

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Nathália Ferreira Vinagre

**PROPOSTAS DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS *IN VITRO* PARA  
ENSAIO DE POTÊNCIA DO MEDICAMENTO CONTENDO  
FILGRASTIM**

Rio de Janeiro

2017

Nathália Ferreira Vinagre

**PROPOSTAS DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS *IN VITRO* PARA  
ENSAIO DE POTÊNCIA DO MEDICAMENTO CONTENDO  
FILGRASTIM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira e Dr. Fausto Klabund Ferraris

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Vinagre, Nathália Ferreira

Propostas de metodologia alternativa in vitro para ensaio de potência do medicamento contendo Filgrastim/ Nathália Ferreira Vinagre. Rio de Janeiro: INCQS /FIOCRUZ, 2017.

125 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Orientadores: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira, Fausto Klabund Ferraris

1. Ensaio de potencia. 2. Filgrastim. 3. Biofarmacêutica. 4. Controle de Qualidade.  
I. Título.

Proposals for alternative methodology in vitro for potency testing of Filgrastim

Nathália Ferreira Vinagre

**PROPOSTAS DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS *IN VITRO* PARA  
ENSAIO DE POTÊNCIA DO MEDICAMENTO CONTENDO  
FILGRASTIM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (FIOCRUZ)

---

Paulo Emílio Corrêa Leite (Doutor)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

---

Jaline Coutinho Silvério (Doutor)  
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (FIOCRUZ)

---

Fábio Coelho Amendoeira (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (FIOCRUZ)

---

Cíntia Ferreira Marinho (Doutor)  
Hospital da Força Aérea do Galeão (HFAG)

---

Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (Doutor) - Orientador  
Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

---

Fausto Klabund Ferraris (Doutor) - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (FIOCRUZ)

Dedico este trabalho as pessoas que  
mais amo, são minha força e razão de  
viver, Débora Vinagre e Márcio Cipitelli

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado forças para persistir e alcançar os meus objetivos;

À minha irmã e melhor amiga, Débora, pela inspiração, força e ajuda que ela nem imagina que me dá, compreensão e todo amor durante toda minha vida;

Ao meu namorado e amigo, Márcio Cipitelli por toda paciência e amor durante os períodos mais difíceis;

Aos meus pais, pelos exemplos que me fizeram ter vontade de conquistar cada vez mais; E familiares: Luís Cláudio, Alesandra, Luís Gustavo e Renan pelo apoio e incentivo;

Aos meus orientadores Fausto e Tininha, pela paciência, dedicação, puxões de orelha, empenho e confiança durante meu projeto de dissertação;

A Dra Vera Sovieiro, Gabriela Americano e Raquel Carvalho, pelo grande apoio e por possibilitar a conclusão deste trabalho;

Aos meus colegas de laboratório por todo apoio: Amanda, Thaís, Esdras, Letícia, Isabela, Nathália Rocha, Periela e Carlos;

Aos meus amigos do mundo acadêmico para a vida: Letícia, Flávia, Glauciene, Alessandra, Dina, Mayra, Daniele Sophia, Fábio, Jaline, Sara e Gabriel pelo constante incentivo no desenvolvimento da minha formação;

Aos meus amigos que conquistei durante a graduação e são minha força: Jônatas, Paula, Thaísa, Jéssica, Mariana, Lauane, Thamires, Aline, Angélica, Breno, Maria Olívia, Carolina, Tatiana que contribuíram diretamente ou indiretamente com apoio e amizade;

Aos chefes de laboratório Dr Fábio e Dra Rosa pelo suporte financeiro e incentivo;

A coordenação da Pós-graduação, em especial a Dra Kátia Leandro, por todo o carinho com os alunos, pelo apoio e incentivo;

A pesquisadora Dra. Raquel Maia e a Aline Rangel pelo apoio e fornecimento inicial da linhagem Kasumi-1 que possibilitou este estudo;

Ao Dr. Wlamir Moura, por toda a ajuda e empenho nas análises estatísticas dos ensaios realizados nesta dissertação;

Aos laboratórios: Farmacologia Aplicada (ITF), Pesquisas sobre o Timo (IOC), Irritação, Pirogênio e LAL (INCQS), Toxicologia (INCQS), Banco de células (INCQS), por todo suporte fornecido durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Fábio Amendoeira pela dedicação e ajuda na revisão desta dissertação;

Aos membros da banca por terem aceitado participar desta avaliação e pelas contribuições que serão enriquecedoras;

Muito obrigada!!!!

A ciência é uma disposição de aceitar os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos.

Burrhus Frederic Skinner



## RESUMO

O Filgrastim é um biofármaco que compõe um biomedicamento constante na lista de excepcionais adquiridos pelo SUS e está entre os imunobiológicos importados de alto custo. Este biofármaco é uma proteína recombinante humana altamente purificada, baseada no fator estimulador de colônias de granulócitos humano (G-CSF), que tem como ação principal estimular a proliferação e ativação de granulócitos, através de um receptor específico, conhecido como G-CSFR (receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos). Atualmente, este biomedicamento não possui monografia na Farmacopéia Brasileira e não é realizado o controle de qualidade biológico deste bioproduto no Brasil. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram estabelecer o método para controle de qualidade biológico do Filgrastim preconizado pela Farmacopeia Europeia (FE) no INCQS, desenvolver métodos alternativos ao descrito nesta farmacopéia através da utilização de citometria de fluxo por ensaios de proliferação, ciclo celular e marcação intracelular e testar uma linhagem humana (Kasumi-1) como alternativa a linhagem murina (M-NFS-60) sugerida pela FE. Os resultados dos ensaios de MTT com ambas as linhagens satisfizeram os critérios de regressão como linearidade e coeficientes de determinação ( $R^2$ ). Quando comparados entre os ensaios através da inclinação da reta, ambas as linhagens se encontram dentro dos limites, mostrando que para ambas as linhagens os ensaios com MTT apresentaram precisão intra e inter ensaio, sendo assim possível o seu estabelecimento no INCQS. Quando realizados ensaios de proliferação e ciclo celular com CFSE e com iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo, não foram observadas diferenças significativas de proliferação entre as células sem estímulo e tratadas com Filgrastim para a linhagem M-NFS-60, demonstrando que talvez estes ensaios não sejam adequados para ensaios de potência com esta linhagem. Já a linhagem Kasumi-1 no tempo de 48h de estímulo apresentou diferença entre as diferentes concentrações de Filgrastim, apresentando uma regressão significativa e determinação de 0,9 no ensaio de CFSE e apenas uma tendência no ensaio com PI. Para ambas as linhagens nos ensaios de ativação dos fatores de transcrição do G-CSFR a quantificação de STAT3 e STAT5 com diferentes concentrações de Filgrastim apresentou uma boa correlação ( $R^2 > 0,7$ ) e com uma relação concentração-resposta visível. Por fim, os ensaios de proliferação por CFSE e ciclo celular por PI foram padronizados, porém os mesmos não foram capazes de apresentar uma dose-resposta em relação a proliferação das células, sendo considerados não adequados para ensaio de potência do biofármaco Filgrastim. Os ensaios de ativação dos fatores de transcrição apresentaram tendências promissoras a uma concentração-resposta, confirmando a hipótese de que o ensaio de MTT visualiza para este biofármaco, mais a ativação celular do que a proliferação. Por fim, foi possível atingir todos os objetivos deste trabalho, como desenvolvimento, estabelecimento e padronização dos ensaios, ficando em pendência a validação destes ensaios com o padrão de referência. Os ensaios por citometria de fluxo com a marcação dos fatores de sinalização STAT3 e STAT5 se mostraram promissores para verificação de potência do biofármaco Filgrastim, assim como a linhagem Kasumi-1.

Palavras-chaves: Ensaio de potência. Controle de Qualidade. Filgrastim. MTT. Citometria de fluxo.

## ABSTRACT

Filgrastim is a biopharmaceutical which takes part in the list of special medications acquired by SUS and is among the imported immunobiological lowest cost. This biopharmaceutical is formed by a recombinant human protein highly purified, based on the granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), which has the main function of stimulate the granulocyte proliferation and activation, through a specific receptor, known as G-CSFR (granulocyte-colony stimulating factor receptor). Currently, this biopharmaceutical doesn't have a monograph in the Brazilian Pharmacopoeia and the biological quality control is not realized in Brazil. The goals of this work were: to establish the method to biological quality control of Filgrastim from European Pharmacopoeia at INCQS; to develop alternative methods from the described in this Pharmacopoeia through the usage of flow cytometry by proliferation assays, cell cycle and intracellular staining and to test a human lineage (Kasumi-1) as an alternative to the murine lineage (M-NFS-60) suggested by European Pharmacopoeia (FE). The results of MTT assays with both the lineages presented good linearity e coefficients of correlation. When compared among the assays through slope of the line, both lineages were between the limits, showing that for both cells lines the MTT assay presented intra and inter-assay precision, thus being possible to establish it in the INCQS. When proliferation and cell cycle assays were performed with CFSE and propidium iodide (PI) by flow cytometry, no significant differences in proliferation were observed between cells without stimulation and Filgrastim treated for the M-NFS-60 lineage, demonstrating that maybe these assays not be the most suitable for potency assays with the cell line suggested by FE. However, the lineage Kasumi-1, at the 48h time of stimulus, presented difference between the different concentrations, presenting a significant regression and correlation of 0,9 in the CFSE assay and only a tendency in the PI assay. For both lineages, in the assays of activation of the transcription factors from G-CSFR the quantification of STAT3 and STAT5 with different doses of Filgrastim presented a good correlation ( $R^2 > 0,7$ ) and with a visible relation concentration-answer. Finally, the assays of proliferation by CFSE and cell cycle by PI were standardized, but the same were not able of presenting a concentration-answer in relation to the cells' proliferation, being considered not suitable for potency testing of the Filgrastim. The activation assays of factors of transcription has shown themselves with strong tendencies to a concentration-answer, confirming the hypothesis that the MTT assay sees for this biopharmaceutical, more the cell activation than the proliferation. Lastly, was possible achieve all the goals of this work, such as development, establishment and standardization of assays, remaining only the validation of these assays with the reference pattern. The assays by flow cytometry with the staining of signaling factors STAT3 and STAT5 have shown themselves promising to the potency verification of the biopharmaceutical Filgrastim, just as the lineage Kasumi-1.

Keywords: Potency assay. Quality control. Filgrastim. MTT. Flow cytometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pág.
<b>Quadro 1</b>	Os principais efeitos da adição de glicocomponente nos biofármacos.	25
<b>Figura 1</b>	Esquema de produção de proteínas recombinantes.	27
<b>Figura 2</b>	Representação estrutural da citocina G-CSF.	30
<b>Figura 3</b>	Principais ações endógenas da citocina G-CSF em diferentes células do organismo.	31
<b>Figura 4</b>	Demonstração integrada da ativação da granulopoiese através de um estímulo microbiano com o aumento da produção de G-CSF	33
<b>Quadro 2</b>	Os receptores presentes nos neutrófilos de maior importância.	34
<b>Figura 5</b>	Representação da granulopoiese “estável” e da granulopoiese de emergência com sinalização diferencial dependendo da quantidade de G-CSF em que o receptor é exposto.	35
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática do receptor de G-CSF: Domínios importantes e vias de ativação do receptor.	37
<b>Figura 7</b>	Representação do complexo de ligação do receptor com a citocina G-CSF na proporção 2:2. Cada molécula de G-CSF (verde) está envolvida na interação com o receptor através do módulo CRH (azul) e Ig (laranja).	38
<b>Figura 8</b>	Estrutura do sal MTT na sua forma íntegra.	43
<b>Figura 9</b>	Representação da reação do MTT em cultura celular, transformação do sal amarelo em cristal roxo, denominado formazan.	44
<b>Figura 10</b>	Representação da reação da luciferase para quantificação de ATP através da formação de luz.	46
<b>Figura 11</b>	Representação de curvas paralelas e curvas não-paralelas.	46
<b>Quadro 3</b>	Tipos de equações e suas transformações em regressão.	47
<b>Figura 12</b>	Ensaio utilizado para quantificação de células viáveis.	48

<b>Figura 13</b>	Representação do funcionamento da técnica de diluição de corantes, na figura representado pelo CFSE.	49
<b>Figura 14</b>	Representação da marcação do iodeto de propídio e a visualização do ciclo celular.	51
<b>Figura 15</b>	Representação da marcação com anticorpos específicos para STATs e a visualização da marcação por citometria de fluxo pela sua intensidade de fluorescência	52
<b>Figura 16</b>	Representação esquemática da avaliação da influência da citocina M-CSF no ensaio de MTT.	60
<b>Equação 1</b>	Equação da taxa de multiplicação celular ( $r$ ).	65
<b>Equação 2</b>	Equação do tempo de dobramento (PDT).	65
<b>Equação 3</b>	Equações de razão.	65
<b>Equação 4</b>	Equações de razão de D.O.	67
<b>Equação 5</b>	Equações de limites superiores e inferiores para o gráfico de controle	67
<b>Equação 6</b>	Equação da razão entre as médias geométricas de fluorescência	68
<b>Figura 17</b>	Curva de crescimento da linhagem M-NFS-60 cultivada com 60 ng/mL de M-CSF, 12 ng/mL e sem citocina M-CSF.	70
<b>Figura 18</b>	Curva de crescimento da Kasumi-1 cultivada com 20% SFB, 10% SFB, 5% SFB e sem soro.	74
<b>Figura 19</b>	Metabolização de MTT na linhagem M-NFS-60 cultivada com 60ng/mL para visualização da influência da citocina M-CSF.	77
<b>Figura 20</b>	Ensaio de MTT com a linhagem M-NFS-60 cultivada em 60ng/mL de citocina	79
<b>Figura 21</b>	Gráfico de controle de ensaio: Inclinações das curvas dos 5 experimentos de MTT com a linhagem M-NFS-60 cultivada em 60ng/mL de citocina	80
<b>Figura 22</b>	Ensaio de MTT com a linhagem M-NFS-60 cultivada em 12ng/mL de citocina contra a linhagem M-NFS-60 cultivada em 60ng/mL.	81
<b>Figura 23</b>	Gráfico de controle de ensaio: Inclinações das curvas dos 6	

	experimentos de MTT com a linhagem M-NFS-60 cultivada em 60ng/mL de citocina e comparados com a linhagem cultivada com 12ng/mL.	82
<b>Figura 24</b>	Ensaio de MTT com a linhagem Kasumi-1 em diferentes concentrações celulares.	83
<b>Figura 25</b>	Ensaio de MTT com a linhagem Kasumi-1 cultivada com 20%SFB.	85
<b>Figura 26</b>	Gráfico de controle de ensaio: Inclinações das curvas dos 4 experimentos de MTT com a linhagem Kasumi-1 cultivada com 20%SFB	86
<b>Figura 27</b>	Histogramas do ensaio de CFSE da linhagem M-NFS-60 em contato 24h e 48h com o Filgrastim.	88
<b>Figura 28</b>	Razão das médias geométricas das células em proliferação no ensaio de CFSE com a linhagem M-NFS-60 em contato 24h e 48h com o Filgrastim.	89
<b>Figura 29</b>	Histogramas do ensaio de CFSE da linhagem Kasumi-1 em contato 24h e 48h com o Filgrastim.	91
<b>Figura 30</b>	Razão das médias geométricas das células em proliferação no ensaio de CFSE com a linhagem Kasumi-1 em contato 24h e 48h com o Filgrastim.	92
<b>Figura 31</b>	Resultado gráfico do ensaio de Iodeto de propídio (PI) da linhagem M-NFS-60 em contato 48h com o Filgrastim.	94
<b>Figura 32</b>	Ensaio de Ciclo celular com a linhagem M-NFS-60 após 48h de contato com o Filgrastim	95
<b>Figura 33</b>	Resultado gráfico do ensaio de Iodeto de propídio (PI) da linhagem Kasumi-1 em contato 48h com o Filgrastim.	96
<b>Figura 34</b>	Ensaio de Ciclo celular com a linhagem Kasumi-1 após 48h de contato com Filgrastim	97
<b>Figura 35</b>	Ensaio de Cinética de ativação do fator de transcrição pSTAT3 e pSTAT5 com a linhagem M-NFS-60	99
<b>Figura 36</b>	Ensaio de cinética de ativação do fator de transcrição pSTAT3 e pSTAT5 com a linhagem Kasumi-1	101
<b>Figura 37</b>	Ensaio de STAT3 e STAT5 em curva com o Filgrastim com	

	a linhagem M-NFS-60.	102
<b>Figura 38</b>	Ensaio de STAT3 e STAT5 em curva com o Filgrastim com a linhagem Kasumi-1.	104
<b>Figura 39</b>	Comparação entre o ensaio de MTT e STATs em forma de curva com Filgrastim para linhagem M-NFS-60.	106
<b>Figura 40</b>	Comparação entre o ensaio de MTT, CFSE 48h e STATs em forma de curva com Filgrastim para linhagem Kasumi-1.	107
<b>Figura 41</b>	Comparação da razão das linhagens no ensaio de MTT.	108
<b>Figura 42</b>	Comparação do percentual de células positivas para cada STATs em cada linhagem	109

