

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

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA AVALIAÇÃO DE
POTÊNCIA DE MOLGRAMOSTIMA. CORRELAÇÃO
COM O BIOENSAIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diogo Paim Leal

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA AVALIAÇÃO DE
POTÊNCIA DE MOLGRAMOSTIMA. CORRELAÇÃO COM O
BIOENSAIO**

por

Diogo Paim Leal

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS, Brasil

2010

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

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

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA EM
FASE REVERSA PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE
MOLGRAMOSTIMA. CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO**

elaborada por
Diogo Paim Leal

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Davi Pereira de Santana, Dr. (UFPE)

Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, Dr^a. (IPEN-USP)

Santa Maria, 24 de Setembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, pelo amor, educação e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa;

Aos meus irmãos, pelo carinho, amizade e compreensão;

Aos colegas de mestrado Estevan e Felipe, bolsistas e técnicos do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência, pelo auxílio e amizade;

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial;

À UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

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

RESUMO

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

VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE MOLGRAMOSTIMA. CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO

AUTOR: DIOGO PAIM LEAL

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de Setembro de 2010.

O fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é uma citocina que regula a proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas e ativa granulócitos e macrófagos maduros. É clinicamente indicado após quimioterapia para o câncer e após transplante de medula óssea. No presente trabalho foi validado método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para a avaliação da molgramostima, forma recombinante não-glicosilada do GM-CSF, em formulação biofarmacêutica. Utilizou-se coluna Júpiter C₄ (250 mm x 4,6 mm d.i.), mantida a 45 °C. A fase móvel A foi composta de ácido trifluoracético 0,1% e a fase móvel B de ácido trifluoracético 0,1% em acetonitrila, eluídas no gradiente: 0,01 – 34 min, 37 – 50% de B; 34 – 35 min, 50 – 37% de B, mantendo-se nesta proporção até 40 min. Utilizou-se vazão de 1 mL/min, usando detector de arranjo de diodos (DAD) a 214 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 29,2 min, sendo linear na faixa de concentração de 2 – 300 µg/mL ($r^2 = 0,9992$). O procedimento foi validado, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação. A especificidade foi comprovada através de estudos de degradação, demonstrando também que não houve interferência dos excipientes. Além disso, realizou-se o teste de citotoxicidade *in vitro* dos produtos degradados que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). O método foi aplicado para avaliação de potência de molgramostima e de proteínas relacionadas, e os resultados foram correlacionados com o bioensaio, observando-se diferenças médias de potência 1,02% superiores por CL-FR. Contribuiu-se assim para o estabelecimento de alternativas que aprimoram o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica.

Palavras-chave: molgramostima, fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos, bioensaio cromatografia líquida, fase reversa, validação.

ABSTRACT

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

VALIDATION OF A REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE POTENCY EVALUATION OF MOLGRAMOSTIM. CORRELATION WITH THE BIOASSAY

AUTHOR: DIOGO PAIM LEAL

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, September 24th 2010.

The granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a cytokine that regulates the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells and activates mature granulocytes and macrophages. Clinically is used in enhancing hematopoietic recovery after cancer chemotherapy and bone marrow transplantation. A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the determination of the non-glycosylated recombinant rhGM-CSF (Molgramostim) in biopharmaceutical formulations. The RP-LC method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at 45 °C. The mobile phase A consisted of 0.1% TFA and the mobile phase B consisted of 0.1% TFA in acetonitrile, run at a gradient from: 0.01 – 34 min, 37% – 50% of B; 34 – 35 min linear back to 37% of B and 35 – 40 min, 37% of B. The flow rate was 1 mL/min, and using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The chromatographic separation was obtained with the retention time of 29.2 min, and was linear over the concentration range of 2-300 µg/mL ($r^2 = 0.9992$). The procedure was validated evaluating parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection and limit of quantitation. The specificity was proven through degradation studies, showing that also there was no interference of the excipients. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed significant differences ($p < 0.05$). The proposed method was applied for the analysis of molgramostim and their related proteins, and the results were correlated to the bioassay, showing mean differences of the potency 1.02% higher for the RP-LC method, contributing to establish alternatives to characterize and monitoring its instability, improving the quality control and assuring the therapeutic efficacy.

Keywords: molgramostim, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, bioassay, liquid chromatography, reversed-phase, validation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação da estrutura tridimensional da molgramostima, adaptada (WALTER, et al.,1992).....15

FIGURA 2 - Representação da estrutura primária da molgramostima com suas duas pontes dissulfeto adaptada (CLARK-LEWIS et al., 1988).....16

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA SUBMETIDA 3.1

FIGURE 1 – RP-LC chromatograms of rhGM-CSF (100 µg/mL). (A) Ph. Eur. CRS for rhGM-CSF: peak 1 = rhGM-CSF. (B) After degradation by oxidative conditions: peak 1 = deamidates, 2 = sulphoxides, 3 = rhGM-CSF. (C) biopharmaceutical formulations: peak 1 = excipients, 2 = rhGM-CSF.....49

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA SUBMETIDA 3.1

TABLE 1 – Inter-days and between-analysts precision data of RP-LC for rhGM-CSF in biopharmaceutical formulations.....45

TABLE 2 – Accuracy of RP-LC for rhGM-CSF in the formulation.....46

TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing...47

TABLE 4 – Comparative content/potencies evaluation of rhGM-CSF in biopharmaceutical formulations, by RP-LC method and bioassay against the reference substance48

LISTA DE ABREVIATURAS

BP	Farmacopéia Britânica
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human use
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
CZE	Eletroforese capilar de zona
DAD	Detector de arranjo de diodos
d.i.	Diâmetro interno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMA	European Medicines Agency
EP	Farmacopéia Européia
FAB-MS	Espectrometria de massas com bombardeamento atômico
FDA	Food and Drug Administration
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GM-CSF	Fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos
hGM-CSF	Fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSA	Albumina de soro humano
IC ₅₀	Concentração inibitória 50
ICH	International Conference on Harmonisation
IL	Interleucina
kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídios
LQ	Limite de quantificação
mg	Miligrama

min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PEG	Polietilenoglicol
pg	Picograma
PTH	Hormônio da paratireóide
SDS-CGE	Eletroforese capilar em gel com dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
r ²	Coefficiente de determinação
rhGM-CSF	Fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos humano recombinante
rmGM-CSF	Fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos de rato recombinante
rhIFN- α 2a	Interferon-alfa 2a humano recombinante
SBR-rhGM-CSF	Substância biológica de referência do fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos humano recombinante
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
°C	Grau Celsius
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA SUBMETIDA	23
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÕES.....	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas recentes, na área de biotecnologia, possibilitaram a transferência de genes de um organismo para outro e viabilizaram a produção de macromoléculas altamente purificadas em quantidades consideráveis. Entre elas destaca-se o fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos humano recombinante (rhGM-CSF).

O rhGM-CSF não glicosilado, também denominado molgramostima, é um fator de crescimento hematopoiético que regula proliferação, diferenciação e funções dos monócitos-macrófagos e células granulocíticas. É clinicamente indicado após quimioterapia intensiva para câncer e após transplante de medula óssea, para corrigir os baixos níveis de neutrófilos e monócitos no sangue. Como resultado, a molgramostima minimiza a necessidade de tratamento com antibióticos e o risco de complicações decorrentes de infecções.

A avaliação de potência da molgramostima tem sido realizada através do ensaio biológico *in vitro*, baseado na atividade proliferativa das células TF-1. As respostas espectrofotométricas são determinadas pelo efeito sobre corantes vitais como azul de alamar e sais de tetrazólio (KITAMURA et al., 1989, FOGOLIN et al., 2002; LEE et al., 2008; SCHWANKE et al., 2009).

Por sua vez, os métodos por cromatografia líquida (CL) viabilizam a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas, e também tem sido estudados como alternativa ou para uso em combinação com os bioensaios. Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) com detecção no ultravioleta (UV) são amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e determinação das formas oxidadas e desamidadas de proteínas (RIBELA et al., 2006; ZARRIN et al., 2006; SILVA et al., 2009). Observa-se que presença de formas relacionadas e degradadas de proteínas recombinantes de uso terapêutico pode causar efeitos indesejáveis com redução ou perda da atividade farmacológica, razão pela qual devem ser estabelecidas especificações para os produtos acabados, para garantir também a eficácia e segurança clínica (EMEA, 2005; EMEA, 2007; LONGSTAFF et al., 2009).

As proteínas requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com o sítio de ação. Por essa razão, é enfatizada a caracterização físico-química para demonstrar estruturas correspondentes às formas biologicamente ativas dos produtos biotecnológicos. As instabilidades químicas e físicas de proteínas recombinantes têm sido investigadas por diferentes técnicas analíticas que incluem cromatografia líquida, espectrometria de massas,

análise térmica e eletroforese capilar. Esses procedimentos juntamente com os ensaios da atividade biológica e enzimaímunoensaio (ELISA), possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, bem como avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos, que por sua vez, podem contribuir para o desenvolvimento de novas moléculas similares (WANG et al., 1999;; ICH, 1999; FDA, 2001; E.P. 2007; PARNHAM et al., 2007; KRESSE, 2009).

