RSD of 0.47% as shown in Table 3. It is evident that the method is accurate within the desired range.

## Validation of an RP-LC Method

1761

**Table 1.** Inter-day precision data of RP-LC for rhG-CSF in samples of pharmaceutical formulation

| Sample | Day | Recovery <sup>a</sup> (%) | Mean <sup>b</sup> (%) | RSD <sup>c</sup> (%) |
|--------|-----|---------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1      | 1   | 101.20                    | 100.40                | 1.12                 |
|        | 2   | 99.09                     |                       |                      |
|        | 3   | 100.84                    |                       |                      |
| 2      | 1   | 100.35                    | 99.80                 | 0.48                 |
|        | 2   | 99.74                     |                       |                      |
|        | 3   | 99.39                     |                       |                      |

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

The robustness was determined by analyzing the same pharmaceutical samples under the variety of conditions described. The results and the experimental range of the selected variables are given in Table 4, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when the above modifications were made in the experimental conditions, thus showing that the method is robust.

The LOD and the LOQ calculated were 0.66 and 2.20 µg/mL, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision lower than 5% and accuracy within ±5%, was found to be 10 µg/mL.

The system suitability tests were also carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed. Results of system suitability tests are given in Table 5, showing that the parameters are within the suitable range.

**Table 2.** Between-analyst precision data of RP-LC for rhG-CSF in samples of pharmaceutical formulation

| Sample | Analyst | Recovery <sup>a</sup> (%) | Mean <sup>b</sup> (%) | RSD <sup>c</sup> (%) |
|--------|---------|---------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1      | A       | 98.71                     | 99.70                 | 1.40                 |
|        | B       | 100.68                    |                       |                      |
| 2      | A       | 100.29                    | 101.13                | 1.18                 |
|        | B       | 101.97                    |                       |                      |
| 3      | A       | 100.37                    | 99.88                 | 0.69                 |
|        | B       | 99.39                     |                       |                      |

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

1762

S. L. Dalmora et al.

**Table 3.** Accuracy of RP-LC for rhG-CSF in samples of pharmaceutical formulation

| Nominal concentration<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | Mean concentration<br>found <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | RSD <sup>b</sup><br>(%) | Accuracy<br>(%) |
|--|--|-------------------------|-----------------|
| 160  | 159.07   |                         |                 |
| 200  | 200.75   | 0.47                    | 99.90           |
| 240  | 239.70   |                         |                 |

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

### Analysis of Pharmaceutical Dosage Forms by Physicochemical and Biological Methods

The analysis of eleven commercial batches of pharmaceutical dosage forms, carried out in parallel by the chromatographic and biological methods, resulted in a mean difference between estimated potency of  $2.04\% \pm 2.67$  lower for the RP-LC compared to the bioassay, except for the sample 10, that due to the altered forms, showed 5.34% higher value than the biological potency, according to the Table 6. The mean difference of the estimated potency was also  $4.03\% \pm 1.32$  lower for the SE-LC compared to the bioassay, and the highest difference was 5.50%, with significant correlation as calculated by the Student's *t*-test ( $P > 0.05$ ). As shown by the samples

**Table 4.** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

| Variable                                  | Range investigated | rhG-CSF <sup>a</sup> (%) | Optimized value |
|---|--------------------|--------------------------|-----------------|
| Flow rate (mL/min)                        | 0.3                | 101.98                   |                 |
|   | 0.5                | 100.01                   | 0.5             |
|   | 0.8                | 101.25                   |                 |
|   | 1.0                | 99.96                    |                 |
| Column temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 25                 | 100.53                   | 25              |
|   | 30                 | 101.20                   |                 |
|   | 35                 | 101.77                   |                 |
|   | 40                 | 102.10                   |                 |
|   | 40                 | 102.10                   |                 |
| Injection volume ( $\mu\text{L}$ )        | 30                 | 100.42                   |                 |
|   | 50                 | 100.05                   | 50              |
|   | 60                 | 101.10                   |                 |
| Solution stability                        | Autosampler 24 h   | 99.20                    | —               |
| Wavelength (nm)                           | 210–320            | —                        | 280             |