## LISTA DE TABELAS

		<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b>	Resultado dos parâmetros avaliados para cada ensaio realizado.	79
<b>Tabela 2</b>	Resultado dos parâmetros avaliados para cada ensaio realizado com 12ng/mL de M-CSF contra ensaios com 60ng/mL de M-CSF.	82
<b>Tabela 3</b>	Curvas de estimação entre experimentos com diferentes concentrações celulares.	84
<b>Tabela 4</b>	Resultado dos parâmetros avaliados para cada ensaio realizado.	85

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	- Microlitro
ALT	- Alanina Aminotransferase
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	- Adenosina 5' trifosfato
BCRJ	- Banco de células do Rio de Janeiro
BPF	- Boas práticas de fabricação
CFSE	- <i>Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester</i>
CHO	- <i>Chinese Hamster Ovary</i>
CHR	- Homólogo ao receptor de citocina
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
CSFs	- <i>Colony Stimulating Factors</i>
D.O.	- Densidade ótica
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
E.coli	- Escherichia coli
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FN	- Fibronectina
g	- gravidade
G-CSF	- Granulocyte- <i>Colony Stimulating Factors</i> ou Fator estimulador de colônia de granulócitos
G-CSFR/ CD114	- <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor</i> ou Receptor do Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	- <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> ou Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
h	- Horas
HCl	- Ácido clorídrico
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
Ig	- Imunoglobulina ou <i>Ig-like</i>
IL	- Interleucina
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Jak/STAT	- <i>Janus kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription</i> ou janus quinase/ Transdutor de sinal e ativador da transcrição
kDa	- Kilo Daltons
LACEN	- Laboratório central
Ln	- Logarítmico natural
Log	- Logarítmico
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógeno
M-CSF	- <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> ou Fator estimulador de colônia de macrófagos
MG	- Média geométrica de fluorescência
min	- Minutos
mL	- Mililitros
mm <sup>3</sup>	- milímetros cúbicos
MTS	- <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
MTT	- Sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
ng	- Nanograma
nm	- Nanometros
OECD	- <i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PAMPS	- Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	- <i>Phosphate-buffered saline</i> / Tampão fosfato salina
PEG	- Polietilenoglicol
pH	- Potencial hidrogeniônico
pI	- Ponto isoelétrico
PI	- <i>propidium iodide</i> ou iodeto de propídio
PI-3K/Akt	- <i>Phosphoinositide 3-kinase - Protein Kinase B</i> ou fosfatidilinositol-3 quinase/AKT
PMN	- Política Nacional de Medicamentos
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RENAME	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RNA	- Ácido Ribonucleico
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>

SOCS	- <i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SUS	- Sistema Único de Saúde
SV 40	- <i>Simian virus 40</i>
TLRs	- Receptores do tipo Toll
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
UI	- Unidades internacionais
WHO	- <i>World Health Organization</i>
WST-8	- <i>Water-soluble Tetrazolium salts</i>

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	20
1.1. PREFÁCIO	20
1.2. VIGILÂNCIA SANITÁRIA E OS MEDICAMENTOS NO BRASIL	20
1.3. BIOFÁRMACOS E SEU CONTROLE DE QUALIDADE	22
1.4. O MEDICAMENTO FILGRASTIM	29
1.4.1. Fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e os neutrófilos	29
1.4.2. O receptor do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSFR) e sua sinalização	36
1.4.3. O Fator estimulador de colônia de granulócitos recombinante, Filgrastim, e seu controle de qualidade	39
1.4.3.1. <i>Ensaio de MTT</i>	43
1.4.3.2. <i>Ensaio da Luciferase/ATP</i>	45
1.4.3.3. <i>Análise estatística realizada em ensaios de potência preconizados nos compêndios internacionais</i>	46
1.4.3.4. <i>Ensaio alternativo para estimativa da potência do Filgrastim</i>	47
1.4.3.5. <i>O uso de linhagens celulares para estimativa da potência</i>	53
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	55
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
<b>3. METODOLOGIA</b>	56
3.1..FILGRASTIM UTILIZADO E MEIOS DE CULTURA	56
3.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES	57
3.2.1. Linhagem M-NFS-60	57
3.2.2. Linhagem Kasumi-1	58
3.3. OTIMIZAÇÃO DA CULTURA CELULAR	58
3.3.1. Linhagem M-NFS-60	58
3.3.2. Linhagem Kasumi-1	58
3.4. ENSAIO DE MTT	59
3.4.1. Condições experimentais com a linhagem M-NFS-60	59
3.4.2. Condições experimentais com a linhagem Kasumi-1	60

3.5. QUANTIFICAÇÃO DA PROFILERAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO COM CFSE	61
3.6. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO COM IODETO DE PROPÍDIO	62
3.7. ENSAIO DE ATIVAÇÃO DO RECEPTOR COM MARCAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO STAT3 E STAT5 FOSFORILADAS	63
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
3.8.1. Padronização e otimização do cultivo das linhagens celulares	64
3.8.2. Ensaio de MTT	66
3.8.2.1. <i>Padronização do ensaio de MTT</i>	66
3.8.2.2. <i>Realização do ensaio de MTT</i>	67
3.8.3. Ensaio de proliferação com CFSE	68
3.8.4. Ensaio de ciclo celular com Iodeto de propídio	69
3.8.5. Ensaio de ativação do receptor com marcação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT5 fosforiladas	69
<b>4. RESULTADOS</b>	70
4.1. PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DAS LINHAGENS	70
4.1.1. Linhagem celular M-NFS-60	70
4.1.2. Linhagem celular Kasumi-1	73
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS DIFERENTES LINHAGENS CELULARES FRENTE AO ESTIMULO DE FILGRASTIM PELO ENSAIO DE MTT	76
4.2.1. Linhagem celular M-NFS-60	76
4.2.1.1. <i>Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: influência da citocina M-CSF no ensaio</i>	76
4.2.1.2. <i>Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: precisão intra e inter ensaios</i>	78
4.2.1.3. <i>Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: teste com diferentes concentrações da citocina M-CSF no cultivo da linhagem</i>	80
4.2.2. Linhagem celular Kasumi-1	83
4.2.2.1. <i>Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: determinação do número de células utilizadas</i>	83
4.2.2.2. <i>Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: precisão intra e</i>	84

*inter ensaios*

4.3. QUANTIFICAÇÃO DA PROFILERAÇÃO CELULAR NAS DIFERENTES LINHAGENS POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO COM CFSE	87
4.3.1. Curva do Filgrastim com a linhagem celular M-NFS-60	87
4.3.2. Curva do Filgrastim com a linhagem celular Kasumi-1	90
4.4. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DAS DIFERENTES LINHAGENS POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO COM IODETO DE PROPÍDIO	93
4.4.1. Ensaio de ciclo celular com a linhagem M-NFS-60	93
4.4.2. Ensaio de ciclo celular com a linhagem Kasumi-1	95
4.5. ENSAIO DE ATIVAÇÃO DO RECEPTOR COM MARCAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO STAT3 E STAT5 FOSFORILADAS	98
4.5.1. Cinética de ativação dos fatores de transcrição	98
4.5.1.1. <i>Linhagem M-NFS-60</i>	98
4.5.1.2. <i>Linhagem Kasumi-1</i>	100
4.5.2. Curva de ativação dos fatores de transcrição com diferentes doses de Filgrastim	102
4.5.2.1. <i>Linhagem M-NFS-60</i>	102
4.5.2.2. <i>Linhagem Kasumi-1</i>	103
4.6. COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS E LINHAGENS	105
4.6.1. Comparação de ensaios com a linhagem M-NFS-60	105
4.6.2. Comparação de ensaios com a linhagem Kasumi-1	106
4.6.3. Comparação entre as linhagens no ensaio de MTT	107
4.6.4. Comparação entre as linhagens no perfil de ativação das pSTAT3 e pSTAT5.	108
<b>5. DISCUSSÃO</b>	110
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	119
<b>7. CONCLUSÃO</b>	120
<b>REFERÊNCIAS</b>	122
<b>ANEXO A – Monografia Filgrastim Farmacopéia Americana</b>	134
<b>ANEXO B – Monografia Filgrastim Farmacopéia Britânica harmonizada com a Farmacopéia Européia</b>	140

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PREFÁCIO

A presente dissertação teve o objetivo de abordar a temática a cerca do controle de qualidade do biofármaco Filgrastim. O medicamento contendo este biofármaco está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil e é considerado de alto custo. Sua utilização é recomendada em casos de neutropenia grave, com o objetivo de reverter esta situação o mais rápido possível sem que haja prejuízo a saúde do paciente. Atualmente, o controle biológico deste medicamento não é realizado no Brasil, visto esta necessidade e também a visualização de limitações nos métodos preconizados internacionalmente. Este trabalho teve como objetivo padronizar o método internacionalmente aceito e desenvolver e padronizar métodos por citometria de fluxo a fim de propor novas metodologias para o ensaio de potência do medicamento contendo Filgrastim. Nos capítulos a seguir da introdução, pretende-se destacar aspectos que irão contribuir para o entendimento do desenvolvimento deste trabalho.

### 1.2. VIGILÂNCIA SANITÁRIA E OS MEDICAMENTOS NO BRASIL

A vigilância sanitária juntamente com a assistência a saúde e a vigilância epidemiológica constituem os pilares da saúde. Enquanto a assistência a saúde e a vigilância epidemiológica se referem ao tratamento e acompanhamento da saúde da população, a vigilância sanitária tem como objetivos principais: normatizar, controlar e fiscalizar os processos, produtos e insumos que potencialmente podem afetar a saúde do ser humano, logo, a importância da vigilância sanitária é justificada por suas ações influenciarem diretamente na prevenção a riscos, na qualidade de vida e nos direitos dos cidadãos em consumirem produtos seguros e eficazes (MELLO et al., 1993; PIOVESAN, 2002).

Com a criação de legislações específicas sanitárias no Brasil em relação a medicamentos, como a Lei 5.991 de 17 de dezembro de 1973, sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos; e a Lei 6.360 de 23 de setembro de 1976, a chamada Lei da Vigilância Sanitária, surgiram conceitos e normas importantes para o país acerca do tema

(BRASIL, 1973, 1976), principalmente visando a qualidade dos produtos para saúde ofertados à população (ROZENFELD, 2000).

Em 1988 com a nova Constituição Federal Brasileira, foi estabelecido que a saúde é um direito social e seu cuidado uma competência comum da União, estados e municípios, além disso, na Constituição foi introduzido o conceito de direito do consumidor, que no ano seguinte foi reforçado por uma legislação específica, a Lei de Defesa do Consumidor Nº 8078/90 (CONNAS, 2007; MELLO et al., 1993), fortalecendo ainda mais a legislação já existente, a Lei 6.360, para proteção à saúde como um direito do cidadão (BRASIL, 1976, 1988, 1990a).

A regulamentação da Constituição Federal específica para a área da saúde foi estabelecida pela Lei orgânica da Saúde, a Lei 8.080 de 1990, que dentre outras observações importantes, descreve a vigilância sanitária como um conjunto de ações voltadas principalmente para redução ou prevenção dos riscos à saúde, capacidade de intervir em problemas sanitários em relação a bens de consumo ou prestação de serviços de saúde (BRASIL, 1990b), sendo um dos principais produtos para saúde os medicamentos.

Juntamente com a definição de vigilância sanitária, esta mesma Lei (8080/90) determinou os campos de atuação do SUS, que no seu 6º artigo determina a formulação da Política Nacional de Medicamentos (PNM) e atribui ao setor da saúde, a responsabilidade pela execução de ações de assistência terapêutica integral, inclusive a assistência farmacêutica (CONNAS, 2007), acordando com as legislações anteriores, onde é formado um forte vínculo entre a vigilância sanitária e o controle de medicamentos.

A PNM só foi instituída no país em 1998, dez anos após a Constituição Federal, por meio da Portaria do Ministério da Saúde Nº 3.916, onde suas principais finalidades são: promoção do uso racional de medicamentos, acesso da população aos medicamentos considerados essenciais por meio da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) e garantir a segurança, eficácia e a qualidade dos medicamentos, sendo uma das suas principais diretrizes a organização das atividades de vigilância sanitária dos medicamentos (BRASIL, 2002; CONNAS, 2007).

Os medicamentos contemplados na PNM são divididos em grupos de acordo com o bloco de financiamento do SUS ao qual fazem parte, esses grupos são: componente básico da assistência farmacêutica, composto pelos medicamentos

destinados a atenção básica; componente estratégico, onde são incluídos medicamentos para doenças infecciosas, endêmicas ou negligenciadas, como por exemplo malária; e componente de medicamentos de dispensação especializado ou excepcionais, que engloba os medicamentos de alto custo, para doenças raras ou ainda para tratamento inserido na atenção especializada, custeados parcialmente pela esfera federal (BRASIL, 2002; CFF, 2010).

Desta forma, a vigilância sanitária, a assistência a saúde e a PNM estão diretamente interligadas, já que a PNM prevê a qualidade dos medicamentos distribuídos e comercializados no Brasil, e que por outro lado, as atividades sanitárias sobre produtos farmacêuticos necessitam ser regulamentadas por uma autoridade nacional competente em vigilância sanitária. Essa autoridade é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CONNAS, 2007; WHO, 2007), que exerce sua atividade através do controle de qualidade de medicamentos, atribuídos aos laboratórios centrais (LACENS) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Segundo Piovesan (2002), os medicamentos são considerados um dos principais produtos relacionados a assistência a saúde e mais relevantes em relação a vigilância sanitária, destacando a importância de ações sobre o controle de qualidade destes produtos (PIOVESAN, 2002).

Apesar de existir legislação brasileira para o controle de qualidade de medicamentos em circulação no Brasil e a PNM ter a qualidade de medicamentos como uma das suas principais diretrizes, os chamados biomedicamentos (compostos por biofármacos) que fazem parte do componente especializado da assistência farmacêutica, passaram a possuir legislação específica somente em 2005 com a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA (RDC) nº 315, revogada mais tarde pela RDC 49/2011 (ANVISA, 2011). No entanto, os biofármacos comercializados no Brasil não estão contemplados a cerca do seu controle de qualidade por essa RDC, logo, a vigilância sanitária em relação a este tipo de produto ainda se apresenta insuficiente a respeito de legislações específicas.

### 1.3. BIOFÁRMACOS E SEU CONTROLE DE QUALIDADE

Medicamentos são aqueles produtos farmacêuticos tecnicamente obtidos ou elaborados com finalidade de diagnóstico, cura ou profilático (BRASIL, 1973). Estes podem ser produzidos a partir de diferentes substâncias farmacologicamente ativas,



como fármacos, produtos biológicos ou biofármacos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; MORAIS; AUGUSTO; CASTILHO, 2008), além de conter substâncias sem atividade farmacológica como: conservantes, diluentes, aglutinantes, estabilizantes, dentre outros (AULTON, 2005).

O termo “fármaco” é bastante amplo e pode ser utilizado para diversos produtos terapêuticos, mas que tipicamente se refere a substâncias obtidas através de síntese química ou através da fermentação clássica (como a penicilina), ou ainda, por fonte natural (ex. Paclitaxel). Já a nomenclatura “produtos biológicos” se refere aos produtos terapêuticos derivados de organismos vivos, incluindo neste grupo: vacinas, hemoderivados, extratos de maneira geral, extratos alergênicos e tecidos (GEIGERT, 2004).

O termo “biofármacos” surgiu no início dos anos 80 juntamente com a aprovação do primeiro produto, a insulina humana recombinante (GEIGERT, 2004; WALSH, 2005), sendo os biofármacos considerados quaisquer substâncias obtidas a partir do uso de biotecnologia com finalidade terapêutica ou diagnóstica. Os biomedicamentos ou em inglês “*biopharmaceuticals*” são os produtos tecnicamente obtidos ou elaborados possuindo como ativo principal um biofármaco (GEIGERT, 2004; MORAIS; AUGUSTO; CASTILHO, 2008; WHO, 2007). São considerados biofármacos: hormônios, citocinas, enzimas, hemoderivados, imunoglobulinas e fatores de crescimento, quando obtidos por processos biotecnológicos (MORAIS; AUGUSTO; CASTILHO, 2008; WHO, 2007). A classe de biofármacos que inclui as proteínas terapêuticas obtidas com o uso da técnica do DNA recombinante corresponde ao maior grupo de biofármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e conseqüentemente uma das classes mais utilizadas mundialmente (GEIGERT, 2004).

