

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

**AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE TOXINA
BOTULÍNICA TIPO A POR ENSAIOS BIOLÓGICOS E
MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA EM
FASE REVERSA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Guilherme Weber de Freitas

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A POR ENSAIOS BIOLÓGICOS E MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA

Guilherme Weber de Freitas

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.

2015

**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

**AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A POR
ENSAIOS BIOLÓGICOS E MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA EM FASE REVERSA**

elaborada por
Guilherme Weber de Freitas

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Gizele Scotti do Canto, Dr^a (UFSM)

Rosmari Horner, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2015.

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A POR ENSAIOS BIOLÓGICOS E MÉTODO POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA

AUTOR: GUILHERME WEBER DE FREITAS

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2015.

A toxina botulínica tipo A (BTTA) é um polipeptídeo constituído de 1296 aminoácidos e é recomendada para patologias, como hiperhidrose e enxaqueca, mas é especialmente usada como cosmético. A toxina botulínica é produzida através do processo de fermentação bacteriana e após sucessivas etapas de purificação resulta em uma proteína com 150 kDa responsável pelo seu efeito biológico. No presente trabalho foi desenvolvido e validado método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para a avaliação de potência de BTTA em formulações de produtos biofarmacêuticos. No método foi utilizada coluna Zorbax 300 SB C₁₈ (150 mm x 4,6 mm d.i.), mantida a 45 °C. A fase móvel A foi constituída por tampão sulfato de sódio 0,05 M, pH 2,8, e a fase móvel B por acetonitrila, eluídas em vazão isocrática de 0,3 mL/min. O método utilizou detector de arranjo de diodos (DAD) a 214 nm. A separação cromatográfica foi obtida em 11,4 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,2-100 UI/mL ($r^2 = 0,9999$). Os limites de detecção e quantificação foram 0,04 e 0,16 UI/mL, respectivamente. A especificidade foi avaliada em estudos de degradação, que também demonstraram que não houve interferência dos excipientes. A exatidão foi 100,31 com bias inferior a 0,80. O método validado foi correlacionado com bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Além disso, realizou-se o teste de citotoxicidade *in vitro* das formas degradadas, as quais apresentaram diferença significativa em relação a forma intacta ($p < 0,05$). O método proposto foi aplicado para avaliação da potência de BTTA em formulações biofarmacêuticas, e os resultados foram comparados com o bioensaio *in vivo*, observando-se diferença das médias de teor/potência de 1,16% inferior para o método cromatográfico. Contribuiu-se assim para estabelecer procedimentos que aprimoram a caracterização ou o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia do produto biotecnológico.

Palavras-chave: Toxina botulínica tipo A (BTTA). Cromatografia líquida em fase reversa. Bioensaio de DL₅₀. Cultura celular T47D. Validação. Correlação.

ABSTRACT

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

POTENCY EVALUATION OF BOTULINUM TOXIN TYPE A BY BIOASSAYS AND REVERSE-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

AUTHOR: GUILHERME WEBER DE FREITAS

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, February 26th 2015.

Botulinum toxin type A (BTTA) is a polypeptide with 1296 amino acids and its used in some pathologies like hyperhidrosis and migraine, but the cosmetic area is the most important application. BTTA is produced from broth-culture synthesized by the *Clostridium botulinum* as a single peptide with 150 kDa. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was developed and validated for the assessment of botulinum toxin type A in biopharmaceutical formulations. A RP-LC method was carried out on a Zorbax 300 SB C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at 45 °C. The mobile phase A consisted of 0.05 M sodium sulphate buffer, pH 2.8, and the mobile phase B was acetonitrile, run isocratically at flow rate 0.3 mL/min. Chromatographic separation was obtained with retention time of 11.4 min, and was linear over the concentration range of 0.2-100 IU/mL ($r^2 = 0.9999$) with photodiode array (PDA) detection at 214 nm. The limits of detection and quantitation were 0.04 and 0.16 IU/mL, respectively. Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. Equally, the accuracy was 100.31% with bias lower than 0.80%. The method was correlated with *in vivo* and *in vitro* bioassays. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of related proteins and higher molecular weight forms showed significant differences ($p < 0.05$) compared to intact molecule. The validated methods were applied for the determination of BTTA in biopharmaceutical-derived products, giving mean values of the estimated content/potencies 1.16% lower compared to the *in vivo* bioassay. It is concluded that represents a contribution to establish new alternatives to monitor stability, quality control and thereby assure efficacy of the biotechnology-derived product.

Keywords: Botulinum toxin type A. Reversed-phase liquid chromatography. LD₅₀ mice bioassay. Cell culture T47D. Validation. Correlation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura tridimensional da toxina botulínica, adaptada (SESARDIC; GAINES DAS, 2009)..... 13

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1 20

FIGURE 1 – Representative chromatograms showing peak 1=Botulinum toxin type A; peak 2=deamidated; peaks 3-4=sulphoxides. (a) Biological Reference Substance of botulinum toxin type A; (b) Sample of biopharmaceutical formulation, and (c) after degradation by hydrogen peroxide; (d) after photodegradation 50

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1	20
TABLE 1 – Inter-days and between-analysts precision data of RP-LC for botulinum toxin type A in biopharmaceutical formulations	46
TABLE 2 – Accuracy of RP-LC for botulinum toxin type A in the formulations.....	47
TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure.....	48
TABLE 4 – Comparative content/potencies evaluation of botulinum toxin type A in biopharmaceutical formulations, by <i>in vivo</i> DL ₅₀ mice bioassay, RP-LC method and <i>in vitro</i> T47D cell bioassay.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

BP	Farmacopéia Britânica
BS-BTTA	Substância de referência de toxina botulínica tipo A
BTTA	Toxina botulínica tipo A
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
EMA	European Medicines Agency
EP	Farmacopéia Européia
ESI	Ionização por electrospray
FDA	Food and Drug Administration
kg	Kilograma
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MALDI	Ionização e desorção a laser assistida por matriz
MS	Espectrometria de massas
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
pH	Potencial hidrogeniônico
r^2	Coefficiente de determinação
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TOF	Tempo de Voo
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
TFA	Ácido trifluoracético
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	20
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÕES.....	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas na área de biotecnologia viabilizaram a produção de biomoléculas importantes para a área de saúde pública e cosmética. Entre elas destaca-se a toxina botulínica tipo A, que é obtida através de processo de fermentação com *Clostridium botulinum* sob condições anaeróbicas.

A toxina botulínica tipo A é um polipeptídeo constituído por 1296 aminoácidos que formam duas cadeias menores, com massas moleculares 50 kDa e 100 kDa, respectivamente, denominadas cadeia leve e pesada, unidas por pontes dissulfeto, originando a massa molecular da estrutura com, aproximadamente, 150 kDa (DAS GUPTA; SUGYAMA 1972)

A toxina botulínica tem sido amplamente usada no tratamento estético para rugas de expressão causadas pelo uso dos músculos faciais. Seu uso como cosmético visa diminuir a força muscular sem causar paralisia total do mesmo, impedindo assim complicações como queda da pálpebra e perda da expressão facial. Na clínica é indicada para o tratamento de estrabismo e hiperhidrose, mas estão sendo realizados estudos visando o uso para tremor, bruxismo, enxaqueca, entre outros. O produto está disponível comercialmente sob os nomes de Botox, Botulift, Dysport, entre outros, na forma liofilizada em frascos-ampola contendo de 50 a 500 U.

A avaliação de potência de toxina botulínica tipo A tem sido realizada através do ensaio biológico *in vivo* baseado na determinação da dose letal 50 (DL₅₀), em camundongos (EP, 2013). Entretanto, devido aos aspectos éticos e políticos, além da variabilidade dos ensaios *in vivo*, é recomendada a pesquisa de métodos alternativos no contexto da substituição, redução do uso ou aprimoramento dos ensaios. Assim, observam-se avanços no estudo de métodos por cultura de células T47D *in vitro* e físico-químicos, por cromatografia líquida, com a finalidade de também aprimorar a avaliação de potência desses produtos biotecnológicos.

As proteínas requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com o sítio de ação. Por essa razão, é enfatizada a caracterização físico-química para demonstrar estruturas correspondentes às formas biologicamente ativas dos produtos biotecnológicos. Os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) viabilizam a separação, identificação e avaliação de teor/potência das substâncias biológicas, e neste contexto, têm sido estudados como procedimentos alternativos. As instabilidades químicas e físicas das proteínas têm sido investigadas por diferentes técnicas analíticas que incluem cromatografia

líquida, espectrometria de massas e eletroforese capilar. Esses procedimentos juntamente com os ensaios da atividade biológica e enzima-imunoensaio (ELISA), possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, bem como avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos (WANG, 1999; ICH 2005; STAMM et al., 2013a).

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 processos biotecnológicos complexos, deve ser realizada por métodos eficientes e validados para assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual 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 (BRASIL, 2010; EMA, 2014).

