

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

**ESTUDO DE METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO  
DO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE HUMANO  
RECOMBINANTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Fernanda Pavani Stamm**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2013**

**ESTUDO DE METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DO  
HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE HUMANO  
RECOMBINANTE**

**Fernanda Pavani Stamm**

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.**

**2013**

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

Stamm, Fernanda Pavani

Estudo de metodologias para avaliação do hormônio da paratireóide humano recombinante / Fernanda Pavani Stamm.-2013.

52 p.; 30cm

Orientador: Sérgio Luiz Dalmora

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. Hormônio da paratireóide humano recombinante (1-34).  
2. Cromatografia líquida 3. Bioensaio 4. Validação 5.  
Correlação I. Dalmora, Sérgio Luiz II. Título.

**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

**ESTUDO DE METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DO HORMÔNIO  
DA PARATIREÓIDE HUMANO RECOMBINANTE**

elaborada por  
**Fernanda Pavani Stamm**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

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

**Gizele Scotti do Canto, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

Santa Maria, 31 de janeiro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

aos meus pais, José Jarbas e Miriam Elizabeth pelo amor, educação, incentivo e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa;

ao meu noivo Ivan Carlos Maldaner, pelo amor, carinho, apoio e compreensão;

aos colegas Ricardo Souto, Guilherme Calegari, Francine Trevisan, Guilherme de Freitas, Maurício Walter e demais bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência, em especial a Yãnaí Schneinder, Bruna Xavier, Rafaela Perobelli e Clóvis Cardoso Jr;

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 contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

*“Mude as suas opiniões, mantenha os seus princípios, troque suas folhas e mantenha suas raízes.”*

Victor Hugo

## RESUMO

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

### ESTUDO DE METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE HUMANO RECOMBINANTE

AUTORA: FERNANDA PAVANI STAMM

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de janeiro de 2013.

O hormônio da paratireóide humano (hPTH) é um polipeptídeo constituído de 84 aminoácidos e tem função essencial como regulador da homeostase dos íons cálcio e fosfato, e manutenção da estrutura óssea. O hormônio da paratireóide humano recombinante, rhPTH (1-34), é produzido pela tecnologia do DNA em *Escherichia coli*, apresenta a sequência de aminoácidos responsável pela porção biologicamente ativa do paratormônio natural e é usado clinicamente para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa e de homens com osteoporose primária ou hipogonadal. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM) para a avaliação de rhPTH (1-34) em formulações de produtos biofarmacêuticos. No método por CL-FR, foi utilizada coluna Zorbax 300 SB C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm d.i.), mantida a 40 °C. A fase móvel A foi constituída por tampão sulfato de sódio 0,1 M, pH 2,3, e a fase móvel B por acetonitrila, eluídas em gradiente. No método por CL-EM foi utilizada coluna BioSep-SEC-S 2000 (300 mm x 7,8 mm d.i.), mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída de tampão ácido fosfórico 0,1 M, pH 2,5, eluída em vazão isocrática de 0,7 mL/min. Para ambos os métodos utilizou-se detector de arranjo de diodos (DAD) a 214 nm. A separação cromatográfica foi obtida nos tempos de 12,2 e 13,2 min, sendo linear na faixa de concentração de 1-250 µg/mL ( $r^2 = 0,9997$ ) e 1-300 µg/mL ( $r^2 = 0,9993$ ), respectivamente, para os métodos por CL-FR e CL-EM. Os limites de detecção e quantificação foram 0,44 e 1,47 µg/mL, respectivamente, para o método por CL-FR e 0,79 e 2,63 por CL-EM. A especificidade foi avaliada em estudos de degradação, que também demonstraram que não houve interferência dos excipientes. A exatidão foi 100,49 e 100,22, com bias inferior a 1,12 e 0,81, respectivamente, para os métodos por CL-FR e CL-EM. Além disso, realizou-se o teste de citotoxicidade *in vitro* das formas degradadas, as quais apresentaram diferença significativa em relação a forma intacta ( $p < 0,05$ ). Os métodos propostos foram aplicados para avaliação da potência de rhPTH (1-34) e de proteínas relacionadas em formulações biofarmacêuticas, e os resultados foram comparados com os bioensaios, observando-se diferenças das médias de teor/potência 0,64% e 1,31% inferiores para os métodos por CL-FR e CL-EM, em relação ao bioensaio *in vivo*, e 0,98% e 0,31% superiores, respectivamente, em relação ao *in vitro*. Contribuiu-se assim para estabelecer procedimentos que aprimoram o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biotecnológico.

**Palavras-chave:** Hormônio da paratireóide humano recombinante (1-34). Cromatografia líquida. Bioensaio. Validação. Correlação.

## ABSTRACT

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

### METHODOLOGY STUDY FOR THE EVALUATION OF RECOMBINANT HUMAN PARATHYROID HORMONE

AUTHOR: FERNANDA PAVANI STAMM

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, January 31<sup>th</sup> 2013.

Human parathyroid hormone (hPTH) is a polypeptide with 84 amino acids and it is the most important peptide regulator for calcium and phosphate ion homeostasis, maintaining bone structure. Recombinant human parathyroid hormone, rhPTH (1-34), produced by DNA technology in *Escherichia coli* contain the active amino-terminal fragment of the full length hPTH and is currently being used worldwide for the treatment of osteoporosis at high risk of fractures in postmenopausal women and men with osteoporosis primary or hypogonadal. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and size exclusion liquid chromatography (SE-LC) methods were developed and validated for the assessment of recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34) in biopharmaceutical formulations. A gradient RP-LC method was carried out on a Zorbax 300 SB C<sub>18</sub> column (150 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at 40 °C. The mobile phase A consisted of 0.1 M sodium sulphate buffer, pH 2.3, and the mobile phase B was acetonitrile. The SE-LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm i.d.), maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 0.1 M phosphoric acid buffer, pH 2.5, run isocratically at a flow rate of 0.7 mL/min. Chromatographic separation was obtained with retention times of 12.2 min, and 13.2 min, and was linear over the concentration range of 1-250 µg/mL ( $r^2 = 0.9997$ ) and 2-300 µg/mL ( $r^2 = 0.9993$ ), respectively, for RP-LC and SE-LC, with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The limits of detection and quantitation were 0.44 and 1.47 µg/mL, respectively, for the RP-LC and 0.79 and 2.63 µg/mL, for the SE-LC. Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. Equally, the *in vitro* cytotoxicity test of related proteins and higher molecular weight forms showed significant differences ( $p < 0.05$ ) compared to intact molecule. The validated methods were applied for the determination of rhPTH and related proteins in biotechnology-derived products, giving lower mean differences of the estimated content/potencies of 0.64% and 1.31% for the RP-LC and SE-LC related to the *in vivo* bioassay, and of 0.98% and 0.31% higher, compared to the *in vitro* cell culture assay, respectively. It is concluded that represents a contribution to establish new alternatives to monitor stability, quality control and thereby assure therapeutic efficacy of the biotechnology-derived medicine.

**Keywords:** Recombinant human parathyroid hormone (1-34). Liquid chromatography. Bioassay. Validation. Correlation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura primária do rhPTH (1-34), adaptada (LIN & LIN, 2011) .....	18
FIGURA 2 - Representação da estrutura tridimensional do rhPTH (1-34), adaptada (LEI et al., 2005) .....	18
FIGURA 3 - Representação da interação do rhPTH com o receptor acoplado a proteína G <sub>s</sub> (A) e G <sub>q</sub> (B) conforme Ulloa-Aguirre et al., 1999. ....	20
FIGURA 4- Esquema representativo da ação indireta do rhPTH sobre os osteoclastos conforme Gracitelli et al., 2002 .....	21

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1.....27**

FIGURE 1- RP-LC chromatograms of rhPTH (50 µg mL <sup>-1</sup> ). (a) R-rhPTH: peak 1= rhPTH. (b) Biopharmaceutical formulations after degradation by hydrogen peroxide: peak 1= rhPTH, peaks 2, 3, 4= sulphoxides, peak 5= meta-cresol, peak 6= hydrogen peroxide. (c) After photodegradation: peak 1= rhPTH, peaks 2, 3, 4= sulphoxides, peak 5= meta-cresol (d) Biopharmaceutical formulation: peak 1 = rhPTH, peak 2 = meta-cresol.....	32
FIGURE 2- SE-LC chromatograms of rhPTH (40 µg mL <sup>-1</sup> ). (a) R-rhPTH: peak 1= rhPTH. (b) After thermal degradation for 1 h at 80 °C: peak 1= rhPTH, peak 2= dimmer, peak 3= aggregate, peak 4= meta-cresol. (c) Biopharmaceutical formulation: peak 1= rhPTH, peak 2= meta-cresol..	33

## LISTA DE TABELAS

<b>PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1 .....</b>	<b>27</b>
TABLE 1 – Accuracy of RP-LC and SE-LC for rhPTH in the formulations .....	33
TABLE 2 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the RP-LC method. ....	34
TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the SE-LC method.....	34
TABLE 4 – Comparative content/potencies evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations, by LC methods. ....	34
TABLE 5 – Comparative content/potencies evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations, by <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> bioassays.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

A <sub>C</sub>	Adenilato ciclase
AMP <sub>C</sub>	Monofosfato cíclico de adenosina
BMP	Proteína morfogenética óssea
rhBMP-2	Proteína morfogenética óssea humana recombinante
BP	Farmacopéia Britânica
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
DAG	Diacilglicerol
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMEA	European Medicines Agency
ESI	Ionização por electrospray
EP	Farmacopéia Européia
FDA	Food and Drug Administration
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GTP	Guanosina difosfato ativa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
hPTH	Hormônio da paratireóide humano
ICH	International Conference on Harmonisation
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2

IP <sub>3</sub>	1,4,5- trifosfato inositol
kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MALDI	Ionização e desorção a laser assistida por matriz
Met	Metionina
MS	Espectrometria de massas
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
OPG	Osteoprotegerina
OPG-L	Ligante da osteoprotegerina
RNA	Ácido ribonucleico
pH	Potencial hidrogeniônico
PK-A	Proteína quinase A
PK-C	Proteína quinase C
PRPI	Receptor do hormônio da paratireóide humano tipo I
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RANK	Receptor ativador de fator nuclear kappa-B
R-rhPTH	Reference reagent parathyroid hormone, human rDNA derived
rhPTH	Hormônio da paratireóide humano recombinante
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SC	Subcutâneo
TOF	Tempo de Voo
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
TFA	Ácido trifluoracético
TGF-β	Fator de crescimento transformante β
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>27</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>

## **INTRODUÇÃO**

---

# 1 INTRODUÇÃO

---

O hormônio da paratireóide humano (hPTH) é produzido e secretado pelas glândulas paratireóides e é o principal regulador da homeostase dos íons cálcio e fosfato nos ossos e sangue, atuando na manutenção da estrutura óssea.

As pesquisas recentes, especialmente na área de biotecnologia, possibilitaram a transferência de genes de um organismo para outro e viabilizaram a produção de moléculas altamente purificadas em quantidades consideráveis. Entre elas destaca-se o hormônio da paratireóide humano recombinante, rhPTH (1-34), que é produzido por engenharia genética, apresenta massa molecular de 4,1 kDa e é composto pela sequência de 34 aminoácidos que correspondem a porção biologicamente ativa do hormônio da paratireóide humano. É clinicamente indicado para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa e de homens com osteoporose primária ou hipogonadal.

A avaliação de potência do rhPTH (1-34) tem sido realizada através do ensaio biológico da hipercalcemia em frangos *in vivo* e do bioensaio *in vitro*, baseado na atividade da adenilato ciclase em células UMR-106 e SaOS-2. Recentemente foi introduzido bioensaio baseado na atividade proliferativa de células UMR-106, cujas respostas espectrofotométricas são determinadas com corantes vitais como MTT (PARSONS et al., 1973; REIDHAAR-OLSON et al., 2000, MOK et al., 2010).