Diferentemente dos medicamentos sintéticos, compostos por moléculas consideradas pequenas e de simples caracterização físico-química, os biofármacos são moléculas complexas e a maioria deles possui alto peso molecular, com difícil caracterização físico-química e biológica, com processo de produção complexo e conseqüentemente apresentam maiores taxas de heterogeneidade (SEKHON, 2010).

Cerca de 250 milhões de pessoas no mundo utilizam ou já utilizaram biofármacos, e cada biofármaco excede o gasto de mais de 1 bilhões de dólares ao ano no mundo (GEIGERT, 2004; WALSH, 2005). No Brasil, os biofármacos fazem

parte do componente especializado da assistência farmacêutica, que em 2005 levaram o SUS a custear 1,92 bilhão de reais não previstos no orçamento (BRANDÃO et al., 2011) e que em 2016, os gastos somente na esfera federal com o componente especializado foram superiores a 500 milhões de reais (BRASIL, 2016), já que atualmente os gastos com este tipo de medicamento são divididos entre as esferas.

Os altos gastos com este tipo de medicamento são justificados pelo seu alto custo na produção e armazenamento, uma das suas principais desvantagens (SETO, 2004). Além disso, outras desvantagens incluem: risco de aumento da imunogenicidade, estrutura molecular crítica, dificuldade em estimar sua potência, alta heterogeneidade na produção, potencial risco de transmissão de infecções presentes na cultura, entre outros (GEIGERT, 2004; GUPTA et al., 2017; SCHELLEKENS, 2002).

Apesar das suas desvantagens, o surgimento dos biofármacos apresentou possíveis soluções para doenças que até o momento eram tratadas apenas com medicamentos paliativos insuficientes, ou tratamentos com produtos biológicos com altas taxas de efeitos adversos ou ainda, alternativas para doenças que não possuíam tratamento algum (MADEIRA, 2013).

Com o advento da biotecnologia surgiram novas soluções e até o aprimoramento das alternativas presentes, como exemplo, a diabetes tipo I deixou de ser tratada com a insulina extraída do pâncreas suíno para dar lugar a insulina humana recombinante, com menos efeitos adversos, sem a utilização de animais, prevenção de doenças que poderiam ser transmitidas entre espécies distintas e a possibilidade de menos aplicações da insulina diariamente devido a possibilidade de modificações na formulação e estabilidade do bioproduto (GEIGERT, 2004; MADEIRA, 2013).

As maiores vantagens dos biofármacos em relação a obtenção dos produtos de fonte natural (extração de fontes humanas ou animais) são: produção relativamente fácil e de forma ilimitada; menor risco de contaminação associadas as fontes de extração, como por exemplo o fator VIII que era inicialmente obtido do sangue humano e poderia estar contaminado com alguns vírus como o vírus da imunodeficiência humana (HIV); a quantidade de biofármacos produzida por biotecnologia é superior ao obtido de fontes naturais e a maioria dos biofármacos possui melhores resultados quando comparado ao produto natural equivalente

(GEIGERT, 2004; MORAIS; AUGUSTO; CASTILHO, 2008). A possibilidade de modificações estruturais pós-tradução garantem aos biofármacos melhoras específicas em relação a proteína natural, sendo as modificações mais usuais a glicosilação, fosforilação, acetilação, entre outras (WALSH; JEFFERIS, 2006).

A glicosilação corresponde a uma das modificações pós-tradução mais comum, porém uma das mais complexas. Mais de um terço dos biofármacos são glicoproteínas, sendo que a glicosilação tem importante papel na funcionalidade da proteína, conforme apresentado no **Quadro 1** (WALSH; JEFFERIS, 2006).

**Quadro 1.** Os principais efeitos da adição de glicocomponente nos biofármacos.

Papel / Efeito	Explicação
Dobramento da proteína	A glicosilação pode afetar a estrutura secundária da proteína e contribuir para o dobramento da cadeia polipeptídica.
Alvo da proteína	O glicocomponente pode participar no direcionamento da proteína para seu objetivo final.
Reconhecimento	O teor de carboidratos dos anticorpos pode influenciar na ligação aos receptores Fc de monócitos e na interação com o componente C1q.
Atividade biológica	Por exemplo, a cadeia lateral de carboidratos das gonadotrofinas é essencial para a ativação do sinal de transdução desta molécula.
Estabilidade	As cadeias laterais de açúcar podem estabilizar uma glicoproteína como melhorando a solubilidade, a proteção contra proteólise e aumento da estabilidade.
Regulação da meia-vida da proteína	Grandes quantidades de ácido siálico podem aumentar a meia-vida plasmática de uma glicoproteína. A exposição de resíduos de galactose podem diminuir a meia-vida plasmática. A N-glicosilação comum de leveduras é do tipo manose alta, o que leva a uma rápida remoção da circulação.
Imunogenicidade	Algumas modificações estruturais por glicosilação, principalmente derivadas de plantas como xilose, são altamente imunogênicos em mamíferos.

*Adaptado de* (WALSH; JEFFERIS, 2006).

A modificação pode estar relacionada ao organismo produtor da proteína, como a glicosilação é associada a produção do biofármaco em células eucarióticas, ou ainda para melhora na ação, como por exemplo, a substituição de cisteína por serina na molécula de Interleucina-2 (IL-2) recombinante prevenindo a perda de ligações dissulfeto, relacionadas com a estabilidade química da molécula (GEIGERT, 2004; MORAIS; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

Outras modificações podem ser realizadas através de uma reação química direta ou uma reação enzimática com o objetivo de melhoramento do biofármaco. Uma das modificações mais utilizadas é a adição do grupamento polietilenoglicol

(PEG) de forma covalente. A chamada PEGilação pode reduzir a imunogenicidade, a proteção contra degradação proteolítica e o aumento do tempo de ação do biofármaco através do aumento de tamanho da molécula (DEFREES et al., 2006; WALSH; JEFFERIS, 2006; YANG; KIDO, 2011).

Diversas espécies podem ser utilizadas como produtores de biofármacos *in vitro* como: bactérias, células de mamíferos, leveduras, células de insetos e células de plantas. A escolha do organismo produtor depende basicamente de dois fatores: a necessidade de produção de uma molécula modificada ou a particularidade da molécula. Cada organismo terá um processo de produção específico e controlado, no qual o biofármaco poderá sofrer modificações estruturais de acordo com o organismo produtor, e por este motivo, os biofármacos produzidos em organismos diferentes são considerados produtos distintos (AVIS; WAGNER; WU, 1999; LORENCE, 2012; SEKHON, 2010).

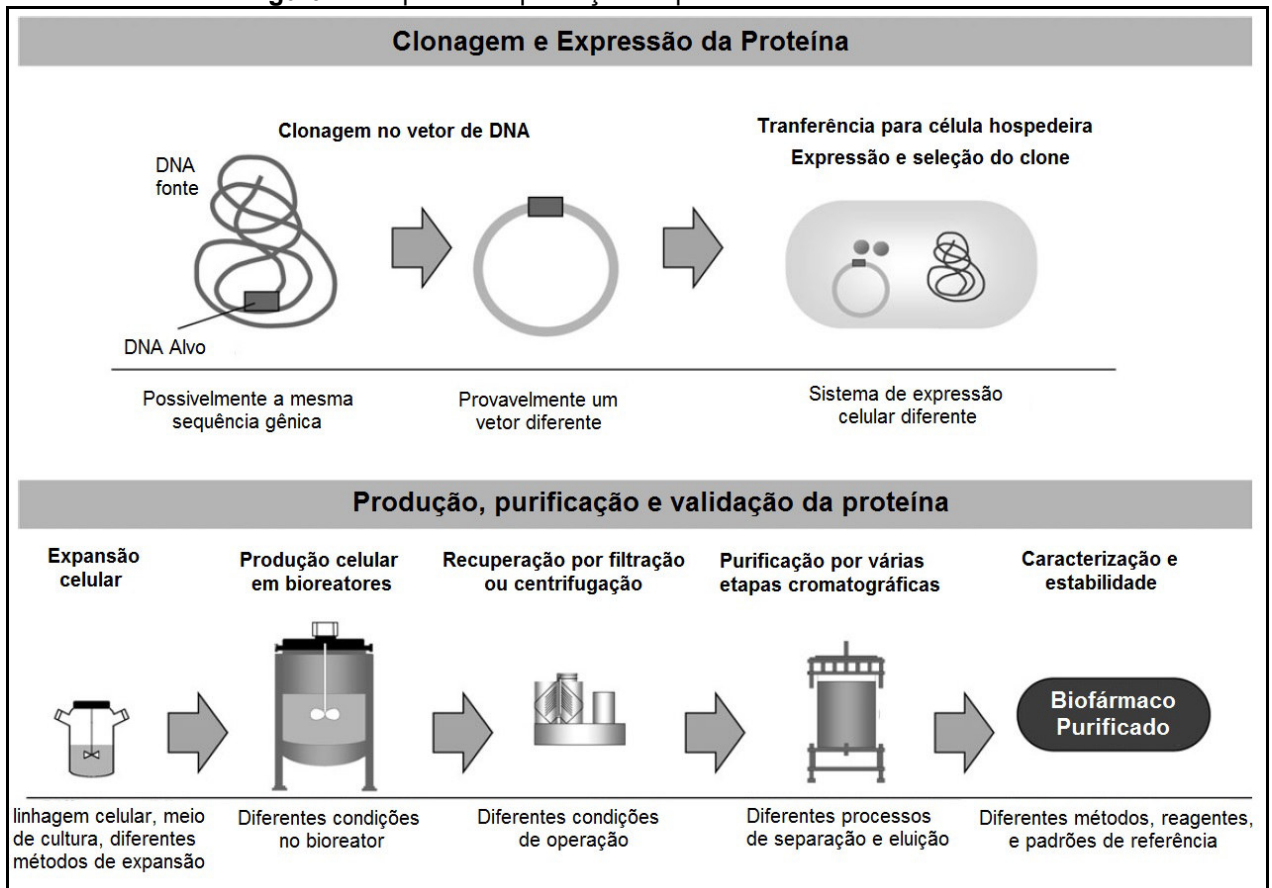
O Filgrastim, por exemplo, é o Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) recombinante produzido por *Escherichia coli* (*E. coli*) geneticamente modificada e não é glicosilado, já o Lenograstim é o G-CSF recombinante produzido em células de Ovário de hamsters chinês (CHO) e é glicosilado, neste caso, a diferença está no organismo produtor que apenas pela glicosilação, gera um biofármaco diferente. Esta adição aumenta a atividade biológica e estabilidade do produto, porém, não é possível produzir o Lenograstim em um biorreator contendo *E.coli* justamente devido a particularidades da molécula que não são supridas por este organismo produtor (HÖGLUND, 1998; ONO, 1994).

Os processos de produção de biofármacos são mais complexos que os de síntese química, pois envolvem o uso de diversas tecnologias, desde processos de bioreação sofisticados com extenso controle de qualidade da cultura e do bioproduto, sistemas de purificação de alta eficiência, como a cromatografia, e necessidade de controle de qualidade com técnicas complementares, já que um único ensaio não é capaz de comprovar a qualidade do produto (BRAVERY et al., 2013; MADEIRA, 2013). Além disso, demandam conhecimento especializado, sendo os processos mais comuns de obtenção de biofármacos a tecnologia do DNA recombinante e a tecnologia de hibridomas (WHO, 2007).

A obtenção de biofármacos com o uso da tecnologia do DNA recombinante é a mais usual e, se inicia através da produção de um vetor de DNA, a sua introdução em células específicas, a seleção do clone celular ideal e a expansão do mesmo

para produção do biofármaco, seguido pela recuperação do produto, purificação e formulação do produto final, conforme exemplificado na **Figura 1** (MELLSTEDT; NIEDERWIESER; LUDWIG, 2008; WALSH, 2005). Estes processos de produção da expressão da proteína até o biofármaco purificado e concentrado são divididos em: processos *upstream*, que engloba a clonagem e expressão da proteína, e *downstream*, que englobam os processos de concentração e purificação do produto (MORAIS; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

**Figura 1.** Esquema de produção de proteínas recombinantes.



*Adaptado de* (MELLSTEDT; NIEDERWIESER; LUDWIG, 2008).

A produção de biofármacos é regida pelas Boas práticas de fabricação (BPF) específicas que são diferentes das BPFs dos fármacos obtidos por síntese química, sendo os tópicos de maior importância: um banco de células conhecido e bem caracterizado; extremo controle das condições de cultura celular ou na fermentação; validação de todas as etapas de isolamento e purificação; controle de qualidade das etapas de inativação viral e remoção de DNA e ácidos nucleicos relacionados ao organismo produtor, estes últimos fatores são de extrema relevância, pois os

biofármacos são produzidos em organismos vivos passíveis de contaminação (AVIS; WAGNER; WU, 1999; GEIGERT, 2004; MORAIS; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

O controle de qualidade na biotecnologia é extremamente importante, pois se baseia no uso de organismos vivos e na maioria dos casos, estes produtos biotecnológicos tem uma grande relevância para manutenção da vida humana (GARNICK; SOLLI; PAPA, 1988; ROFAIL et al., 2012; SKRLIN et al., 2010). Este tema a respeito do controle de qualidade rigoroso de bioprodutos começou a ter destaque em 1901 após crianças terem falecido por receberem um soro antidiftérico contaminado com o bacilo tetânico (a causa foi um cavalo produtor infectado). Ainda destacando a problemática na produção *in vitro*, temos o exemplo da vacina Salk contra poliomielite nos anos 60, produzida em células de rim de macaco que estavam contaminadas com o vírus simian 40 (SV40), descrito como carcinogênico em hamsters e potencialmente perigoso para humanos (GEIGERT, 2004).

Além dos biofármacos serem de origem biológica, estão relacionados a uma outra questão: são formulações estéreis, pois são preparações de uso injetável, exigindo um controle de qualidade ainda mais rigoroso e maiores cuidados pós-produção, principalmente na esterilização e estocagem deste tipo de medicamento, que em sua maioria exige temperatura refrigerada (WHO, 2007). Sendo assim, a formulação final dos biofármacos está sujeita a ensaios para controle de qualidade comuns a medicamentos injetáveis como: teste de esterilidade, ensaio de pirogênio, teste de micoplasma, teste de contaminação de DNA e de contaminação viral, além dos ensaios de controle de qualidade específicos de cada biofármaco (AVIS; WAGNER; WU, 1999; BRASIL, 2010).

Segundo o FDA, devido as particularidades dos biofármacos, seu controle de qualidade deve ser realizado em dois grandes momentos: durante todas as fases de produção e no produto final. Este controle inclui a caracterização física, química e biológica, pois a produção, purificação e formulação final estão sujeitas a variações da qualidade devido as inúmeras etapas de produção, ao uso de biotecnologia e de organismos vivos (GEIGERT, 2004; WALSH, 2005). O controle de qualidade do produto final é tipicamente determinado pelo seu processo de fabricação e também pelo mecanismo de ação do biofármaco, diferentemente dos medicamentos sintéticos nos quais de maneira geral, o controle de qualidade se resume a quantificação do teor e a ensaios acerca da forma farmacêutica (WHO, 2007).

#### 1.4. O MEDICAMENTO FILGRASTIM

O Filgrastim (*r-met HU G-CSF*) é um biofármaco que compõe um medicamento que faz parte da lista de produtos adquiridos pelo SUS e está entre os imunobiológicos importados e de alto custo, incluído no Programa de Medicamentos Excepcionais. Em um estudo brasileiro, foi demonstrado que a classe de citocinas, a qual o biofármaco Filgrastim pertence, ocupa o terceiro lugar no *ranking* de medicamentos com maior custo por indivíduo para o Ministério da Saúde (BRANDÃO et al., 2011).

O medicamento Filgrastim é obtido a partir de um biofármaco, ou seja, uma proteína recombinante humana altamente purificada baseada no fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (CRAWFORD et al., 1991), esta citocina tem ação principal em granulócitos, através de um receptor específico (SOUZA et al., 1986).

##### 1.4.1. Fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e os neutrófilos

Fatores Estimuladores de Colônias em inglês “*Colony Stimulating Factors*” (CSFs), também chamados de Fatores de Crescimento Hematopoiético, são citocinas que atuam na regulação de células que são produzidas na medula óssea e que atuam no sangue periférico e demais tecidos (BATH; SPRIGG, 2006). Estes fatores (CSFs) são considerados cruciais para a sobrevivência, proliferação, diferenciação, maturação e ativação funcional de células hematopoiéticas (FRANCISCO-CRUZ et al., 2013).