Na presente pesquisa, objetivou-se: a) avaliar a potência da toxina botulínica tipo A pelo ensaio biológico da determinação da DL_{50} *in vivo*; b) pesquisar ensaio biológico por cultura de células T47D *in vitro*; c) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa para determinação de proteínas relacionadas e da forma não-alterada ; d) avaliar correlação entre os ensaios biológicos e o método físico-químico; e) pesquisar a citotoxicidade da molécula íntegra e das formas degradadas. Desse modo, pretende-se estudar metodologias que possam contribuir para a avaliação de identidade, pureza e teor/potência, aprimorando o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Clostridium botulinum é uma bactéria gram-positiva pertencente à família *Bacillaceae*, cujas células têm a forma de bastonetes (bacilos). Desenvolvem-se em ambiente livre de oxigênio, são anaeróbicos, movem-se por flagelos peritricos, formam esporos e produzem neurotoxinas, denominadas toxinas botulínicas altamente potentes designadas A, B, C1, D, E, F e G. A composição particular e o peso molecular do complexo depende do sorotipo e da cepa de *Clostridium* usada na produção (ALSTYNE et al., 1966; BINZ et al., 1990).

O princípio ativo da toxina botulínica é um complexo proteico que possui uma neurotoxina com 150 kDa e proteínas adicionais, não tóxicas, que estabilizam e protegem o componente ativo, resultando em estrutura com peso molecular que varia de 300 a 900 kDa. Este é variável de acordo com o sorotipo e a cepa de *Clostridium botulinum*, e também conforme os métodos de purificação e análise (AOKI; GUYER, 2001).

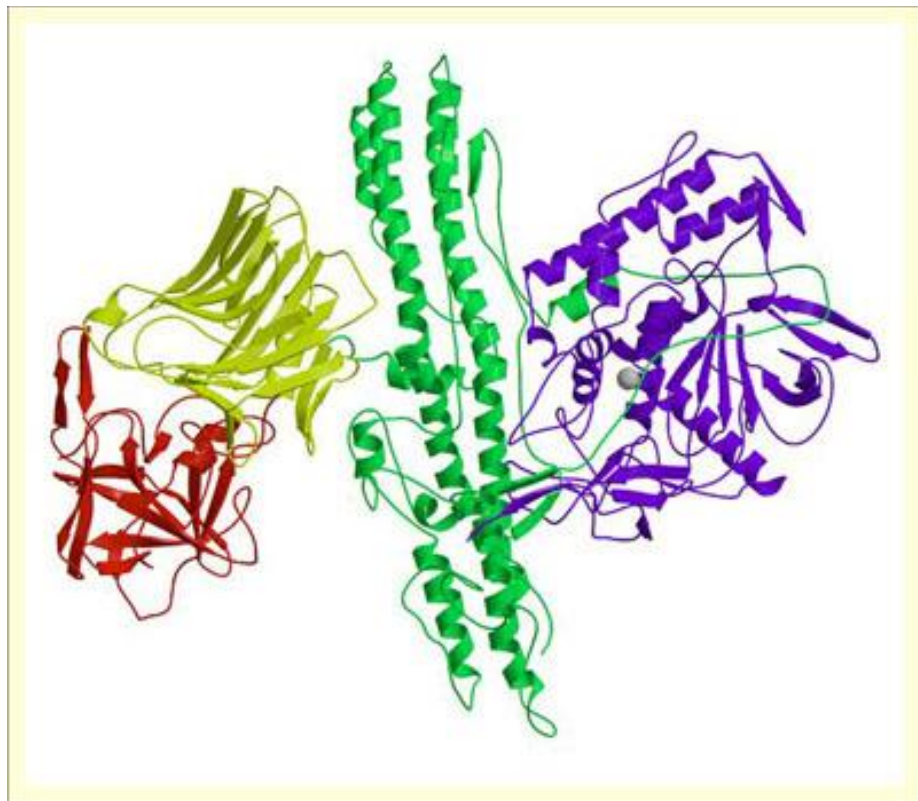


Figura 1: Estrutura tridimensional da toxina botulínica, adaptada (SESARDIC; GAINES DAS, 2009).

A composição de neurotoxinas na forma ativa varia de acordo com os sorotipos de neurotoxinas botulínicas. A toxina botulínica tipo A é um polipeptídeo produzido por fermentação bacteriana, constituído por 1296 aminoácidos com massa molecular de 150 kDa,

conforme a figura 1. Observa-se que é subdividida pelas proteases em dois fragmentos polipeptídicos, uma cadeia leve formada por 448 aminoácidos (aminoácidos 1 - 448) e uma cadeia pesada, formada por 848 aminoácidos (aminoácidos 449 - 1296), ligados por uma ponte dissulfeto entre os aminoácidos 430 da cadeia leve e 454 da cadeia pesada (DAS GUPTA; SUGYAMA 1972; LAING et al., 2006).

A estrutura primária da toxina botulínica tipo A foi identificada com a sequência de 1296 aminoácidos, pontes dissulfeto e localização dos grupamentos sulfidríla. Identificaram os carbonos terminais das cadeias leve e pesada, sugerindo conformação para as estruturas secundária e terciária, respectivamente. Determinaram as massas moleculares de 50 kDa e 100 kDa, para as cadeias leve e pesada, e 150 kDa para a estrutura completa. A estrutura foi comparada com outras neurotoxinas de *Clostridium* (BINZ et al., 1990)

Exemplos de produtos comerciais liberados para o uso terapêutico, são o Botox[®] (100 UI/frasco) fabricado pelo laboratório Allergan[®], o Dysporte[®] (500 UI/frasco) fabricado pelo laboratório Aché[®] e o Prosigne[®] (100 UI/frasco) do laboratório Cristália[®], Botulift[®] (100 UI/frasco) do laboratório Bergamo[®], entre outros (FREVERT; DRESSLER, 2010).

O primeiro produto comercial a receber aprovação do US Food and Drug Administration (FDA), em 1989, foi o Botox, usado para o tratamento do estrabismo, e em 2002 liberado para ser utilizado como cosmético (COTÉ et al., 2005).

Lowe; Yamauchi (2004) estudaram a atividade da neurotoxina usada para fins cosméticos, retardando o aparecimento de curvas de expressão, e para rejuvenescimento. Observando a diferença de potência entre os produtos disponíveis comercialmente e pesquisaram a aplicação da toxina botulínica tipo B para fins cosméticos.

A toxina botulínica tipo A é bem conhecida pelo seu uso no tratamento de condições neuromusculares tais como distonias e espasticidade, e recentemente tem sido sugerida para uso em rugas faciais. É útil para essas condições devido a inibição da liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares. Os autores revisaram também sua aplicação potencial para sialorréia (excesso de secreção salivar), hiperhidrosis, palmar e axilar, enxaqueca. Nas doenças estudadas foi observado baixo índice de efeitos colaterais com alto índice de melhora nos pacientes tratados com a toxina (BHIDAYASIRI; TRUONG, 2005)

O mecanismo de ação, as propriedades farmacológicas e bioquímicas da toxina botulínica tipo A e outros sorotipos de toxinas, têm sido estudados. Após o contato com a pessoa humana, a toxina botulínica tipo A se acumula nas junções neuromusculares e em condições fisiológicas, o complexo é dissociado e é liberada a neurotoxina pura, pois os complexos são estáveis apenas em pH ácido, e essa clivagem entre a cadeia leve e pesada é

necessária para a ativação da toxina. A cadeia pesada da toxina é responsável pela internalização da toxina nos terminais colinérgicos pré-sinápticos, e a cadeia leve é responsável pelo efeito tóxico. A toxina é uma protease responsável pela clivagem dos receptores SNARE que é a base para a ação da toxina na liberação dos neurotransmissores. Após essa ação os neurônios pré-sinápticos ficam impedidos de liberarem acetilcolina, não ocorrendo assim a contração muscular (MONTECUCCO; SCHIAVO, 1994; AOKI; GUYER, 2001).

Para a ação, a toxina sofre clivagem, e a porcentagem varia de acordo com o sorotipo da toxina, sendo que a toxina de sorotipo A apresenta maior clivagem (de 90 a 95%). Após clivagem a cadeia leve é translocada através da membrana da vesícula endocítica para o interior do citosol onde se liga ao receptor SNARE (proteínas que estão envolvidas na liberação de neurotransmissores) impedindo que ocorra a exocitose de neurotransmissores (ROSALES et al., 2006).

O início da ação da toxina no músculo estriado ocorre em alguns dias (2 a 5 dias) e se estende em alguns casos por até duas semanas, sendo a duração da ação de seis semanas a seis meses (em média 4 meses). A restauração da fisiologia normal pode ocorrer de duas formas diferentes, brotamento neural onde ocorre a reinervação muscular temporária ou regeneração dos receptores SNARE (DRESSLER; SABERI, 2005).

As neurotoxinas botulínicas são substâncias altamente tóxicas encontradas na natureza, e que apresentam dose letal de 0,4 a 2,5 ng/kg para ratos. Em humanos, a dose é de aproximadamente 0,2 ng/kg. A toxina se forma no interior do organismo e é liberada por autólise, ou seja, as células bacterianas se destroem após sua produção e liberação da toxina para o meio. A análise da composição permitiu avaliar o impacto de proteínas acessórias sobre a biodisponibilidade oral da toxina em matriz de alimentos (CHENG et al., 2008).

A purificação e composição de aminoácidos da neurotoxina botulínica tipo A foi determinada a partir da produção por cultura com *Clostridium botulinum*, sob condições anaeróbicas, avaliando-se os resultados por eletroforese (SDS-PAGE), e demonstrando que é produzida como mistura de duas formas, uma precursora de cadeia única e outra de duas cadeias (DASGUPTA; SATHYAMOORTHY, 1984).