Acrescenta-se que após o desenvolvimento de um método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que ele atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ICH, 2005; ROZET et al., 2007). A avaliação de biomoléculas produzidas por expressão em sistemas celulares diversos, por métodos eficientes e validados é fundamental para assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos, durante o processo de registro.

O presente trabalho teve por objetivos: a) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa para a avaliação de proteínas relacionadas e da forma não-alterada da molgramostima em produtos biofarmacêuticos; b) estabelecer correlação com o bioensaio *in vitro*. Desse modo, pretendeu-se estudar alternativas que contribuam para aprimorar o controle da qualidade garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

O fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos humano recombinante (rhGM-CSF) pode ser expresso em *Escherichia coli* (molgramostima), levedura *Saccharomyces cerevisiae* (sargramostima) ou em células de ovário de hamster Chinês (regramostima) (DESCH & OZER, 1997). Enquanto sargramostima e regramostima são as formas glicosiladas do rhGM-CSF, a molgramostima é constituída por uma cadeia polipeptídica não-glicosilada com 127 aminoácidos, incluindo quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto. A molgramostima possui massa molecular de, aproximadamente 14,5 kDa, com estrutura tridimensional altamente compacta, globular e núcleo predominantemente hidrofóbico. A fórmula química é $C_{693}H_{1007}N_{171}O_{196}S_8$ e a estrutura tridimensional da molgramostima está representada na Figura 1 (WINGFIELD et al., 1988; REICHERT et al., 1990; WALTER et al., 1992; TSARBOPOULOS et al., 1993; BP, 2010).

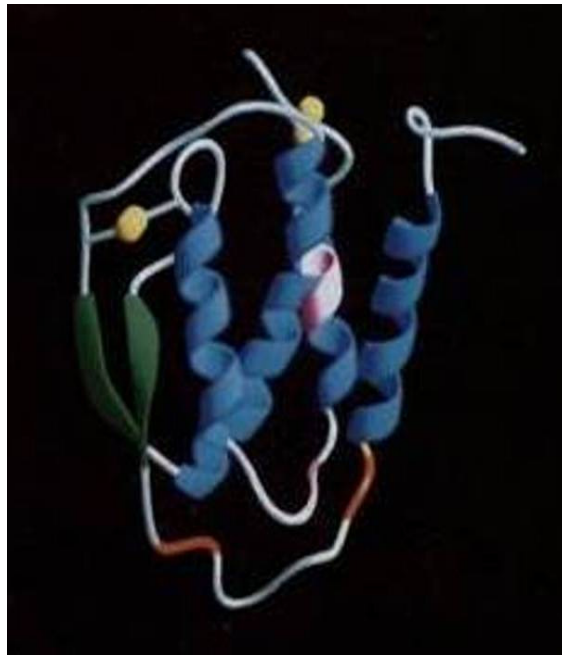


Figura 1. Representação da estrutura tridimensional da molgramostima, adaptada (WALTER et al., 1992).

A estrutura primária da molgramostima está representada na Figura 2 (CLARK-LEWIS et al., 1988).

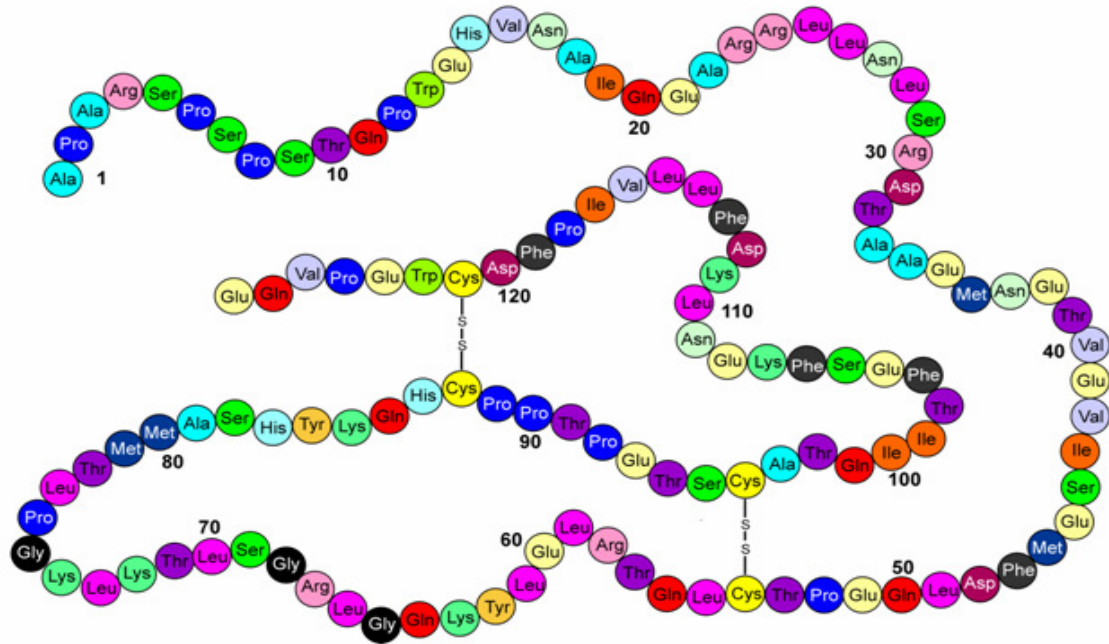


Figura 2 – Estrutura primária da molgramostima com suas duas pontes dissulfeto, adaptada (CLARK-LEWIS et al., 1988).

O fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é produzido por diferentes tipos de células dentre elas, linfócitos T, macrófagos, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos, após indução por estímulos que incluem lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e hormônio da paratireóide (PTH). Demonstrou-se que citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também induzem a formação de GM-CSF *in vitro* (FLEETWOOD et al., 2005; KIM et al., 2008). A molgramostima estimula a produção de colônias de granulócitos e macrófagos a partir de seus precursores e promove o crescimento e diferenciação das células progenitoras pluripotentes. Também aumenta a formação eritrócitos na medula óssea e a atividade fagocitária de granulócitos maduros. É clinicamente indicada após quimioterapia para o câncer e após transplante de medula óssea. Pode ser utilizada na profilaxia ou tratamento adjuvante de infecções bacterianas ou fúngicas em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com câncer submetidos a quimioterapia mielossupressora e com infecção avançada por HIV. Também apresenta efeitos benéficos em processos inflamatórios e nas doenças autoimunes (MAYER et al., 1987; HUSSEIN et al., 1995; ARMITAGE 1998; BARREDA et al., 2004; GHOSH et al., 2007; HAMILTON, 2008).

A molgramostima com um resíduo adicional de metionina na posição 1 foi expressa no espaço periplasmático da *Escherichia coli* (*E. coli*) usando plasmídio com promotor de temperatura. A atividade específica determinada na molgramostima purificada demonstrou que apesar da falta de glicosilação, a molécula mantém a conformação nativa e retém suas funções biológicas (BURGESS et al., 1987).

A avaliação de potência da molgramostima tem sido realizada através do ensaio biológico *in vitro*, baseado na atividade proliferativa das células TF-1. As respostas espectrofotométricas são determinadas pelo efeito sobre corantes vitais como azul de alamar e sais de tetrazólio (KITAMURA et al., 1989, FOGOLIN et al., 2002; LEE et al., 2008; SCHWANKE et al., 2009). Mire-sluis et al. (1995) realizaram estudo colaborativo internacional que estabeleceu o primeiro padrão internacional da molgramostima para ensaio biológico. Os participantes executaram bioensaio com diferentes linhagens celulares, incluindo as células TF-1, ensaio da medula óssea e imunoenaios *in vitro*, com base nos quais foi estabelecida a potência e avaliada a estabilidade da preparação.

Schrimsher et al. (1987) caracterizaram a molgramostima por técnicas de eletroforese e físico-químicas, que incluem cromatografia líquida e espectrofotometria e avaliaram a atividade biológica por bioensaios em cultura de células mielóides humana leucêmicas. Concluíram que apesar da ausência de glicosilação e da presença de metionina inicial, a molgramostima apresenta atividade semelhante a proteína natural.

A eficácia do rhGM-CSF glicosilado e não-glicosilado foi avaliada em macacos rhesus após injeções diárias por via subcutânea e intravenosa, durante sete dias consecutivos. Observou-se aumento dos leucócitos (após 24 horas), com efeitos progressivamente maiores dependendo da dose (MAYER et al., 1987).

Yowell et al. (1993) analisaram rhGM-CSF por eletroforese capilar, focalização isoelétrica capilar e cromatografia líquida demonstrando a influência dos sais da formulação e avaliando a eficiência e reprodutibilidade de cada método de quantificação. Concluíram que as concentrações de sais influenciam a sensibilidade dos métodos quantitativos por eletroforese capilar e focalização isoelétrica capilar.

Ohgami et al. (1989) caracterizaram a molgramostima por espectrometria de massas com bombardeamento atômico (FAB-MS). Submeteram a amostra à digestão enzimática com tripsina e separaram seis frações usando cromatografia líquida em fase reversa com gradiente linear utilizando coluna C₁₈ no comprimento de onda de 230 nm. As frações foram submetidas ao ensaio biológico com células da medula óssea de cobaio obtendo atividade semelhante para quatro frações, e menor para as outras duas. Demonstraram a sulfoxidação do

resíduo de metionina que pode se formar durante o processo de renaturação ou purificação da proteína. Observaram que a combinação desses métodos possibilita eficiente caracterização de proteínas recombinantes.