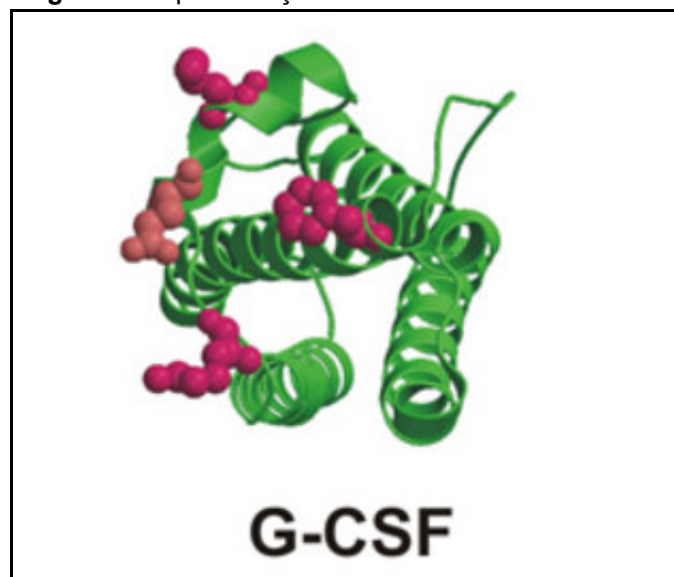
A primeira descrição de fatores estimuladores de colônia foi realizada em 1906 por Carnot e Deflandre (*apud* (BIERMAN, 1964), quando se acreditava que o próprio soro humano possuía uma atividade de estimulação a proliferação de células. Já em 1964, Bierman descobriu que não era o soro, mas sim um componente contido neste que possuía o efeito de estimular a proliferação de leucócitos, intitulando-o como Leucopoetina G, gerando um questionamento sobre a existência e o envolvimento de outros fatores de estimulação de proliferação celular contidos no soro (BIERMAN, 1964).

Ainda nos anos 60, dois grupos de pesquisadores independentes isolaram uma substância da medula óssea de camundongos e humanos, que era capaz de

estimular a proliferação de células em cultura (BRADLEY; METCALF, 1966; ICHIKAWA; PLUZNIK; SACHS, 1966). Mas somente nos anos 80, Nicola e colaboradores conseguiram purificar um dos fatores estimuladores de colônia, o G-CSF (*Granulocyte- Colony Stimulating Factor*), por cromatografia, e determinar a sequência de aminoácidos (NICOLA et al., 1983), o que possibilitou mais tarde a sua produção de forma recombinante (SOUZA et al., 1986) e seu uso como produto farmacêutico, sendo o primeiro biofármaco contendo G-CSF denominado Filgrastim (GABRILOVE et al., 1988).

O G-CSF (*Granulocyte- Colony Stimulating Factor*), também conhecido como CSF 3, é uma glicoproteína com peso molecular de 18 – 22 kDa composta por uma única cadeia polipeptídica de 174 ou 177 aminoácidos, com ponto isoelétrico (pI) 5,5 – 6,1, e configuração estrutural polipeptídica em 4- $\alpha$  hélice, conforme exemplificado na **Figura 2**, ligadas por pontes de dissulfeto, glicosilada no resíduo de treonina 133 (BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004).

**Figura 2.** Representação estrutural da citocina G-CSF.



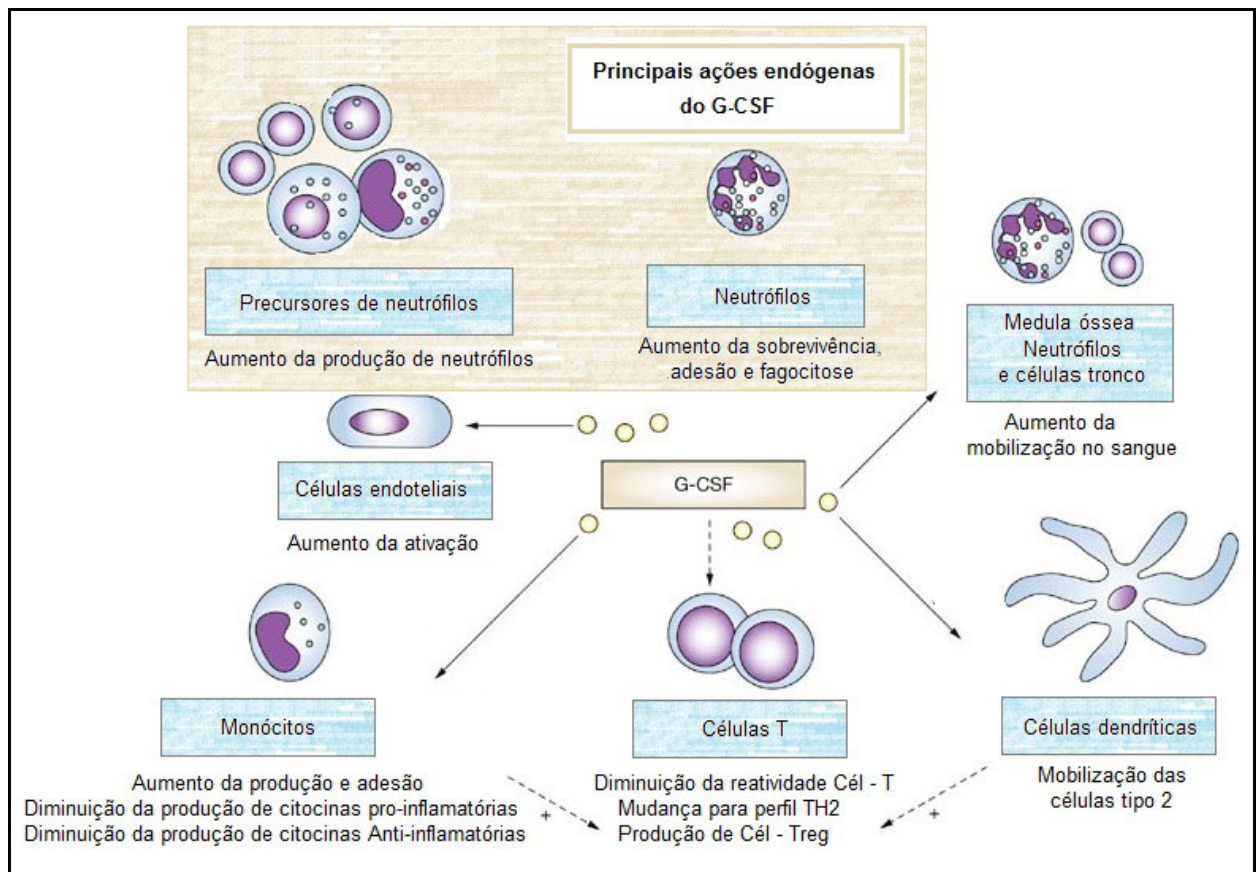
Adaptado de (LAYTON; HALL, 2006).

O G-CSF natural é codificado geneticamente no cromossomo 17, nas posições q 21 e 22, contendo cinco éxons e quatro íntrons ocupando uma área de 2,5 kB, que codificam duas isoformas: A com 177 aminoácidos e B com 174 aminoácidos. A isoforma B, está relacionada a maior atividade biológica e é base do medicamento Filgrastim (BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004; GASCON, 2011; HAMILTON, 2008; METCALF, 1998).



No organismo de mamíferos, esta citocina é produzida principalmente por células endoteliais, monócitos, fibroblastos e células estromais, atuando especificamente sobre células da linhagem granulocítica, promovendo entre outros: a expansão, diferenciação e maturação de neutrófilos; migração desses da medula óssea para a corrente sanguínea; além da ativação destas células, sendo assim, esta citocina é fundamental para a hematopoiese e para a resposta imune, visto sua relação com os granulócitos. Estas ações estão representadas na **Figura 3** (BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004; BENDALL; BRADSTOCK, 2014a; STEWARD, 1993).

**Figura 3.** Principais ações endógenas da citocina G-CSF em diferentes células do organismo.



Adaptado de (EYLES et al., 2006).

Os neutrófilos ou granulócitos, as principais células responsivas ao G-CSF, são as células mais abundantes no sangue, representando cerca de 50-75% do total de leucócitos circulantes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAIS, 2011; FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013). Estas células são provenientes da medula óssea a partir da linhagem mielóide e por este motivo compartilham de algumas características

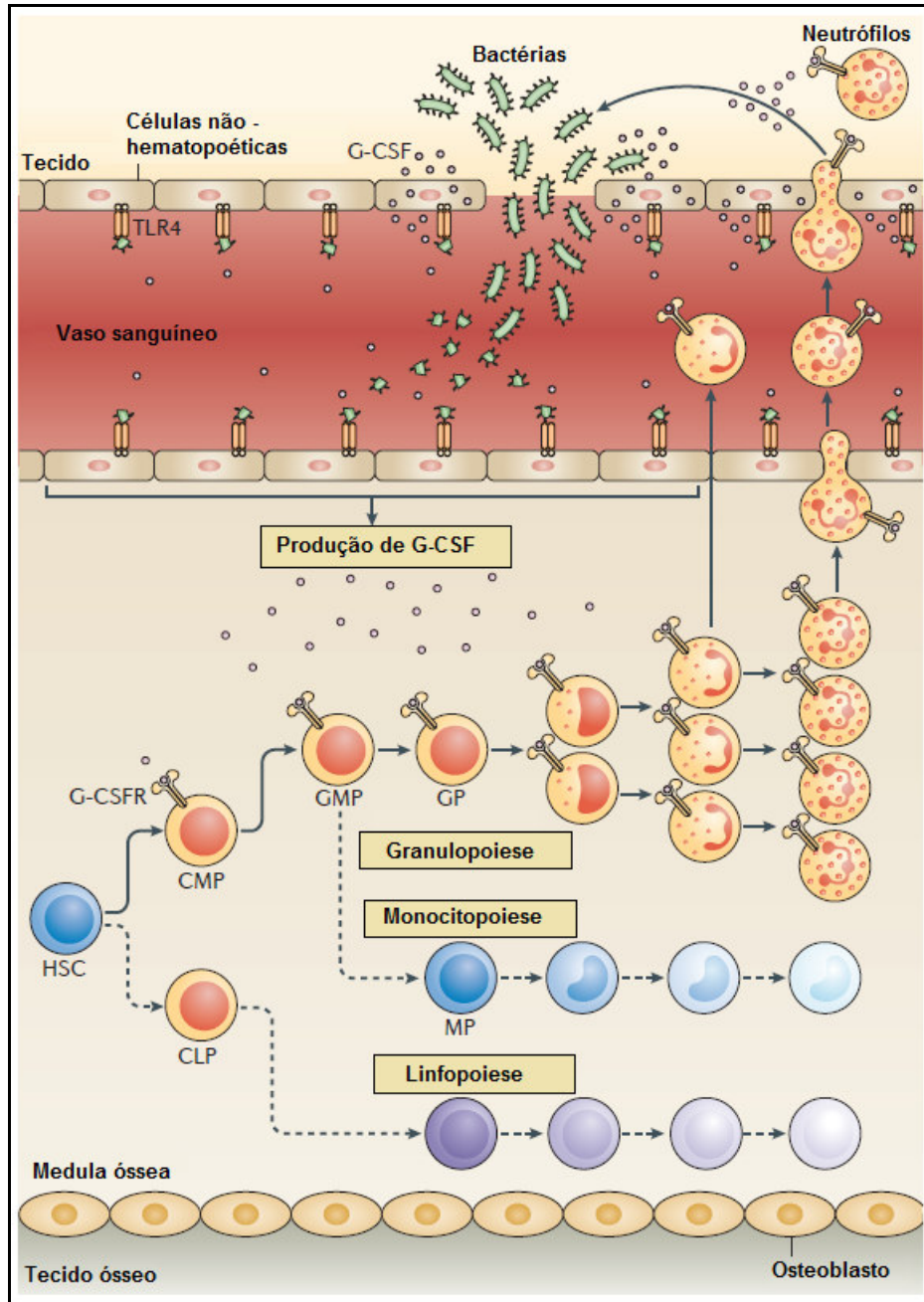
comuns a outras células mielóides como macrófagos e mastócitos (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013).

Os neutrófilos são células de vida curta, que a menos que sejam ativadas por algum estímulo (microbiano ou inflamatório) só sobrevivem por um curto período de tempo na corrente sanguínea e posteriormente entram em apoptose espontânea. Apresentam morfologia nuclear condensada e multilobular, além de conter um grande número de grânulos e vesículas no seu citoplasma, sendo estas as características que as determinam como células polimorfonucleares (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; KYONO; COATES, 2002).

Diversos distúrbios estão associados aos neutrófilos, uma das principais alterações é a neutropenia (KYONO; COATES, 2002). A neutropenia é uma condição clínica caracterizada pela diminuição de neutrófilos/granulócitos ( $< 1500$  células por  $\text{mm}^3$ ) no sangue, que está diretamente relacionada com o aumento do risco à infecções. Este aumento de risco à infecções está presente tanto em adultos como em crianças com neutropenia idiopática, cíclica ou congênita, na anemia aplástica, na infecção por HIV, entre outras doenças, além de ser observada também após ciclos de tratamento por quimioterápicos depressores da medula óssea, sendo fundamental o aumento do número dessas células para recuperação do indivíduo (AAPRO et al., 2011; BENDALL; BRADSTOCK, 2014b; CRAWFORD et al., 1991; KYONO; COATES, 2002).

A regulação da produção e estimulação de neutrófilos é de extrema importância para os diversos quadros clínicos não infecciosos citados, e a mesma pode ser efetuada através de citocinas como G-CSF, GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) e M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), em especial o G-CSF, conforme exemplificado na **Figura 4**. O mesmo acontece em quadros infecciosos, onde através do estímulo por citocinas e outros fatores há um aumento do número de neutrófilos, portanto, o uso de citocinas recombinantes, como do G-CSF recombinante (Filgrastim) podem ser considerados uma importante ferramenta terapêutica para as doenças em que há quadros de neutropenia (AAPRO et al., 2011; BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004; STEWARD, 1993).

**Figura 4.** Demonstração integrada da ativação da granulopoiese através de um estímulo microbiano com o aumento da produção de G-CSF.



Bactérias gram-negativas (PAMPs) que superam as barreiras de defesa locais, obtêm acesso a circulação sistêmica e conseqüentemente são detectados por receptores Toll-like 4 (TLR4) de células não-hematopoiéticas através do reconhecimento de Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), indicando assim um estado de emergência. A transdução de sinal de TLR4 em células não-hematopoiéticas resulta na expressão e secreção de grandes quantidades de G-CSF. Na medula óssea, o G-CSF atua em diferentes estágios da linhagem granulocítica via receptor de G-CSF (G-CSFR), agindo em células tronco-hematopoiéticas (HSC), células progenitoras de mielóides (CMP), progenitoras de granulócitos-macrófagos (GMP) e progenitoras de granulócitos (GP). Além de efeitos anti-apoptóticos e microbicidas em neutrófilos maduros, o G-CSF também estimula a mobilização de células da medula óssea para periferia e promove a proliferação de células progenitoras mielóides e a diferenciação granulocítica, o que resulta na geração melhorada de neutrófilos e no aumento da produção destas células na medula óssea. *Adaptado de* (MANZ; BOETTCHER, 2014).

Os neutrófilos são células que participam das fases iniciais das reações inflamatórias e na resposta imune contra microorganismos patogênicos como bactérias e fungos, através da expressão de um grande número de receptores de superfície, sendo eles: de reconhecimento inato (através da interação com estruturas conservadas de microorganismos), receptores capazes de reconhecer o ambiente inflamatório, ou ainda receptores ligados a ativação da resposta imune adaptativa, alguns dos receptores mais estudados estão listados no **Quadro 2** (ABBAS; LICHTMAN; PILLAIS, 2011; BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004; BENDALL; BRADSTOCK, 2014b; FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; STEWARD, 1993) .