A produção, purificação em diferentes etapas, análises por eletroforese e cromatografia, avaliação de atividade biológica foram descritas, observando-se também as condições de armazenamento (MALIZIO et al., 2000).

A farmacocinética da toxina botulínica tipo A tem sido estudada em cobaias, ratos, coelhos e macacos. Considera-se que exista pequena distribuição sistêmica do produto após o

uso de doses terapêuticas. Estudos clássicos a respeito da absorção, distribuição, biotransformação e eliminação não foram realizados devido à natureza do produto, porém pesquisas em ratos mostraram difusão lenta no músculo injetado, seguida de rápida metabolização sistêmica e excreção urinária (WOHLFARTH et al., 2004).

A avaliação de potência da toxina botulínica tipo A tem sido preconizada pelo ensaio biológico baseado na avaliação da dose letal 50 (DL₅₀) em camundongos. A relação entre as respostas de mortalidade obtidas para as amostras e o padrão, é calculada estatisticamente através de ensaio de retas paralelas com probitos, e fornece a potência e intervalos de confiança (P=0.05). A validade do ensaio é demonstrada pela análise de variância (EP, 2013).

Gaines Das et al. (1999) desenvolveram método alternativo para a avaliação de potência de toxina botulínica tipo A com base na diminuição do sofrimento e do número de animais utilizados no ensaio. O ensaio é baseado na capacidade da toxina botulínica de agir sobre um substrato específico, SNAP-25, formando diferentes cadeias de aminoácidos que posteriormente são detectadas por imunoenensaio (ELISA).

Wildner-Kofie et al. (2011) propuseram modelo para análise de potência da toxina botulínica utilizando animais, de acordo com os 3Rs, diminuindo o número e o sofrimento dos mesmos, e avaliando respostas de contração muscular de camundongos em relação à concentração da toxina aplicada. O ensaio baseou-se no uso de cinco concentrações na faixa linear fornecendo respostas adequadas para método quantitativo.

Fernández-Salas et al. (2012) desenvolveram método para determinação da potência *in vitro*, utilizando a linhagem celular SiMa. A toxina em contato com as células cliva a proteína SNAP₂₀₆ nos 9 aminoácidos terminais, formando assim a proteína SNAP₁₉₇, que então é quantificada pelo método de ELISA, usando anticorpo monoclonal específico. Os níveis de SNAP₁₉₇ obtidos eram proporcionais aos níveis de toxina botulínica.

A linhagem celular T47D (ATCC HTB-133), de câncer de mama foi utilizada para avaliar a atividade de diferentes concentrações de toxina botulínica tipo A. As respostas de apoptose e viabilidade celular foram determinadas usando o método de iodeto de propídio/anexina V e o corante 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), respectivamente. Observaram que exerceu maior efeito citotóxico nas células T47D em comparação com a MCF10A normais, e concluíram que a toxina botulínica tipo A induz processo apoptótico dependente de caspase-3 e 7 na linhagem celular T47D. Estudaram o ensaio em placa de 96 poços, na qual foram colocadas 1×10^4 células por poço, e adicionadas soluções entre 0 a 15 U de toxina botulínica tipo A, respectivamente. Após 24h de incubação foi realizada a leitura por método espectrofotométrico com MTT. Demonstram que o método é

sensível à toxina botulínica, fornecendo resultados de citotoxicidade de acordo com as concentrações da toxina (BANDALA et al., 2013).

A cromatografia líquida destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de biofármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como método específico, sensível, robusto e reproduzível, com custo e duração de análise adequados (COLLINS et al., 1997; ZARRIN et al., 2006; STAMM et al., 2013a). 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 (SOUTO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014). 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 (MANNING et al., 2010; LEAL et al., 2011).

Krieglstein et al. (1994) estudaram métodos por CL-FR para determinar a estrutura molecular da toxina botulínica através da clivagem da molécula utilizando brometo cianogênico e tripsina. Pesquisaram métodos com coluna C₁₈ e fase móvel composta por ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e acetonitrila, sob condições de gradiente, fluxo de 1,0 ml/min e leitura em 206 nm, detectando fragmentos da molécula da toxina.

Hunt et al. (2010) desenvolveram métodos para determinar substratos de clivagem da toxina botulínica tipo A por CL-FR utilizando coluna C₁₈ e fase móvel composta por ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água ultra pura e acetonitrila. Utilizaram gradiente, fluxo de 1,0 mL/min e detecção fluorimétrica com comprimentos de onda de 322 nm e 420 nm para excitação e emissão, respectivamente.

Purcell; Hoard-Fruchey (2007) utilizaram métodos para clivagem dos diferentes sorotipos da toxina botulínica e executaram a quantificação da atividade da toxina e identificação dos picos separados por eletroforese capilar. Os autores determinaram substratos específicos diferentes para identificar os sorotipos da toxina, com excessão dos sorotipos C e D, e concluindo que esse método pode ser adotado para analisar da atividade das toxinas botulínicas.

A estabilidade da biomolécula pode variar de acordo com a formulação e produção, mas deve ser de, no mínimo, dois anos para o produto liofilizado e após a reconstituição, a toxina botulínica tipo A e não pode ser congelada (ANDERSON, 2004). A estabilidade da toxina botulínica foi estudada através da monitoração dos principais produtos de degradação em função do tempo, os quais foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a

espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e por espectrometria de massas por tempo de voo com ionização e dessorção da matriz assistida por laser (MALDI-TOF-MS) (SETO; KANAMORI-KATAOKA, 2005).

Boyer et al. (2005) desenvolveram método baseado na detecção de fragmentos específicos dos sete diferentes sorotipos da toxina botulínica após a sua quebra e a respectiva quantificação através da espectrofotometria de massa por tempo de voo com ionização e dessorção da matriz assistida por laser (MALDI-TOF-MS) ou por cromatografia líquida acoplada a a espectrometria de massa (CL-MS/MS).

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005; USP 37, 2014). 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) (STAMM et al., 2013b) 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 (SHABIR et al., 2007; ROZET et al., 2007).

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. 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 físico-químicos, biológicos e imunológicos que representam a tecnologia do estado-da-arte. Além disso, os métodos preconizados para as etapas pré-clínicas, avaliação de identidade, pureza, potência e caracterização das biomoléculas são também importantes para fundamentar estudos de comparabilidade. Os guias oficiais preconizam procedimentos e parâmetros de especificação

que têm sido avaliados e atualizados com destaque para o impacto na segurança e eficácia terapêutica (KRESSE, 2009; EMA, 2014).

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 – FREITAS, G. W.; PEROBELLI, F. R.; STAMM, F. P.; XAVIER, B.; SCHRAMM, V. G.; DALMORA, S. L. Potency Assessment of Botulinum Toxin Type A by Bioassays and Correlation with RP-LC method.

**Potency Assessment of Botulinum Toxin Type A by Bioassays and Correlation
with RP-LC method**

Guilherme Weber de Freitas, Rafaela Ferreira Perobelli, Fernanda Pavani Stamm, Bruna Xavier,
Vanessa Grigoletto Schramm, Sérgio Luiz Dalmora*

Department of Industrial Pharmacy
Federal University of Santa Maria
97105-900 - Santa Maria-RS, Brazil

*Corresponding author. Phone./Fax: +55 55 3220 8952
E-mail address: sdalmora@terra.com.br (S.L. Dalmora).

Abstract

A stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated to determine content/potency assessment of botulinum toxin type A (BTTA) in biotechnology-derived products. The method was carried out on a Zorbax 300SB-C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 300 Å), maintained at 45 °C. The mobile phase consisted of 0.05 M sodium phosphate buffer solution, pH 2.8, and acetonitrile, run isocratically at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹, and using a photodiode array (PDA) detection at 214 nm. Separation was obtained with a retention time of 11.4 min, and was linear over the concentration range of 0.2 - 100 IU mL⁻¹ ($r^2 = 0.9999$). Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.31% with bias lower than 0.80%. Moreover, the results were correlated to those of the *in vivo* LD₅₀ mice bioassay and the T47D cell culture bioassay. Degraded forms were subjected to the *in vitro* cytotoxicity test showing significant differences ($p < 0.05$). The method was applied to the assessment of BTTA in biotechnology-derived products in the context of the 3Rs, and the results compared to the *in vivo* bioassay, giving mean values of the estimated potencies 1.16% lower, and contributing to improve the quality control and to assure the safety and biological efficacy.

Keywords: Botulinum toxin type A; LD₅₀ mice bioassay; Reversed-phase liquid chromatography; Cell culture assay; Biotechnology-product.

Introduction

Botulinum neurotoxins are recognized as some of the most potent toxins. There are seven serologically distinguishable neurotoxins (types A-G) produced from broth-culture by the anaerobic bacteria *Clostridium botulinum*. Botulinum toxin type A (BTTA) is synthesized by the bacterium as a single peptide with 150 kDa (1,296 amino acids) that is post-translationally processed by bacterial or host proteases into a disulfide-linked dichain toxin containing a 50 kDa light chain (amino acid residues 1-448) and a 100 kDa heavy protein (amino acid residues 449-1296), held together by a single disulfide bond (C₄₃₀-C₄₅₄) (BINZ et al., 1990; LAING et al., 2006; CHENG et al., 2008).