O GM-CSF humano (hGM-CSF) foi sintetizado quimicamente através de métodos automatizados em fase sólida. Os requisitos estruturais para as atividades do hGM-CSF sintético foram examinadas através do planejamento e síntese de fragmentos e análogos. Os autores demonstraram que o hGM-CSF sintético impuro tem ações semelhantes nas células hematopoiéticas quando comparado ao rhGM-CSF purificado (CLARK-LEWIS et al. 1988).

Wingfield et al. (1988) analisaram a conformação e a estabilidade da molgramostima por ultracentrifugação, eletroforese em gel e por espectrometria de massas. Demonstraram que as pontes dissulfeto intramoleculares são essenciais para manter a conformação nativa da proteína. Compararam as formas glicosiladas e não-glicosiladas, observando que a glicosilação não tem maiores efeitos na estabilidade conformacional do rhGM-CSF.

Cebon et al. (1988) desenvolveram ensaio de ELISA, sensível e reprodutível para determinação da molgramostima na faixa de sensibilidade de 2,5 ng/mL a 100 pg/mL. O ensaio foi aplicado para a avaliação farmacocinética da molgramostima através de injeção subcutânea da dose de 10 µg/Kg que propiciou níveis sorológicos superiores a 1 ng/mL, com pico máximo, aproximadamente às 3 horas. Os resultados foram comparáveis com os fornecidos pelo bioensaio da cultura de células de medula óssea.

Kumarasamy et al. (1994) estudaram a ligação covalente do rhGM-CSF com albumina de soro humano (HSA), após desenvolver e validar ensaio por ELISA, sensível e específico para quantificação do complexo (rhGM-CSF/HSA) em solução. Observaram a importância do estudo de estabilizadores para manter a atividade biológica dos produtos recombinantes, especialmente a albumina de soro humano que tem sido escolhida devido a sua solubilidade, estabilidade térmica e capacidade de prevenir a adsorção do biofármaco à superfície. Realizaram identificação por SDS-PAGE e transferência para detecção da HSA usada como agente transportador e protetor durante armazenamento e uso de proteínas recombinantes. Demonstraram a combinação química do HSA com rhGM-CSF.

Fogolin et al. (2002) desenvolveram três métodos de ELISA com anticorpo monoclonal, não envolvido na glicosilação, para quantificar rhGM-CSF expresso em *E. Coli* e em células de mamíferos. Compararam as respostas com o ensaio biológico da proliferação celular *in vitro*, usando células TF-1 e demonstrando sua aplicação para determinar a biomolécula em misturas com conteúdo variável de proteínas, em especial durante o processo de produção.

Ettinger et al. (1997) compararam a capacidade das Interleucinas 3 e 5 e do GM-CSF em promover crescimento e estimular a fosforilação da tirosina na linhagem celular humana TF-1. A viabilidade e a proliferação celular foram determinadas por ensaio colorimétrico baseado na reação do sal de tetrazólio, que é reduzido proporcionalmente pelas células viáveis. A absorvância foi determinada em leitor de microplacas em 450 nm.

Wang et al. (2009) usaram sementes de planta transgênica *Arabidopsis thaliana* para obter elevado nível de expressão do rhGM-CSF. Avaliaram a atividade biológica pelo bioensaio com células TF-1, efetuando a leitura espectrofotométrica após reação com sais de tetrazólio (MTT) e demonstrando que não havia diferenças em relação ao hGM-CSF. Pesquisas anteriores com o rhGM-CSF secretado em culturas de células de *Nicotina tabacum* L. geneticamente modificadas, em suspensão, visaram avaliar o efeito da adição dos polímeros polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona e gelatina como estabilizantes do biofármaco, com base em ensaios quantitativos por ELISA (LEE et al. 2002).

Schwanke et al. (2009) descreveram a construção do gene que codifica a proteína rhGM-CSF, clonagem e expressão em *E. coli*. Determinaram o seqüenciamento dos aminoácidos N-terminal e a atividade biológica em células TF-1, observando que os procedimentos poderão ser úteis para estudos de proteínas biossimilares.

Os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados após administração por via intraperitoneal e intravenosa de rhGM-CSF não-glicosilado, expresso em células bacterianas, e glicosilado, derivados de células de mamíferos, em roedores. As análises foram realizadas por ELISA observando-se concentrações plasmáticas mais elevadas e eliminação mais rápida para a forma glicosilada (MARINI et al. 2007).

O método de eletroforese em gel, descrito por Laemmli, é amplamente usado e se baseia em sistema descontínuo sob condições desnaturantes, em presença de dodecil sulfato de sódio. A transferência e detecção imunológica têm sido utilizada para identificar substâncias biológicas com anticorpos policlonais ou monoclonais, pela sua especificidade na caracterização de proteínas (WINGFIELD et al., 1988; AUSUBEL et al. 1996).

O método de eletroforese capilar em gel na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-CGE) é uma alternativa ao método clássico SDS-PAGE. A substituição está sendo pesquisada na indústria biofarmacêutica, pois apresenta vantagens como automação do processo, maior velocidade, reprodutibilidade e robustez, permitindo seu uso na rotina do controle de qualidade (RUSTANDI et al. 2008).

Liang et al. (2006) estudaram interações entre o GM-CSF e heparinas inclusive heparinas de baixa massa molecular, por eletroforese capilar de zona (CZE). Selecionaram a

carragenina como controle e demonstraram interação específica com as heparinas, por ligar-se seletivamente com carboidratos polisulfatados.

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

Sainathan et al. (2005) produziram a forma peguilada do fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos de rato recombinante (rmGM-CSF) e submeteram à caracterização por eletroforese e espectrometria de massas. Foram efetuados estudos dos mecanismos moleculares e celulares dessa citocina na regulação da inflamação do trato gastrointestinal, em modelos animais. Após administração em camundongos determinaram-se os níveis plasmáticos por ELISA. A forma peguilada do rmGM-CSF reproduziu o potente efeito da estimulação de colônias de células progenitoras quando comparada ao rhGM-CSF.

Análogos de rhGM-CSF foram expressos com resíduos adicionais de cisteína e peguilados com modificações sítio-específicas de 5, 10 e 20 kDa, avaliando os parâmetros farmacocinéticos e a atividade por cultura de células TF-1 (DOHERTY et al., 2005). Nova estratégia usando glicosiltransferases foi estudada para ligar o polietilenoglicol à O-glicanos de rhGM-CSF e rhINF α -2b, envolvendo sítios específicos de serina e treonina, seguido de transferência enzimática de ácido siálico conjugado com polietilenoglicol ao resíduo de GalNAc introduzido (DEFREES et al., 2006).

Foram preparados conjugados do rhGM-CSF com moléculas do PEG com massa molecular de 20, 30 e 40 kDa. As formas monopeguiladas foram isoladas por cromatografia de troca iônica e caracterizadas por eletroforese em gel, cromatografia líquida por fase reversa e exclusão molecular, espectrometria de massas, mapeamento peptídico, bioensaio da proliferação de células TF-1 e estudos farmacocinéticos em ratos. Todas as formas do rhGM-CSF peguilado estimularam a proliferação das células TF-1. Os estudos farmacocinéticos em ratos demonstraram melhoria nos parâmetros farmacocinéticos, determinados por ELISA, da forma peguilada quando comparada com a nativa (LEE et al., 2008).

A cromatografia líquida destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como um método específico, sensível, robusto e reprodutível, com custo e duração de análise adequados

(ZARRIN et al., 2006; SILVA et al., 2009; ALMEIDA et al. 2010). Os métodos por CL-FR exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas e têm sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, separação e quantificação de formas oxidadas e desamidadas das proteínas, com detecção no ultravioleta (BUCHHEIT et al., 2002; AHRER & JUNGBAUER, 2006; DALMORA et al., 2006; RIBELA et al., 2006). Um inconveniente deste método é a possível desnaturação ou dissociação das proteínas adsorvidas à matriz da coluna, não sendo apropriado para estabelecer a potência dos produtos farmacêuticos que contêm oligômeros não covalentes e polímeros biologicamente inativos (DALMORA et al., 1997; WANG, 1999; OLIVEIRA et al., 2007). Por sua vez, a separação por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM), baseia-se no tamanho das moléculas. As proteínas podem também formar dímeros e oligômeros de alta massa molecular, cujas variantes podem ser resultado de ligações covalentes, não-covalentes ou por pontes dissulfeto. Essas agregações podem ser induzidas por temperaturas elevadas, agitação mecânica, mudanças de pH, liofilização, aumento da concentração de sais e interação com a embalagem da preparação farmacêutica, podendo gerar bioatividade reduzida e reações imunogênicas (WANG, 2005; WANG, 2010; DIRESS, 2010). Nesse contexto, esses métodos podem ser utilizados para avaliação das instabilidades químicas e físicas de proteínas recombinantes, bem como de modificações pós-traducionais na estrutura, e causadas por fatores como sistema de expressão, purificação, formulação e condições de armazenamento (BRISTOW et al. 1992; RAO & NAGARAJU, 2003; SILVA Jr., 2004; HERMELING et al., 2004; SILVA et al., 2008; LONGSTAFF et al., 2009).