**Quadro 2.** Os receptores presentes nos neutrófilos de maior importância.

Acoplados a proteína G	Do tipo Fc	De adesão	De citocinas	Da imunidade inata
Receptor formil-peptídeo: FPR1; FPR2; FPR3;  Receptores quimioatraentes clássicos: BLT1; BLT2; PAFR; C5aR;  Receptores de quimiocinas: CXCR1; CXCR2; CCR1; CCR2;	Receptor Fcγ : FcγRI; FcγRIIA; FcγRIIB; FcγRIIIB;  Receptores Fcα: FcαRI  Receptores Fcε: FcεRI; FcεRII;	Selectinas e ligantes : L-selectina; PSGL-1;  Integrinas: LFA-1; Mac-1; VLA-4;	Tipo I: IL-4R; IL-6R; IL-12R; IL-15R; G-CSFR; GM-CSFR;  Tipo II: IFNAR; IFNGR; IL-10R;  Família IL-1R: IL-1R1; IL-1RII; IL-18R;  Família TNFR: TNFR1; TNFR2; Fas; LTβR; RANK; TRAIL-R2; TRAIL-R3;	Receptores tipo Toll: TLR1; TLR2; TLR4; TLR5; TLR6; TLR8; TLR9;  Lectinas tipo C: Dectina-1; Mincle; MDL-1; Mcl; CLEC-2;  Receptores tipo NOD: NOD2; NLRP3;  Receptores tipo RIG: RIG -1; MDA5;

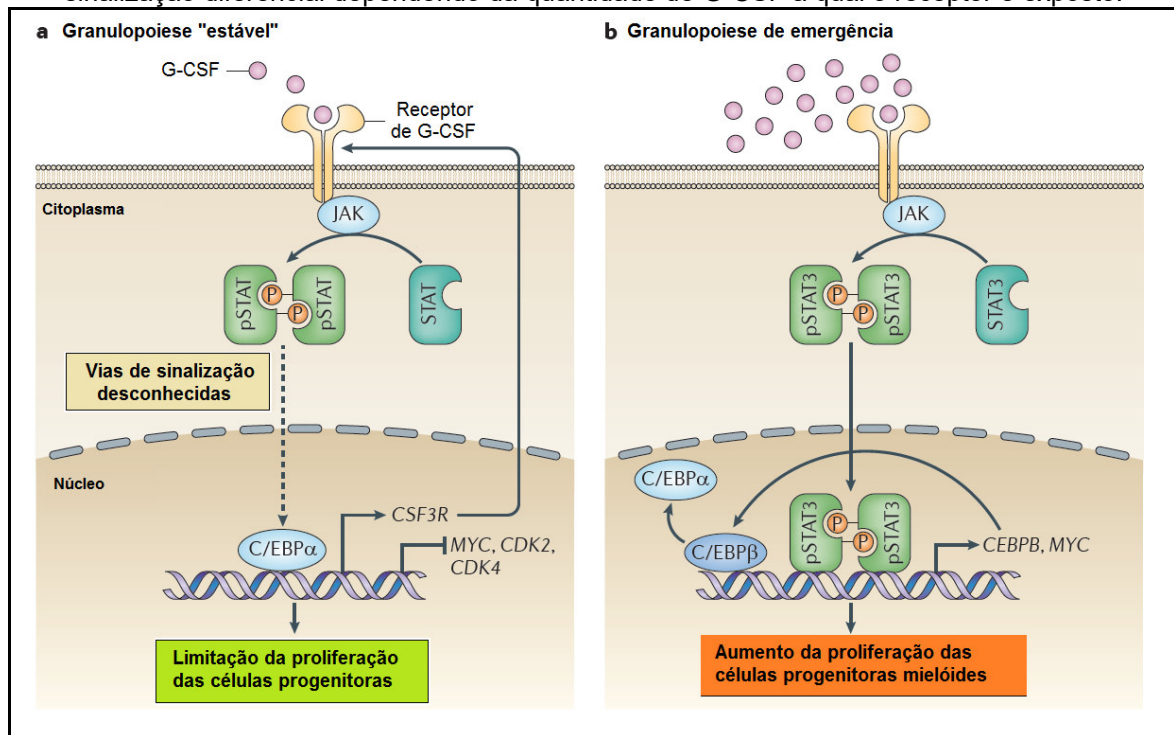
adaptado de (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013).

Diversos trabalhos apontam o G-CSF e o seu receptor específico, o G-CSFR (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor*), com papéis fundamentais na produção e estimulação de neutrófilos (LIESCHKE et al., 1994; LIU et al., 1996; MANZ; BOETTCHER, 2014) tanto em um estado de homeostase/ estável ou de equilíbrio (definido como infecção local), quanto em um estado de granulopoiese de emergência, este último, caracterizado por Manz e colaboradores em 2014 como estado em que há uma nova geração de neutrófilos resultante do aumento das

células progenitoras mielóides na medula óssea em resposta a alterações sistêmicas disseminadas (MANZ; BOETTCHER, 2014).

Apesar do resultado final ser o mesmo, ou seja, o aumento do número de neutrófilos circulantes, a ativação do receptor G-CSFR é diferenciada conforme mostrado na **Figura 5**. Quando o estímulo de G-CSF é aumentado, decorre um consequente aumento do fator proliferativo (C/EBP- $\beta$ )<sup>1</sup>, superando o efeito anti-proliferativo (C/EBP- $\alpha$ )<sup>1</sup> e assim resultando em uma resposta com maior número de granulócitos produzidos e estimulados (MANZ; BOETTCHER, 2014; PANOPOULOS; WATOWICH, 2008).

**Figura 5.** Representação da granulopoiese “estável” e da granulopoiese de emergência com sinalização diferencial dependendo da quantidade de G-CSF a qual o receptor é exposto.



(a) O principal regulador transcrricional da granulopoiese em estágio estacionário é a proteína C/EBP $\alpha$ , esta, conduz a expressão de genes que codificam proteínas que são necessárias para a proliferação de progenitores mielóides e diferenciação granulocítica, incluindo o receptor (G-CSFR) que é codificado por CSF3R. No entanto, C/EBP $\alpha$  simultaneamente restringe o excesso de proliferação, inibindo a expressão de genes que são necessários para a progressão do ciclo celular (MYC, CDK2 e CDK4). As vias de sinalização da granulopoiese estável não são bem compreendidas. (b) Durante a granulopoiese de emergência, os níveis de G-CSF estão aumentados. A sinalização de G-CSFR através de Jak leva a translocação nuclear de STATs fosforiladas que estimula diretamente a expressão dos genes que codificam MYC e o principal regulador transcrricional de granulopoiese de emergência C/EBP $\beta$ , este estimula diretamente a transcrição MYC e também substitui C/EBP $\alpha$  no promotor MYC por meio da competição pela ligação, levando assim a inibição da repressão transcrricional que C/EBP $\alpha$  exerce na expressão MYC. Como resultado, os efeitos proliferativos de C/EBP $\beta$  superam os efeitos antiproliferativos de C/EBP $\alpha$ , resultando em maior proliferação de células progenitoras mielóides e geração de neutrófilos. *adaptado de* (MANZ; BOETTCHER, 2014).

<sup>1</sup> C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) são uma família de fatores de transcrição envolvidos na proliferação e diferenciação de diversas células, incluindo células mielóides (RAMJI; FOKA, 2002).

Os efeitos biológicos do G-CSF, conforme citado anteriormente, são mediados através de um receptor específico de alta afinidade, o G-CSFR (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor*) (KENDRICK; BOGOYEVITCH, 2007).

#### 1.4.2. O receptor do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSFR) e sua sinalização

O receptor de G-CSF, o G-CSFR, é expresso na linhagem granulocítica, desde células mieloblásticas até em neutrófilos maduros, logo a ação seletiva do G-CSF na linhagem mielóide tem sido atribuída a esta expressão restrita (KENDRICK; BOGOYEVITCH, 2007). Este receptor também está presente em outras células, como células de linhagens tumorais HL-60 e M-NFS-60 originadas de leucemias mielocíticas. Em neutrófilos humanos maduros acredita-se que haja de 200 a 1000 receptores G-CSFR por célula (BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004), onde sua principal função é transmitir sinais para expansão, diferenciação e sobrevivência destas células (KENDRICK; BOGOYEVITCH, 2007). Em estudo avaliando a ausência deste receptor, animais geneticamente modificados apresentaram grave neutropenia e maior suscetibilidade a infecções (LIESCHKE et al., 1994), evidenciando a sua relevância.

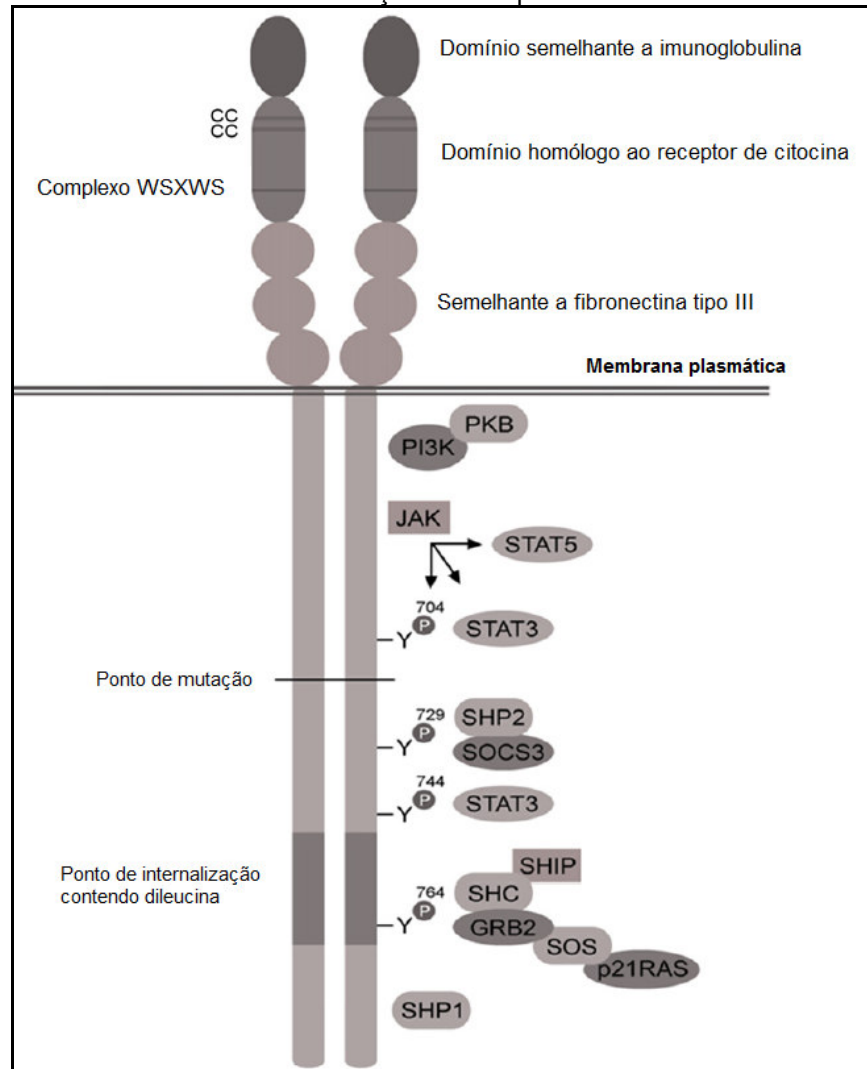
Este receptor, também conhecido com CD114, é uma proteína transmembrânica, com peso molecular de aproximadamente 130-150 kDa, membro da família classe I de receptores de citocina hematopoéticas, sendo um receptor homodimérico. É codificado por um único gene, localizado no cromossomo p35 - p34, incluindo dezessete éxons que ocupam uma área de 16,5 kB. A parte extracelular do receptor possui quatro resíduos de cisteína e se divide em domínios como: semelhante a imunoglobulina (*Ig-like* ou Ig) ou D1, homólogo ao receptor de citocina (*CHR*) ou D2 e D3, três semelhantes a fibronectina tipo III (*FN III*) ou D4 a D6 e um complexo WSXWS<sup>2</sup>. Intracelularmente, o receptor possui um domínio  $\alpha$ -helicoidal hidrofóbico, onde se ligam as janus cinases (Jaks) e outras moléculas conforme representado na **Figura 6** (KENDRICK; BOGOYEVITCH, 2007; METCALF, 1998; PANOPOULOS; WATOWICH, 2008; THOMAS; VADAS; LOPEZ, 2004; TOUW; PALANDE; BEEKMAN, 2013). Mutações nos domínios do receptor e nas suas vias de sinalização tem sido relatadas e podem levar a uma resposta

<sup>2</sup> Um pentapeptídeo formado por triptofano, serina, um aminoácido qualquer e noventa e nove triptofano e serina (BAYNES; DOMINICZAK, 2015)



deficiente ou exacerbada (LIONGUE; WARD, 2014).

**Figura 6.** Representação esquemática do receptor de G-CSF: Domínios importantes e vias de ativação do receptor.

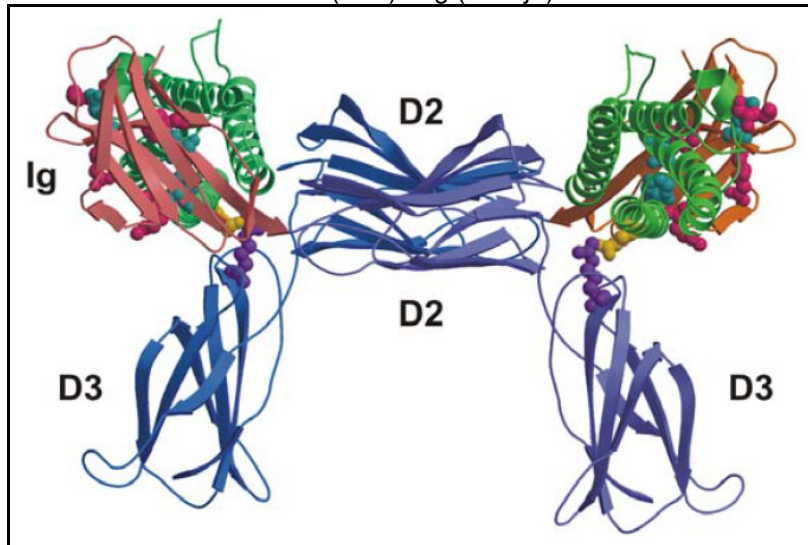


adaptado de (TOUW; PALANDE; BEEKMAN, 2013).

Assim como outros membros dos receptores tipo I, o G-CSFR pode ativar 3 principais vias de sinalização: janus cinase (Jak/STAT – *Janus kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription*), fosfatidilinositol-3 cinase/AKT (PI-3K/Akt – *Phosphoinositide 3-kinase - Protein Kinase B*), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e a via inibitória do receptor SOCS 3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*), esta última, considerada um regulador negativo da granulopoiese (BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004; FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; KIMURA et al., 2004; TOUW; PALANDE; BEEKMAN, 2013).

O G-CSF se liga ao G-CSFR na proporção 2:2, aparentemente no domínio semelhante a imunoglobulina, esta ligação promove a homodimerização das cadeias do receptor, pode ainda ocorrer ligação com outros domínios como D2 e D3 (homólogo ao receptor de citocina), formando um complexo tetramétrico (LAYTON; HALL, 2006), conforme representado na **Figura 7**.

**Figura 7.** Representação do complexo de ligação do receptor com a citocina G-CSF na proporção 2:2. Cada molécula de G-CSF (verde) está envolvida na interação com o receptor através do módulo CRH (azul) e Ig (laranja).



adaptado de (LAYTON; HALL, 2006).

A via principal de sinalização do receptor G-CSFR é JAK-STAT, onde moléculas JAK ( Jak 1, Jak 2 e Tky 2, principalmente Jak 2) irão fosforilar resíduos de tirosina, recrutando os fatores de transcrição STATs (STAT 1, STAT 3 e STAT 5), que também serão fosforilados pelas cinases da família JAK associadas ao receptor. Quando fosforilados e liberados da parte interna do receptor, as STATs se dimerizam e no DNA, regulam a transcrição do gene (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; MANZ; BOETTCHER, 2014).

Foi observado, que Jak 1 está associado a uma região proximal do receptor G-CSFR, enquanto Jak 2 é recrutado somente após a ativação do receptor, sendo um recrutamento tardio (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; KENDRICK; BOGOYEVITCH, 2007; PANOPOULOS; WATOWICH, 2008). O mesmo é observado com as STATs em relação a sua cinética, aparentemente, a STAT 3 permanece ativada por um longo período (de horas até dias), já a STAT 5 é observada sua fosforilação após 15 minutos e decai rapidamente após este tempo (HERMANS et al., 1999).



Alguns trabalhos apontam que a via das Janus cinase estaria envolvida em duas formas de promover a granulopoiese: a “granulopoiese de equilíbrio” considerada a proliferação celular do estado homeostático (para manutenção do número de neutrófilos circulantes) ou ainda, a proliferação celular estimulada por um processo inflamatório local; e a “granulopoiese emergencial” (LIESCHKE et al., 1994; MANZ; BOETTCHER, 2014; PANOPOULOS; WATOWICH, 2008). A granulopoiese estável/ equilíbrio ainda é pouco descrita, justamente pela sua dificuldade de avaliação de forma isolada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MANZ; BOETTCHER, 2014).

Conforme mostrado na **Figura 5**, quando há um estímulo do receptor com determinada concentração de G-CSF, considerada normal, a ativação da via de sinalização pelas JAK-STATs leva a ativação do fator de transcrição de efeito anti-proliferativo C/EBP- $\alpha$  que, como consequência, regula a proliferação dos granulócitos (MANZ; BOETTCHER, 2014).