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

## Validation of an RP-LC Method

1763

**Table 5.** Results of the system suitability test

| Parameter          | Minimum | Maximum | RSD (%) | Status |
|--------------------|---------|---------|---------|--------|
| Asymmetry          | 1.04    | 1.05    | 0.42    | Passed |
| Theoretical plates | 13075   | 13626   | 1.55    | Passed |
| Retention time     | 31.81   | 31.90   | 0.10    | Passed |
| Area               | 878897  | 896292  | 0.85    | Passed |

10 and 11, these values can change due to the content of the rhG-CSF related contaminants of each product, indicating the importance of the identity and purity evaluation of the samples before the quantitative control of the potency by SE-LC.

The results of the content/potency were calculated against the reference substance and expressed as percentage of the main peak, for the RP-LC, and the monomer for the SE-LC, also illustrated with the mean values for each method (Table 6). The results of the analysis of the aggregates and

**Table 6.** Determination of the rhG-CSF potency in pharmaceutical dosage forms against the reference standard

| Sample          | SE-LC <sup>a,b</sup><br>(%) | RP-LC <sup>a,b</sup><br>(%) | Bioassay <sup>a</sup> |                                 |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|
|                 |                             |                             | Potency<br>(%)        | Confidence<br>limits (P = 0.95) |
| 1               | 97.20                       | 98.30                       | 102.70***             | 90–117                          |
| 2               | 95.81                       | 96.53                       | 100.20**              | 82–122                          |
| 3               | 94.50                       | 97.11                       | 98.40*                | 71–136                          |
| 4               | 93.02                       | 94.25                       | 98.00*                | 71–134                          |
| 5               | 99.22                       | 101.60                      | 103.10*               | 79–134                          |
| 6               | 110.00                      | 111.50                      | 113.50*               | 87–150                          |
| 7               | 94.76                       | 96.20                       | 99.20**               | 77–127                          |
| 8               | 95.92                       | 98.19                       | 101.10*               | 83–123                          |
| 9               | 121.56                      | 124.59                      | 126.10*               | 103–156                         |
| 10              | 74.80                       | 83.54                       | 78.20*                | 64–95                           |
| 11              | 86.90                       | 83.80                       | 87.50*                | 72–106                          |
| Mean            | 96.70                       | 98.69                       | 100.73                | —                               |
| SD <sup>c</sup> | 11.84                       | 11.52                       | 12.31                 | —                               |

\*Number of independent assays.

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

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

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

1764

S. L. Dalmora et al.

**Table 7.** Analysis of the rhG-CSF-related proteins in pharmaceutical dosage forms

| Sample          | SE-LC <sup>a</sup> |           |         | RP-LC <sup>a</sup> |                            |
|-----------------|--------------------|-----------|---------|--------------------|----------------------------|
|                 | Monomer (%)        | Dimer (%) | HMM (%) | Main peak (%)      | Deamidates/sulphoxides (%) |
| 1               | 99.26              | 0.18      | 0.56    | 99.88              | 0.12                       |
| 2               | 99.84              | 0.08      | 0.08    | 99.93              | 0.07                       |
| 3               | 99.78              | 0.22      | 0.00    | 99.90              | 0.10                       |
| 4               | 99.53              | 0.00      | 0.47    | 99.49              | 0.51                       |
| 5               | 99.34              | 0.00      | 0.66    | 100.00             | 0.00                       |
| 6               | 99.93              | 0.00      | 0.07    | 99.95              | 0.05                       |
| 7               | 99.34              | 0.00      | 0.66    | 99.58              | 0.42                       |
| 8               | 99.51              | 0.41      | 0.08    | 99.61              | 0.39                       |
| 9               | 99.78              | 0.00      | 0.22    | 99.81              | 0.19                       |
| 10              | 83.76              | 11.80     | 4.44    | 99.89              | 0.11                       |
| 11              | 99.81              | 0.00      | 0.19    | 95.68              | 4.32                       |
| Mean            | 98.17              | 1.15      | 0.68    | 99.43              | 0.57                       |
| SD <sup>b</sup> | 4.79               | 3.53      | 1.27    | 1.25               | 1.25                       |

<sup>a</sup>Mean of three replicates.<sup>b</sup>SD = Standard deviation.

degraded forms were expressed as percentage of the total area obtained in the respective chromatographic procedure, as shown in Table 7.