A Farmacopéia Britânica 2010 (BP, 2010), em sua monografia da solução concentrada da molgramostima, especifica potência de não menos que $0,7 \times 10^7$ UI/mg de proteína e, além disso, conter quantidade superior a 2 mg/mL da molgramostima. A potência estimada nos ensaios deve estar entre 80 – 125% e o intervalo de confiança (P=0,95) de 74 – 136%. A Farmacopéia Americana (USP 33, 2010) não faz referência a molgramostima.

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (FDA, 2001; ICH, 2005; USP 33, 2010). Os principais parâmetros a serem avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. Esses parâmetros encontram-se detalhadamente descritos em dissertações já desenvolvidas no laboratório de produtos biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (BARTH, 2007; SILVA, 2009) e no artigo submetido (ARTIGO 3.1). Desse modo, esses parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos

resultados (SWARTZ & KRULL, 1998; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; SHABIR, 2007; ROZET, et al. 2007; INJAC, et al. 2008).

Os estudos de métodos físico-químicos alternativos ou em combinação com os bioensaios *in vitro*, são importantes para as análises qualitativas e quantitativas das proteínas relacionadas, e das formas de alta massa molecular das macromoléculas biologicamente ativas. Além disso, a precisão, exatidão, condições e facilidade de execução em relação ao ensaio biológico contribuem para aprimorar o controle da qualidade dos produtos biológicos. Atualmente, os métodos preconizados para as etapas pré-clínicas, avaliação de identidade, pureza, potência e caracterização das biomoléculas são importantes também para fundamentar estudos de biosimilaridade conforme preconizam os guias internacionais, com os avanços sucessivos na área de bioterapêuticos (CHMP, 2005; EMEA, 2005). As estruturas moleculares tridimensionais complexas de alta massa molecular dos biofármacos e sua heterogeneidade dependente do processo de produção de células vivas, faz com que as biomoléculas sejam diferentes dos fármacos clássicos. Assim, os métodos analíticos usuais não conseguem caracterizar estas moléculas suficientemente para confirmar a equivalência estrutural com o referênci. Consequentemente tem sido usada a combinação de métodos que representam a tecnologia do estado-da-arte para caracterização e estudos de comparabilidade desses biossimilares. Os guias e parâmetros legais tem sido avaliados e atualizados com destaque para o impacto na segurança e eficácia terapêutica (SCHELLEKENS, 2009; KRESSE, 2009; SCHELLEKENS & MOORS, 2010).

A publicação científica efetuada no contexto da dissertação está anexada a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos na mesma.

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA SUBMETIDA

3.1 – LEAL, D. P.; SCHUTKOSKI, R.; ZIMMERMANN, E. S.; BERGAMO, A. C.; DALMORA, S. L. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor: Evaluation of Biopharmaceutical Formulations by a Stability-indicating RP-LC Method and Bioassay. **Biologicals**. Submetido em Julho de 2010.

**Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor: Evaluation of
Biopharmaceutical Formulations by a Stability-indicating RP-LC Method
and Bioassay**

Diogo Paim Leal^b, Renato Schutkoski^b, Estevan Sonogo Zimmermann^b, Ana Cláudia
Bergamo^a and Sérgio Luiz Dalmora^{a*}

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

Running Title: "Potency assessment of rhGM-CSF"

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

E-mail adress: sdalmora@terra.com.br (Sérgio Luiz Dalmora)

Abstract

The granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a cytokine that regulates the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells and activates mature granulocytes and macrophages. A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the determination of the non-glycosylated recombinant rhGM-CSF (Molgramostim) in biopharmaceutical formulations. The RP-LC method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at 45°C. The mobile phase A consisted of 0.1% TFA and the mobile phase B consisted of 0.1% TFA in acetonitrile, run at a flow rate of 1 mL/min, and using photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The chromatographic separation was obtained with the retention time of 29.2 min, and was linear over the concentration range of 2-300 µg/mL ($r^2 = 0.9992$). The specificity was proven through degradation studies, showing that also there was no interference of the excipients. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed significant differences ($p < 0.05$). The proposed method was applied for the analysis of rhGM-CSF and their related proteins, and the results were correlated to the bioassay, contributing to establish alternatives to characterize and monitoring its instability, improving the quality control and assuring the therapeutic efficacy.

Keywords: Molgramostim, Recombinant Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor, Bioassay, Reversed-phase Liquid Chromatography, Validation.

1. Introduction

The granulocyte-macrophage colony stimulating factor is a cytokine that regulates the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells and activates mature granulocytes and macrophages. The human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, produced by recombinant DNA technology (rhGM-CSF), expressed in *Escherichia coli*, Molgramostim, is now marketed world-wide for clinical use in enhancing hematopoietic recovery after cancer chemotherapy and bone marrow transplantation [1-3].

The rhGM-CSF molecule is a non-glycosylated polypeptide chain consisting of 127 amino acids, with four cysteine residues which form two disulphide bonds, between Cys⁵⁴ and Cys⁹⁶ and Cys⁸⁸ and Cys¹²¹. The molecular weight is approximately 14.5 kDa [4-6].

The biological assay based on the proliferation of the factor-dependent cell line TF-1 (ATCC CRL-2003), has been used for the potency assessment of rhGM-CSF. The growth promoting activity has been evaluated by the incubation with tetrazolium bromide (MTT) or alamarBlue and measuring the spectrophotometric absorbances [7-10].

Three enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were developed and compared to the cell proliferation bioassay, showing the suitability to quantify the non-glycosylated rhGM-CSF present in mixtures with variable protein content, being useful for the production process [8]. Also, the ELISA was applied for pharmacokinetic studies [11-12] and validated for the quantitation of adducts of rhGM-CSF and human serum albumin in stressed solution mixtures [13].

Currently, 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 over the

protein. Thus, a combination of physicochemical, immunological, and biological methods is recommended [9, 14, 15]. In fact, liquid chromatography (LC) has been successfully applied to correlations studies between physicochemical and biological assays, seeking for alternatives to improve the characterization and monitoring the instability of different biotherapeutics [16-20]. But, the development of analytical methods for the analysis of biotechnology products present some difficulties, due to the low dose of the microheterogeneous protein in the presence of relatively large amounts of human serum albumin, added to prevent adsorptions of the proteins to the vial walls and to increase stability during storage [13, 21, 22].

The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) exploits the hydrophobic properties of biomolecules in the separation process and offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants or degradation products which may have reduced activity and altered immunogenicity [14, 21]. The rhGM-CSF expressed in *E. coli* was characterized by fast atom bombardment mass spectrometry combined with RP-LC. The fractions of the enzymatic digests were separated by RP-LC using a TSK-ODS column and detection at 230 nm, demonstrating that the sulfoxidation of methionine residues occurs during renaturation and/or purification steps [23]. Also, samples of rhGM-CSF were analyzed by gradient RP-LC using a C₄ column with UV detection at 214 nm, and compared to the capillary electrophoresis method evaluating the potential of this technique [24]. The monopegylated rhGM-CSF was characterized by SDS-PAGE, size-exclusion (SE-LC) and RP-LC, capillary electrophoresis and mass spectrometry, demonstrating the application of these analytical techniques [9]. However, the method validation is essential to show that the procedure is suitable for the intended purpose [25].

The aim of the present article was to validate a specific, sensitive and stability-indicating gradient RP-LC for the quantitative analysis of rhGM-CSF in biopharmaceutical

formulations, evaluating the bioactivity and cytotoxicity of the related proteins; correlate the results to the bioassay, contributing to develop alternatives to characterize and monitoring the quality, assuring the therapeutic efficacy of the biological medicine.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

European Pharmacopoeia Certificated Reference Standard (Ph. Eur. CRS) for rhGM-CSF was obtained from the EDQM (Strasbourg, France) and the 1st International Standard for rhGM-CSF, WHO 88/646, was obtained from National Institute for Biological Standards and Control-NIBSC (Herts, UK). A total of eight batches of rhGM-CSF, containing 300 µg/vial were identified by Arabic numbers from 1 to 8. The samples were obtained from commercial sources within their shelf life period. Hydrogen peroxide 30% in aqueous solution, potassium phosphate monobasic, polyssorbate 80, acetonitrile and trifluoroacetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Apparatus and analytical conditions

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

experiments were performed on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d., with a pore size of 300 Å), maintained at 45°C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The elution was performed by a gradient linear at a constant flow rate of 1 mL/min. Mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B consisted of 0.1% TFA in acetonitrile. The applied gradient was the following: 0.1 min 37% of B, from 34 min linear to 50% of B, from 35 min linear back to 37% of B and 35-40 min 37% 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.