BTTA induces muscle paralysis by blocking release of neurotransmitter acetylcholine. The neurotoxin binds to cholinergic nerve terminals and is subsequently internalized, probably by receptor-mediated endocytosis. After internalization, the disulfide bond is cleaved by an unknown mechanism. The heavy chain is associated with ionic channel formation and translocation of the light chain from the endosome into the neuronal cytoplasm. The light chain disrupts the secretory pathway for acetylcholine. Botulinum toxin specifically targets acetylcholine release, nerve endings that are poisoned with the toxin can still be induced to release normal quanta of acetylcholine but it cannot be useful in the synapses (BRIN, 1997; HUANG et al., 2000; TURTON et al., 2002).

BTTA was initially approved for conditions such as strabismus and hemifacial spasms. It is widely used in cosmetic treatment, and it has been successfully tested in many conditions characterised by muscle spasticity like cervical dystonia, blepharospasm, tremor and hyperhidrosis (CHAPPLE; PATEL, 2006; TRUONG; JOST, 2006).

Biological potency of BTTA has been assessed by the *in vivo* LD₅₀ mice bioassay observing the animal death per dose during seven days (EP, 2013). Alternative assays based on the local paralysis such as abdominal bulge or toe-spread reflex have been tested in mice (SESARDIC; GAINES DAS, 2009; WILDER-KOFIE et al., 2011). An *in vitro* assay based on the endopeptidase

activity of botulinum neurotoxin type A towards immobilised specific synthetic substrate SNPA-25 was validated and the results compared to the *in vivo* bioassay (GAINES DAS et al., 1999). An alternative cell culture bioassay based on the key steps of action was developed using differentiated human neuroblastoma SiMa cell line (ATCC 24 cell line), evaluating the results by a sandwich ELISA (FERNÁNEZ-SALAS et al., 2012). Another *in vitro* cell culture bioassay based on the effect on proliferation and apoptosis was studied using the T47D (ATCC HTB-133) breast cancer cell line, assessing the responses by MTT and showing greater cytotoxicity in comparison with MCF10A cells (BANDALA et al., 2013).

Many analytical techniques are available to monitor the purity, the chemical stability, and the potency of therapeutic proteins. RP-LC offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related proteins variants or degradation products which may have reduced activity and altered immunogenicity (MANNING et al., 2010; LEAL et al., 2011). A gradient RP-LC method using C₁₈ column, mobile phase composed by trifluoroacetic acid and acetonitrile, with fluorescent detection was employed to detect cleavage products generated by formulated botulinum neurotoxin products (HUNT et al., 2010). Capillary electrophoresis method was used to measure catalytic activity of different serotypes of botulinum neurotoxin using peptides derived from native substrates, showing to be useful as a detection assay (PURCELL; HOARD-FRUCHEY, 2007). MALDI-TOF spectrometry method was developed to detect product derived from the endopeptidase activities of botulinum neurotoxins with target specific peptides, allowing to differentiate the different serotypes, and could be useful to standardize the enzymatic activity of clinical preparations. LC-MS/MS with ESI was also used to quantify active toxin (BARR et al., 2005). Two spectrometric platforms MALDI-TOF or LC-MS/MS with ESI were developed to detect the specific endoproteinase activities of seven serotypes of botulinum neurotoxins, with detection limits from 0.039 to 0.625 mouse LD₅₀ mL⁻¹ (BOYER et al., 2005). Physicochemical techniques alone cannot predict BTTA biological activity yet, but they can produce information about structure and composition, and a combination of

physico-chemical, immunological and biological methods has been successfully applied in correlation studies, in attempts to find methods for characterization and to monitor the stability of different biotherapeutics (DALMORA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014; SOUTO et al., 2014).

The aim of this article was to develop and validate a specific, sensitive and stability-indicating RP-LC method for the content/potency assessment of botulinum toxin type A; to correlate the results with the *in vivo* LD₅₀ mice bioassay and the *in vitro* T47D cell culture bioassay; to evaluate cytotoxicity of related proteins; thus contribute to establishing alternative assay in the context of the Three Rs, while ensuring quality and efficacy of the biological product.

Experimental

Chemicals and reagents

The Biological Reference Substance of Botulinum Toxin Type A (BS-BTTA) and Anti Botulinum toxin type A were obtained from the Medytox Inc. (Seocho-Gu, Seoul City, South Korea) and they were supplied by BSG Pharma Co., Ltd (Dohwa-Dong, Seoul City, South Korea). A total of eight batches of Botulift[®] (Bergamo, São Paulo, Brazil), containing 100 IU/vial of BTTA were identified by numbers from 1 to 8. The samples were acquired from commercial sources within their shelf life period. Hydrogen peroxide (30%) in aqueous solution, human serum albumin, sodium chloride, tetramethylammonium hydroxide, formic acid, acetonitrile, trifluoroacetic acid (TFA) and sodium phosphate monobasic were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All the others chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Apparatus

Liquid Chromatography (LC) method was carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, a LC-20 AD pump, a DGU-20A_s degasser, a SIL-20AC_{HT} autosampler, a CTO-20A column oven and a SPD-M20A PDA detector. The peak areas were automatically integrated by computer using a LC Solution version 1.22 SP1 software program.

Samples and Standard Solution

Working standard and sample solutions of BTTA were prepared daily by diluting the BS-BTTA and the samples of biopharmaceutical formulations in ultra pure water, to a final concentration of 25 IU mL⁻¹, for RP-LC; in 0.9% sodium chloride solution to final concentrations of

6.02, 6.90, 7.90, 9.15 and 10.52 IU mL⁻¹, for LD₅₀ mice bioassay; and in RPMI-1640 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) medium containing 2% (v/v) fetal bovine serum Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) to final concentrations of 0.625, 1.25, 2.5 and 5.0 IU mL⁻¹, for T47D cell culture bioassay.

Procedures

Reversed-Phase Liquid Chromatography Method (RP-LC)

The experiments were performed on a reversed-phase Zorbax 300SB-C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 300 Å) maintained at 45 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 2.8, and acetonitrile (80:20, V/V), run at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹. PDA detection at 214 nm was used. The mobile phase was filtered through a 0.22 µm membrane Millipore filter (Bedford, MA, USA). The injection volume was 50 µL for both the reference substance and samples.

***In vivo* LD₅₀ mice bioassay**

Female 7 to 8 weeks-old Balb/c mice weighing between 18 and 23 g were housed in air-conditioned, controlled conditions (room temperature 22 ± 2 °C, relative humidity of 50 – 60%, and artificial illumination, 12 h per day). They were given free access to food and water. The bioassay was performed as described previously (EP, 2013), and modified accordingly. Briefly, the animals were allocated to sample, standard, and control groups in a fully randomized order with 10 mice per treatment group, respectively. Standard and samples were diluted to concentrations of 6.02, 6.90, 7.90, 9.15 and 10.52 IU mL⁻¹ with 0.9% sodium chloride solution. Each mouse received single intraperitoneal injection of 0.1 mL of respective solution. The animals were observed during seven

days, and the number of deaths per treatment group was used for the statistical analysis by probits, to calculate the potency of the sample against the BS-BTTA. All of the assays were conducted in accordance with the National Protection Laws on Animal Welfare.

Identity Test

Female 7 to 8 weeks-old Balb/c mice weighing between 18 and 23 g, and male 7 to 8 weeks-old American guinea pig weighing approximately 350 g, were allocated to sample and control groups in a fully randomized order. Samples containing 100 IU were neutralized with 1 IU of anti-botulinum toxin type A. Single injections of 0.5 and 5.0 mL of the sample were intraperitoneally injected, respectively, in 3 mice and in 3 guinea pigs, and equally of 0.9% sodium chloride solution in a control group. The animals were observed during seven days, registering the results as survival or deaths.

***In vitro* T47D cell bioassay**

The bioassay was performed as described elsewhere (BANDALA et al., 2013) and adjusted. The T47D cells (breast cancer cells, ATCC number HTB-133) were maintained in culture medium RPMI-1640 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) containing 10% (v/v) fetal bovine serum Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), seeding at approximately $2.0-4.0 \times 10^6$ cells mL^{-1} . The assay was performed in triplicate, the cells were seeded in 96-well cell culture plates BD Biosciences (San Jose, CA, USA) at a density 2.0×10^5 cells mL^{-1} , (1.0×10^4 cells/well) and dosed on seeding by using four concentrations with two fold dilution series of BTTA between 0.5 - 5 IU mL^{-1} . The BS-BTTA was used as standard and the negative control was RPMI-1640 culture medium. Briefly, the plates were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h. Then 50 μL per well of MTT solution 5 mg mL^{-1} , was added per well, and the plates were incubated for a further 4 h. Following the addition of 100 μL per well of

dimethyl sulfoxide (DMSO) for a further 3 h, the absorbance was assessed at 570 nm, using a microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

***In vitro* cytotoxicity test**

The *in vitro* cytotoxicity method was performed as described elsewhere (STAMM et al., 2013), based on a neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) and of CHO-K1 cell line (Chinese hamster ovary, ATCC number CCL-61) to the BTTA sample. The pH of the samples was adjusted to 7.0, and positive and diluents controls were included in the assay together with BS-BTTA standard solution. The NRU assay was performed on 96-well microplates, maintained at 37 °C in a CO₂ incubator for 24 h, with a cell suspension density of approximately 2×10^5 cells mL⁻¹. Neutral red release was evaluated by the addition of an extracting solution, and the absorbance was measured at 540 nm.