Em um processo infeccioso, o G-CSF associado a outras citocinas inflamatórias como IL-1 (interleucina 1) e TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa), juntamente com o reconhecimento de PAMPS (Padrões moleculares associados a patógenos), através dos TLRs (receptores do tipo Toll), amplificam a proliferação celular tanto através da estimulação do neutrófilo por estas citocinas e vias quanto através do aumento expressivo da produção de G-CSF, resultando em um estímulo maior e constante do receptor de G-CSF. O receptor ativado recruta e fosforila preferencialmente a STAT3, demonstrada por diversos autores sua relação com a granulopoiese emergencial (PANOPOULOS et al., 2006; PANOPOULOS; WATOWICH, 2008; ZHANG et al., 2010). A STAT3 pode se ligar diretamente ao promotor Myc<sup>3</sup> ou acionar o C/EBP- $\beta$  que se liga diretamente ao promotor conduzindo a expressão do gene de proliferação, bem como a supressão da ligação de C/EBP- $\alpha$  ao promotor (BOETTCHER et al., 2014; CAIN et al., 2011; PANOPOULOS; WATOWICH, 2008).

#### 1.4.3. O Fator estimulador de colônia de granulócitos recombinante, Filgrastim, e seu controle de qualidade

O Filgrastim foi o primeiro medicamento a conter o biofármaco fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) recombinante. Mais tarde foram

<sup>3</sup> Myc: Um gene regulador, a proteína codificada por este gene está relacionada ao ciclo celular (AMATI; LAND, 1994).

lançados outros biofármacos tendo como base o Filgrastim, como por exemplo: Lenograstim, produzido em células de mamífero e o PegFilgrastim, o Filgrastim modificado pela adição de um grupo PEG (polietilenoglicol) (HOGGATT; PELUS, 2014; HÖGLUND, 1998).

O Filgrastim, é uma proteína recombinante humana purificada, possuindo uma única cadeia polipeptídica com 175 aminoácidos e peso molecular de 18.8 kDa, sendo produzido através da *E. coli* geneticamente modificada através da tecnologia do DNA recombinante (BRAVERY et al., 2013).

A diferença entre o Filgrastim e o G-CSF natural é que o medicamento não é glicosilado e o aminoácido terminal é a metionina, necessária para expressão gênica em bactérias. Entretanto, esta diferença não altera a capacidade do medicamento em atuar no receptor específico, o G-CSFR, sendo capaz de produzir os mesmos efeitos do G-CSF natural (CRAWFORD et al., 1991; MORSTYN et al., 2001; ROFAIL et al., 2012).

É descrito como uso clínico do Filgrastim para a redução da duração da neutropenia que está diretamente relacionada com o aumento do risco a infecções (AAPRO et al., 2011; BENDALL; BRADSTOCK, 2014; CRAWFORD et al., 1991; KYONO; COATES, 2002), também utilizado antes e/ou após doses citotóxicas de quimioterápicos, além de mobilizar células progenitoras em adultos ou crianças com neutropenia idiopática, cíclica ou congênita, na anemia aplástica, no tratamento da neutropenia persistente na infecção por HIV, entre outras doenças. Portanto, é considerado um importante medicamento de suporte a outros tratamentos e possui a capacidade de aumentar a sobrevida do paciente indiretamente (AAPRO et al., 2011; BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004; GASCON, 2011; STEWARD, 1993).

O mecanismo de ação deste medicamento é equivalente ao efeito da citocina G-CSF natural, já descrito anteriormente (*item 1.4.1*) (GASCON, 2011). A área sob a curva do medicamento decai a níveis basais após 72h e os efeitos adversos mais relatados são: dores de cabeça, febre, dor nas costas, fraqueza, hipertensão e laboratorialmente foi observado o aumento da atividade de Alanina Aminotransferase (ALT) e fosfatemia (SVEIKATA et al., 2014), também foi relatada intensa dor músculo-esquelética no local da aplicação, visto que sua administração possa ser subcutânea ou intravenosa (CARVALHO et al., 2015; HEIL et al., 1997).

O controle de qualidade deste medicamento é realizado através de ensaios físico-químicos e ensaios biológicos (USP PHARMACOPEIA, 2015). Os ensaios físico-químicos são preferencialmente realizados por cromatografia líquida, devido sua resolução na caracterização e quantificação de moléculas (LANÇAS, 2009). No caso deste medicamento, é padronizado através de compêndios internacionais o *peptide mapping*, onde o biofármaco é fracionado por processos digestivos e sua identificação é realizada pelas sequências peptídicas observadas no cromatógrafo de acordo com um padrão de referência (PHARMACOPEIA, 2014; USP PHARMACOPEIA, 2015). Outros métodos cromatográficos e ensaios de separação como eletroforese, também são relatados na literatura, mas ainda não são utilizados oficialmente (CLOGSTON et al., 1992; CODEVILLA et al., 2005; FARAJI et al., 2010; MIRE-SLUIS et al., 1996; MULINARI, 2012; VANZ et al., 2008).

Sendo o Filgrastim um biofármaco de origem proteica, este é considerado como uma molécula complexa, onde suas propriedades físico-químicas podem ser demasiadamente extensas e de difícil confirmação da estrutura de forma totalmente confiável. Por este motivo, o controle de qualidade físico-químico pode não representar sua real atividade biológica. No entanto, ensaios biológicos para o controle de qualidade podem complementar a caracterização do medicamento, pois desta maneira é possível avaliar a atividade biológica do produto de forma mais direta, como por exemplo através do ensaio de potência farmacológica (MIRE-SLUIS et al., 1996; SKRLIN et al., 2010; ZHANG, 2014).

A atividade terapêutica de um produto farmacêutico pode ser estimada por ensaios de potência, que podem ser *in vivo*, *in vitro*, ou ambos, desde que seja específico e capaz de determinar a potência de um medicamento (FDA, 2008). O objetivo final deste tipo de ensaio é prever sua atividade biológica, identificar os parâmetros essenciais para a eficácia e qualidade do produto e controlar o processo de fabricação de tal forma que seja ofertado ao consumidor um produto de qualidade com homogeneidade constante (BRAVERY et al., 2013). Uma das formas mais comuns de realização do ensaio de potência *in vitro* é o estabelecimento de uma curva concentração-resposta e a comparação de um padrão com o medicamento a ser testado (PORAT et al., 2015).

Na literatura são descritos diversos ensaios para avaliação da potência do Filgrastim utilizando animais de laboratório como camundongos. Os animais recebem altas doses de quimioterápicos e são tratados com Filgrastim,

posteriormente é estimada a proliferação de neutrófilos no sangue, em coelhos o Filgrastim é administrado para estimativa de tolerância deste fármaco injetável (CODEVILLA et al., 2004; CROBU et al., 2014; FRAMPTON; LEE; FAULDS, 1994; LORD; WOOLFORD; MOLINEUX, 2001).

Atualmente, os ensaios descritos por entidades internacionais e aceitos são os métodos alternativos, que não utilizam animais para o controle de qualidade biológico do Filgrastim, como por exemplo os descritos na Farmacopéia Européia e Americana (PHARMACOPEIA, 2014; USP PHARMACOPOEIA, 2015), mas que não são realizados no Brasil.

Ensaio *in vitro*, como em cultura de células, podem ser utilizados para determinação da atividade biológica de citocinas, sendo estes mais sensíveis que os imunoenaios, e são até o momento a única metodologia capaz de determinar a atividade biológica de uma amostra sem fazer o uso de um modelo animal (BRAVERY et al., 2013; PORAT et al., 2015; ZHANG, 2014).

Sendo o principal modo de ação do Filgrastim a proliferação e ativação celular, os ensaios *in vitro* para avaliação da potência farmacológica deste biofármaco se voltam para quantificação destes fenômenos. A determinação da proliferação celular para o ensaio de potência do Filgrastim, segundo os compêndios oficiais, pode ser avaliada utilizando-se dois métodos oficiais disponíveis: a metabolização mitocondrial do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (PHARMACOPEIA, 2014) ou o através do ensaio de bioluminescência (USP PHARMACOPOEIA, 2015).

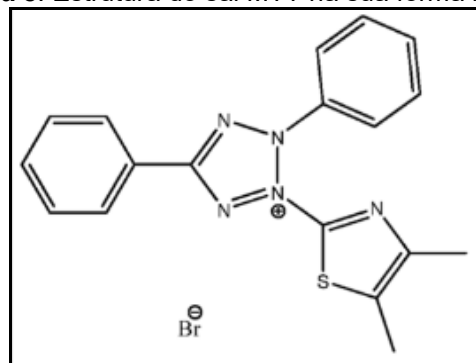
Ambos os ensaios se baseiam na atividade mitocondrial das linhagens utilizadas tratadas com o medicamento e o padrão de referência. Para a produção de energia na forma de ATP, a mitocondria metaboliza ativamente o piruvato, um produto da glicólise que é acoplado com a coenzima A para produzir acetil CoA na matriz mitocondrial. A acetil CoA é também fornecida como um substrato à mitocondria através do metabolismo de aminoácidos e oxidação de ácidos graxos. Uma vez na mitocondria, o acetil CoA, participa do ciclo do ácido tricarbóxico (Ciclo do TCA) onde ele reage com varias enzimas para produzir uma cadeia de substratos e elétrons, resultando na produção de ATP. Uma destas enzimas é a succinato desidrogenase, responsável por uma conversão enzimática que fornece um par de elétrons para ser utilizado na produção de ATP. Desta forma, podem ser avaliados produtos, reações e enzimas que participam deste processo de produção energética

como forma de avaliação da proliferação celular de forma indireta (KOLESNIKOV, 2016; MOSMANN, 1983; SCOTT; YOULE, 2010).

#### 1.4.3.1. Ensaio de MTT

O ensaio *in vitro* para determinação da potência farmacológica do Filgrastim preconizado pela Farmacopéia Européia juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece o uso de linhagens celulares responsivas a esta proteína como a linhagem M-NFS-60, onde é avaliada a proliferação destas células frente a diferentes concentrações do medicamento empregando o ensaio de MTT (Sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), estrutura química representada na **Figura 8**, sendo comparada sua resposta com o padrão deste medicamento (HAMID et al., 2004; PHARMACOPEIA, 2014; TSUCHIYA et al., 1986; VAN DE LOOSDRECHT et al., 1994).

**Figura 8.** Estrutura do sal MTT na sua forma íntegra.



Adaptado de (BARAHUIE et al., 2014).

O ensaio do MTT é um teste que pode ser realizado com diferentes finalidades e seu estabelecimento amplia as opções de possibilidades do uso em controle de qualidade de medicamentos para o laboratório que a dispõe. As principais utilizações do ensaio de MTT são para avaliar a citotoxicidade ou para estimar a proliferação celular, este último como objetivo do ensaio para o medicamento Filgrastim (DE OLIVEIRA et al., 2013; VAN DE LOOSDRECHT et al., 1994; WANG; HENNING; HEBER, 2010). Além disso, este ensaio é amplamente conhecido e validado para métodos alternativos sendo parte do método OECD 439.

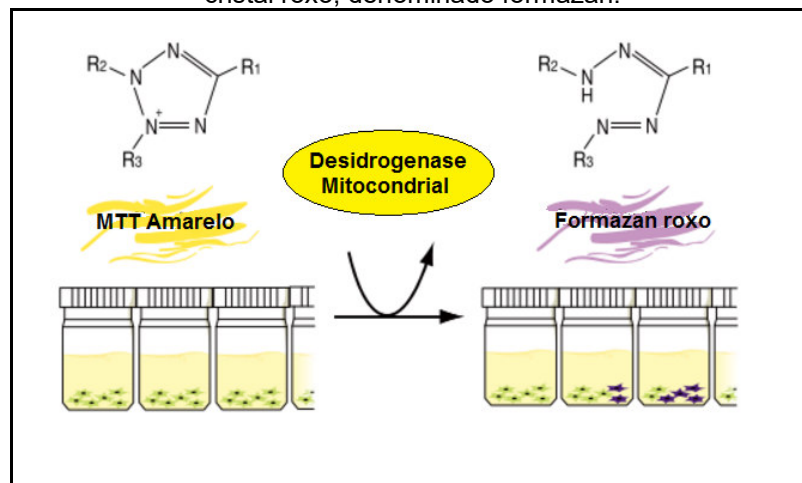
O ensaio MTT é capaz de mensurar a atividade celular *in vitro* através da redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio de cor

amarela, por células metabolicamente ativas através da ação de enzimas desidrogenases mitocondriais, como a succinato desidrogenase.

As desidrogenases agem no anel nitrogenado central de sais tetrazólicos resultando em uma alteração de cor para roxa intracelular e estável pela formação de cristais formazan. Logo, desde que esta conversão ocorra em células viáveis, a quantidade de formazan produzida correlaciona-se com o número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983), conforme exemplificado na **Figura 9**.

Desta forma o ensaio de MTT é utilizado para diversas avaliações celulares, como ativação celular, metabolismo mitocondrial, citotoxicidade e a proliferação celular. A estimativa da proliferação celular ocorre de forma indireta, pois a mesma é avaliada pelo aumento do número de mitocôndrias, resultante do aumento do número de células. O ensaio de MTT avalia a proliferação, por exemplo, através da intensidade de cor, quanto mais cor, maior será o número de mitocôndrias sugerindo um maior número de células. A intensidade de cor é medida por um espectrofotômetro após os cristais intracelulares de formazan serem solubilizados em um solvente orgânico tipicamente em pH extremos (HAMID et al., 2004; VAN DE LOOSDRECHT et al., 1994), a fim de evitar a interferência da coloração do meio de cultura (como vermelho de fenol) (OECD, 2015).

**Figura 9.** Representação da reação do MTT em cultura celular, transformação do sal amarelo em cristal roxo, denominado formazan.



Adaptado de (CNHAOBIO, 2010).

Porém, encontram-se algumas limitações para este método atualmente sugerido pela Farmacopeia Européia para o controle de qualidade deste biofármaco (PHARMACOPEIA, 2014).

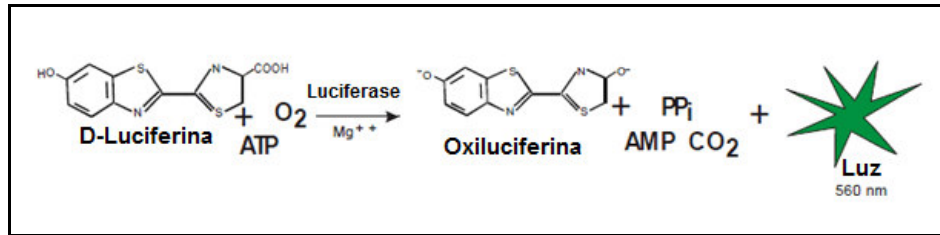
Primeiramente, a linhagem usualmente empregada nos ensaios, M-NFS-60, é de origem murina de uma leucemia mielogênica vírus induzida e não representa de forma tão específica a atuação do medicamento em células humanas (TSUCHIYA et al., 1986). Além disso, o ensaio do MTT também possui alguns problemas, pois este ensaio estima a proliferação, ativação e a toxicidade celular de forma indireta, através do metabolismo celular, possuindo assim um viés de real quantificação da potência farmacológica do Filgrastim, pois caso o medicamento module positivamente o metabolismo celular, sem afetar contudo a sua proliferação, objetivo deste biofármaco, o resultado poderá ser interpretado erroneamente como proliferação celular, ou ainda, se o medicamento estiver contaminado com patógenos, as células ativadas irão responder como uma alta potência (PORAT et al., 2015; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987; WANG; HENNING; HEBER, 2010).

#### *1.4.3.2. Ensaio da Luciferase/ATP*

O trifosfato de adenosina (ATP) desempenha um papel fundamental no metabolismo, sinalização e energia para a célula, logo com a sua quantificação é possível estimar a quantidade de células, seu gasto energético e seu metabolismo (ALBERTS et al., 2010a).

O ensaio de bioluminescência é um ensaio onde a luz emitida é oriunda de uma fonte biológica. Baseia-se em uma reação química onde uma enzima externa ao sistema se liga a um composto marcador de atividade celular. Para avaliação da proliferação celular, o ensaio quantifica ATP livre, produzido somente por células vivas durante a respiração celular. O ATP reage com a enzima luciferase, na presença de luciferina e íons magnésio, formando um complexo que na presença de oxigênio irá produzir luminescência, conforme representado na **Figura 10**. Quanto maior a quantidade de células que se proliferam, a quantidade de ATP disponível aumenta, resultando em maior luminescência a ser observada e quantificada em um luminômetro, fluorímetro ou espectrofotômetro (CROUCH et al., 1993; KUDRYASHEVA, 2006).