Besides, some pharmaceutical samples were artificially degraded and analysed by the RP-LC validated method, and subjected to the neutropenia mouse bioassay, resulting, for the sulphoxides and deamidates forms, in a mean biological activity of  $15.63 \pm 5.73\%$  ( $n = 3$ ). Moreover, the dimers and HMM were also analysed by SE-LC and subjected to the bioassay, resulting in mean biological activities of  $14.60 \pm 3.81\%$  ( $n = 3$ ) and  $13.47 \pm 5.22\%$  ( $n = 3$ ), respectively. Therefore, the RP-LC method is recommended for the analysis of the related proteins, and the SE-LC for the evaluation of dimers and HMM, and for the potency assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations.

A current concern in the administration of recombinant derived proteins, is that the presence of rhG-CSF related contaminants can have undesirable side effects and usually may have no or reduced activity, as demonstrated in the present article. So, proper quality controls must be taken to ensure that the levels of such forms are accurately determined, and the limits in the pharmaceutical products must be well established. The combination of the validated physicochemical techniques employed, offered a high degree of resolving power and selectivity and is suggested as an alternative in the context of the replacement of the bioassay for the quality control of rhG-CSF in pharmaceutical dosage forms.

**Validation of an RP-LC Method****1765****CONCLUSION**

The results of the validation show that the proposed RP-LC method is specific, accurate, precise, and possesses excellent linearity characteristics, and has been used for the analysis of the pharmaceutical formulations. Moreover, based on the reduced biological activity of the rhG-CSF related forms, and the correlation between the SE-LC and the neutropenia mouse bioassay, the SE-LC method is proposed in combination with the RP-LC, as an alternative to the bioassay for the potency evaluation of rhG-CSF, that can be applied to the purification process and to the quality assessment of the pharmaceutical product.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for their support.

**REFERENCES**

1. Zsebo, K.M.; Cohen, A.M.; Murdock, D.C.; Boone, T.C.; Inoue, H.; Chazin, V.R.; Hines, D.; Souza, L.M. Recombinant human granulocyte colony stimulating factor: Molecular and biological characterization. *Immunobiol.* **1986**, *172*, 175–184.
2. Lu, H.S.; Clogston, C.L.; Narhi, L.O.; Merewether, L.A.; Pearl, W.R.; Boone, T.C. Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (13), 8770–8777.
3. Herman, A.C.; Boone, T.C.; Lu, H.S. Characterization, formulation, and stability of Neupogen® (Filgrastim), a recombinant human granulocyte colony stimulating factor. In *Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs*; Pearlman, R., Wang, Y.J., Eds.; Plenum Press: New York, 1996, 303–326.
4. Rubenstein, E.B. Colony stimulating factor in patients with fever and neutropenia. *Intl. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 117–121.
5. Bowen, S.; Tare, N.; Inoue, T.; Yamasaki, M.; Okabe, M.; Horii, I.; Eliason, J.F. Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony stimulating factor mutein. *Exp. Hematol.* **1999**, *27*, 425–432.
6. Matsuzaki, G.; Li, X.Y.; Ohyama, Y.; Nomoto, K. Kinetics of serum granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) concentration and G-CSF receptor expression during G-CSF treatment of cyclophosphamide treated mice. *Intl. J. Immunoph.* **1996**, *18*, 363–369.
7. Kaneko, M.; Kawakita, T.; Kumazawa, Y.; Takimoto, H.; Nomoto, K.; Yoshikawa, T. Accelerated recovery from cyclophosphamide induced leukopenia in mice administered a japanese ethical herbal drug, *Hochu-ekki-to*. *Immunopharmacol.* **1999**, *44*, 223–231.