Validation of RP-LC method

The method was validated using samples of biopharmaceutical formulations of BTTA with a label claim of 100 IU/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 the guidelines (ICH, 2005; FDA, 2014).

Specificity

The specificity of the method was assessed by subjecting a BS-BTTA solution and a sample of BTTA biopharmaceutical formulations (25 IU mL⁻¹), to oxidative conditions induced by adding

50 μL of 3% hydrogen peroxide for 25 min. Photodegradation was induced by exposing the samples in a photostability chamber to 200 W h m^{-2} of near ultraviolet-light for 4 hours and 30 min. In addition, interference from excipients of the biopharmaceutical formulations was determined by injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of formulation excipients). Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity using PDA detector. Additionally, the BTTA and the degraded samples were subjected to the *in vitro* cytotoxicity test.

Linearity

The linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight concentrations of the BS-BTTA, over the $0.2 - 100 \text{ IU mL}^{-1}$ range. Three replicate $50 \mu\text{L}$ injections of the reference solutions were prepared to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of BS-BTTA 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.

Precision and accuracy

Assay precision was determined by means of repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-days). Repeatability was examined by eight evaluations of sample of BTTA, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by analysis of two samples of the pharmaceutical formulations on three different days (inter-days) and also by submitting the samples to analysis by other analysts in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was assessed applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the biomolecule, to obtain solutions at

concentrations of 20, 25 and 30 IU mL⁻¹, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. Accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation; it was expressed as the percentage relative error (bias%) between the measured mean concentrations and the added concentrations.

Limits of detection and quantitation

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

Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters; it provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same samples (25 IU mL⁻¹) under a variety of conditions of the method parameters, such as: sodium phosphate concentration, percent of acetonitrile, buffer pH in mobile phase, flow rate, temperature and the wavelength. To assess the stability of the BTTA samples, analysis were performed after their storage at 2 – 8 °C for 48 h, and also placed into the auto sampler, at room temperature, for 24 h. To study the stability of these solutions the experiment was run and any changes in the chromatographic pattern as compared with the freshly prepared solutions were noted.

System suitability test

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and repeatability of the RP-LC system. Five replicate injections of a BS-BTTA 25 IU ml⁻¹ were used. The peak area, retention time, theoretical plates, and tailing factor (peak symmetry) were measured using the LC Solution Version 1.22 SP1 software.

Results and discussion

Optimization of chromatographic conditions

Tests on different amounts of 0.05 M sodium phosphate buffer solution, acetonitrile, tetramethylammonium hydroxide buffer, formic acid and TFA-acetonitrile solution mixed with water were carried out to achieve which mobile phase would lead to satisfactory selectivity and sensitivity within a short separation time. Next, evaluation of C₁₈ columns with lengths of 250 and 150 mm and different pore sizes showed that the Zorbax column measuring 250 mm length provide longer retention times. Hence, due to the best chromatographic performance and better resolution, a 150-mm-long Zorbax column was selected. For the selection of the best wavelength detection a PDA detector was used. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of BTTA in biopharmaceutical formulations.

Typical chromatograms obtained by the proposed RP-CL method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak, corresponding to BTTA, with retention time of 11.4 min, are shown in Fig 1(a,b).

Fig. 1

RP-LC Method validation

Specificity of the method for the biological product was evaluated under oxidative conditions, generating additional peaks of related proteins with retention times at 7.27, 8.45 and 10.19 min. Photodegradation resulted in three additional peaks with retention times at 5.66, 6.35 and 7.46 min, respectively, as shown in the typical chromatograms in Fig. 1 (c,d). Moreover, the interference of the

excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of the formulation excipients), giving no additional peak. Then the specificity of the method was established by determining the peak purity in the BS-BTTA and the samples using a PDA detector. It is possible that other physical or chemical factors may affect the stability of the protein and might produce degraded products which are not detected by the RP-LC method.

The analytical curves constructed for BS-BTTA were found to be linear over the range 0.2 - 100 IU mL⁻¹ range. The determination coefficient calculated from $y = (100937 \pm 128.99)x + (17295 \pm 1641.66)$, where, x is concentration and y is the absolute peak area, was $r^2 = 0.9999$, indicated linearity of the analytical curve for the method.

The precision was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) for eight analyses at a concentration of 25 IU mL⁻¹, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD value was 0.09%. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-days), giving RSD values of 0.20% and 0.27%, respectively. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD after analysis of two samples of the same pharmaceutical formulations by two analysts; the mean values were found to be 99.41 and 99.94 and the RSD values found to be 0.25% and 0.54%, respectively, as given in Table 1.

Table 1

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 20, 25 and 30 IU mL⁻¹, respectively. The absolute means obtained with a mean value of 100.31% and a bias lower than 0.80% (Table 2), show that the method is accurate within the desired range.

Table 2

The LOD and LOQ 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 0.04 and 0.16 IU mL⁻¹, respectively.

The robustness of the analytical procedure (DEJAEGHER; KOCEVAR, 2007) was determined by analyzing samples of the BS-BTTA reference solution containing 25 IU mL⁻¹ in triplicate by the one-variable-at-a-time (OVAT) approach. The results and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 3, together with the optimized values. Additionally, the robustness was also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach (INJAC et al., 2008) at three levels (1 unit per parameter up or down around optimized values). This procedure gives results for minimum changing of the maximum number of parameters at a time, and is a very useful, rapid and efficient approach for a robustness determination. The results for the OVAT and MVAT procedures were within the acceptable deviation (RSD < 2 %), and an analysis of the variance showed non-significant differences ($p > 0.05$). The analysis performed with a wider level of variations of the solution pH, acetonitrile percentage and flow rate, showed changes of the retention time related to the optimized conditions. Moreover, the peak symmetry values were also evaluated, showing non-significant differences ($p > 0.05$). The stability of reference and sample solutions was assessed after storage for 48 h at 2-8 °C, and also placed in an auto-sampler for 24 h at

room temperature, showing non-significant changes (< 2%) relative to freshly prepared samples, as suggested (SHABIR, 2003).

Table 3

The system suitability test was performed and RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 0.89, 0.87 and 0.63%, respectively. The number of theoretical plates was about 10,125, with RSD of 0.67%. The experimental results showed that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the system is suitable for the intended analysis.

Method application

The validated RP-LC method was applied for the determination of BTTA in biopharmaceutical formulations, giving content/potencies within 97.45 and 101.72% of the stated potency, with calculated SD 1.65%, as shown in Table 4. The results demonstrated the stability-indicating capability and the application of the method.

Table 4

***In vivo* LD₅₀ mice bioassay**

The biological potency of BTTA was assessed by the *in vivo* LD₅₀ mice bioassay based on the number of deaths dose-dependent in mice during seven days. The statistical analysis of the assay data was performed by a probit method, using CombiStats software- EDQM (Strasbourg, France), which

gave the values shown in Table 4. The correlation between the results of the physico-chemical method and the biological bioassay represent an important advance in the context of the 3Rs, in attempts to develop alternative methods, which could improve the identity, purity and potency/content evaluation of the biologicals.

Identity test

The results observed as survival of the guinea pigs and mice injected with the solution containing the botulinum toxin type A solution and the antitoxin, demonstrated the specific neutralization and constitutes an identity test of the biomolecule.

***In vitro* T47D cell bioassay**

The potency of BTTA was assessed by the T47D cell bioassay based on the dose-dependent cytotoxicity curve of the cells, evaluating the response with MTT. The statistical analysis of the assay was performed by a parallel line method, using CombStats. Biological activity of biopharmaceutical products was assessed by the *in vitro* T47D cell bioassay, which showed mean values 0.24% higher, compared to the *in vivo* LD₅₀ mice bioassay, as shown in Table 4, with non-significant difference, as calculated by the Student's t-test ($p > 0.05$).

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, showing more toxic responses for the CHO-K1 cell line with mean values of IC₅₀=1.22 IU mL⁻¹ and IC₅₀=0.88 IU

mL⁻¹ for BTTA sample and for the photodegraded molecule, respectively, with significant differences ($p < 0.05$). Such evaluations are now necessary, mainly due to the recent concerns related to possible human undesirable effects of the degraded forms (DE GROOT; SCOTT, 2007).

Conclusion

The results of the validation studies show that the RP-LC method is specific, sensitive with a LOQ of 0.16 IU mL^{-1} , accurate and possesses significant linearity and precision characteristics. Separation of BTTA was achieved with a retention time of 11.4 min, and the method was successfully used for the analysis of biological products, showing mean values of the estimated content/potencies 1.16% lower, compared to the *in vivo* LD₅₀ mice bioassay. The proposed method can be applied in combination with the *in vivo* LD₅₀ mice bioassay and the *in vitro* T47D cell culture assay, representing an advance which contributes to improve quality control, to monitor stability and to assure the batch-to-batch consistency of the biological products.

Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Project 306898/2011-0, for financial support.