As proteínas requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com o sítio de ação, que justifica a caracterização físico-química para demonstrar as formas biologicamente ativas dos produtos biotecnológicos. Neste sentido, os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) viabilizaram a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas, e também tem sido estudados para uso em combinação com os bioensaios ou como alternativa. 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; SILVA et al., 2009a). Do mesmo modo, a cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) é uma técnica versátil adotada para determinação de proteínas e das formas agregadas na sua configuração nativa, devido as condições de eluição compatíveis com as macromoléculas biológicas (QIAN et al., 2008). A presença de formas relacionadas e degradadas nas proteínas recombinantes de uso terapêutico pode causar alterações com redução ou perda da atividade farmacológica e efeitos

imunológicos (WANG, 2005; WANG 2010). Desse modo, recomenda-se determinar seu teor e estabelecer limites nos produtos biofarmacêuticos.

Acrescenta-se que após o desenvolvimento de um método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que este atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ICH, 2005; 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. Além disso, são importantes para viabilizar possíveis estudos de similaridade de macromoléculas biologicamente ativas. Por sua vez, as especificações preconizadas para os produtos biológicos visam garantir a eficácia e segurança clínica (EMEA, 2005; LONGSTAFF et al., 2009; BRASIL, 2010). Destaca-se que até o presente momento não existe na literatura oficial metodologia para a avaliação da potência de rhPTH (1-34).

Neste trabalho, objetivou-se: a) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa para a avaliação de proteínas relacionadas e da forma não-alterada de rhPTH (1-34) em produtos biofarmacêuticos; b) desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular para avaliação de potência, determinação de dímeros e agregados de rhPTH (1-34); c) avaliar correlação entre os métodos por cromatografia líquida e os bioensaios de hipercalcemia *in vivo* e de cultura de células *in vitro*; d) avaliar a bioatividade *in vivo* e *in vitro* e citotoxicidade das formas degradadas e molécula íntegra. Desse modo, pretendeu-se estudar metodologias que possam contribuir para a avaliação de identidade, pureza e teor/potência, aprimorando o controle da qualidade e garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

A osteoporose é uma doença caracterizada pelo aumento da fragilidade esquelética, devido a redução e deterioração da densidade mineral (DMO) e da microestrutura óssea, que conseqüentemente eleva o risco de fraturas (NOTELOVITZ, 2008). Agentes anti-reabsortivos, estrogênios e bisfosfanatos inibem a degradação óssea e tem sido utilizados para prevenção e redução do risco de fraturas osteoporóticas. Entretanto, esses compostos não restauram a massa óssea, cujo efeito é atribuído ao hormônio da paratireóide humano, hPTH (SAMBROOK, 1995; CHUNXIAO, 2011). O hPTH é um polipeptídeo constituído de 84 aminoácidos com massa molecular de 9 kDa, propriedades básicas e ponto isoelétrico  $PI > 9$ . Tem função essencial como regulador da homeostase dos íons cálcio e fosfato, e na manutenção da estrutura óssea.

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a clonagem e expressão do gene do hPTH em *Escherichia coli* (*E.coli*), com produção do hormônio da paratireóide humano recombinante, rhPTH (1-34), também denominado Teriparatida. Estruturalmente tem sequência de 34 aminoácidos que é idêntica à porção N-terminal do hPTH, que é responsável pela sua atividade biológica. Apresenta massa molecular de 4,1 kDa e a fórmula química do rhPTH (1-34) é  $C_{181}H_{291}N_{55}O_{51}S_2$ . A estrutura primária e tridimensional estão representadas nas Figuras 1 e 2 (HAMANN & LANE, 2006; QUATTROCCHI & KOURLAS, 2004; LIN & LIN, 2011).

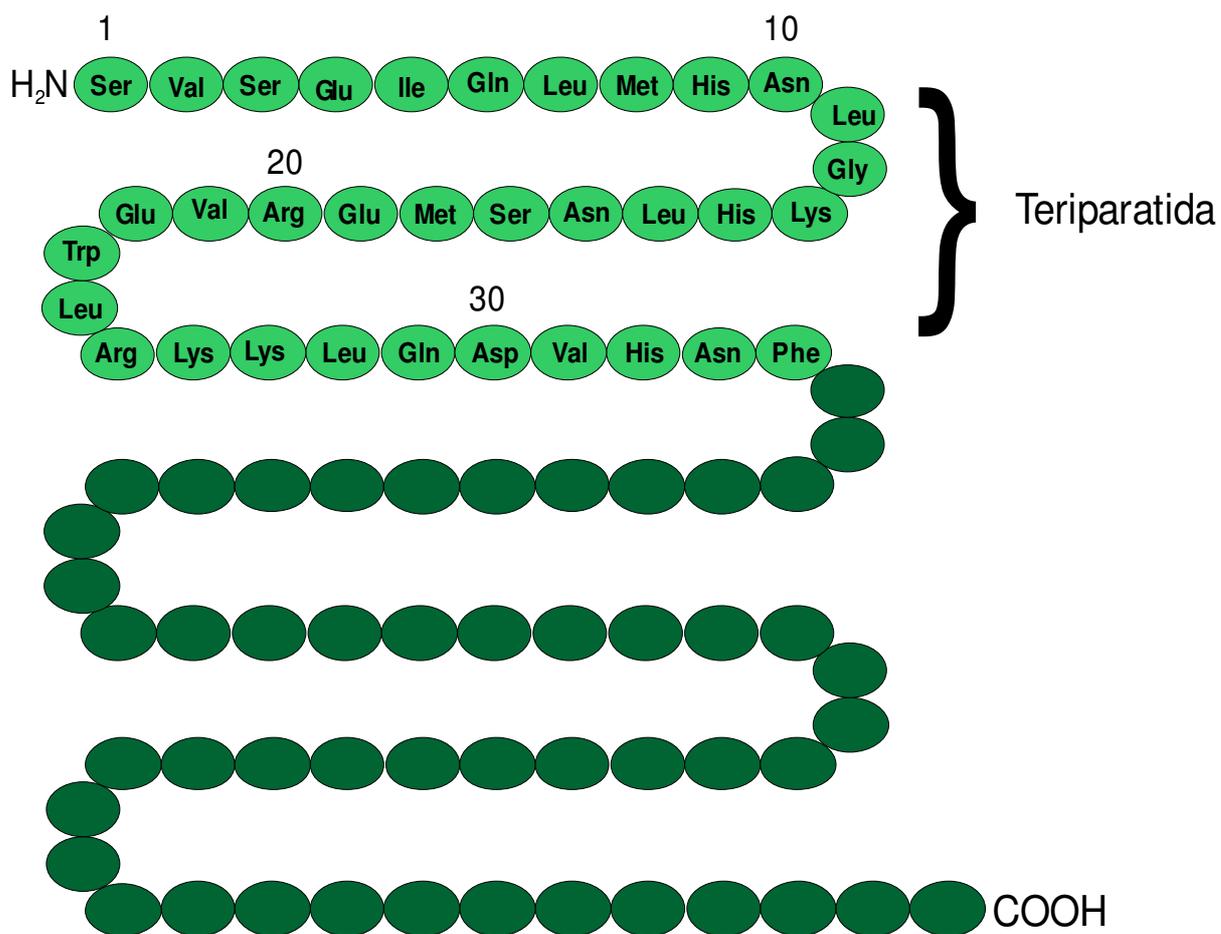


Figura 1 – Estrutura primária do rhPTH (1-34), adaptada (LIN & LIN, 2011).

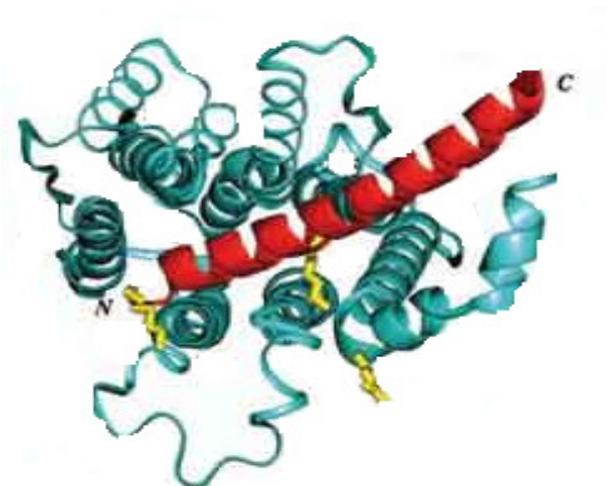


Figura 2 – Representação da estrutura tridimensional do rhPTH 1-34, adaptada (LEI et al., 2005).

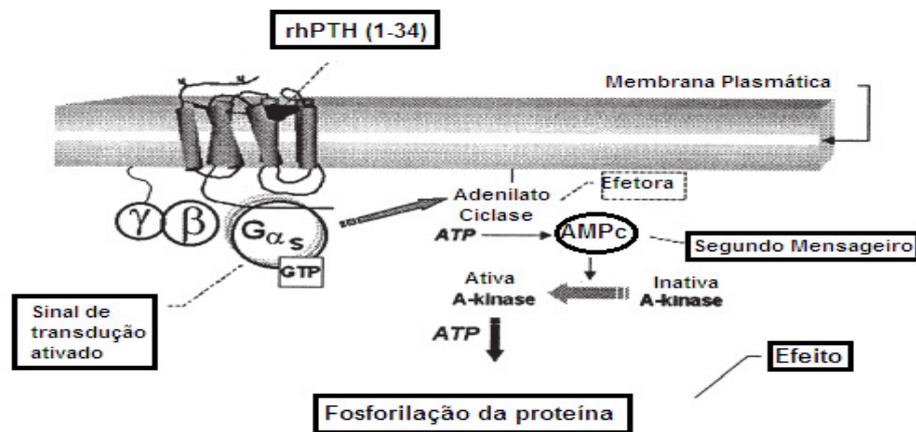
O rhPTH (1-34) encontra-se disponível como produto biofarmacêutico denominado Fortéo<sup>®</sup>, sendo fabricado pelo laboratório francês Lilly France e distribuído no Brasil pelo laboratório Eli Lilly, sob a forma de solução injetável, na apresentação de 750 mcg/ caneta injetora. A dose diária recomendada é de 20 mcg, por via subcutânea durante período máximo de 2 anos.

A administração diária de baixas doses de rhPTH previne a perda óssea e preserva ou aumenta a densidade mineral óssea (DMO), a massa e força óssea em humanos e várias outras espécies animais (LINDSAY et al., 1997; NEER et al., 2001). O rhPTH foi o primeiro agente anabólico a receber a aprovação do US Food and Drug Administration (FDA), sendo clinicamente indicado para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa e de homens com osteoporose primária ou hipogonadal (QUATTROCCHI & KOURLAS, 2004).

O rhPTH atua no metabolismo do cálcio semelhantemente ao hPTH, exercendo atividades regulatórias responsáveis pela manutenção da homeostase do cálcio, tais como: elevação do cálcio sanguíneo através do aumento da reabsorção óssea osteoclástica, aumento da reabsorção renal de cálcio e elevação de fosfatúria pela inibição da via de reabsorção trans-epitelial tubular renal de fosfato. Também contribui para o aumento da absorção intestinal de cálcio, estimulando a síntese renal de 1,25- dihidróxivitamina D (KIMMEL et al., 1993; SATTERWHITE et al., 2010, COLE et al., 2007).