2.3. Procedure

2.3.1. *In vitro* bioassay

The bioassay was performed as described elsewhere [10,26], and the growth-promoting activity of rhGM-CSF assessed on TF-1 cell line (ATCC number CRL-2003). The cells were maintained in culture medium RPMI 1640 containing 10% (v/v) fetal bovine serum Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), adding concentrations of GM-CSF (1-20 ng/mL) for cell proliferation in 75 cm² flasks for 24 h, seeding at approximately $2.0 - 6.0 \times 10^5$ cells/mL. The assay was performed in triplicate, the cells were seeded in 96-well cell culture plates BD Biosciences (San Jose, CA, USA) at a density 4×10^5 cells/mL (2×10^4 cells/well) and dosed on seeding with two fold dilution series range starting with 65 IU/mL (6.5 ng/mL) of rhGM-CSF. The WHO (88/646) rhGM-CSF was used as standard and the negative control was RPMI 1640 culture medium. Briefly, the plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for a minimum of 24 h. Then 25 µL/well of MTT solution (5 mg/mL) was added and the plates were incubated for a further 5 h. Following the addition of 100 µL/well of sodium dodecyl sulphate (240 mg/mL) overnight, the absorbance was assessed at 595 nm, using microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

2.3.2. *In vitro* cytotoxicity test

The *in vitro* cytotoxicity method was performed as described elsewhere [27], based on the neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) to the degraded samples of rhGM-CSF, with the pH previously adjusted to 7.0, to the rhGM-CSF reference solution, to the negative and positive controls. The NRU assay was performed on the 96-well microplates, maintained at 37°C in a CO₂ incubator for 24 h, with the cell suspension having a density of about 2×10^5 cells/mL. The neutral red released was evaluated by the addition of extractant solution, and the absorbance measured at 540 nm.

2.3.3. Samples and Standard Solutions

Working standard and sample solutions were daily prepared by diluting the Ph. Eur. CRS for rhGM-CSF and the samples of pharmaceutical formulations in phosphate buffer 0.05M pH 7.4 containing 0.5 mg/mL of polysorbate 80, to a final concentration of 100 µg/mL.

2.4. Validation of the method

The method was validated using samples of biopharmaceutical formulations of rhGM-CSF with the label claim of 300 µg/vial by determinations of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, and system suitability test, following the ICH guidelines [25].

2.4.1. Specificity

Specificity of the method towards the biological was evaluated using a reference and sample solution of rhGM-CSF (100 µg/mL) subjected to degradation by oxidative conditions, by adding 10 µL of hydrogen peroxide 3% during 3 min. Moreover, the interference of the excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only a placebo (in-house mixture of the formulation excipients). Then the specificity of the method was established by determining the peak purity in the samples using a PDA detector. Additionally the rhGM-CSF reference substance and the degraded samples were subjected to the *in vitro* cytotoxicity test.

2.4.2. Linearity

Linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight reference standard substance concentrations of rhGM-CSF, in the range of 2-300 µg/mL prepared in phosphate buffer containing 0.5 mg/mL of polysorbate 80. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 20 min with the mobile phase. Three replicate of 50 µL injections of the reference solutions were made to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of rhGM-CSF to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

2.4.3. Precision and accuracy

The precision of the method was determined by the repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by eight evaluations of the same concentration sample of rhGM-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-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the drug, to obtain solutions at concentrations of 80, 100 and 120 $\mu\text{g/mL}$, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and added concentrations.

2.4.4. Limits of detection and quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH,[25] using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

2.4.5. Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same samples (100 $\mu\text{g/mL}$) under a variety of conditions of the method parameters, such as: injection volume, percent of acetonitrile, flow rate, temperature and the wavelength. To assess the stability of sample solutions of rhGM-CSF, the samples were tested maintained at 2-8°C for 48 h and also placed into the autosampler, at room temperature, for 24 h. The stability of

these solutions was studied by observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

2.4.6. System suitability test

To ensure the validity of the analytical procedure, data from five injections of 50 μL of the working standard solution containing 100 $\mu\text{g/mL}$ were used for evaluation of the system suitability parameters, such as asymmetry, number of theoretical plates, retention time, and area, through the CLASS-VP[®] V 6.12 software.

2.5. Analysis of rhGM-CSF in biopharmaceutical formulations

The biopharmaceutical samples were previously identified by SDS-PAGE as described elsewhere [28], followed by transference to a nitrocellulose membrane and immunodetection with a rhGM-CSF-specific antiserum. For the quantitation of rhGM-CSF by the proposed method, the respective solutions were diluted to appropriate concentration with phosphate buffer containing 0.5 mg/mL of polysorbate 80, injected in triplicate and the percentage recoveries of the biopharmaceutical calculated against the Ph. Eur. CRS for rhGM-CSF.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of chromatographic conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phases were optimized to provide appropriate selectivity and sensitivity. The use of gradient elution resulted in better

sensitivity, improving the peak symmetry (about 1.13) with the retention time suitable for the separation also of deamidates and sulphoxides, as usually suggested [14, 26]. The PDA detector was used for the selection of the best wavelength detection, and the LC method was validated for the analysis of rhGM-CSF in bulk, biotechnology formulations, and correlations studies with the bioassay.

3.2. Method validation

The specificity of the analytical method was indicated by the oxidative conditions that generated the main peak at 29.2 min and additional peaks of the related proteins with the retention times at 18.2 min and 24.4 min, as shown in the typical chromatograms in Fig. 1. The data together with the peak purity index higher than 0.9999 showed that the peak was free from any co-eluting peak with no interference of formulation excipients, thus confirming that the proposed method is specific for the content/potencies assessment of rhGM-CSF.

The analytical curves constructed for rhGM-CSF were found to be linear over the concentration range of 2-300 $\mu\text{g/mL}$. The value of the determination coefficient calculated [$r^2 = 0.9992$, $y = (35295.33 \pm 353.48) x + (84636.67 \pm 8628.17)$], where, x is concentration and y is the peak absolute area] indicated the linearity of the calibration curve for the method.

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) for eight determinations of the 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration. The obtained RSD value was 0.25% as show in Table 1. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulations on three different days (inter-days) giving RSD values of 0.61 and 0.85%, respectively. The between analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples and the values were found to be 0.79 and 0.39%, respectively.

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 80, 100 and 120 µg/mL. The absolute means obtained are shown in Table 2 with a mean value of 101.15% and bias lower than 1.33%, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

For the calculation of the LOD and LOQ, a calibration equation, $y = 35295.33x + 84636.67$, was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LOD and LOQ were obtained by using the mean of the slope, 35295.33 ± 353.48 , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as 84636.67. The LOD and LOQ calculated were 0.81 and 2.44 µg/mL, respectively. The evaluated experimental LOQ with a precision ($\leq 5\%$) and accuracy within $\pm 5\%$, [29, 30] was found to be 2.0 µg/mL.

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

A system suitability test was carried out to evaluate the resolution and repeatability of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference standard substance solution containing 100 µg/mL of rhGM-CSF. The RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.39, 0.41 and 0.49%, respectively. The number of theoretical plates was about 35523, with RSD of 0.62%. The parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%).

3.3. Method application

The western blotting of the samples revealed the same general pattern with a single diffuse band, typical of a protein, in the molecular weight range from 10-20 kDa (data not shown) comparable to the Reference preparation. Then, the proposed method was applied for the analysis of the samples giving values within 94.42 and 104.21% of the stated potency, with calculated RSD lower than 1.81%, and related proteins lower than 2.36%, as shown in Table 4. As there are only limits recommended for the concentrated solution (<4%), the obtained experimental values, contribute to the establishment of specifications for the finished biotherapeutic, as suggested for the biotechnology-derived products [26, 31].

3.4. Bioactivity assessment

The biological potency of rhGM-CSF was assessed by the proliferation TF-1 cell bioassay based on the cells dose-dependent growth curve, using MTT. The statistical analysis of the assay data was performed by parallel line method, using PLA 2.0 software (Stegmann System-beratung, Rodgau, Germany), giving the values shown in Table 4, together with the physicochemical analysis.

The bioactivity of the sulphoxides/deamidates degraded samples were evaluated by the *in vitro* cell proliferation assay and the *in vivo* neutropenia mouse assay [32], (approved and conducted in accordance with the national protection laws on animal ethics and welfare), non-detecting significant changes of the activity related of the intact rhGM-CSF, as also previously observed [23].

3.5. Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity test of the degraded forms related to the intact molecule, was performed trying to detect some possible effects resulting from the instability of the samples during storage, giving mean $IC_{50} = 39.40 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} = 36.24 \mu\text{g/mL}$, respectively for the deamidates and sulphoxides, respectively, with significant differences ($p < 0.05$).

4. Conclusion

The results of the validation studies show that the gradient RP-LC method is specific, accurate with a mean value of 101.15%, and possesses significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients. The separation was achieved with the retention time of 29.2 min, and the method has been successfully used for the analysis of biopharmaceutical formulations, showing mean difference between the estimated potency of 1.02% higher compared to the bioassay, with non-significant difference, as calculated by the Student's *t*-test ($p > 0.05$). Moreover, the RP-LC method represent an alternative with advantages of lower time-consumption and stability-indicating capability, improving the existing procedures, which can be applied for the process monitoring, purification steps and to ensure the batch-to-batch consistency of the bulk and finished biological products.

Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), projects 475029/2007-0, 304860/2008-5 and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

References

- [1] Hussein AM, Ross M, Vrendenburgh J, Meisenberg B, Hars V, Gilbert C, Petros WP, Coniglio D, Kurtzberg J, Rubin P. Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor produced in Chinese hamster ovary cells (regramostim), E. coli (molgramostim) and yeast (sargramostim) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *Eur J Haematol* 1995;55(5): 348 – 56.
- [2] Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998;92(12): 4491 – 508.
- [3] Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 2004;28(5): 509 – 54.
- [4] Wingfield P, Graber P, Moonen P, Craig S, Pain RH. The conformation and stability of recombinant-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Eur J Biochem* 1988;173(1): 65 – 72.
- [5] Reichert P, Cook WJ, Ealick SE, Hammond GS, Le HV, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE. Crystallization and preliminary X-ray investigation of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1990; 265(1): 452 – 53.
- [6] Tsarbopoulos A, Pramanik NB, Labdon JE, Reichert P, Gitlin G, Patel S, Sardana V, Nagabhushan TL, Trotta PP. Isolation and characterization of a resistant core peptide of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); confirmation of the GM-CSF amino acid sequence by mass spectrometry. *Protein Sci* 1993; 2(11): 1948 – 58.

- [7] Kitamura TK, Tance T, Terasawa T. Established and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 1989;140(2): 323 – 34.
- [8] Fogolín BM, Eberhardt MO, Kratje R, Etcheverrigaray M. Choice of the adequate quantification method for recombinant human GM-CSF produced in different host systems. *Electronic J Biotechnol* [on line] 2002;5(3). Available from: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/6/index.html>> ISSN 0717-3458 [accessed June 2010].
- [9] Lee DL, Sharif I, Kodihalli S, Stewart DIH, Tsvetnitsky V. Preparation and characterization of monopegylated human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Interferon Cytokine Res* 2008;28(2): 101 – 12.
- [10] Schwanke RC, Renard G, Chies JM, Campos MM, Junior ELB, Santos DS, Basso LA. Molecular cloning, expression in *Escherichia coli* and production of bioactive homogeneous recombinant human granulocyte and macrophage colony stimulating factor. *Int J Biol Macromol* 2009;45(2): 97 – 102.
- [11] Marini G, Forno G, Kratje, R, Etcheverrigaray M. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effect of glycosilation on pharmacokinetics parameters. *Electronic j biotechnol* 2007;10(2): 271 – 78.
- [12] Cebon J, Dempsey P, Fox R, Kannourakis G, Bonnem E, Burgess AW, Morstyn G. Pharmacokinetics of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor using a sensitive immunoassay. *Blood* 1988;72(4): 1340 – 47.
- [13] Kumarasamy R, Bausch J, Kopcha D, Patel S, Mcgonigle E. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of adducts of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and human serum albumin (HSA) in stressed solution mixtures. *Pharma Res* 1994;11(3): 365 – 71.

- [14] Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1999;185(2): 129 – 88.
- [15] Longstaff C, Whitton CM, Stebbings R, Gray E. How do we assure the quality of biological medicines? *Drug Discov Today* 2009;14(1-2): 50 – 5.
- [16] Almeida BE, Oliveira JE, Carvalho CM, Dalmora SL, Bartolini P, Ribela MTCP. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reverse-phase high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2010;53(1): 90 – 7.
- [17] Ferreto RM, Leal DP, Silva LM, Nogueira DR, Dalmora SL. Validation of a size-exclusion LC method and assessment of rhEPO in pharmaceutical formulation by liquid chromatography and biological assay. *J Liq Chrom Relat Tech* 2009;32(10): 1392 – 406.
- [18] Dalmora SL, D'Avila FB, da Silva LM, Bergamo AC, Zimmermann ES. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay. *J Chromatogr B* 2009;877(24): 2471 – 6.
- [19] Silva MMCG, Lamarre B, Cesaroli E, Rakowska P, Hills A, Bailey MJA, Wheeler JX, Burns CJ, Gaines-Das RE, Jones C, Robinson CJ. Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceutical: Interferon alfa-2 case study. *Biologicals* 2008;36(6):383 – 92.
- [20] Bristow AF, Jeffcoate SL. Analysis of therapeutic growth hormone preparations: report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies. *Biologicals* 1992;20(3): 221 – 31.

- [21] Lara-Quintanar P, Lacunza I, Sanz J, Diez-Masa JC, de Frutos M. Immuno-chromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2007;1153(1-2): 227 – 34.
- [22] Diress A, Lobertskie B, Larocque L, Li X, Alteen M, Isbrucker R, Girard M. Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays. *J Chromatogr A* 2010;1217(19): 3297 – 306.
- [23] Ohgami Y, Nagase M, Nabeshima S, Fukui M, Nakazawa H, Characterization of recombinant DNA-derived human granulocyte macrophage colony stimulating factor by fast atom bombardment mass spectrometry. *J Biotechnol* 1989;12(3-4): 219 – 30.
- [24] Yowell GG, Fazio SD, Vivilecchia RV. Analysis of a recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor dosage form by capillary electrophoresis, capillary isoelectric focusing and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1993;652(1): 215 – 24.
- [25] ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for human use. Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
- [26] British Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2010.
- [27] Nogueira DR, Sangoi MS, da Silva LM, Todeschini V, Dalmora SL. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulations by a validated stability-indicating MEKC method. *J Sep Sci* 2008;31(16-17): 3098 – 105.

- [28] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227: 680 – 5.
- [29] Shabir GA, Lough WL, Arain SA, Bradshaw TK. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *J Liq Chrom Relat Tech* 2007;30(3): 311 – 33.
- [30] J. Ermer and J. H. McB. Miller, *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*. ed. Wiley-VCH. Weinheim: Germany; 2005.
- [31] *European Pharmacopoeia*, 6th Ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2007.
- [32] Dalmora SL, Masiero SMK, Oliveira PR, Sangoi MS, Brum L. Validation of an RP-HPLC method and assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulation by liquid chromatography and biological assay. *J Liq Chrom Relat Tech* 2006;29(12): 1753 – 67.

Table 1. Inter-days and between-analysts precision data of RP-LC for rhGM-CSF in biopharmaceutical formulations.

Sample	Day	Inter-days		Analysts	Between-analysts	
		Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)		Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)
1	1	98.69	0.61	A	99.61	0.79
	2	99.90		B	100.26	
	3	99.32		C	98.69	
2	1	101.27	0.85	A	101.37	0.39
	2	101.42		B	102.00	
	3	99.85		C	101.27	

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative Standard Deviation.

Table 2. Accuracy of RP-LC for rhGM-CSF in the formulation.

Nominal concentration (µg/mL)	Mean concentration found ^a (µg/mL)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
80	81.06	0.28	101.33	1.33
100	101.06	0.53	101.06	1.06
120	121.26	0.43	101.05	1.05

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative Standard Deviation.

^cBias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

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

Variable	Range investigated	rhGM-CSF ^a (%)	RSD ^b %	Optimized value
Flow rate (mL/min)	0.9	101.07	1.25	1
	1	99.27	0.42	
	1.1	99.80	0.47	
Injection volume (μL)	30	100.95	0.48	50
	40	100.61	1.37	
	50	101.19	0.26	
Temperature (°C)	40	100.50	0.51	45
	45	101.19	0.26	
	50	100.31	0.32	
Acetonitrile (%)	35	101.78	0.36	37
	37	100.90	0.34	
	39	101.01	0.41	
Solution stability	Autosampler 24 h	101.23	1.39	-
	2-8°C 24 h	101.31	0.29	-
	2-8°C 48 h	101.56	0.30	-
Wavelength (nm)	210-320	-	-	214

^aMean of three replicates.^bRSD = Relative Standard Deviation.

Table 4. Comparative content/potencies evaluation of rhGM-CSF in biopharmaceutical formulations, by RP-LC method and bioassay against the reference substance.

Sample	RP-LC ^a		<i>In vitro</i> bioassay	
	Main peak (%)	Deamidate/Sulphoxides (%)	Potency (%)	Confidence intervals (<i>P</i> = 0.95)
1	100.14	1.15	98.32	91.73 – 105.64
2	103.13	2.36	100.21	92.81 – 108.27
3	101.86	1.32	102.39	97.52 – 107.46
4	98.26	0.96	99.85	93.45 – 106.61
5	94.42	1.78	91.40	85.44 – 97.93
6	104.21	1.35	102.69	96.67 – 108.95
7	96.29	0.85	93.70	87.56 – 100.33
8	99.58	0.47	101.22	95.92 – 106.84
Mean	99.74	1.28	98.72	–
SD ^b	3.35	0.58	4.10	–

^aMean of three replicates.

^bSD = Standard Deviation.