**Figura 10.** Representação da reação da luciferase para quantificação de ATP através da formação de luz.



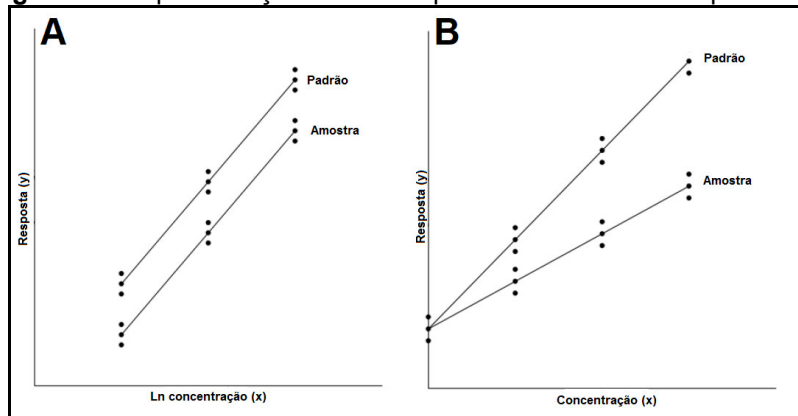
adaptado de (HELD, 2004).

Entretanto, o ensaio apresenta algumas limitações já mencionadas para o ensaio de MTT: a quantificação da potência é estimada de forma indireta, através da quantificação de ATP celular, que pode estar alterado em diversos casos, até mesmo na apoptose, ou ainda, no caso de aumento do estresse celular, há um aumento drástico na produção de ATP podendo produzir um resultado falso-positivo (ZAMARAEVA et al., 2005), produzindo assim uma errônea estimativa da potência.

#### 1.4.3.3. Análise estatística realizada em ensaios de potência preconizados nos compêndios internacionais

Para a estimativa da potência farmacológica relativa deste fármaco é considerada uma pré-condição em que as curvas do padrão e das amostras sejam paralelas, esta pré-condição é conhecida como teste de linhas paralelas ou teste de paralelismo, conforme demonstrado na **Figura 11**.

**Figura 11.** Representação de curvas paralelas e curvas não-paralelas.



No gráfico A é representado duas curvas paralelas, de um padrão e de uma amostra, que podem ser comparadas pelo teste de paralelismo, esta condição é melhor avaliada quando a concentração ou dose das substâncias é expresso em Ln. No gráfico B é representado duas curvas que não apresentam uma relação paralela e por este motivo não podem ser comparadas. *Adaptado de (PHARMACOEPIA, 2008).*



Neste teste é necessário que haja uma curva de concentração-resposta contendo um fator de diluição constante e a mesma apresente uma relação entre eixos no formato de potência ou logarítmica, onde a concentração é calculada como logarítmico, sendo assim, ambos os modelos de regressão logaritmo e potência podem ser utilizados para o ensaio de paralelismo (HAUCK et al., 2005), conforme mostrado no **Quadro 3**.

**Quadro 3.** Tipos de equações e suas transformações em regressão linear.

Tipo	Equação	Transformação	Variável X	Variável Y
Linear	$y = a + bx$	$y = a + bx$	x	y
Exponencial	$y = a \cdot e^{bx}$	$\ln y = \ln a + bx$	x	$\ln y$
Logarítmica	$y = a + b \cdot \ln x$	$y = a + b \cdot \ln x$	$\ln x$	y
Potência	$y = a \cdot x^b$	$\ln y = \ln a + b \cdot \ln x$	$\ln x$	$\ln y$

Adaptado de (SALAS, 2016)

O padrão e a amostra devem ser analisados no formato de curva na faixa linear de doses e comparados se ambas são paralelas, sendo o mecanismo chave deste ensaio a similaridade entre as curvas. Para avaliação do desvio vertical, é utilizado o valor de F, e então calculado a potência relativa do medicamento a ser testado baseado na potência do padrão (FLEETWOOD; BURSA; YELLOWLEES, 2015; GUARDABASSO; RODBARD; MUNSON, 1986; PHARMACOPEIA, 2008).

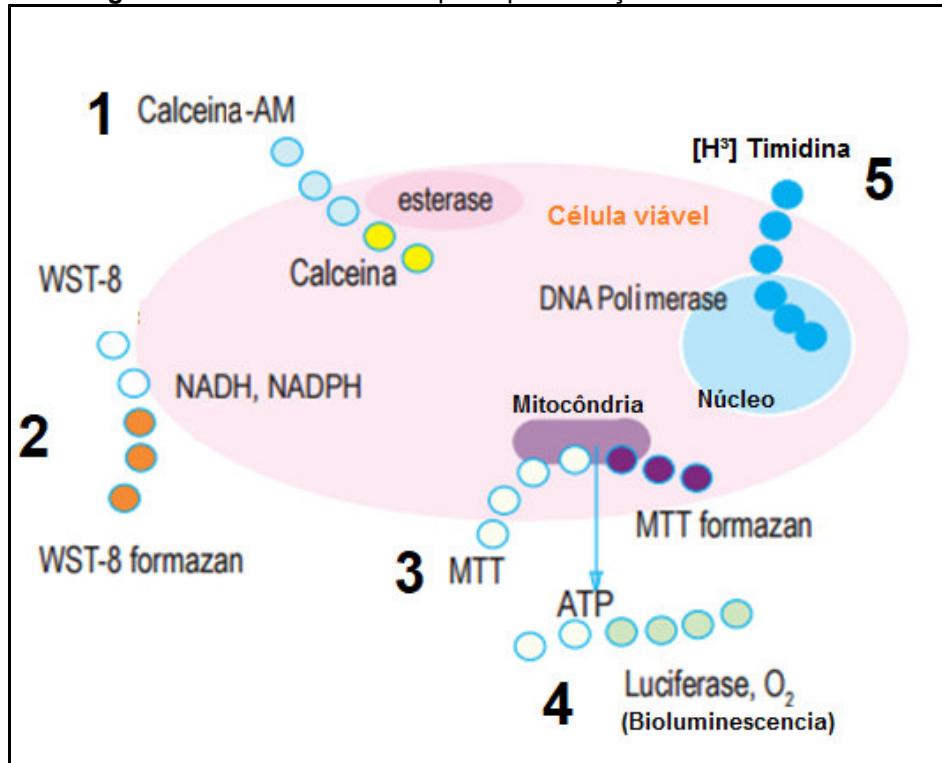
Porém, o ensaio de paralelismo utilizado como método estatístico para avaliar o ensaio de MTT e o ensaio da luciferase não é adequado para ensaios altamente seletivos, sendo assim, além do ensaio de MTT possuir problemas intrínsecos, a análise estatística deste ensaio também é descrita como falha, sendo usada tipicamente em ensaios com baixa seletividade (HAUCK et al., 2005; LIAO; TIAN; CAPEN, 2011).

#### 1.4.3.4. Ensaio alternativo para estimativa da potência do Filgrastim

Sendo o Filgrastim um medicamento que possui como principal mecanismo de ação a proliferação celular, diversos outros ensaios para avaliação da proliferação celular podem ser utilizados, como: Resarsurina, Timidina, BrdU

(Bromodesoxiuridina, um análogo da Timidina), MTS, Calceína, WST-8, entre diversos outros ensaios (LU; BERGELSON, 2014), exemplificados na **figura 12**.

**Figura 12.** Ensaios utilizados para quantificação de células viáveis.



Os ensaios representados na figura mostram técnicas que podem ser utilizadas para estimativa da proliferação celular. Em 1 é representado o ensaio com calceína em que esta substância entra no citoplasma celular e por ação de esterasas se torna fluorescente, sendo possível de mensuração por fluorimetria. Em 2 e 3 são representados os ensaios de WST-8 e MTT, ambos são baseados na transformação do sal tetrazólico pelo metabolismo celular e mensurados pela cor. Em 4 é apresentado o ensaio de bioluminescência em que é avaliada a respiração celular pela quantificação de ATP por luciferase. Em 5 é representado o ensaio com timidina tritiada, um intercalante de DNA incorporado somente em momentos de divisão celular, sendo assim, possível detectar as células que entraram em divisão pela radioatividade da timidina a elas incorporada. *adaptado de* (HELD, 2004).

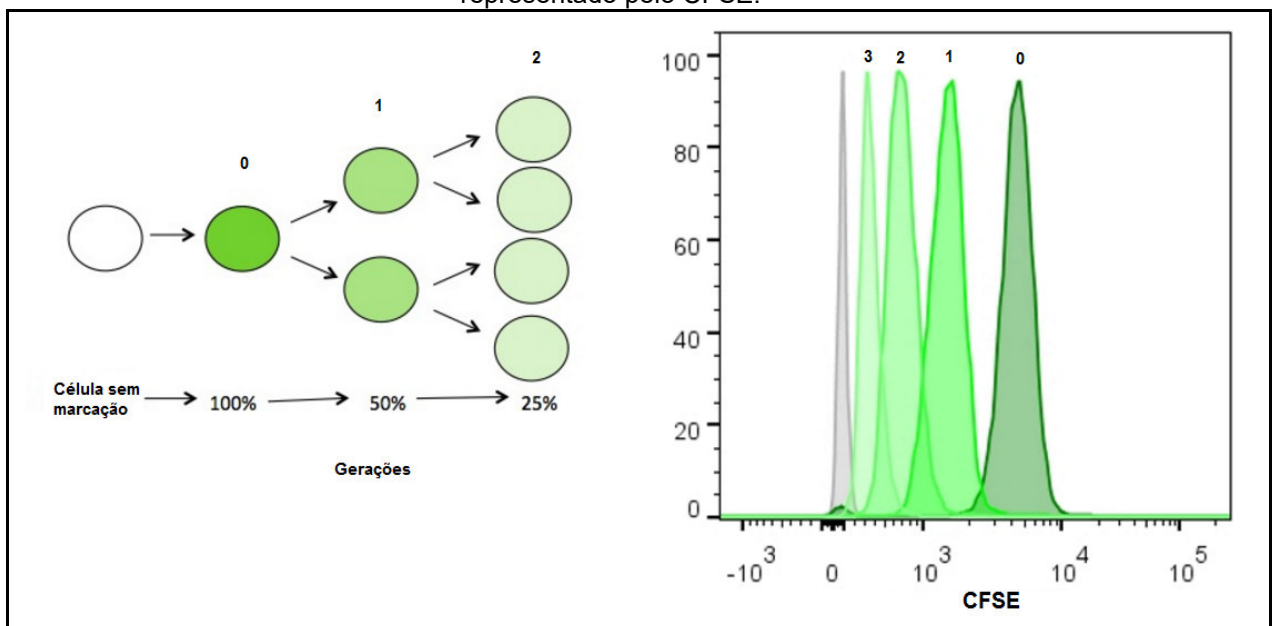
Dentre as diversas técnicas citadas, nenhuma delas é capaz de estimar o número de divisões realizadas pela célula, ou ainda o número de células totais finais após o estímulo de proliferação. Outros ensaios também podem ser utilizados para estimativa da potência farmacológica de um biofármaco baseando-se na ação farmacológica.

No caso do Filgrastim, o objetivo do ensaio é avaliar a proliferação celular, seu principal mecanismo de ação (PORAT et al., 2015). Sendo assim, poderia ser utilizado um ensaio por citometria de fluxo conhecido como ensaio de proliferação com CFSE (LYONS, 2000), este ensaio estima a quantificação da proliferação celular pelo método da diluição de corantes (LYONS; PARISH, 1994).

A técnica de citometria de fluxo permite a avaliação de características celulares como tamanho, granulosidade/complexidade e fluorescência, esta última, pode marcar a célula através de fluoróforos seletivos e assim diferenciar um perfil celular e/ou de resposta (WOO; BAUMANN; ARGUELLO, 2013).

O CFSE (*carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester*), um marcador intracelular direto de fluorescência verde, com excitação em 488 nm e emissão no canal FL1 (530/30), é um corante capaz de atravessar a membrana celular passivamente, e neste ambiente por ação de esterases presentes no citoplasma, se tornar fluorescente através da ligação a proteínas citoplasmáticas. Esta molécula pode ser utilizada para a avaliação da proliferação celular em diversas linhagens, sendo detectado em até 10 gerações de células filhas por citometria de fluxo, conforme exemplificado na **Figura 13**. Além de ser um marcador direto da proliferação celular, o mesmo não inviabiliza as células, ou seja, são quantificadas ainda viáveis (LYONS, 2000).

**Figura 13.** Representação do funcionamento da técnica de diluição de corantes, na figura representado pelo CFSE.



Na figura é representado a marcação de CFSE na célula como momento zero (0), com a divisão da célula, o corante também se divide, ficando mais diluído nas células geradas, a cada divisão celular, o corante se dilui mais, sendo assim, quanto maior o número de divisões, maior será o decaimento da fluorescência. *adaptado de* (SCHOOL OF LIFE SCIENCE, [s.d.]).

Assim como qualquer ensaio, o CFSE possui algumas questões que podem induzir ao erro na análise do resultado, como: excesso do corante pode levar a morte das células ou inviabilizar a análise no citometro pelo limite da fluorescência

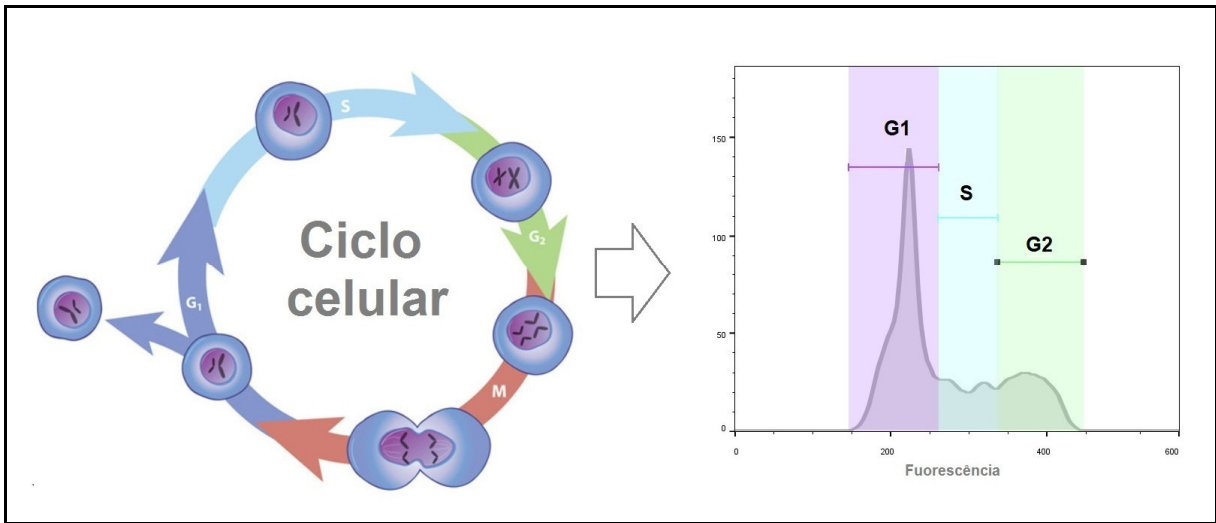
observada; excassez do corante pode resultar nas células geradas perderem completamente a fluorescência e ser impossível determinar as gerações nesta faixa com precisão; o CFSE decai naturalmente 24 – 36 h após a marcação, podendo perder a precisão do ensaio, entre outros problemas, mas que podem ser contornados com controles e titulação adequada, além disso as respostas ofertadas pelo uso deste corante apresentam diversas vantagens já relatadas (BUSHNELL, 2014).

Além do CFSE, outra marcação fluorescente também pode ser utilizada por citometria de fluxo para avaliação da proliferação celular, o iodeto de propídio (PI – *propidium iodide*). O iodeto de propídio é uma substância de fluorescência laranja/vermelha capaz de intercalar com DNA e RNA quando a célula está permeabilizada, e por este motivo tem sido utilizado na citometria de fluxo para quantificações relacionadas diretamente com a quantidade de material genético. Sendo assim, pode ser utilizado para determinação do ciclo celular, diretamente relacionado com a proliferação celular, quantificação da apoptose, entre outros fatores (DEITCH; LAW; WHITE, 1982; NICOLETTI et al., 1991; NUNEZ, 2001; ORMEROD, 2002).

O ciclo celular de uma célula eucariótica é dividido em 4 fases: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M, sendo S a fase de síntese de DNA e a fase M a fase de mitose. O PI como intercalante de DNA é capaz de diferenciar estas fases na citometria de fluxo, indicando em que etapa da replicação do DNA estão as células, conforme exemplificado na **Figura 14** (ALBERTS et al., 2010b).