As principais atuações do rhPTH sobre os osteoblastos iniciam com a ligação da sua porção amino-terminal a um tipo de receptor de membrana específico tipo I (PRPI) acoplado a proteína G. Essa ligação provoca mudanças conformacionais e estruturais no meio citoplasmático, que permite a ativação da proteína G do tipo G<sub>S</sub> ou G<sub>Q</sub>. A proteína G<sub>S</sub> ativada aumenta a atividade da enzima adenilato ciclase (Ac), elevando os níveis celulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMP<sub>C</sub>). Este atua como segundo mensageiro ativando a proteína quinase A (PK-A), cujos substratos são fosforilados em resposta a ativação do receptor PRPI. A proteína G<sub>Q</sub> ativada aumenta a atividade da fosfolipase C, enzima que hidrolisa a membrana plasmática do fosfolípido 4,5-bisfosfato fosfatidilinositol para produzir diacilglicerol (DAG) e 1,4,5- trifosfato inositol (IP3). DAG e IP3 atuam como segundo mensageiros, ativando a proteína quinase C (PK-C), o que resulta na abertura dos canais de cálcio presentes na membrana do retículo endoplasmático e no aumento de cálcio livre no citosol (GRACITELLI et al., 2002; GOLTZMAN et al., 1999; ULLOA-AGUIRRE et al., 1999).

(A)



(B)

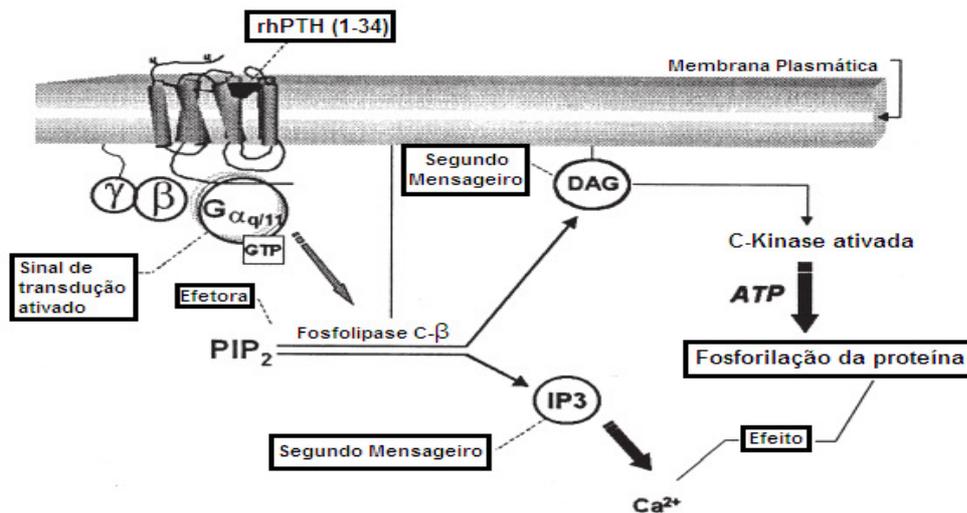


Figura 3 – Representação da interação do rhPTH com o receptor acoplado a proteína  $G_s$  (A) e  $G_q$  (B) conforme Ulloa-Aguirre et al., 1999.

A ativação da via Ac/AMPC/PK-A é essencial para a maioria das funções osteoblásticas e embora ative genes primordiais, mediadores da osteoclastogênese, o sistema da PK-C também tem se mostrado importante para a função osteoblástica quando o rhPTH é fornecido de maneira intermitente. De modo geral, o rhPTH induz a expressão de genes relacionados a uma série de fatores de crescimento, os quais incluem IGF-1, IGF-2, TGF- $\beta$ , nas células estromais. Os fatores de crescimento atuam no recrutamento de células pré-osteoblásticas, derivadas das células estromais da medula óssea, e induzem a diferenciação e

maturação destas em osteoblastos maduros, capazes de sintetizar colágeno em grande quantidade (GOLTZMAN, 1999).

Embora de forma indireta, o rhPTH atua sobre os osteoclastos, uma vez que osteoblastos e células estromais estão envolvidas na osteoclastogênese. Sob estímulo do rhPTH, a célula madura secreta o ligante da osteoprotegerina (OPG-L), que tem sua transcrição ativada pela via da PK-A. O OPG-L tem a capacidade de se ligar ao receptor de membrana (RANK) nas células progenitoras hematopoiéticas, induzindo a diferenciação em osteoclastos. No entanto, a osteoprotegerina (OPG), receptor solúvel da família do fator de necrose tumoral, inibe a diferenciação e ativação destas células por competir com o RANK pela OPG-L. Estudos *in vivo* demonstraram que administrações contínuas de rhPTH, causadoras de reabsorção óssea, desencadeiam diminuição da OPG e aumento da OPG-L (MA et al., 2001; SUDA et al., 1995; BEKKER et al., 2001).

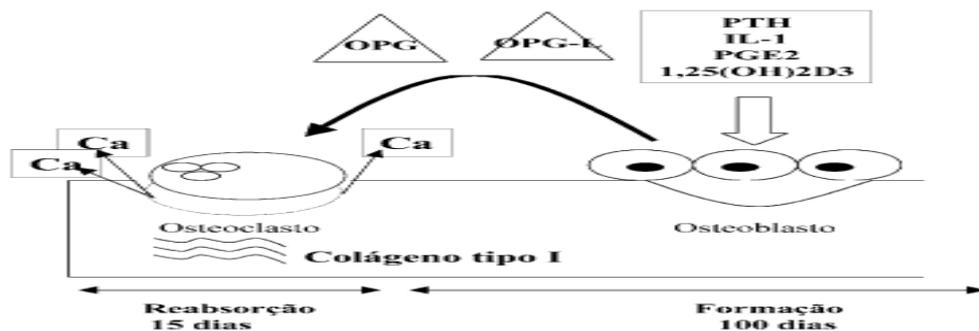


Figura 4 – Esquema representativo da ação indireta do rhPTH sobre os osteoclastos conforme Gracitelli et al., 2002.

As ações renais do rhPTH incluem: inibição da reabsorção renal de fosfato, estimulação da reabsorção de cálcio e aumento da produção de 1,25-dihidroxitamina D. O fosfato forma complexo com o cálcio livre no sangue, que resulta na redução dos níveis de cálcio ionizado quando há elevação do fosfato sérico. Assim, a excreção renal do fosfato induzida pelo rhPTH facilita o aumento do cálcio ionizado e total no sangue. A fosfatúria deve-se a inibição do co-transportador sódio-fosfato tipo II, que conduz a resposta de inibição da reabsorção de fosfato pelo túbulo proximal renal. Os principais sítios de atuação do rhPTH para o aumento da reabsorção renal de cálcio são o túbulo contorcido distal renal e o ramo ascendente da alça de Henle. Estudos demonstram que a reabsorção tubular distal renal de cálcio é um processo ativo que requer entrada de cálcio nos canais diidropiridínicos. Os fármacos que inibem estes canais são efetivos para bloquear a reabsorção renal de cálcio induzida pelo rhPTH (MARCUS et al., 2001).

Parsons et al. (1973) desenvolveram e validaram bioensaio *in vivo* baseado na hipercalcemia em frangos induzida por PTH, administrando doses de 6, 18 e 54 µg/mL de PTH de formulações farmacêuticas, via intravenosa. Determinaram a concentração sérica de cálcio 60 minutos após as injeções por espectrofotometria de absorção atômica.

Yamamoto et al. (1994) realizaram estudo comparativo da bioatividade do hPTH(1-84) e hPTH (1-34) avaliada pelo bioensaio *in vivo* de hipercalcemia em frangos. Os resultados demonstraram potência biológica superior para o hPTH (1-84), que pode estar relacionada a maior afinidade da região C-terminal pelo receptor do PTH.

Reidhaar-Olson et al. (2000) realizaram mutagênese sítio dirigida para a obtenção de variantes ativas de rhPTH (1-34), que tiveram sua potência biológica avaliada pela atividade da adenilato ciclase em células de osteosarcoma de rato UMR-106 e em células de osteosarcoma humana SaOS-2. Além disso, os autores avaliaram a afinidade das variantes ativas ao receptor PTH através do ensaio de ligação ao receptor. Embora algumas mutações nos resíduos Lys<sup>13</sup>, Glu<sup>19</sup>, Val<sup>21</sup>, Glu<sup>22</sup>, Lys<sup>27</sup> e Asp<sup>30</sup> contribuam para o aumento da atividade biológica do rhPTH (1-34), verificou-se que esta depende criticamente da identidade dos resíduos de metionina das posições 8 e 18.

Mok et al. (2010) desenvolveram bioensaio *in vitro* da atividade proliferativa de células UMR-106 para avaliar a atividade biológica de Icariin, flavonóide glicosilado da Herba *Epimedii* que apresenta efeito farmacológico na prevenção da perda óssea durante a osteoporose. A proliferação celular foi detectada com MTS e a absorbância determinada em leitor de microplacas a 490 nm.

Hashimoto et al. (1994) demonstraram a expressão de receptores de PTH/rhPTH acoplados ao sistema de ativação da adenilato ciclase em cultura de astrócitos de rato. O sistema de ativação do receptor foi confirmado pelo aumento linear de AMPc determinado por radioensaio. Também verificaram por imunofluorescência que o rhPTH (1-34) induz mudanças morfológicas mediadas por AMPc intracelular em astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP), sugerindo que o rhPTH desempenha resposta local na fisiologia neuronal.

Nakao et al. (2009) pesquisaram a relação entre a sinalização da proteína morfogenética óssea (BMP) e o aumento dos níveis de AMPc induzido por PTH em linhagem de células osteoblásticas de camundongo MC3T3-E1. Foram determinados os níveis de AMPc bem como as atividades da fosfatase alcalina e luciferase em células MC3T3-E1 tratadas com hPTH (1-34) e rhBMP-2. Os resultados demonstraram a eficácia do tratamento

cíclico com PTH na manutenção do AMPc em níveis intracelulares elevados, o que promove aceleração da diferenciação osteoblástica induzida pela proteína morfogenética óssea.

A farmacocinética, distribuição tecidual e perfil de excreção do rhPTH (1-34) foi estudada em ratos após injeção única por via subcutânea de 5, 10 e 20 µg/kg e intravenosa de 10 µg/kg, demonstrando biodisponibilidade absoluta, rápida absorção e excreção, especialmente urinária (HU et al., 2006).

A estabilidade *in vitro* do rhPTH (1-34) foi estudada em homogeneizados de tecido hepático, renal e pulmonar de ratos. A degradação do rhPTH foi monitorada em função do tempo e os principais produtos de degradação foram identificados por espectrometria de massas com ionização e desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS). O principal produto de degradação deriva da clivagem da ligação peptídica Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup> e sua presença foi verificada nos três tecidos analisados. A degradação pode ser interrompida com inibidores específicos de serina e metaloproteases (LIAO et al., 2010).

Chunxiao et al. (2007) realizaram a clonagem e expressão de análogo com duas prolinas adicionais aos 34 aminoácidos do rhPTH. Executaram a caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), avaliação da atividade biológica pelo ensaio de Parsons em frangos, e da atividade farmacológica pela determinação da densidade do material ósseo (DMO) em ratas. Posteriormente, Chunxiao et al. (2011) prepararam derivados com substituição da arginina por leucina e adição de prolinas na carboxila terminal, que foram caracterizados e avaliada a atividade biológica pelo ensaio de Parsons.

Pichette et al. (2000) desenvolveram método por CL-FR em coluna C<sub>18</sub> mantida a 50 °C para determinação da pureza de hPTH (1-84) em preparações sintéticas. Observaram que a utilização de fase móvel composta por ácido trifluoracético (TFA) e acetonitrila não foi eficiente para a separação da impureza principal. A separação cromatográfica foi obtida com a aplicação de gradiente com fase móvel A composta de cloreto de sódio 0,155 M e de pentanosulfonato de sódio 0,037 M, pH 5,6, e fase móvel B de acetonitrila. Efetuaram análise de hPTH (1-84) com separação de impurezas em níveis similares ao detectado pelo método por eletroforese capilar.