References

- [1] T. Binz, H. Kurazono, J. Frevert, K. Wernars, H. Niemann, The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9153-9158.
- [2] T.D. Laing, A.J. Marenco, D.M. Moore, G.J. Moore, D.C.W. Mah, W.E. Lee, Capillary electrophoresis laser-induced fluorescence for screening combinatorial peptide libraries in assays of botulinum neurotoxin A, *J. Chromatog. B* 843 (2006) 240-246.
- [3] L.W. Cheng, B. Onisk, E.A. Johnson, J.R. Reader, S.M. Griffey, A.E. Larson, W.H. Tepp, L.H. Stanker, D.L. Brandon, J.M. Carter, Effects of purification on the bioavailability of botulinum neurotoxin type A, *Toxicology* 249 (2008) 123-129.
- [4] M.F. Brin, Botulinum Toxin: Chemistry, Pharmacology, Toxicity, and Immunology, *Muscle Nerve* 20 (1997) 146-168.
- [5] W. Huang, J.A. Foster, A.S. Rogachefsky, Pharmacology of botulinum toxin, *J. Am. Acad. Dermatol.* 43 (2000) 249-259.
- [6] K. Turton, J.A. Chaddock, K.R. Acharya, Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 552-558.
- [7] C. Chapple, A. Patel, Botulinum Toxin - New Mechanisms, New Therapeutic Directions? *Eur. Urol.* 49 (2006) 606-608.
- [8] D.D. Truong, W.H. Jost, Botulinum toxin: Clinical use, *Parkinsonim. Relat. Disord.* 12 (2006) 331-355.
- [9] European Pharmacopoeia, 7th ed., Council of Europe, Strasbourg, France, 2013.
- [10] D. Sesardic, R. Gaines Das, Botulinum toxin: applying the 3Rs to product potency testing, *NC3Rs* (2009) 1-8.

- [11] T.D. Wilder-Kofie, C. Lúquez, M. Adler, J.K. Dykes, J.D. Coleman, S.E. Maslanka, An Alternative In Vivo Method to Refine the Mouse Bioassay for Botulinum Toxin Detection, *Comp. Med.* 61 (2011) 235-242.
- [12] R.E. Gaines Das, A.B. Heath, H. Martin, D. Sesardic, Validation of In Vitro Assays for Botulinum Toxin: A Case Study, *Dev. Biol. Stand.* 101 (1999) 267- 276.
- [13] E. Fernández-Salas, J. Wang, Y. Molina, J.B. Nelson, B.P.S. Jacky, K.R. Aoki, Botulinum Neurotoxin Serotype a Specific Cell-Based Potency Assay to Replace the Mouse Bioassay, *PloS One* 7 (2012) 1-13.
- [14] C. Bandala, J.L.M. Perez-Santos, E. Lara-Padilla, M.G.D. Lopez, M. Anaya- Ruiz, Effect of Botulinum Toxin A on Proliferation and Apoptosis in the T47D Breast Cancer Cell Line, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14 (2013) 891-894.
- [15] M.C. Manning, D.K. Chou, B.M. Murphy, R.W. Payne, D.S. Katayama, Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update, *Pharm. Res.* 4 (2010) 544-575.
- [16] D.P. Leal, R.B. Souto, R. Schutkoski, A.C. Bergamo, S.L. Dalmora, Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: Evaluation of biopharmaceutical formulations by stability-indicating RP-LC method and bioassay, *Biologicals* 39 (2011) 211-216.
- [17] T. Hunt, D. Rupp, G. Shimizu, K. Tam, J. Weidler, J. Xie. Characterization of SNARE Cleavage Products Generated by Formulated Botulinum Neurotoxin Type-A Drug Products, *Toxins* 2 (2010) 2198-2212.
- [18] A.L. Purcell, H.M. Hoard-Fruchey, A capillary electrophoresis method to assay catalytic activity of botulinum neurotoxin serotypes: Implications for substrate specificity, *Anal. Biochem.* 366 (2007) 207-217.
- [19] J.R. Barr, H. Moura, A.E. Boyer, A.R. Woolfitt, S.R. Kalb, A. Pavlopoulos, L.G. McWilliams, J.G. Schmidt, R.A. Martinez, D.L. Ashley, Botulinum Neurotoxin

- Detection and Differentiation by Mass Spectrometry, *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2005) 1578-1583.
- [20] A.E. Boyer, H. Moura, A.R. Woolfitt, S.R. Kalb, L.G. McWilliams, A. Pavlopoulos, J.G. Schmidt, D.L. Ashley, J.R. Barr, From the Mouse to the Mass Spectrometer: Detection and Differentiation of the Endoprotease Activities of Botulinum Neurotoxins A - G by Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3916-3924.
- [21] S.L. Dalmora, F.B. D'Avila, L.M. Silva, A.C. Bergamo, E.S. Zimmermann, Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay, *J. Chromatog. B* 877 (2009) 2471-2476.
- [22] B.E. Almeida, R. Damiani, J.E. Oliveira, S.L. Dalmora, P.A. Torjesen, P. Bartolini, M.T.C.P. Ribela, Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination, *Anal. Methods* 6 (2014) 6688-6694.
- [23] R.B. Souto, F.P. Stamm, J.B. Schumacher, C.D.A. Cardoso, G.W. Freitas, R.F. Perobelli, S.L. Dalmora, Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with reversed-phase liquid chromatography and bioassay, *Talanta* 123 (2014) 179-185.
- [24] F.P. Stamm, G.Z. Calegari, G.W. Freitas, R.B. Souto, L.P. Porto, C.D.A. Cardoso, S.L. Dalmora, Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays, *Analyst* 138 (2013) 1419- 1426.
- [25] ICH – Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology, ICH Steering Committee, 2005, pp. 1–13.

- [26] FDA Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drug and Biologics, Food and Drug Administration (2014) 1-14.
- [27] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, Ruggedness and robustness testing, *J. Chromatog. A* 1158 (2007) 138–157.
- [28] R. Injac, M. Boskovic, N. Kocevar, T. Vovk, 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, *Anal. Chim. Acta*, 620 (2008) 150–161.
- [29] G.A. Shabir, 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, *J. Chromatog. A* 987 (2003) 57–66.
- [30] A.S. De Groot, D.W. Scott, Immunogenicity of protein therapeutics, *Trends Immunol.* 28 (2007) 482-490.

Table 1. Inter-days and between-analysts precision data of RP-LC for botulinum toxin type A in biopharmaceutical formulations

Sample	Inter-days			Between-analysts		
	Day	Recovery ^a , %	RSD ^b , %	Analysts	Recovery ^a , %	RSD ^b , %
1	1	99.56	0.20	A	99.23	0.25
	2	99.27		B	99.58	
	3	99.66				
2	1	100.27	0.27	A	99.55	0.54
	2	99.85		B	100.32	
	3	99.64				

a. Mean of three replicates.

b. RSD, relative standard deviation.

Table 2. Accuracy of RP-LC for botulinum toxin type A in the formulations

Nominal concentration/ IU mL ⁻¹	Mean concentration measured ^a / IU mL ⁻¹	RSD ^b , %	Accuracy, %	Bias ^c , %
20	20.16	0.23	100.80	0.80
25	25.02	0.23	100.09	0.08
30	30.01	0.05	100.03	0.03

a. Mean of three replicates.

b. RSD, relative standard deviation.

c. Bias, [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

Table 3. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure

Variable	Range investigated	Botulinum Toxin Type A ^a , (%)	RSD ^b , (%)	Optimized value
Sodium phosphate concentration (M)	0.02	95.57	0.05	0.05
	0.05	97.47	0.04	
	0.08	94.35	0.10	
Acetonitrile (%)	10	96.92	0.24	20
	20	98.33	0.04	
	30	96.62	0.10	
Buffer pH in mobile phase	3.0	97.38	0.73	2.8
	2.8	98.07	0.00	
	2.6	98.05	0.07	
Flow rate (mL/min)	0.1	93.90	0.04	0.3
	0.3	99.11	0.02	
	0.5	97.73	0.07	
Temperature (°C)	40	94.52	0.10	45
	45	98.11	0.02	
	50	94.71	0.70	
Solution stability	Autosampler 6h	96.12	0.05	-
	Autosampler 24h	96.20	0.63	-
	2 – 8 °C, 24 h	98.16	0.03	-
	2 – 8 °C, 48 h	98.48	0.08	-
Wavelength (nm)	210 - 320	-	-	214

a. Mean of three replicates.

b. RSD, relative standard deviation.

Table 4. Comparative content/potencies evaluation of botulinum toxin type A in biopharmaceutical formulations, by *in vivo* DL₅₀ mice bioassay, RP-LC method and *in vitro* T47D cell bioassay

Sample	LD ₅₀ bioassay		RP-LC ^a		T47D bioassay ^a	
	Potency, %	Confidence intervals (P=0.95)	Main peak, %	Deamidated/sulphoxides, %	Potency, %	Confidence intervals (P=0.95)
1	100.04	88.10 – 112.10	99.19	0.76	99.24	91.40 – 108.20
2	103.89	89.20 – 114.70	101.43	0.66	101.37	93.70 – 110.50
3	98.14	86.30 – 109.30	98.18	1.18	100.06	89.90 – 108.60
4	99.23	85.70 – 110.20	97.64	1.16	101.18	93.50 – 109.70
5	103.30	91.50 – 115.90	101.72	0.83	104.13	94.20 – 112.40
6	101.45	92.10 – 111.90	100.36	0.99	99.17	92.40 – 107.30
7	98.26	87.10 – 113.10	99.95	0.79	100.16	93.20 – 108.50
8	100.92	90.60 – 113.40	97.45	1.34	101.81	92.60 – 109.40
Mean	100.65	-	99.49	0.96	100.89	-
SD ^b	2.16	-	1.65	0.24	1.63	-

a. Mean of three replicates.

b. SD, standard deviation.