Figure Captions

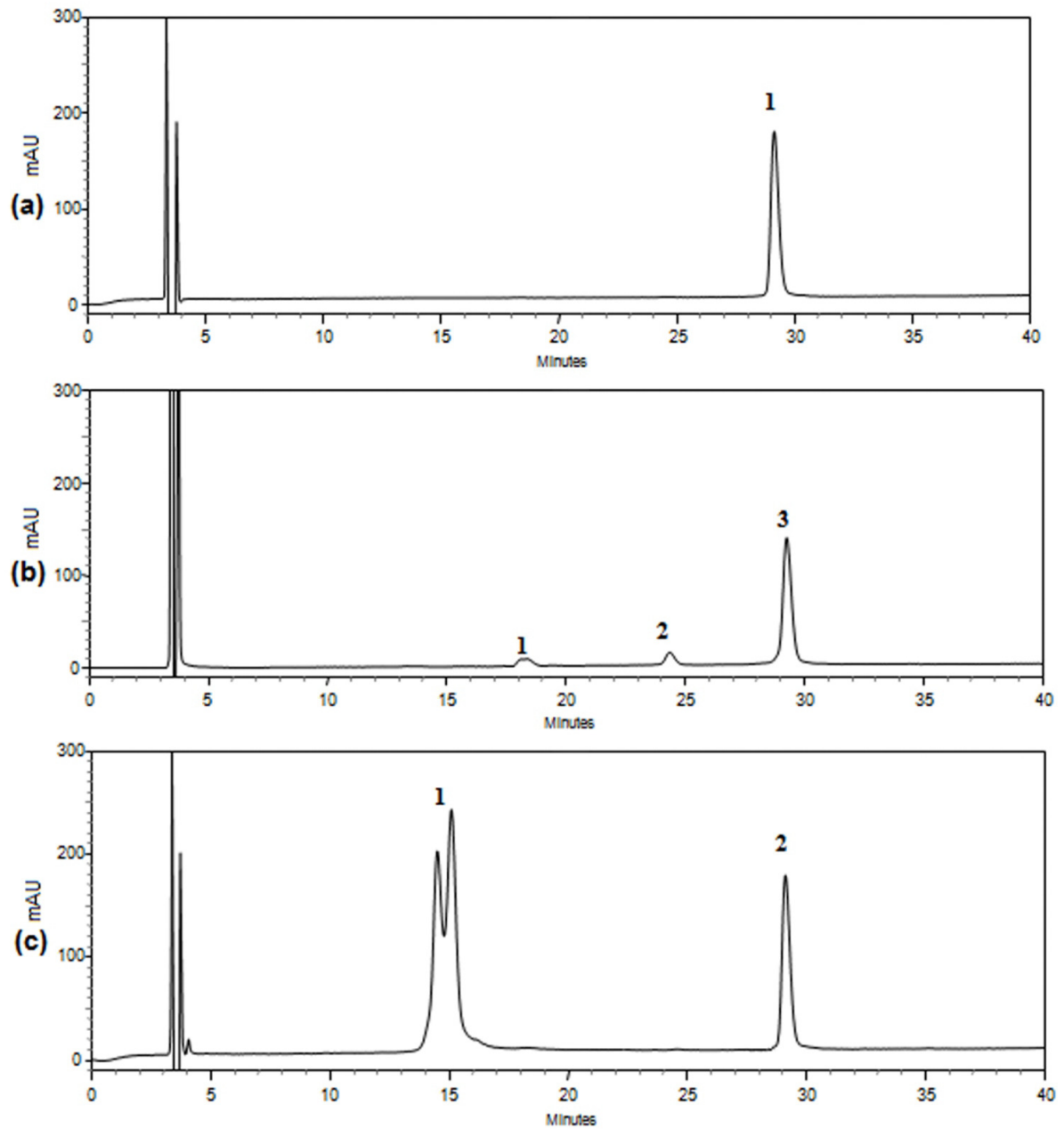


Figure 1. RP-LC chromatograms of rhGM-CSF (100 µg/mL). (A) Ph. Eur. CRS for rhGM-CSF: peak 1 = rhGM-CSF. (B) After degradation by oxidative conditions: peak 1 = deamidates, 2 = sulphoxides, 3 = rhGM-CSF. (C) biopharmaceutical formulations: peak 1 = excipients, 2 = rhGM-CSF.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

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

Os ensaios biológicos expressam a atividade biológica e sua realização é essencial para a avaliação da potência de biofármacos, para os quais em geral não se dispõem de metodologias analíticas para o controle de qualidade. Especialmente, para a molgramostima a potência biológica tem sido determinada por bioensaios *in vitro*, entre os quais destaca-se a avaliação da atividade proliferativa da linhagem de células TF-1 (KITAMURA, 1989; FOGOLIN 2002; LEE, 2008; SCHWANKE, 2009), adotado no presente trabalho. Estabeleceu-se a transformação de unidades internacionais para massa com base na expressão preconizada no 1º Padrão Internacional da molgramostima (WHO 88/646), no qual 10.000 UI correspondem a 1 micrograma.

O teste de identificação dos produtos biofarmacêuticos acabados, que contêm albumina de soro humano, usada como excipiente estabilizador do produto final e é detectada na região de 67 kDa, foi realizado por SDS-PAGE não-redutora, obtendo-se perfil eletroforético com banda relativa a molgramostima na região de 14,5 kDa, confirmada também pelos marcadores e pelo padrão de referência, aplicados no mesmo gel (AUSUBEL et al. 1996; SCHWANKE et al., 2009). A transferência e detecção imunológica efetuada com anticorpos específicos em membrana de nitrocelulose, apresentou banda única na região de 14,5 kDa. Esses procedimentos podem ser usados inclusive para identificar e quantificar impurezas protéicas conhecidas da célula hospedeira (USP 33, 2010).

O estudo de métodos cromatográficos que tem sido usado para diferentes produtos biológicos recombinantes como técnica de separação, purificação e análise qualitativa e quantitativa, possibilitando estudos de correlação com os bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Desse modo, optou-se por pesquisar e validar procedimento por cromatografia líquida em fase reversa para a determinação da molgramostima e suas proteínas relacionadas em produtos biofarmacêuticos.

A discussão apresentada a seguir está baseada no **ARTIGO 3.1**, submetido para publicação. A separação por RP-LC foi alcançada com tempo de corrida de 29,2 min (figura 1). A geração de picos adicionais, relativos aos desamidados e sulfóxidos, sob condições oxidativas e a análise de amostra preparada com excipientes, confirmaram a especificidade do método, conforme pureza do pico da molgramostima demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 2 a 300 µg/mL ($r^2 = 0,9992$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram CV inferiores a 0,85% 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 2, o valor médio experimental de 101,15%, confirmando exatidão significativa. As potências obtidas nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstra a tabela 3. Por sua vez, os dados obtidos na verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, pois os valores de CV% foram inferiores a 2% (ICH, 2005; USP 33, 2010). Conforme descrito em publicações, um inconveniente deste método é a desnaturação ou dissociação das proteínas quando adsorvidas à matriz da coluna. Além disso, as condições típicas da fase reversa podem afetar a conformação da proteína e a resposta obtida não necessariamente representa a atividade da biomolécula (WICAR et al., 1994; DALMORA et al., 1997). Porém, viabiliza a determinação de desamidados e sulfóxidos que é necessária devido às possíveis respostas imunogênicas que podem causar no organismo humano (EMEA, 2007; GROOT & SCOTT, 2007). Demonstrou-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregado para análise da molgramostima em produtos biofarmacêuticos. Paralelamente, executou-se o bioensaio da atividade proliferativa em células TF-1 que forneceu os resultados apresentados na tabela 4. Estudou-se então a correlação entre os resultados fornecidos pelo método cromatográfico e biológico com as amostras selecionadas, observando que as potências por CL-FR foram em média 1,02% superiores em relação ao bioensaio com diferença não significativa, conforme calculado pelo teste t de Student ($p > 0,05$).

A solução concentrada da molgramostima está descrita na literatura oficial (BP., 2010), porém não há referência ao produto acabado. Além disso, não há métodos cromatográficos validados publicados para avaliação da molgramostima em formulações biofarmacêuticas, o que é necessário no contexto da produção de produtos biológicos

recombinantes. Sugere-se, portanto, que o método por CL-FR, seja adotado em combinação com o bioensaio para a avaliação de potência e pureza da molgramostima durante as etapas do processo de produção/purificação para monitorar pequenas variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica (KAISER et al., 1997) e para o controle da qualidade do produto biofarmacêutico acabado.

Tendo em vista possíveis degradações dos produtos biotecnológicos durante as etapas do processo de produção e/ou armazenamento avaliou-se a citotoxicidade *in vitro*. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida em fase reversa, coletando-se as frações relativas aos desamidados e sulfóxidos. Os solventes foram evaporados e o ensaio realizado comparativamente à molécula íntegra da molgramostima, que apresentou os resultados descritos na publicação, demonstrando aumento de citotoxicidade com valores de $IC_{50} = 39,40 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} = 36,24 \mu\text{g/mL}$, para desamidados e sulfóxidos respectivamente, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à molécula íntegra.

Desse modo, contribui-se para aprimorar o controle da qualidade através da melhor caracterização da biomolécula, ampliando os procedimentos disponíveis para os estudos de comparabilidade, garantindo sua eficácia terapêutica e segurança.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método específico, preciso, exato e robusto por cromatografia líquida em fase reversa para avaliação da molgramostima, obtendo resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e avaliação de desamidados, sulfóxidos e da forma não-alterada.
- ✓ O bioensaio da atividade proliferativa em células TF-1 mostrou a potência biológica dos produtos biotecnológicos selecionados, e foi adotado para viabilizar estudo de correlação.
- ✓ Sugere-se a aplicação do método cromatográfico para avaliação da molgramostima em combinação com o bioensaio da atividade proliferativa em células TF-1, pois representa contribuição para análise do produto biofarmacêutico, devido a determinação de formas relacionadas, especificidade e tempo de execução em relação ao ensaio biológico *in vitro*.
- ✓ O método desenvolvido e validado no presente trabalho estabelece bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, de comparabilidade com biomoléculas da área e procedimentos para aprimorar o controle de qualidade do produto biotecnológico disponível no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ARMITAGE, J. O. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, v.92, p. 4491-4508, 1998.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R. E.; KINGSTON, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, v. 3, 1996.