Frelinger et al. (1984) separaram os produtos de oxidação do hPTH sintético de origem bovina por cromatografia líquida em fase reversa e avaliaram a atividade biológica pelo bioensaio da adenilato ciclase renal. Os resultados demonstraram atividade reduzida para os sulfóxidos da metionina, Met<sup>8</sup> e Met<sup>18</sup>.

Nabuchi et al. (1995) determinaram os resíduos oxidados de metionina do rhPTH após tratamento com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), por espectrometria de massas. A atividade biológica dos sulfóxidos foi avaliada pelo ensaio da adenilato ciclase em células de osteosarcoma de rato ROS 17/2,8-5, que demonstrou a bioatividade reduzida das formas oxidadas.

Yin et al. (2004) avaliaram os efeitos e mecanismos antioxidantes do ácido ascórbico sobre o hormônio da paratireóide humano (13-34). Método por CL-FR com coluna C<sub>4</sub> e gradiente de eluição foi empregado para quantificar a oxidação do resíduo de metionina (Met<sup>18</sup>) do hPTH (13-34). Observaram que baixas concentrações de ácido ascórbico, na presença de íons metálicos de ferro e cobre, fazem com que o mesmo atue como pró-oxidante. Também verificaram que a adição do agente quelante EDTA na formulação foi efetiva para a prevenção da degradação do hPTH (13-34).

Kamberi et al. (2004) desenvolveram método por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) e estudaram a efetividade da adição de sal e solventes orgânicos na supressão de interações hidrofóbicas/eletrostáticas entre o hPTH (1-34) e a coluna, bem como no aumento da precisão durante a determinação de agregados. Os autores obtiveram melhor resolução pela combinação de fase móvel A composta por ácido trifluoracético 0,1% em solução de cloreto de sódio 0,2 M e fase móvel B de acetonitrila (80/20, v/v), eluídas em vazão de 0,5 mL/min e detecção a 215 nm.

Na & Lee (2004) caracterizaram o hormônio da paratireóide humano (1-34) peguilado por eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas MALDI-TOF-MS. O método foi utilizado para otimizar o processo de peguilação e determinar a extensão e os sítios de peguilação de cada isômero a partir da sua clivagem enzimática. Sugeriram a aplicação do método para estudos de peguilação de outros produtos biofarmacêuticos.

Jing et al. (2006) identificaram a estrutura primária do rhPTH (1-34) e determinaram o seu peso molecular por espectrometria de massas com triplo quadrupolo-tempo de vôo e ionização por nanoelectrospray (ESI-TOF-MS). A massa molecular determinada foi de 4115,21 Da com erro relativo de 0,06% comparável a massa molecular teórica de 4117,76 Da, demonstrando que não houve deleção, mutação ou modificação durante o processo de expressão e purificação do rhPTH.

A cromatografia líquida destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como método específico, sensível, robusto e reprodutível, com custo e duração de análise adequados (ZARRIN et al., 2006; 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).

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (FDA, 2001; ICH, 2005; USP 35, 2012). 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, 2009b) e no artigo (**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 et al., 2007; ROZET et al., 2007; INJAC et al., 2008).

Os estudos de métodos físico-químicos que possam ser usados em combinação ou como alternativa aos bioensaios *in vitro* e *in vivo*, 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 também importantes 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 fazem com que as biomoléculas sejam diferentes dos fármacos clássicos. Assim, os métodos analíticos usuais não conseguem caracterizar estas moléculas suficientemente para confirmar a sua equivalência estrutural com o fármaco de referência. Conseqüentemente tem sido usada a combinação de métodos que representam a tecnologia do estado-da-arte para caracterização e estudos de comparabilidade. Os guias oficiais e parâmetros de especificação têm sido

avaliados e atualizados com destaque para o impacto na segurança e eficácia terapêutica (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

---

3.1 – Fernanda Pavani Stamm, Guilherme Zanini Calegari, Guilherme Weber de Freitas, Ricardo Bizogne Souto, Larissa Pereira Porto, Clóvis Dervil Apratto Cardoso Júnior and Sérgio Luiz Dalmora. Assessment of Recombinant Human Parathyroid Hormone: Correlation of LC Methods with Bioassays. **Analyst**, 2013. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/an/c2an36583a>.

## Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays

Cite this: DOI: 10.1039/c2an36583a

Fernanda P. Stamm,<sup>b</sup> Guilherme Z. Calegari,<sup>b</sup> Guilherme W. de Freitas,<sup>a</sup> Ricardo B. Souto,<sup>b</sup> Larissa P. Porto,<sup>a</sup> Clóvis D. A. Cardoso, Jr.<sup>a</sup> and Sérgio L. Dalmora<sup>\*a</sup>

Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and size exclusion liquid chromatography (SE-LC) methods were validated for the assessment of recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34). The gradient RP-LC method was carried out on a Zorbax 300 SB C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm i.d.), maintained at 40 °C. The mobile phase A consisted of 0.1 M sodium sulphate buffer, pH 2.3, and the mobile phase B was acetonitrile. The SE-LC method was carried out on a BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm × 7.8 mm i.d.), maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 0.1 M phosphoric acid buffer, pH 2.5, run isocratically at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>. Chromatographic separation was obtained with retention times of 12.2 min, and 13.2 min, and was linear over the concentration range of 1–250 µg mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9997$ ) and 2–300 µg mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9993$ ), respectively, for RP-LC and SE-LC, with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. Equally, the accuracy was 100.49% and 100.22%, with bias lower than 1.12% and 0.81% respectively. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of related proteins and higher molecular weight forms showed significant differences ( $p < 0.05$ ). Chromatographic methods were applied for the content/potency assessment of rhPTH and related proteins in biopharmaceutical injectable dosage forms, and the results were correlated with those of *in vitro* and *in vivo* bioassays. It is concluded that the employment of the methods in conjunction allows a great improvement in monitoring stability, contributing to evaluate alternatives which improve the quality control and thereby assure the therapeutic efficacy of the biotechnology-derived medicine.

Received 30th October 2012  
Accepted 21st December 2012

DOI: 10.1039/c2an36583a

www.rsc.org/analyst

### 1 Introduction

Human parathyroid hormone (hPTH) is produced and secreted by the parathyroid glands and is the most important peptide regulator of calcium and phosphate ion homeostasis in blood and bones. Recombinant human parathyroid hormone 1-34 (rhPTH 1-34) produced by DNA technology in *Escherichia coli* is currently being used worldwide for the treatment of osteoporosis at high risk of fractures in postmenopausal women and men with osteoporosis primary or hypogonadal.<sup>1–3</sup>

The polypeptide structure of rhPTH contains 34 amino acids with a molecular mass of 4.1 kDa, which is considered to contain both the structural determinants of the biological activity and the receptor-binding region of the full length of hPTH (1-84).<sup>1</sup>

The biological potency of rhPTH (1-34) has been assessed by an *in vivo* bioassay based on the hypercalcemia caused by intravenous injection in chickens.<sup>4</sup> The bioassay was applied to

a comparative study of the bioactivity of the human PTH (1-84) and the rhPTH (1-34),<sup>5</sup> and novel recombinant peptides derived from hPTH (1-34) through gene engineering, cloning and expression in *E. coli*.<sup>3,6</sup> An *in vitro* cell culture-based bioassay was developed using rat osteosarcoma UMR-106 cells and was used to evaluate the effect of site-directed mutagenesis on the bioactivity measured by stimulation of adenylate cyclase activity and to identify functionally critical regions/residues of the biomolecule.<sup>7</sup> Also, the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line was used to evaluate bone morphogenetic protein activity by increasing the intracellular 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP).<sup>8</sup>

An ion-pairing reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was developed for the analysis of hPTH (1-84) in synthetic preparations, and the separation of impurities, as previously demonstrated by capillary electrophoresis (CE), using a C<sub>18</sub> column and a mobile phase comprising sodium chloride and sodium pentanesulfonate.<sup>9</sup> A size-exclusion liquid chromatography (SE-LC) method using a G2000 column with detection at 215 nm was used to overcome non-specific interactions for a precise quantification of non-covalent aggregation of rhPTH (1-34).<sup>10</sup> A CE method and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

<sup>a</sup>Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: sdalmora@terra.com.br; Tel: +55 55 32208952

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: sdalmora@terra.com.br; Tel: +55 55 32208952

(MALDI-TOF MS) were applied to optimize the process and, for the characterization of pegylated hPTH (1-34).<sup>11</sup>

LC has been successfully applied to monitor the content, purity, identity and chemical stability of the biotechnology-derived products.<sup>12,13</sup> RP-LC offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants or degradation products which may have reduced activity.<sup>14</sup> One drawback of this technique is that proteins are usually denatured or dissociated as they are adsorbed on to the column matrix, and, therefore is not appropriate for use as a single technique for establishing the potency of preparations that contain biologically inactive, non-covalent oligomers and polymers.

Moreover, SE-LC has been performed under separation conditions which are expected not to affect the higher order structure of the protein, and could be used for monitoring minor structural, as well as conformational variations. It is usually applied for quantification and to determine the native size of protein and to reveal possible dimers and aggregates which have no or reduced activity, and altered immunogenicity.<sup>15,16</sup>

Physicochemical techniques cannot yet predict the biological activity, but can produce information about the structure and composition and are used to monitor content, purity, and chemical stability. No single technique can satisfactorily provide sufficient information about the protein. Thus, a combination of physicochemical, immunological, and biological methods has been successfully applied in correlation studies between physicochemical and biological assays, in attempts to find methods for characterization and for monitoring the stability of different biotherapeutics.<sup>17–20</sup> At the moment, rhPTH (1-34) is not included in any Pharmacopoeia, but the biotherapeutic should meet the specifications and acceptance criteria for biotechnology-derived proteins.<sup>21</sup>

The aim of this research was to develop and validate specific, sensitive and stability-indicating RP-LC and SE-LC methods for the content/potency assessment of rhPTH in biopharmaceutical formulations; to correlate the results with those from the *in vitro* and *in vivo* bioassays, and to evaluate the bioactivity and the cytotoxicity of related proteins and higher molecular weight forms; thus contributing to the development of alternative methods to monitor stability, improve quality control, and thereby assure the therapeutic efficacy of the biotechnology-derived product.

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals and reagents

The reference reagent parathyroid hormone, human rDNA derived, (R-rhPTH WHO 04/200), was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control-NIBSC (Hertz, UK). A total of eight batches of Fortéo® Eli Lilly (São Paulo, SP, Brazil), containing 250 µg mL<sup>-1</sup> of rhPTH (1-34), were identified by numbers from 1 to 8. The samples were obtained from commercial sources within their shelf life period. Sodium sulphate anhydrous, acetonitrile, phosphoric acid, bovine serum albumin, mannitol, sodium acetate, glacial acetic acid,

*meta*-cresol, and calcium chloride anhydrous used as reagents or excipients were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was obtained using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system Millipore (Bedford, MA, USA). All solutions were degassed by ultrasonication Tecnal (São Paulo, SP, Brazil) and filtered through a 0.22 µm Millex filter Millipore (Bedford, MA, USA).

### 2.2 Apparatus

The LC methods were carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, a LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD<sub>VP</sub> autosampler, and a SPD-M10A<sub>VP</sub> PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP® V 6.14 software program.