Fig. 1

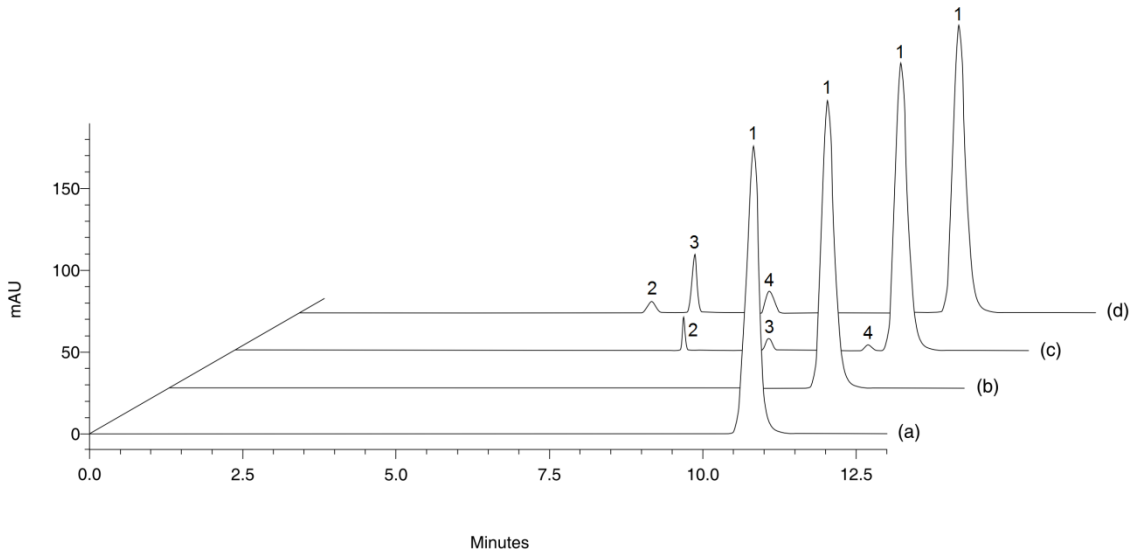


Figure Captions:

Fig. 1. Representative chromatograms showing peak 1=Botulinum toxin type A; peak 2=deamidated; peaks 3-4=sulphoxides. (a) Biological Reference Substance of botulinum toxin type A; (b) Sample of biopharmaceutical formulation, and (c) after degradation by hydrogen peroxide; (d) after photodegradation.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os processos tecnológicos de fermentação bacteriana viabilizaram a produção de proteínas de interesse terapêutico e cosmético. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos, e sua combinação é importante, pois são necessários para a avaliação da identidade, pureza, potência e estabilidade, e completa caracterização do produto biotecnológico.

Os ensaios biológicos expressam a atividade biológica e sua realização é essencial para a avaliação da potência de toxina botulínica, para a qual não se dispõem de metodologias analíticas físico-químicas, para o controle de qualidade. Deste modo, a potência biológica tem sido determinada através de bioensaio *in vivo*, baseado na determinação da dose letal 50 (DL₅₀) em camundongos, que foi adotado no presente trabalho (EP, 2013). Paralelamente, avançou-se para a pesquisa do bioensaio por cultura de células T47D *in vitro*, visando o desenvolvimento de alternativa no contexto dos 3Rs. Os resultados dos bioensaios foram usados para estudos de correlação com o método físico-químico.

Os métodos cromatográficos têm sido usados para diferentes produtos biológicos nas etapas de produção, purificação e análise qualitativa e quantitativa, e para estudos de correlação com os bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Neste contexto, optou-se inicialmente, por pesquisar e validar procedimento por cromatografia líquida em fase reversa para a determinação de toxina botulínica tipo A e suas proteínas relacionadas nos produtos biofarmacêuticos.

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

A atividade biológica/potência da toxina botulínica tipo A foi avaliada através do bioensaio *in vivo* baseado na observação da mortalidade de camundongos, induzida pela injeção de formulações biofarmacêuticas, e determinação estatística da DL₅₀. As potências obtidas variaram entre 98,14% e 103,89%, com os respectivos intervalos de confiança (P=0,05) correspondendo a 98,14 UI e 103,89 UI de toxina/frasco, em relação ao valor declarado, conforme demonstra a tabela 4.

Paralelamente, executou-se o bioensaio *in vitro* baseado na apoptose celular, e observação da citotoxicidade. Selecionou-se a linhagem de células T47D (ATCC HTB-133) com base na literatura (BANDALA et al., 2013) e otimizou-se o ensaio de acordo com a curva dose-resposta. Avaliou-se a potência de produtos biotecnológicos obtendo resultados entre 99,17 % e 104,13%, com os respectivos intervalos de confiança (P=0,05). Os dados

foram comparados com os fornecidos pelo ensaio da DL_{50} em camundongos, observando-se que foram em média 0,24% superior em relação ao bioensaio *in vivo* com diferença não significativa, conforme calculado pelo teste t de Student ($p > 0,05$), de acordo com a tabela 4.

Executou-se a análise pelo método validado por CL-FR alcançando a separação do pico correspondente à toxina botulínica tipo com 14,4 min, e tempo de corrida de 12,5 min (figura 1). Paralelamente, realizou-se degradação de produto sob condições oxidativas, obtendo-se picos adicionais, relativos aos sulfóxidos e desamidados de toxina botulínica tipo A, demonstrando a especificidade do método. A pureza do pico da toxina botulínica tipo A foi analisada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método por CL-FR apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 0,2 a 100 UI/mL ($r^2 = 0,9999$). Os dados obtidos para precisão intermediária forneceram CV inferiores a 0,54%, que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza $CV \leq 2\%$ (SHABIR, 2003). Na tabela 2 podem ser observados os valores experimentais obtidos, com média de 100,31%, 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. Determinaram-se também, nas amostras, o teor de sulfóxidos e desamidados, através da soma das áreas dos picos com tempo de retenção menor que o principal, em relação à área total. Os resultados foram expressos em percentagem, obtendo-se valor máximo de 3,97%. Não há especificações farmacopéicas específicas para toxina botulínica tipo A, mas observando produtos que tem monografias e para as quais há limite preconizado de 6%, pode-se concluir que os resultados encontrados são aceitáveis (BP, 2013). O método por CL-FR tem inconvenientes entre os quais, destaca-se 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 (DALMORA et al., 1997). Porém viabiliza a determinação de sulfóxidos e desamidados que é necessária devido às possíveis respostas imunogênicas que podem causar no organismo humano (EMA, 2014).

Demonstrou-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados para validação de métodos analíticos. Estudou-se então, a correlação entre os resultados fornecidos pelo método cromatográfico e o bioensaio *in vivo* para as amostras selecionadas, conforme demonstra a tabela 4. Observou-se que o teor/potência por CL-FR foi em média 1,16% inferior em relação ao bioensaio *in vivo*, com diferença não significativa, conforme calculado pelo teste t de Student ($p > 0,05$), podendo inicialmente ser empregado para análise

de toxina botulínica tipo A em combinação com o bioensaio *in vivo*, fundamentando avanços na caracterização e qualidade desse produto biofarmacêutico.

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, estabelecendo-se o teor de degradação de cada forma. As amostras foram então preparadas nesta condição e o ensaio realizado comparativamente à molécula íntegra da toxina botulínica tipo A. Os resultados obtidos apresentaram média (n=3) de $CI_{50} = 0,88 \pm 0,04$ UI/mL para sulfóxidos e desamidados, com diferenças significativas comparadas à forma íntacta da toxina botulínica tipo A que apresentou $CI_{50} = 1,22 \pm 0,07$ UI/ mL, conforme calculado pelo teste t de Student ($p < 0.05$).

Até o presente momento, não se encontram na literatura publicações de método cromatográfico validado para avaliação da toxina botulínica tipo A, o que é preconizado no contexto da produção e caracterização de produtos biológicos. Em conformidade com as recomendações atuais de aprimoramento, redução e substituição do uso de animais, sugere-se que o método por CL-FR seja adotado em combinação com os bioensaios *in vivo e in vitro*, para a avaliação de potência e pureza da toxina botulínica tipo A durante as etapas do processo de produção e purificação. Deste modo contribui-se para monitorar variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica e para aprimorar o controle da qualidade dos produtos biofarmacêuticos acabados.