BARREDA, D. R.; HANINGTON, P. C.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 509-554, 2004.

BARTH, T. **Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para avaliação de potência de eritropoietina humana recombinante. Correlação com o ensaio biológico**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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.

BRITISH Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2010, p. 1448-1451.

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

BURGESS, A. W.; BEGLEY, C. G.; JOHNSON, G. R.; LOPEZ, A. F.; WILLIAMSON, D. J.; MERMOD, J. J.; SIMPSON, R. J.; SCHMITZ, A.; DELAMARTER, J. F. Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. **Blood**, v. 69, p. 43-51, 1987.

CEBON, J.; DEMPSEY, P.; FOX, R.; KANNOURAKIS, G.; BONNEM, E.; BURGESS, A. W.; MORSTYN, G. Pharmacokinetics of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor using a sensitive immunoassay. **Blood**, v. 72, p. 1340-1347, 1988.

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

CLARK-LEWIS, I.; LOPEZ, A. F.; TO, L. B.; VADAS, M. A., SCHRADER, J. W.; HOOD, L. E.; KENT, S. B. Structure-function studies of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Identification of residues required for activity. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 881-889, 1988.

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

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

DEFREES, S.; WANG, Z.; XING, R.; SCOTT, A. E.; WANG, J.; ZOPF, D.; GOUTY, D. L.; SJOBERG, E. R.; PANNEERSELVAM, K.; ELS C. M. BRINKMAN-VAN LINDEN, E. C. M. B.; BAYER, R. J.; TARP, M. A.; CLAUSEN, H. GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in *Escherichia coli*. **Glycobiology**, v. 16, n. 9, p. 833-843, 2006.

DESCH, C. E.; OZER, H. Neutropenia and neoplasia: an overview of the pharmacoeconomics of sargramostim in cancer therapy. **Clinical Therapeutics**, v. 19, p. 847-865, 1997.

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

DOHERTY, D. H.; ROSENDAHL, M. S.; SMITH, D. J.; HUGHES, J. M.; CHLIPALA, E. A.; COX, G. N. Site-Specific PEGylation of engineered cysteine analogues of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Bioconjugate Chemistry**, v. 16, p. 1291-1298, 2005.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guidance on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues**”. London, 30 June 2005.

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

ETTINGER, S.; FONG, D.; DURONIO, V. Lack of correlation between growth of TF-1 cells and tyrosine phosphorylation signals in response to IL-3, IL-5 and GM-CSF. **Citokine**, v.9, p. 650-659, 1997.

EUROPEAN Pharmacopoeia 6th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2007.

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

FLEETWOOD, A. J.; COOK, A. D.; HAMILTON, J. A. Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Critical reviewsTM in immunology**, v. 25, p. 405-428, 2005.

FOGOLÍN, B. M.; EBERHARDT, M. O.; KRATJE, R.; ETCHEVERRIGARAY, M. Choice of the adequate quantification method for recombinant human GM-CSF produced in different host systems. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, 2002. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/6/index.html>> ISSN 0717-3458. Acesso em: 10 Jun. 2010.

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

GHOSH, P. K.; BHARDWAJ, D.; KARNIK, R. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: The protein and its current & emerging applications. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 435-448, 2007.

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

HAMILTON, J. A., Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, p. 533-544, 2008.

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

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

HUSSEIN, A. M.; ROSS, M.; VRENDENBURGH, J.; MEISENBERG, B.; HARS, V.; GILBERT, C.; PETROS, W. P.; CONIGLIO, D.; KURTZBERG, J.; RUBIN, P. Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor produced in Chinese hamster ovary cells (regramostim), *E. coli* (molgramostim) and yeast (sargramostim) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. **European Journal of Haematology**, v. 55, p. 348-356, 1995.

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

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

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

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

KIM, J. H.; LEE, D. H.; KIM, D. K.; HAN, G. B.; KIM, H. J. The glycosylation and in vivo stability of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor produced in rice cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 290-294, 2008.

KITAMURA, T. K.; TANCE, T.; TERASAWA, T. Established and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, p. 323-334, 1989.

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

KUMARASAMY, R.; BAUSCH, J.; KOPCHA, D.; PATEL, S.; MCGONIGLE, E. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of adducts of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and human serum albumin (HSA) in stressed solution mixtures. **Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 365-371, 1994.

LEE, D. L.; SHARIF, I.; KODIHALLI, S.; STEWART, D. I. H.; TSVETNITSKY, V. Preparation and characterization of monopegylated human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 28, p. 101-112, 2008.

LEE, J. H.; KIM, N. S.; KWON, T. H.; JANG, Y. S.; YANG, M. S. Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 96, p. 205-211, 2002.

LIANG, A.; DU, Y.; WANG, K.; LIN, B. Quantitative investigation of the interaction between granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and heparin by capillary zone electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1637-1641, 2006.

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

MARINI, G.; FORNO, G.; KRATJE, R.; ETCHEVERRIGARAY, M. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effect of glycosylation on pharmacokinetics parameters. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 271-278, 2007.

MAYER, P.; LAM, C.; OBENAU, H.; LIEHL, E.; BESEMER, J. Recombinant human GM-CSF induces leukocytosis and activates peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in nonhuman primates. **Blood**, v. 70, p. 206-213, 1987.

MIRES-SLUIS, A. R.; DAS, R. G.; THORPE, R. The international standard for granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) evaluation in an international collaborative study. **Journal of Immunological Methods**, v. 179, p. 127-135, 1995.

OHGAMI, Y.; NAGASE, M.; NABESHIMA, S.; FUKUI, M.; NAKAZAWA, H. Characterization of recombinant DNA-derived human granulocyte macrophage colony stimulating factor by fast atom bombardment mass spectrometry. **Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 219-229, 1989.

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

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

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

REICHERT, P.; COOK, W. J.; EALICK, S. E.; HAMMOND, G. S.; LE, H. V.; NAGABHUSHAN, T. L.; TROTTA, P. P.; BUGG, C. E. Crystallization and preliminary x-ray investigation of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 452-453, 1990.

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

RIBELA, M. T. C. P.; GOUT, P. W.; OLIVEIRA, J. E.; BARTOLINI, P. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 103-126, 2006.

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

RUSTANDI, R. R.; WASHABAUGH, M. W.; WANG, Y. Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products. **Electrophoresis**, v. 29, p. 3612-3620, 2008.

SAINATHAN, S. K.; TU, L.; BISHNUPURI, K. S.; HAN, M.; LI, A.; NEWBERRY, R. D.; MCDONALD, K. G.; CRIMMINS, D. L.; HOUCHEN, C.; ANANT, S.; DIECKGRAEFE, B. K.; PEGylated murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Production, purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 44, p. 94-103, 2005.

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

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

SCHRIMSHER, J. L.; ROSE, K.; SIMONA, M.G.; WINGFIELD, P. Characterization of human and mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factors derived from *Escherichia coli*. **The Biochemical Journal**, v. 247, p. 195 -199, 1987.

SCHWANKE, R. C.; RENARD, G.; CHIES, J. M.; CAMPOS, M. M.; JUNIOR, E. L. B.; SANTOS, D. S.; BASSO, L. A. Molecular cloning, expression in *Escherichia coli* and production of bioactive homogeneous recombinant human granulocyte and macrophage colony stimulating factor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 97-102, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

TSARBOPOULOS, A.; PRAMANIK, N. B.; LABDON, J. E.; REICHERT, P.; GITLIN, G.; PATEL, S.; SARDANA, V.; NAGABHUSHAN, T. L.; TROTTA, P. P. Isolation and characterization of a resistant core peptide of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); confirmation of the GM-CSF amino acid sequence by mass spectrometry. **Protein Science**, v. 2, p. 1948-1958, 1993.

WALTER, M. R.; COOK, W. J.; EALICK, S. E.; NAGABHUSHAN, T. L.; TROTTA, P. P.; BUGG, C. E. Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Molecular Biology**, v. 224, p. 1075-1085, 1992.

WANG, B.; JIANG, Y. N.; YAO, L. M.; WU, T. L. Improved production of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic *Arabidopsis thaliana* seeds using a dual sorting signal peptide. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 27, p. 462-468, 2009.

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

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

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

WICAR, S.; MULKERRIN, M. G.; BATHORY, G.; KHUNDKAR, L. H.; KARGER, B. L. Conformational changes in the reversed phase liquid chromatography of recombinant human growth hormone as a function of organic solvent: the molten globule state. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 3908-3915, 1994.

WINGFIELD, P.; GRABER, P.; MOONEN, P.; CRAIG, S.; PAIN, R. H. The conformation and stability of recombinant-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **European Journal of Biochemistry**, v. 173, p. 65-72, 1988.

YOWELL, G. G.; FAZIO, S. D.; VIVILECCHIA, R. V. Analysis of a recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor dosage form by capillary electrophoresis, capillary isoelectric focusing and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 652, p. 215-224, 1993.

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