### 2.3 Samples and standard solutions

Working standard and sample solutions were prepared daily by diluting the R-rhPTH and the samples of biopharmaceutical formulations in 0.1 M sodium sulphate buffer, pH 2.3, to a final concentration of 50 µg mL<sup>-1</sup>, for RP-LC, and in 0.1 M phosphoric acid buffer, pH 2.5, to a final concentration of 40 µg mL<sup>-1</sup>, for SE-LC.

### 2.4 Procedures

**2.4.1 Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC).** The experiments were performed on a reversed-phase Agilent (Santa Clara, CA, USA) Zorbax 300 SB C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm i.d., with a pore size of 300 Å) maintained at 40 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. Mobile phase A consisted of 0.1 M sodium sulphate buffer, pH 2.3, and mobile phase B was acetonitrile, run as follows: time 0 to 0.1 min 25% of B; from 0.1 to 5 min linear up to 40% of B; from 5.01 to 11 min linear down to 25% of B, maintained up to 25 min. Simultaneously, the following gradient flow-rate was used: from 0–11.8 min: 0.3 mL min<sup>-1</sup>; from 11.8–12.2 min: 0.30 to 0.15 mL min<sup>-1</sup>; from 12.2–18 min: 0.15 mL min<sup>-1</sup>; from 18–20 min: 0.15 to 0.30 mL min<sup>-1</sup> and from 20–25 min: 0.30 mL min<sup>-1</sup>. The elution was performed with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The mobile phases were filtered through a 0.22 µm membrane filter Millipore (Bedford, MA, USA). The injection volume was 20 µL, respectively, for reference standard and sample solutions, containing 50 µg mL<sup>-1</sup>.

**2.4.2 Size-exclusion liquid chromatography (SE-LC).** The experiments were performed on a size-exclusion Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm × 7.8 mm i.d.) maintained at 25 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 0.1 M phosphoric acid, pH 2.5, run isocratically at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup> with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The mobile phases were filtered through a 0.22 µm membrane filter Millipore (Bedford, MA, USA). The injection volume was 30 µL of a solution containing 40 µg mL<sup>-1</sup>.

**2.4.3 *In vitro* UMR-106 cell proliferation bioassay.** The bioassay was performed as described elsewhere<sup>22</sup> adjusted, and the growth-promoting activity of rhPTH was assessed on the UMR-106 cell line (rat osteoblast-type cells, ATCC number CRL-1661). The cells were maintained in culture medium DMEM containing 10% (v/v) fetal bovine serum Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) seeding at approximately  $2.0\text{--}4.0 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . The assay was performed in triplicate, the cells were seeded in 96-well microplates BD Biosciences (San Jose, CA, USA) at a density  $6 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  and dosed on seeding with five fold dilution series range starting with  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  of rhPTH. The R-rhPTH was used as standard and the negative control was DMEM culture medium. Briefly, the plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  for a minimum of 48 h. Then  $50 \mu\text{L}$  per well of MTT solution ( $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was added and the plates were incubated for a further 4 h. Following the addition of  $100 \mu\text{L}$  per well of dimethyl sulfoxide (DMSO) for a further 3 h, the absorbance was assessed at 595 nm, using microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

**2.4.4 Chicken hypercalcemia bioassay.** The bioassay was performed as described elsewhere,<sup>4</sup> modified accordingly. Approximately two weeks-old male chickens COBB weighing between 120 and 140 g were housed under controlled conditions and they were given free access to food and water. Before the assay the animals were starved for 12–16 h. The chickens were allocated to sample, standard, and control groups in a fully randomized order and identified by the color code for the assay, usually with 5 chickens per treatment group. Standard and test samples were diluted to concentrations of 10, 25 and  $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  with a vehicle containing  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  of bovine serum albumin, pH 4.0, and sufficient  $\text{CaCl}_2$  to give a concentration of  $20 \mu\text{mol } 0.4 \text{ mL}^{-1}$ , respectively, which was the volume injected intravenously to the chickens. After 60 min they were anesthetized and the blood was collected, centrifuged at  $2750 \times g$  for 10 min. The serum calcium concentration was determined by a colorimetric method using Ca-Color Arsenazo III AA Kit Wiener lab. (Rosario, Argentina), reading the absorbances at 620 nm in the microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland). All the assays were conducted in accordance with the National Protection Laws on Animal Welfare.

**2.4.5 *In vitro* cytotoxicity test.** The *in vitro* cytotoxicity assay was performed as described elsewhere,<sup>23</sup> 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/aggregated samples of rhPTH. The pH of the samples was adjusted to 7.0, and positive and diluents controls, together with R-rhPTH, were included in the assay. The NRU assay was performed on the 96-well microplates maintained at  $37^\circ\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  incubator for 24 h, with a cell suspension density of approximately  $2 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . The neutral red released was evaluated by the addition of extractant solution, and the absorbance was measured at 595 nm.

## 2.5 Validation of liquid chromatographic methods

The methods were validated using samples of biopharmaceutical formulations of rhPTH with a label claim of

$250 \mu\text{g}$  per vial by determination of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, stability, and system suitability test, following ICH guidelines.<sup>24</sup>

**2.5.1 Specificity.** Specificity<sup>25</sup> of the RP-LC method for the biomolecule was assessed by determination of the peak purity of reference solutions and samples of biopharmaceutical formulation of rhPTH ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Oxidative degradation was induced by adding  $50 \mu\text{L}$  of hydrogen peroxide 3% for 45 min. Photodegradation was induced by exposing the sample in a photostability chamber to  $200 \text{ W h m}^{-2}$  of near ultraviolet light for 6 h. For the SE-LC a sample solution at  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  was maintained at  $80^\circ\text{C}$ , for 1 h and shaken for 15 min. In addition, the interference of excipients of the formulation was determined by injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of formulation excipients). Additionally samples of biopharmaceutical formulations of rhPTH, and of degraded and aggregated forms were subjected to the *in vitro* cytotoxicity test.

**2.5.2 Linearity.** The linearity of the RP-LC and SE-LC methods was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight concentrations of R-rhPTH over the range of  $1\text{--}250 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $2\text{--}300 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Besides, three replicates of  $20 \mu\text{L}$  and  $30 \mu\text{L}$  injections of the reference solutions, respectively, were prepared to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of rhPTH to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and the determination coefficient.

**2.5.3 Precision and accuracy.** The precision of the methods was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-days). Repeatability was examined by six evaluations of sample of rhPTH, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the methods was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulations on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was assessed by applying the proposed methods to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the biomolecule, to obtain solutions with concentrations at 40, 50 and  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the RP-LC, and 32, 40 and  $48 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the SE-LC method, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentrations, 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 the added concentrations.

**2.5.4 Limits of detection and quantitation.** The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH,<sup>24</sup> by using the mean values of the three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the 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.

**2.5.5 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 of the RP-LC and SE-LC methods was determined by analyzing the same samples containing  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, under a variety of conditions of the method parameters, such as: mobile phase concentration, mobile phase pH, column temperature and wavelength. To assess the stability of sample solutions of rhPTH, the samples were tested after being maintained at  $2-8^\circ\text{C}$  for 48 h and also placed into the auto sampler, 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.

**2.5.6 System suitability test.** To ensure the validity of the analytical procedure for RP-LC and SE-LC methods, data from five injections of  $20 \mu\text{L}$  and  $30 \mu\text{L}$  of the working standard solution containing  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, were used for evaluation of the system suitability parameters, such as asymmetry, number of theoretical plates, RSD% of retention time, and peak area, through the CLASS-VP® V 6.12 software.

**2.5.7 Analysis of rhPTH 1-34 in biopharmaceutical formulations.** The biopharmaceutical samples were previously identified by SDS-PAGE followed by transference to a nitrocellulose membrane and immunodetection with a rhPTH (1-34) specific antiserum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). For the quantitation of rhPTH by the RP-LC and SE-LC methods, the respective solutions were diluted to appropriate concentration

with  $0.1 \text{ M}$  sodium sulphate buffer, pH 2.3, or  $0.1 \text{ M}$  phosphoric acid buffer, pH 2.5, injected in triplicate and the percentage recoveries of the biopharmaceutical calculated against the R-rhPTH.

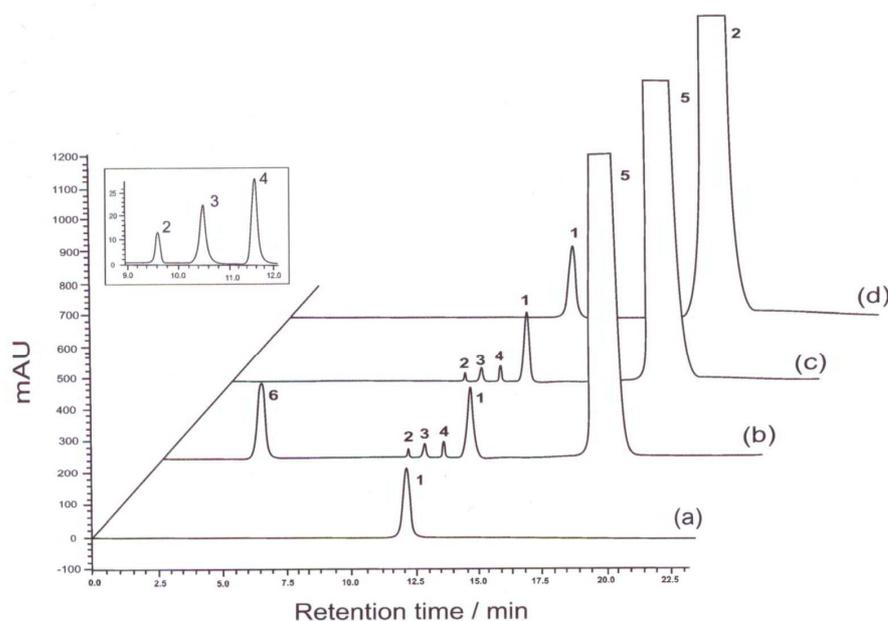
## 3 Results and discussion

### 3.1 Optimization of chromatographic conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide appropriate selectivity and sensitivity. For the RP-LC method, sulphate sodium buffer resulted in higher sensitivity related to phosphate buffer, and lower retention time compared to trifluoroacetic acid and acetonitrile in water. Resolution was improved using gradient with  $0.1 \text{ M}$  sodium sulphate and acetonitrile. For the SE-LC method, phosphoric acid solution resulted in higher sensitivity compared to phosphate buffer and phosphate buffered saline. Optimum wavelength was selected using a PDA detector and the conditions selected, for the respective methods, were validated for the analysis of rhPTH in biotechnology-derived products and correlation studies.

### 3.2 Method validation

**3.2.1 Specificity.** Specificity of the RP-LC method for the biological materials was evaluated under oxidative conditions and photodegradation generating the main peak at 12.2 min, and additional peaks of related proteins with retention times at 9.6 min, 10.5 min and 11.6, respectively, as shown in the typical chromatogram in Fig. 1. Specificity of the SE-LC method was evaluated by subjecting the degraded samples to the analysis



**Fig. 1** RP-LC chromatograms of rhPTH ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). (a) R-rhPTH: peak 1 = rhPTH. (b) Biopharmaceutical formulations after degradation by hydrogen peroxide: peak 1 = rhPTH, peaks 2–4 = sulfoxides, peak 5 = *meta*-cresol, peak 6 = hydrogen peroxide. (c) After photodegradation: peak 1 = rhPTH, peaks 2–4 = sulfoxides, peak 5 = *meta*-cresol (d) biopharmaceutical formulation: peak 1 = rhPTH, peak 2 = *meta*-cresol.

generating the peak of the monomer at 13.2 min, and additional peaks of aggregates and dimers with retention times at 10.8 min and 12.0 min, respectively, as shown in the typical chromatogram in Fig. 2. Moreover, injection of a sample containing only a placebo, showed a peak of *meta*-cresol. Then the specificity of the methods was established by determining the peak purity in the samples using a PDA detector.