Neste contexto, os resultados alcançados contribuem para aprimorar o controle da qualidade através da melhor caracterização da biomolécula, que garantem a eficácia e segurança. Do mesmo modo, estabelecem-se bases com novos procedimentos aplicáveis para os estudos de comparabilidade, viabilizando avanços no estudo do produto biológico no País.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Realizou-se a avaliação de potência de toxina botulínica tipo A pelo bioensaio otimizado, baseado na determinação da DL_{50} em camundongos, e análise estatística dos resultados que apresentaram valores entre 98,14% e 103,89%.
- ✓ Desenvolveu-se método por cultura da linhagem de células T47D (ATCC HTB-133), que forneceu resultados entre 99,17% e 104,13%, que foram em média 0,24% superiores, na comparação com os obtidos pelo bioensaio da DL_{50} *in vivo*.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa que se mostrou específico, preciso, exato e robusto para avaliação da toxina botulínica tipo A, e viabilizou identificação, avaliação de sulfóxidos e desamidados e a forma não-alterada da biomolécula.
- ✓ Estudou-se correlação entre os resultados fornecidos pelo método cromatográfico e o bioensaio da determinação da DL_{50} em camundongos para as amostras selecionadas, observando-se teores/potências em média 1,16% inferiores, em relação ao bioensaio *in vivo*, respectivamente.
- ✓ Realizou-se o teste de citotoxicidade das amostras fotodegradadas observando-se aumento do efeito citotóxico.
- ✓ Os bioensaios estudados e o método validado 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 para uso ou em pesquisa no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, B. E.; DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J. E.; DALMORA, S. L.; TORJESEN, P. A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. **Analytical Methods**, v. 6, p. 6688-6694, 2014.

ALSTYNE, D. V.; GERWING, J.; TREMAINE, J. H. Amino Acid Composition of Clostridium botulinum Type A toxin. **Journal of Bacteriology**, v. 92, p. 796-797, 1966.

ANDERSON, E. R. JR. Proper dose, preparation, and storage of botulinum neurotoxin serotype A. **American Journal Health System Pharmacy**, v. 61, p. 24-26, 2004.

AOKI, K. R.; GUYER, B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. **European Journal of Neurology**, v. 8, p. 21-29, 2001.

BANDALA, C.; PEREZ-SANTOS, J. L. M.; LARA-PADILLA, E.; LOPEZ, M. G. D.; ANAYA-RUIZ, M. Effect of Botulinum Toxin A on Proliferation and Apoptosis in the T47D Breast Cancer Cell Line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 891-894, 2013.

BHIDAYASIRI, R.; TRUONG, D. D. Expanding use of botulinum toxin. **Journal of Neurological Sciences**, v. 235, p. 1-9, 2005.

BINZ, T.; KURAZONO, H.; WILLE, M.; FREVERT, J.; WERNARS, K.; NIEMANN, H. The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 9153-9158, 1990.

BOYER, A.; MOURA, H.; WOOLFITT, A. R.; KALB, S. R.; MCWILLIAMS, L. G.; PAVLOPOULOS, A.; SCHMIDT, J. G.; ASHLEY, D. L.; BARR, J. R. From the Mouse to the Mass Spectrometer: Detection and Differentiation of the Endoproteinase Activities of Botulinum Neurotoxins A – G by Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 77 p. 3916-3924, 2005.

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 Pharmacopeia, London: **The Stationary Office**, 2013.

CHENG, L. W.; ONISK, B.; JOHNSON, E. A.; READER, J. R.; GRIFFEY, S. M.; LARSON, A. E.; TEPP, W. H.; STANKER, L. H.; BRANDON, D. L.; CARTER, J. M. Effects of purification on the bioavailability of botulinum neurotoxin type A. **Toxicology**, v. 249, p. 123-129, 2008.

COLLINS C. H.; BRAGA G. L.; BONATO P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 7^a ed. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 1997.

COTÉ, T. R.; MOHAN, A. K.; POLDER, J. A.; WALTON, M. K.; BRAUN, M. M. Botulinum toxin type A injections: Adverse events reported to the US Food and Drug Administration in therapeutic and cosmetic cases. **American Academy of Dermatology**, v. 53, p. 407-415, 2005.

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.

DASGUPTA, B. R.; SUGIYAMA, H. Role of a Protease in Natural Activation of Clostridium botulinum Neurotoxin. **Infection and Immunity**, v. 6, p. 587-590, 1972.

DASGUPTA, B. R.; SATHYAMOORTHY, V. Purification and amino acid composition of type A botulinum neurotoxin. **Toxicon**, v. 22, p. 415-424, 1984.

DRESSLER, D.; SABERI, F. A. Botulinum Toxin: Mechanisms of Action. **European Neurology**, v. 53, p. 3-9, 2005.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guidance on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1)**”. London, 2014.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 7th ed., Strasbourg: **Council of Europe**, 2013

FERNÁNDEZ-SALAS, E.; WANG, J.; MOLINA, Y.; NELSON, J. B.; JACKY, B. P. S.; AOKI, K. R.; Botulinum Neurotoxin Serotype a Specific Cell-Based Potency Assay to Replace the Mouse Bioassay. **Plos One**, v. 7, 2012.

FREVERT, J.; DRESSLER, D. Complexing proteins in botulinum toxin type A drugs: a help or a hindrance? **Biologics: Target & Therapy**, v. 4, p. 325-332, 2010.

GAINES DAS, R. E.; HEATH, A. B.; MARTIN, H. SESARDIC, D. Validation of in vitro assays for Botulinum Toxin: A case study. **Development of Specifications for Biotechnology Pharmaceutical Products**, v. 101, p. 267-276, 1999.

HUNT, T.; RUPP, D.; SHIMIZU, G.; TAM, K.; WEIDLER, J.; XIE, J. Characterization of SNARE Cleavage Products Generated by Formulated Botulinum Neurotoxin Type-A Drug Products. **Toxins**, v.2, p. 2198-2212, 2010.

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.

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

KRIEGLSTEIN, K. G.; DASGUPTA, B. R.; HENSCHEN, A. H. Covalent Structure of Botulinum Neurotoxin Type A: Location of Sulfhydryl Groups, and Disulfide Bridges and Identification of C-Termini of Light and Heavy Chains. **Journal of Protein Chemistry**, v. 13, p. 49-57, 1994.

LAINING, T. D.; MARENCO, A. J.; MOORE, D. M.; MOORE, G. J.; MAH, D. C. W.; LEE, W. E. Capillary electrophoresis laser-induced fluorescence for screening combinatorial peptide libraries in assays of botulinum neurotoxin A. **Journal of Chromatography B**, v. 843, p. 240-246, 2006.

LEAL, D. P.; SOUTO, R. B.; SCHUTKOSKI, R.; BERGAMO, A. C.; DALMORA, S. L. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: Evaluation of biopharmaceutical formulations by stability-indicating RP-LC method and bioassay. **Biologicals**, v. 39, p. 211-216, 2011.

LOWE, N. J.; YAMAUCHI, P. Cosmetic Uses of Botulinum Toxins for Lower Aspects of the Face and Neck. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 18-22, 2004.

MALIZIO C. J.; GOODNOUGH, C.; JOHNSON, A. Purification of Clostridium Botulinum Type A Neurotoxin. **Methods in Molecular Biology**, v. 145, p. 27-39, 2000.

MANNING, M. C.; CHOU, D. K.; MURPHY, B. M.; PAYNE, R. W.; KATAYAMA, D. S. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 544-575, 2010.

MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 1-8, 1994.

PURCELL, A. L.; HOARD-FRUCHEY, H. M. A capillary electrophoresis method to assay catalytic activity of botulinum neurotoxin serotypes: Implications for substrate specificity. **Analytical Biochemistry**, v. 366, p. 207-217, 2007.

ROSALES, R. L.; BIGALKE, H.; DRESSLER, D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. **European Journal of Neurology**, v. 13, p. 2-10, 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.

SESARDIC, D.; GAINES DAS, R. Botulinum toxin: Applying the 3Rs to product potency testing. **National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research**, 2009.

SETO, Y.; KANAMORI-KATAOKA, M. Mass Spectrometric Strategy for the Determination of Natural and Synthetic Organic Toxins. **Journal of Health Science**, v. 51, p. 519-525, 2005.

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.

SOUTO, R. B.; STAMM, F. P.; RIBELA, M. T. C. P.; BARTOLINI, P.; CALEGARI, G. Z.; DALMORA, S. L. Validation of a Stability-indicating RP-LC Method for the Assessment of Recombinant Human Interleukin-11 and Its Correlation with Bioassay. **Analytical Sciences**, v. 29, p. 215-220, 2012.

STAMM, F. P.; CALEGARI, G. Z.; FREITAS, G. W.; SOUTO, R. B.; PORTO, L. P.; CARDOSO, C. D. A.; DALMORA, S. L. Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays. **Analyst**, v. 138, p. 1419-1426, 2013a.

STAMM, F. P. **Estudo de Metodologias para Avaliação do Hormônio da Paratireóide Humano Recombinante**. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013b.

THE UNITED States Pharmacopeia. 37. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2014.

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

WILDNER-KOFIE, T.; LÚQUEZ, C.; ADLER, M.; DYKES, J. K.; COLEMAN, J. D.; MASLANKA, S. E. An Alternative In Vivo Method to Refine the Mouse Bioassay for Botulinum Toxin Detection. **Comparative Medicine**, v. 61, p. 235-242, 2011.

WOHLFARTH, K.; KAMPE, K.; BIGALKE, H. Pharmacokinetic Properties of Different Formulations of Botulinum Neurotoxin Type A. **Movement Disorders**, v. 19, p.65-67, 2004.

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