8. Shimamura, M.; Kobayashi, Y.; Yuo, A.; Urabe, A.; Okabe, T.; Komatsu, Y.; Itoh, S.; Takaku, F. Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic injury in mice induced by 5-fluorouracil. *Blood*. **1987**, *69*, 353–355.
9. Shirafuji, N.; Asano, S.; Matsuda, S.; Watari, K.; Takaku, F.; Nagata, S. A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders. *Exp. Hematol.* **1989**, *17*, 116–119.
10. Hammerling, U.; Kroon, R.; Sjödin, L. *In vitro* bioassay with enhanced sensitivity for human granulocyte colony-stimulating factor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1995**, *13* (1), 9–20.
11. Oshima, Y.; Tojo, A.; Niho, Y.; Asano, S. Biological activity of human granulocyte colony stimulating factor with a modified c-terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267*, 924–927.
12. Mire-Sluis, A.R.; Gerrard, T.; Das, R.G.; Padilha, A.; Thorpe, R. Biological assays: Their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. *Biologicals* **1996**, *24*, 351–362.
13. Bristow, A.F.; Jeffcoate, S.L. Analysis of therapeutic growth hormone preparations: Report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies. *Biologicals* **1992**, *20*, 221–231.
14. Lu, H.S.; Fausset, P.R.; Narhi, L.O.; Horan, T.; Shinagawa, K.; Shimamoto, G.; Boone, T.C. Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effect on stability and biological activity. *Biochem. Biophys.* **1999**, *362*, 1–11.
15. Yin, J.; Chu, J.W.; Ricci, M.S.; Brems, D.N.; Wang, D.I.C.; Trout, B.L. Effects of excipients on the hydrogen peroxide-induced oxidation of methionine residues in granulocyte colony-stimulating factor. *Pharm. Res.* **2005**, *22* (1), 141–147.
16. Raso, S.W.; Abel, J.; Barnes, J.M.; Maloney, K.M.; Pipes, G.; Treuheit, M.J.; King, J.; Brems, D.N. Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor *in vitro* involves a conformationally altered monomeric state. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 2246–2257.
17. Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Intl. J. Pharm.* **1999**, *185*, 129–188.
18. Codevilla, C.F.; Brum, L., Jr.; Oliveira, P.R.; Dolman, C.; Rafferty, B.; Dalmora, S.L. Validation of an SE-HPLC method for the analysis of rhG-CSF in pharmaceutical formulations. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2004**, *27*, 2681–2690.
19. Krishnan, S.; Chi, E.Y.; Webb, J.N.; Chang, B.S.; Shan, D.; Goldenberg, M.; Manning, M.C.; Randolph, T.W.; Carpenter, J.F. Aggregation of granulocyte colony stimulating factor under physiological conditions: Characterization and thermodynamic inhibition. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6422–6431.
20. Dalmora, S.L.; Oliveira, J.E.; Affonso, R.; Gimbo, E.; Ribela, M.T.C.P.; Bartolini, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. *J. Chromatogr. A.* **1997**, *782*, 199–210.
21. Leon, J.; Reubsæet, E.; Beijnen, J.H.; Bult, A.; Hop, E.; Scholten, S.D.; Teeuwesen, J.; Underberg, W.J.M. Oxidation of recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 283–289.
22. Léon, J.; Reubsæet, E.; Beijnen, J.H.; Bennekom, W.P.V.; Bult, A.; Hoekstra, A.J.; Hop, E.; Os, P.J.H.J.V.; Teeuwesen, J.; Underberg, W.J.M. Reduction of Cys<sup>36</sup>–Cy<sup>42</sup> and Cys<sup>64</sup>–Cy<sup>74</sup> disulfide bonds in recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 837–845.



**Validation of an RP-LC Method****1767**

23. Finney, J.D. *Statistical Methods in Biological Assay*; Charles Griffin: London, 1978.
24. Gaines, D.R.E.; Tydeman, M.S. Iterative weighted regression analysis of logit responses. A computer program for the analysis of bioassays and immunoassays. *Comput. Programs Biomed.* **1980**, *15*, 13–22.
25. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Methodology (ICH-Q2B), November 1996; 1–8.

Received January 14, 2006

Accepted February 10, 2006

Manuscript 6820