**3.2.2 Linearity.** For the RP-LC method, the analytical curves constructed for rhPTH were found to be linear in the 1–250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  range. The value of the determination coefficient calculated [ $r^2 = 0.9997$ ,  $y = (56\,909 \pm 229.691)x - (102\,407 \pm 8367.175)$ ], where,  $x$  is the concentration and  $y$  is the peak absolute area] indicated linearity of the analytical curve for the method. Equally, for the SE-LC method, the analytical curves were found to be linear in the 2–300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  range. The value of the determination coefficient calculated [ $r^2 = 0.9993$ ,  $y = (42\,859 \pm 620.085)x - (268\,841 \pm 11\,280.266)$ ] indicated linearity of the analytical curve for the method.

**3.2.3 Precision.** The precision of the methods was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) for six analyses at a concentration of 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD value was 0.86% and 0.62%. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-days), giving RSD values of 1.56 and 1.69%, respectively for the RP-LC and 1.28 and 1.47%, for the SE-LC methods. The between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples of the biopharmaceutical formulations by three analysts; the values were found to be 1.34 and 1.75%, respectively, for the RP-LC and 1.17 and 1.42%, for the SE-LC methods.

**3.2.4 Accuracy.** The accuracy of the RP-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions

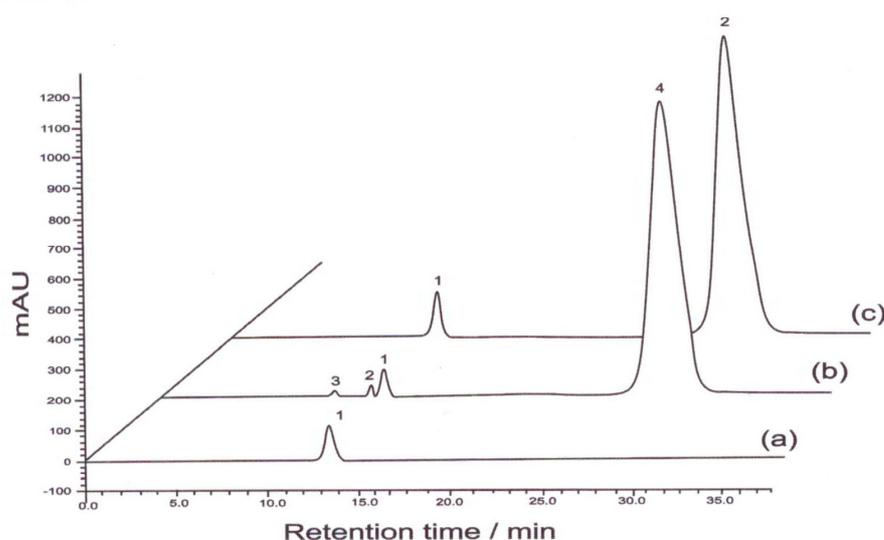
containing 40, 50 and 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. In addition, the accuracy of the SE-LC method was assessed from three solutions containing 32, 40 and 48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The absolute means obtained with a mean value of 100.49 and 100.22% and a bias lower than 1.12% and 0.81% (Table 1), respectively, show that the methods are accurate within the desired ranges.

**3.2.5 Limits of detection and quantitation.** The LOD and LOQ of the LC methods were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression model, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 0.44 and 1.47  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, for the RP-LC and 0.79 and 2.63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , for the SE-LC. The evaluated experimental LOQ with a precision lower than 5% and accuracy within  $\pm 5\%$ <sup>26</sup> was found to be 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The LOD and LOQ of the LC methods are suitable for the quality control analysis of biopharmaceutical formulations.

**Table 1** Accuracy of RP-LC and SE-LC for rhPTH in the formulations

Method	Nominal concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Mean concentration measured <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RSD <sup>b</sup> (%)	Accuracy (%)	Bias <sup>c</sup> (%)
RP-LC	40	40.45	0.11	101.12	1.12
	50	50.48	0.46	100.96	0.96
	60	59.63	1.29	99.38	0.62
SE-LC	32	31.76	0.56	99.25	0.75
	40	40.24	0.27	100.60	0.60
	48	48.39	0.26	100.81	0.81

<sup>a</sup> Mean of three replicates. <sup>b</sup> RSD = relative standard deviation. <sup>c</sup> Bias = [(measured concentration – nominal concentration)/nominal concentration]  $\times$  100.



**Fig. 2** SE-LC chromatograms of rhPTH (40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). (a) R-rhPTH: peak 1 = rhPTH. (b) After thermal degradation for 1 h at 80 °C: peak 1 = rhPTH, peak 2 = dimer, peak 3 = aggregate, peak 4 = *meta*-cresol. (c) Biopharmaceutical formulation: peak 1 = rhPTH, peak 2 = *meta*-cresol.

**3.2.6 Robustness.** The results of the methods and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Tables 2 and 3, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when modifications were introduced into the experimental conditions, thus showing the methods to be robust. The stability of the sample solutions was studied and the data obtained showed the stability for 24 h in an auto sampler and for 48 h when maintained at 2–8 °C.

**3.2.7 System suitability.** The system suitability tests of the chromatographic methods were carried out to evaluate the resolution and repeatability of the system for the analysis to be performed. The obtained RSD values for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.82, 0.93 and 1.87%, respectively for the RP-LC method, and 0.54, 0.81 and 1.36%, for the SE-LC. Besides, the number of theoretical plates was about 24 704, with RSD of 1.64% and 64 704, with RSD of 1.29%, respectively. The parameters tested were within an acceptable range (RSD < 2.0%).

### 3.3 Method application

The validated methods were applied for the determination of rhPTH in biotechnology-derived products, giving mean differences of the estimated content/potencies of 0.64% and 1.31% lower for the RP-LC and SE-LC related to the *in vivo* bioassay, and of 0.98% and 0.31% higher, compared to the *in vitro* cell culture assay, respectively, as shown in Tables 4 and 5. The experimental values were compared statistically by analysis of variance (ANOVA), which showed significant correlation ( $p > 0.05$ ), demonstrating also the stability-indicating capability and the application of the methods, also to support bio-similarity studies of the biomolecule.<sup>27</sup>

### 3.4 Biological potency assessment

The potency of rhPTH was assessed by the UMR-106 cell proliferation bioassay based on the dose-dependent growth curve of the cells, evaluated by the cell counting, and measuring

**Table 2** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the RP-LC method

Variable	Range investigated	rhPTH <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Optimized value
Mobile phase pH	1.8	99.18	0.63	2.3
	2.3	101.83	0.44	
	2.8	100.41	0.58	
	0.05	102.50	0.74	
Sulphate sodium concentration (M)	0.10	100.81	0.49	0.10
	0.15	99.44	0.66	
Column temperature (°C)	35	99.36	0.98	40
	40	99.96	0.31	
	45	101.29	0.61	
	Autosampler 24 h	98.15	0.52	
Solution stability	2–8 °C 24 h	98.67	0.48	—
	2–8 °C 48 h	97.12	0.37	—
Wavelength (nm)	210–320	—	—	214

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

**Table 3** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the SE-LC method

Variable	Range investigated	rhPTH <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Optimized value
Mobile phase pH	2.0	98.39	0.87	2.5
	2.5	99.13	0.33	
	3.0	99.05	1.08	
Phosphoric acid concentration (M)	0.05	98.38	0.97	0.10
	0.10	100.59	0.35	
	0.15	102.58	0.51	
Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	0.5	102.46	0.66	0.7
	0.7	101.02	0.59	
	0.9	99.97	0.85	
Solution stability	Autosampler 24 h	97.53	0.65	—
	2–8 °C 24 h	98.46	0.21	—
	2–8 °C 48 h	96.79	0.56	—
Wavelength (nm)	210–320	—	—	214

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

**Table 4** Comparative content/potency evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations by LC methods

Sample	RP-LC <sup>a</sup>		SE-LC <sup>a</sup>	
	Sulphoxides (%)	Main peak (%)	Aggregates/dimer (%)	Monomer (%)
1	0.45	99.31	0.08	99.84
2	0.22	101.35	0.46	101.13
3	0.53	99.29	1.32	98.87
4	1.84	98.42	0.19	99.05
5	0.31	107.56	0.14	107.18
6	4.24	93.12	3.15	91.43
7	0.39	100.74	0.13	100.45
8	0.28	102.89	0.72	99.30
Mean	1.03	100.33	0.77	99.66
SD <sup>b</sup>	1.40	4.10	1.05	4.28

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

the assay responses with MTT. The statistical analysis of the assay data was performed by a parallel line method, using PLA 2.0 Software (Stegmann System-beratung, Rodgau, Germany), which gave the values shown in Table 5. In addition, the biological activity of eight biopharmaceutical samples was assessed by the *in vivo* chickens hypercalcemia bioassay, which showed mean values 1.62% higher, compared to the *in vitro* cell proliferation bioassay, with significant correlation ( $p > 0.05$ ) as calculated by the Student's *t* test.

Biopharmaceutical samples were also artificially degraded maintaining 50% of the potency, as described under specificity, analyzed by the LC methods, respectively, and subjected to the *in vitro* and *in vivo* bioassays. Sulphoxides and higher molecular weight forms showed bioactivities reduced to 10% ± 5.85 ( $n = 3$ ) and to 14% ± 5.13 ( $n = 3$ ) by the *in vivo* bioassay, and to 8% ± 2.55 ( $n = 3$ ) and to 12% ± 3.46 ( $n = 3$ ) by the *in vitro* assay, respectively. The changes were significant compared to the intact molecule as calculated by the Student's *t* test ( $p < 0.05$ ). Previous studies demonstrated markedly reduction of the

**Table 5** Comparative content/potency evaluation of rhPTH in biopharmaceutical formulations, by *in vivo* and *in vitro* bioassays

Sample	<i>In vivo</i> bioassay		<i>In vitro</i> bioassay	
	Potency (%)	Confidence intervals ( $P = 0.95$ )	Potency (%)	Confidence intervals ( $P = 0.95$ )
1	100.93	95.63–106.52	98.43	92.74–104.52
2	103.56	95.68–112.07	97.72	91.37–104.58
3	99.84	85.54–116.51	101.57	96.53–106.71
4	100.29	94.27–106.62	97.29	92.12–102.65
5	108.05	99.81–117.03	106.94	101.76–112.43
6	91.47	82.65–101.18	91.18	84.12–98.34
7	102.81	96.32–109.89	99.65	93.04–106.65
8	100.83	94.28–107.81	102.06	96.75–107.78
Mean	100.97	—	99.35	—
SD <sup>a</sup>	4.66	—	4.54	—

<sup>a</sup> SD = standard deviation.

bioactivity of the oxidized forms by the osteosarcoma cell adenylate cyclase assay and kidney membrane adenylate cyclase assay.<sup>28,29</sup>

### 3.5 Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity test was performed on degraded forms *versus* the intact molecule, in order to detect possible effects resulting from the instability of the samples during storage, giving mean IC<sub>50</sub> = 46.90 µg mL<sup>-1</sup>, IC<sub>50</sub> = 49.64 µg mL<sup>-1</sup>, respectively, for the sulphoxides and dimer/aggregates, with significant differences as calculated by the Student's *t* test ( $p < 0.05$ ) compared to the intact molecule that showed IC<sub>50</sub> = 69.43 µg mL<sup>-1</sup>. Such evaluations are now necessary, mainly due to the recent concerns related to possible human undesirable effects of the degraded forms.<sup>16,30</sup>

## 4 Conclusions

The results of the validation studies show that the RP-LC and SE-LC methods are specific, sensitive with a LOQ of 1.0 and 2.0 µg mL<sup>-1</sup>, respectively, accurate and possess significant linearity and precision characteristics. The methods were successfully used for the analysis of biopharmaceutical formulations, showing a lower mean difference of the estimated content/potencies of 0.64% and 1.31% for the RP-LC and SE-LC related to the *in vivo* bioassay, and of 0.98% and 0.31% higher, compared to the *in vitro* cell culture assay, respectively, with significant correlation, as calculated by ANOVA ( $p > 0.05$ ). The LC methods represent an improvement to current methods which can be applied in combination with the *in vitro* UMR-106 cell proliferation bioassay, to the characterization of rhPTH by monitoring its stability during the biotechnology process and, through subsequent purification steps, and to assure the batch-to-batch consistency of the bulk and finished biological products.

## Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Projects 477013/

2011 and 306898/2011-0, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERS (Fundação para o Amparo da Pesquisa) for their financial support.

## Notes and references

- 1 E. Quatrocchi and H. Kourlas, *Clin. Ther.*, 2004, **26**, 841.
- 2 Z. Hu, H. Niu, X. Yang, H. Li, G. Sang and B. Li, *Int. J. Pharm.*, 2006, **317**, 144.
- 3 W. Chunxiao, L. Jingjing, X. Yire, L. Jingning, K. Kai, S. Liang, L. Yi and B. Rasco, *Protein Expression Purif.*, 2011, **79**, 156.
- 4 J. A. Parsons, B. Reit and C. J. Robinson, *Endocrinology*, 1973, **92**, 454.
- 5 K. Yamamoto, T. Watanabe, T. Gochou and K. Saito, *J. Bone Miner. Res.*, 1994, **12**, 135.
- 6 W. Chunxiao, L. Jingjing, X. Yire, D. Min, W. Zhaohui, Q. Gaofu, S. Xiangchun, W. Xuejun, W. Jie and L. Taiming, *Regul. Pept.*, 2007, **141**, 35.
- 7 J. F. Reidhaar-Olson, R. M. Davis, J. A. De Souza-Hart and H. E. Selick, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2000, **160**, 135.
- 8 Y. Nakao, T. Koike, Y. Ohta, T. Manaka, Y. Imai and K. Takaoka, *Bone*, 2009, **44**, 872.
- 9 A. Pichette, N. Drouin and M. Girard, *J. Chromatogr., A*, 2000, **890**, 127.
- 10 M. Kamberi, P. Chung, R. DeVas, L. Li, Z. Li, X. Ma, S. Fields and C. M. Riley, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2004, **810**, 151.
- 11 D. H. Na and K. C. Lee, *Anal. Biochem.*, 2004, **331**, 322.
- 12 S. L. Dalmora, F. B. D'ávila, L. M. da Silva, A. C. Bergamo and E. S. Zimmermann, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 2471.
- 13 B. E. Almeida, J. E. Oliveira, C. M. Carvalho, S. L. Dalmora, P. Bartolini and M. T. C. P. Ribela, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, **53**, 90.
- 14 W. Wang, *Int. J. Pharm.*, 1999, **185**, 129.
- 15 H. Goetz, M. Kuschel, T. Wulff, C. Sauber, C. Miller, S. Fisher and C. Woodward, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2004, **60**, 281.
- 16 W. Wang, S. Nema and D. Teagarden, *Int. J. Pharm.*, 2010, **390**, 89.

- 17 A. F. Bristow and S. L. Jeffcoate, *Biologicals*, 1992, **20**, 221.
- 18 B. E. Almeida, J. E. Oliveira, R. Damiani, S. L. Dalmora, P. Bartolini and M. T. C. P. Ribela, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, **54**, 681.
- 19 S. L. Dalmora, C. S. Butzge, F. T. Machado, M. E. Walter, M. E. A. Dalmora and R. B. Souto, *Talanta*, 2012, **94**, 1.
- 20 Substances for Pharmaceutical Use – Products of recombinant DNA technology (0784), British Pharmacopoeia, The Stationery Office, 2012, London.
- 21 ICH Q6B, *International Conference on Harmonization*, IFPMA, Geneva, 1999.
- 22 S. K. Mok, W. F. Chen, W. P. Lai, P. C. Leung, X. L. Wang, X. S. Yao and M. S. Wong, *Br. J. Pharmacol.*, 2010, **159**, 939.
- 23 D. R. Nogueira, M. S. Sangoi, L. M. Silva, V. Todeschini and S. L. Dalmora, *J. Sep. Sci.*, 2008, **31**, 3098.
- 24 ICH Q2(R1), *International Conference on Harmonization*, IFPMA, Geneva, 2005.
- 25 K. M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T. D. Hatajik, W. Kong and Y. Tsuda, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2007, **59**, 29.
- 26 G. A. Shabir, W. L. Lough, S. A. Arain and T. K. Bradshaw, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2007, **30**, 311.
- 27 H. Schellekens and E. Moors, *Nat. Biotechnol.*, 2010, **28**, 28.
- 28 A. L. Frelinger and J. E. Zull, *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 5507.
- 29 Y. Nabuchi, E. Fujiwara, K. Ueno, H. Kuboniwa, Y. Asoh and H. Ushio, *Pharm. Res.*, 1995, **12**, 2049.
- 30 A. S. Groot and D. W. Scott, *Trends Immunol.*, 2007, **28**, 482.

## **DISCUSSÃO**

---

## DISCUSSÃO

---

A tecnologia do DNA recombinante viabilizou a produção de proteínas de interesse terapêutico. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a avaliação da identidade, pureza, potência e estabilidade, fundamenta-se na combinação de técnicas biológicas, físico-químicas e imunológicas, necessárias para a completa caracterização do biofármaco de uso clínico.

Os ensaios biológicos expressam a atividade biológica e sua realização é essencial para a avaliação da potência de biomoléculas, para os quais em geral não se dispõem de metodologias analíticas para o controle de qualidade. Especialmente, para o hormônio da paratireóide humano recombinante a potência biológica tem sido determinada por bioensaios *in vivo* e *in vitro*, baseados na determinação da hipercalcemia em frangos e avaliação da atividade proliferativa da linhagem de células UMR-106, respectivamente, adotados no presente trabalho (PARSONS et al., 1973; REIDHAAR-OLSON et al., 2000; MOK et al., 2010).

Realizou-se teste de identificação por SDS-PAGE não-redutora, obtendo-se perfil eletroforético com banda relativa ao rhPTH (1-34) na região de 4 kDa, confirmada também pelos marcadores de peso molecular e pelo padrão de referência, aplicados no mesmo gel. A transferência e detecção imunológica efetuada com anticorpos específicos em membrana de nitrocelulose, apresentou banda única na região de 4 kDa. Esses procedimentos podem ser usados inclusive para identificar e quantificar impurezas protéicas da célula hospedeira (USP 35, 2012).

Os métodos cromatográficos têm sido usados para diferentes produtos biológicos recombinantes nas etapas de expressão, purificação e análise qualitativa e quantitativa, e para estudos de correlação com os bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Desse modo, optou-se por pesquisar e validar procedimentos por cromatografia líquida em fase reversa e por exclusão molecular para a determinação de rhPTH (1-34), suas proteínas relacionadas e formas de alta massa molecular em produtos biofarmacêuticos.

A discussão apresentada a seguir está baseada no **ARTIGO 3.1**, publicado no *Analyst*.

Avaliou-se a atividade biológica de rhPTH (1-34) pelo bioensaio *in vivo* de hipercalcemia em frangos baseado no aumento dos níveis séricos de cálcio induzido por injeções de formulações farmacêuticas de rhPTH. Observou-se média de potência de

100,97%, correspondente ao teor determinado de 252,42 mcg de rhPTH (1-34), conforme demonstra a tabela 5.

Paralelamente, executou-se o bioensaio *in vitro* da atividade proliferativa em células UMR-106. Observou-se que a potência pelo bioensaio *in vivo* da hipercalcemia em frangos foi em média 1,62% superior em relação ao bioensaio em células UMR-106 com diferença não significativa, conforme calculado pelo teste t de Student ( $p > 0,05$ ).

A separação por CL-FR foi alcançada com tempo de corrida de 12,2 min (figura 1). Os picos adicionais, relativos aos sulfóxidos de metionina de rhPTH (1-34) produzidos sob condições oxidativas e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, com a pureza do pico do rhPTH (1-34) demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método por CL-FR apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 1 a 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $r^2 = 0,9997$ ). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV inferiores a 1,69%, o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza  $CV \leq 2\%$  (SHABIR, 2003). Na tabela 1 podem ser observados os valores experimentais obtidos, com média de 100,49%, confirmando exatidão significativa. As potências obtidas nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, de acordo com a tabela 2. Conforme descrito em publicações, um inconveniente do método por CL-FR 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 sulfóxidos que é necessária devido às possíveis respostas imunogênicas que podem causar no organismo humano (EMEA, 2007; GROOT & SCOTT, 2007).

A separação por CL-EM foi obtida com tempo de retenção de 13,2 min (figura 2). A geração de picos adicionais, relativos aos dímeros e agregados, realizada sob aquecimento e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, com pureza do pico do rhPTH (1-34) demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método por CL-EM apresentou regressão linear significativa na faixa de 2 a 300  $\mu\text{g/mL}$  ( $r^2 = 0,9993$ ). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária para forneceram CV inferiores a 1,47%, o que mostra a precisão do método. Na tabela 1 podem ser observados os valores experimentais obtidos, com média de 100,22%, confirmando exatidão significativa. As potências obtidas nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, de acordo com a tabela 3.

Por sua vez, os dados da verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições dos métodos são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, pois os valores de CV% foram inferiores a 2% (ICH, 2005; USP 35, 2012).

Demonstrou-se, portanto, que os métodos propostos cumprem os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregados para análise de rhPTH (1-34) em produtos biofarmacêuticos. Estudou-se então, a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e o bioensaio em células UMR-106 com as amostras selecionadas, conforme demonstram as tabelas 4 e 5. Observou-se que o teor/potência por CL-FR e por CL-EM foram em média 0,98% e 0,31% superiores, em relação ao bioensaio em células UMR-106, respectivamente, com diferença não significativa, conforme calculado pelo teste t de Student ( $p > 0,05$ ).

Determinaram-se também, os sulfóxidos nas amostras analisadas por CL-FR e os dímeros e agregados nas amostras analisadas por CL-EM, através da soma das áreas dos picos com tempo de retenção menor que o principal, em relação à área total. Os valores foram expressos em percentagem com valor máximo encontrado de 4,24% para sulfóxidos e 3,15% para dímeros e agregados. Observa-se que geralmente as farmacopéias preconizam limite máximo de 12% para os sulfóxidos e de 6% para os compostos de alta massa molecular nas amostras de proteínas recombinantes (BP, 2012; USP, 2012).

As amostras também foram degradadas artificialmente, analisadas por CL-FR e por CL-EM, e submetidas ao bioensaio *in vivo* e *in vitro* para avaliar a bioatividade das formas degradadas. Os sulfóxidos e compostos de alta massa molecular demonstraram bioatividade reduzida de  $10\% \pm 5,85$  ( $n=3$ ) e  $14\% \pm 5,13$  ( $n=3$ ) pelo bioensaio *in vivo*, e de  $8\% \pm 2,55$  ( $n=3$ ) e  $12\% \pm 3,46$  ( $n=3$ ) pelo bioensaio *in vitro*, respectivamente, detectando mudanças significativas em relação à forma intacta do rhPTH (1-34), conforme calculado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Tendo em vista possíveis degradações dos produtos biotecnológicos devido à sua estabilidade durante as etapas do processo de produção e/ou armazenamento avaliou-se também a citotoxicidade *in vitro*. As amostras foram analisadas por CL-FR e CL-EM, estabelecendo-se o teor de degradação de cada forma. As amostras foram então preparadas nesta condição e o ensaio realizado comparativamente à molécula íntegra do rhPTH (1-34). Os resultados obtidos demonstraram médias de  $CI_{50} = 46,90 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 49,64 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, para sulfóxidos e formas de alta massa molecular, com diferenças

significativas comparadas à forma intacta do rhPTH (1-34) que apresentou  $CI_{50} = 69,43 \mu\text{g/mL}$ , conforme calculado pelo teste t de Student ( $p < 0.05$ ).

Até o presente momento, o rhPTH (1-34) não está descrito em nenhuma farmacopéia. Além disso, não há métodos cromatográficos validados publicados, o que é necessário no contexto da produção e caracterização de produtos biológicos recombinantes. Em conformidade com as recomendações atuais de aprimoramento, redução e substituição do uso de animais, sugere-se que os métodos por CL-FR e CL-EM sejam adotados em combinação com o bioensaio em células UMR-106 para a avaliação de potência e pureza do rhPTH (1-34) durante as etapas do processo de expressão e purificação para monitorar variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica (KAISER et al., 1997) e para o controle da qualidade do produto farmacêutico acabado.

Neste contexto, os resultados alcançados contribuem 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

---

- ✓ Os bioensaios da hipercalcemia em frangos e da atividade proliferativa em células UMR-106 mostraram a potência dos produtos biotecnológicos selecionados, e foram adotados para viabilizar estudos de correlação com métodos físico-químicos.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa específico, preciso, exato e robusto para avaliação do hormônio da paratireóide humano recombinante (1-34), que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação, avaliação de sulfóxidos e da forma não-alterada.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular específico, preciso, exato e robusto para avaliação do hormônio da paratireóide humano recombinante (1-34), que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação, avaliação de dímeros, agregados e monômero.
- ✓ Estudou-se a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e o bioensaio em células UMR-106 com as amostras selecionadas. Observou-se que os teores/potências por CL-FR e por CL-EM foram em média 0,98% e 0,31% superiores, em relação ao bioensaio em células UMR-106, respectivamente.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, e de comparabilidade de biomoléculas, contribuindo assim para aprimorar o controle da qualidade e avanços na área de produtos biotecnológicos disponíveis e em pesquisa no País.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AHRER, K.; JUNGBAUER, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. **Journal of Chromatography B**, v. 841, n. 1-2, p. 110-122, 2006.

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

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.

BEKKER, P. J.; HOLLOWAY, D.; NAKANISHI, A.; ARRIGHI, M.; LEESE, P. T.; DUNSTAN, C. R. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 2, p. 348-360, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 55, de 16 de Dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Publicada no D.O.U. de 16 de dezembro de 2010.

BRITISH Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2012.

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, n. 1, p. 7-27, 2002.

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.

CHUNXIAO, W.; JINGJING, L.; YIRE, X.; MIN, D.; ZHAOHUI, W.; GAOFU, Q.; XIANGCHUN, S.; XUEJUN, W.; JIE, W.; TAIMING, L. Study on preparation and activity of a novel recombinant human parathyroid hormone (1-34) analog with N-terminal Pro-Pro extension. **Regulatory Peptides**, v. 141, n. 1-3, p. 35-43, 2007.

CHUNXIAO, W.; JINGJING, L.; YIRE, X.; JINGNING, L.; KAI, K.; LIANG, S.; YI, L.; RASCO, B. Biosynthesis of a novel recombinant peptide derived from hPTH (1-34). **Protein Expression and Purification**, v. 79, n. 1, p. 156-163, 2011.

COLE, D. E. C.; WEBB, S.; CHAN, P. Update on parathyroid hormone: New tests and new challenges for external quality assessment. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 9-10, p. 585-590, 2007.

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, n. 2, 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, n. 12, p. 1753-1767, 2006.

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.

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

FRELINGER, A. L.; ZULL, L. G. Oxidized Forms of Parathyroid Hormone with Biological Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5507-5513, 1984.

GOLTZMAN, D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP Receptor and with Downstream Signaling Pathways: Exceptions That Provide the Rules. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 173-177, 1999.

GRACITELLI, M. E. C.; VIDORIS, A. A. C.; LUBA, R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Paratormônio e Osteoporose: Encontrando o Fio da Meada. Bases Fisiológicas para Utilização do PTH no Tratamento da Osteoporose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 3, p. 215-220, 2002.

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

HAMANN, K.; LANE, N. Parathyroid hormone update. **Rheumatic Disease Clinics**, v. 32, n. 4, p. 703-719, 2006.

HASHIMOTO, H.; AINO, H.; OGAWA, N.; NAGATA, S.; BABA, A. Identification and Characterization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in cultured astrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 200, n. 2, p. 1042-1048, 1994.

HU, Z.; NIU, H.; YANG, X.; SANG, G.; LI, B. Recombinant human parathyroid hormone 1-34: pharmacokinetics, tissue distribution and excretion in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, n. 2, p. 144-154, 2006.

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

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

JING, C.; HONGYING, S.; SHUQING, C. Identification of recombinant human parathyroid hormone (1-34) by nanoelectrospray ionization-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of analytical chemistry**, v. 34, n. 5, p. 603-607, 2006.

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.

KAMBERI, M.; CHUNG, P.; DEVAS,R.; LI, L.; LI, Z.; MA, X.; FIELDS, S.; RILEY, C. M. Analysis of non-covalent aggregation of synthetic hPTH (1-34) by size- exclusion chromatography and the importance of suppression of non-specific interactions for a precise quantitation. **Journal of chromatography B**, v. 810, n. 1, p. 151-155, 2004.

KIMMEL, D. B.; BOZZATO, R. P.; KRONIS, K. A.; COBLE, T.; SINDREY, D.; KWONG, P.; RECKER, R. R. The effect of recombinant human (1-84) or synthetic human (1-34) parathyroid hormone on the skeleton of adult osteopenic ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 132, n. 4, p. 1577-1584, 1993.

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

- LEI, J.; ARMEN, H.; TASHJIAN, J. R.; FAMING, Z. Toward an Understanding of Human Parathyroid Hormone Structure and Function. Molecular Biology of the Parathyroid. **Landes Bioscience**, Austin, TX, USA, 2005.
- LIAO, S.; QIE, J-K.; XUE, M.; ZHANG, Z-Q.; LIU, K-L.; RUAN, J-X. Metabolic stability of human parathyroid hormone peptide hPTH (1-34) in rat tissue homogenates: kinetics and products of proteolytic degradation. **Amino Acids**, v. 38, n. 5, p. 1595-1605, 2010.
- LIN, W-P.; LIN, J. Parathyroid hormone for osteoporosis treatment. **Formosan Journal of Musculoskeletal Disorders**, v. 2, p. 113-117, 2011.
- LINDSAY, R.; NIEVES, J.; FORMICA, C.; HENNEMAN, E.; WOELFERT, L.; SHEN, V.; DEMPSTER, D.; COSMAN, F. Randomized controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. **The Lancet**, v. 350, n. 9077, p. 550-555, 1997.
- 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.
- MA, Y. L.; CAIN, R. L.; HALLADAY, D. L.; YANG, X.; ZENG, Q.; MILES, R. R. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) *in vivo* is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 4047-4054, 2001.
- MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. L. **Osteoporosis**. California: Elsevier Academic Press, 2001.
- MOK, S. K.; CHEN, W. F.; LAI, W. P.; LEUNG, P. C.; WANG, X. L.; YAO, X. S.; WONG, M. S. Icariin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR-106. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 4, p. 939-949, 2010.
- NA, D. H.; LEE, K. C. Capillary electrophoretic characterization of PEGylated human parathyroid hormone with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, n. 2, p. 322-328, 2004.
- NABUCHI, Y.; FUJIWARA, E.; UENO, K.; KUBONIWA, H.; ASOH, Y.; USHIO, H. Oxidation of Recombinant Human Parathyroid Hormone: Effect of Oxidized Position on the Biological Activity. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 12, p. 2049-2052, 1995.

NAKAO, Y.; KOIKE, T.; OHTA, Y.; MANAKA, T.; IMAI, Y.; TAKAOKA, K. Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 3',5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Bone**, v. 44, n. 5, p. 872-877, 2009.

NEER, R. M.; ARNAUD, C. D.; ZANCHETTA, J. R.; PRINCE, R.; GAICH, G. A.; REGINSTER, J. Y.; HODSMAN, A. B.; ERIKSEN, E. F.; ISH-SHALOM, S., GENANT, H. K.; WANG, O.; MITLAK, B. H. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 19, p. 1434-1441, 2001.

NOTELOVITZ, M. **Osteoporosis: prevention, diagnosis and management**. Caddo: Professional Communications Inc, 2008.

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, n. 1-2, p. 206-211, 2007.

PARSONS, J. A.; REIT, B.; ROBINSON, C. J. A bioassay for parathyroid hormone using chicks. **Endocrinology**, v. 92, n. 2, p. 454-462, 1973.

PICHETTE, A.; DROUIN, N.; GIRARD, M. Analysis of human parathyroid hormone (1-84) products separation of a major impurity on synthetic products by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 890, n. 1, p. 127-133, 2000.

QIAN, J.; TANG, Q.; CRONIN, B.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of human serum albumin in a lyophilized formulation of interferon alfa-2b. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, n. 1, p. 48-56, 2008.

QUATTROCCHI, E.; KOURLAS, H. Teriparatide: A review. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 841-854, 2004.

REIDHAAR-OLSON, J. F.; DAVIS, R. M., DE SOUZA-HART, J. A.; SELICK, H. E. Active variants of human parathyroid hormone (1-34) with multiple amino acid substitutions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 160, n. 1-2, p. 135-147, 2000.

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.

SAMBROOK, P. N. The treatment of postmenopausal osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 957-964, 1995.

SATTERWHITE, J.; HEATHMAN, M.; MILLER, P. D.; MARÍN, F.; GLASS, E. V.; DOBNIG, H. Pharmacokinetics of Teriparatide (rhPTH [1-34]) and Calcium Pharmacodynamics in Postmenopausal Women with Osteoporosis. **Clinical Investigations**, v. 87, n. 6, p. 485-492, 2010.

SCHELLEKENS, H. Biosimilar therapeutics - what do we need to consider?. **Nephrology Dialysis Transplantation Plus**, v. 2, n. 1, p. 27-36, 2009.

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

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

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

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- $\alpha$ 2a in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, n. 6, p. 370-382, 2009a.

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, 2009b.

SUDA, T.; UDAGAWA, N.; NAKAMURA, I.; MIYAURA, C.; TAKAHASHI, N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. **Bone**, v. 17, p. 87S-91S, 1995.

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

THE UNITED States Pharmacopeia. 35. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2012.

ULLOA-AGUIRRE, A.; STANISLAUS, D.; JANOVICK, J. A.; CONN, P. M. Structure-Activity Relationships of G Protein- Coupled Receptors. **Archives of Medical Research**, v. 30, n. 6, p. 420-435, 1999.

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

WANG, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

WANG, W.; NEMA, S.; TEAGARDEN, D. Protein aggregation-Pathways and influencing factors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, 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, n. 22, p. 3908-3915, 1994.

YAMAMOTO, K.; WATANABE, T.; GOCHOU, T.; SAITO, K. Comparative study of human-PTH (1-84) and human-PTH (1-34) in the chick hypercalcemia bioassay. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 12, p. S135-S137, 1994.

YIN, J.; CHU, J-W.; RICCI, M. S.; BREMS, D. N.; WANG, D. I. C.; TROUT, B. L. Effects of antioxidants on the hydrogen peroxide-mediated oxidation of methionine residues in granulocyte colony-stimulating factor and human parathyroid hormone fragment 13-34. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 12, p.2377-2383, 2004.

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