Em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> são as células que apresentam DNA não replicado, em S encontram-se as células que apresentam uma quantidade de DNA intermediário, ou seja, em fase de replicação, e finalmente em G<sub>2</sub>/M estão as células que possuem um complemento de DNA completamente replicado, e por isto, as células nessa fase possuem maior intensidade de fluorescência do que as células nas fases anteriores, **Figura 14** (ALBERTS et al., 2010b).

**Figura 14.** Representação da marcação do Iodeto de propídio e a visualização do ciclo celular.



Adaptado de (SZE et al., 2013) e autoria própria.

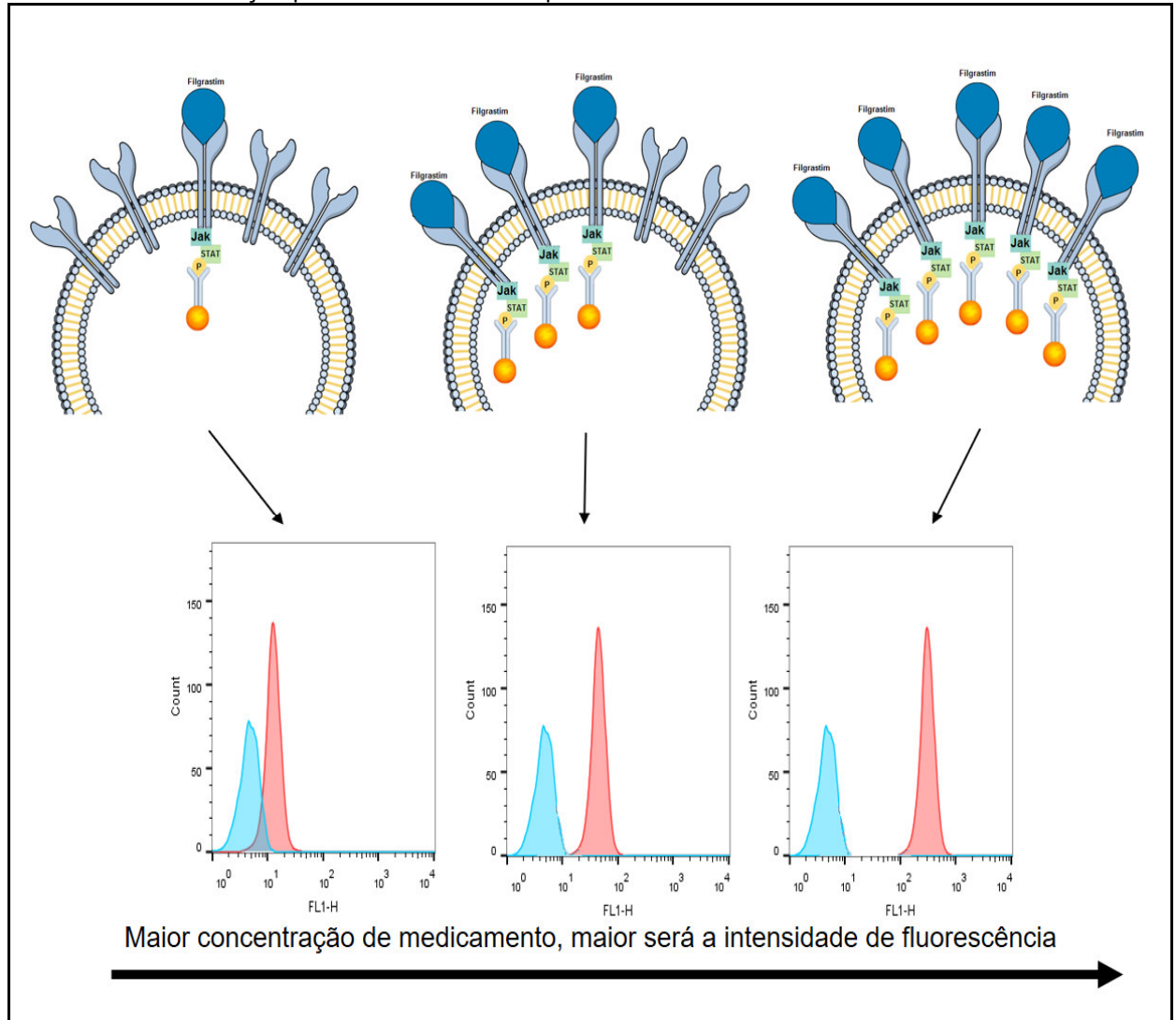
As limitações da marcação com PI incluem o erro de interpretação e análise, pois é descrito que a população sub-G<sub>1</sub> seria reconhecida como apoptótica e muitas vezes podem ser células em outros estágios celulares, dependendo da linhagem celular utilizada que não a apoptose. Além disso, a exclusão de células que foram quantificadas como apenas uma (*doublets*) é essencial para uma análise correta dos resultados, caso contrário, seria um falso-positivo para células em fase G<sub>2</sub> (MATTES, 2007; SHAPIRO, 2003). Como o PI é um intercalante de DNA e RNA, o uso de RNases para eliminar interferentes de RNA é necessário. A marcação incorreta de RNA pode resultar em falso-positivo quase que em todas as fases (RIEGER et al., 2011). Um correto estudo do protocolo da utilização e interpretação deste marcador podem minimizar e até eliminar estes tipos de erros.

Também por citometria de fluxo é possível avaliar a ativação do receptor farmacológico do Filgrastim, o receptor de G-CSF. Quando a ligação do biofármaco acontece com o receptor, o mesmo é ativado e gera uma cascata de sinalização intracelular específica, já descrita anteriormente (*item 1.4.2*).

Existem anticorpos capazes de marcar diferentes moléculas da via de ativação deste receptor, e como descrito, a via preferencial é das Janus-cinases, desta forma a marcação de STAT3 fosforilada e STAT5 fosforilada poderia ser utilizada para determinar a potência através da ativação do receptor, onde quanto maior o número de ligações ao receptor de G-CSF, maior seria o número de STATs

fosforiladas e com a marcação específica com anticorpos fluorescentes, maior seria a intensidade de fluorescência, representados na **figura 15**.

**Figura 15.** Representação da marcação com anticorpos específicos para STATs e a visualização da marcação por citometria de fluxo pela sua intensidade de fluorescência.



Autoria própria.

Método similar já foi descrito pelo nosso grupo anteriormente para outro biofármaco, o Interferon, onde pela ativação do receptor, foi possível estabelecer uma curva concentração-resposta pela marcação de STAT1 fosforilada (DE OLIVEIRA et al., 2012). Ademais, a citometria de fluxo é uma técnica mais refinada e específica quando comparada com o ensaio de MTT, atualmente padronizado por compêndios internacionais.

#### 1.4.3.5. O uso de linhagens celulares para estimativa da potência

Diversas linhagens celulares são responsivas ao G-CSF. Exemplos de tais linhagens são: M-NFS-60, GNFS-60, AML-193, WEHI-3B, HL-60 e Kasumi-1. Dentre as linhagens descritas, a linhagem sugerida mais empregada nos ensaios de potência vem sendo a M-NFS-60 (ATCC No. CRL-1838).

A linhagem M-NFS60 é de origem murina com características de linfoblasto e seu tipo celular é vírus induzida, se apresenta na cultura em suspensão e é conhecida pela sua responsividade ao G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IFN e IL-3 (NOVAK et al., 1996). No entanto, uma desvantagem observada no uso desta linhagem é a necessidade da suplementação de um meio condicionado a 10% de soro fetal bovino associado a citocinas, como M-CSF (*Macrophage - colony-stimulating factor*) na cultura de manutenção. Esta necessidade de suplementação com M-CSF pode gerar um interferente no ensaio de potência do G-CSF, pois esta citocina adicionada também tem potencial de estimular a proliferação celular, levando a variações no padrão de resposta proliferativo de acordo com o número de passagens (ASOU et al., 1991; DEFREES et al., 2006; HONG et al., 2006), além disso, o uso de uma citocina como esta eleva os custos de manutenção da cultura desta linhagem.

A linhagem Kasumi-1(ATCC No. CRL-2724), isolada de uma leucemia mielóide aguda humana, com características e tipo celular de mieloblasto, apresenta resposta proliferativa frente diversas citocinas: IL-3, IL-6, GM-CSF e G-CSF. Diferentemente do que é observado com as linhagens derivadas da M-NFS-60, a Kasumi-1 apresenta algumas vantagens a serem destacadas como: a responsividade ao G-CSF; não requer a presença de nenhuma citocina adicionada ao meio para seu crescimento/manutenção; requer condições mínimas de manutenção celular; é de origem humana (ASOU et al., 1991). Chandavarkar e colaboradores (2009) validaram o uso desta linhagem como uma alternativa segura para realização do bioensaio *in vitro* de potência do G-CSF pela técnica do MTT, Alamar Blue e ensaio da lactato desidrogenase (CHANDAVARKAR et al., 2009).

Ainda, nos últimos anos foram recebidas denúncias no INCQS a cerca da qualidade de 2 biomedicamentos que contém o princípio ativo do Filgrastim, sendo um deles recolhido e suspenso pela ANVISA por desvios na qualidade do produto de acordo com a Resolução nº 2063 de 2016. A falta de documentação comprobatória de qualidade também suspendeu a importação da empresa Shandong Kexing Bio-

Products Co. Ltda. A falta de métodos para controle de qualidade deste produto inviabiliza ações de controle e ações fiscais a cerca deste produto no Brasil (BRASIL, 2016).

Considerando a missão institucional do INCQS na vigilância sanitária e diante dos fatos expostos, o estabelecimento do método oficial para controle de qualidade biológico do Filgrastim no Instituto é de extrema relevância. O desenvolvimento de métodos alternativos ao ensaio preconizado pelos compêndios oficiais utilizando a citometria de fluxo, poderá fornecer resultados mais precisos do que os ensaios utilizados atualmente. Além disso, o uso de uma linhagem celular humana mimetizaria melhor o efeito farmacológico do fármaco no organismo humano, além de possuir uma manutenção menos onerosa por não requerer uso de citocina (M-CSF) da mesma classe que o biofármaco estudado.



## 2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e padronizar uma metodologia *in vitro* alternativa aos métodos já descritos na literatura, para avaliação da potência do medicamento Filgrastim através da proliferação celular e ativação do receptor.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer, padronizar e otimizar o ensaio de potência por MTT para o medicamento Filgrastim seguindo a Farmacopeia Européia em linhagem celular murina (M-NFS-60). Desenvolver o mesmo teste utilizando a linhagem celular humana (Kasumi-1).

Desenvolver e estabelecer ensaio de proliferação celular por CFSE para células M-NFS- 60 e Kasumi-1 para avaliação de forma direta, a proliferação celular em resposta ao medicamento Filgrastim.

Desenvolver e estabelecer ensaio de ciclo celular com iodeto de propídio por citometria de fluxo para células M-NFS- 60 e Kasumi-1 para avaliação de forma direta a proliferação celular em resposta ao medicamento Filgrastim;

Desenvolver e estabelecer ensaio de ativação do receptor farmacológico (G-CSFR) para o Filgrastim através da avaliação da sinalização do receptor celular em células M-NFS-60 e Kasumi-1, avaliando a fosforilação de STAT3 e STAT5;

Comparar os diferentes ensaios e linhagens a fim de avaliar as melhores respostas para triagem de possíveis ensaios candidatos a quantificação da potência farmacológica do biofármaco Filgrastim;

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. FILGRASTIM UTILIZADO E MEIOS DE CULTURA

No Brasil, o medicamento Granulokine<sup>®</sup> fabricado pela Roche (AMGEN internacional) é considerado o medicamento de referência contendo o biofármaco Filgrastim, e por este motivo, foi utilizado como padrão nesta dissertação devido à ausência de um padrão internacional, sendo assim possível a realização da padronização dos ensaios descritos a seguir.

O Granulokine<sup>®</sup> utilizado neste trabalho veio no formato de seringa contendo 30 milhões de unidades internacionais ou 300 microgramas de Filgrastim. Os excipientes descritos pelo fabricante foram: hidróxido de sódio, ácido acético glacial sorbitol, polissorbato 80 e água para injeção.

A solução contendo Filgrastim pode ser expressa em unidades internacionais (UI) ou em unidades de peso (como micrograma ou nanograma), visto que a cada 100.000 UI se tem 1 µg de Filgrastim e que o medicamento referência e biossimilar são rotulados na forma de unidades em peso, foi optado nesta dissertação o uso das unidades em unidades internacionais (UI) e em nanogramas (ng), sendo 800 UI/mL correspondente a 8 ng/mL (AMGEN, 2016).

Durante todos os ensaios foi utilizado o medicamento de referência, este, foi obtido através da compra com verba própria em farmácia especializada em bioprodutos através da apresentação de documento oficial do INCQS solicitando a autorização de compra para o estudo.

Para ambas as linhagens o meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (R6505 Sigma-Aldrich, Alemanha) (pH 7,2 – pH 7,4) suplementado com 100 mg/mL de penicilina e 100 UI/mL de estreptomicina (Gibco, Estados Unidos), 2,5 g/L de glicose (G7021 Sigma-Aldrich, Alemanha), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (58875 Sigma-Aldrich, Alemanha), 2,383 g/L de HEPES (H3375 Sigma-Aldrich, Alemanha) e 0,11 g/L de piruvato de sódio. Este meio foi considerado como “meio RPMI base”, visto que cada linhagem necessita de uma suplementação adicional diferente da outra linhagem.

### 3.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

As linhagens utilizadas foram: M-NFS-60 (ATCC CRL-1838), de origem murina e preconizada pela Farmacopeia Europeia para o ensaio de potência do medicamento Filgrastim. A linhagem Kasumi-1 (ATCC CRL-2724), de origem humana responsiva a esta citocina, sendo assim uma célula promissora para utilização neste ensaio. Ambas as linhagens foram utilizadas até a 15<sup>o</sup> passagem, após este período não foram realizados ensaios e por este motivo se desconhece a responsividade destas linhagens.

Ambas as linhagens certificadas foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), com teste para micoplasma negativo. Para padronização do cultivo das linhagens, uma avaliação da viabilidade e percentual de células mortas foi realizada através da contagem microscópica das células em campo claro no aumento de 400x em câmara de Neubauer e o corante de viabilidade celular azul de tripan na concentração 1:1 em PBS estéril no decorrer dos dias considerados ideais para repique celular de cada linhagem e extrapolando para dias seguintes após o cultivo (STROBER, 2001).

#### 3.2.1. Linhagem M-NFS-60

A linhagem M-NFS-60 certificada, obtida através BCRJ, foi mantida em cultivo através de passagens em meio RPMI base suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino) (Gibco, Estados Unidos), 0,05 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e 60 ng/mL de M-CSF (*Macrophage- Colony Stimulating Factor*) (Sigma-Aldrich, Alemanha) em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> com densidade inicial de  $2,5 \times 10^4$  células/mL e mantidas até obtenção da concentração celular ideal para os ensaios (PHARMACOPEIA, 2014), sendo recomendado pelo fornecedor de 3 a 4 dias o repique.

Para fins de controle, foram realizadas contagens nos dias posteriores ao repique celular, ou seja, dias que as células estiveram em cultura: Dia 1 (D1), Dia 2 (D2), Dia 3 (D3), Dia 4 (D4) e Dia 6 (D6).

Para a contagem das células e posterior realização dos experimentos, a suspensão celular foi centrifugada a 160 x g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI base.

### 3.2.2. Linhagem Kasumi-1

A linhagem Kasumi-1 certificada, obtida através do BCRJ, foi mantida em cultivo através de passagens em meio RPMI base suplementado com 20% de SFB (Gibco, Estados Unidos) e 0,3 g/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich, Alemanha) em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> com concentração inicial de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL e mantidas até obtenção da concentração celular ideal para os ensaios (ASOU et al., 1991; KLIMENKO; SHTILMAN, 2013), sendo recomendado de 5 a 7 dias o repique, mantendo a densidade entre 1 x 10<sup>5</sup> células/mL e 1 x 10<sup>6</sup> células/mL e a cada 2 dias a adição de 1 mL de meio de cultura na garrafa.

Para fins de controle, foram realizadas contagens nos dias posterior ao repique celular, ou seja, dias que as células estiveram em cultura: Dia 1 (D1), Dia 2 (D2), Dia 3 (D3), Dia 4 (D4) e Dia 7 (D7).

Para a contagem das células e posterior realização dos experimentos, a suspensão celular foi centrifugada a 250 x g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura.

## 3.3. OTIMIZAÇÃO DA CULTURA CELULAR

Ambas as linhagens utilizadas neste estudo necessitam de suplementação excepcional para seu cultivo e manutenção, por este motivo, foram realizados ensaios com ajustes na forma de cultivo e avaliação da viabilidade e resposta ao ensaio de potência em comparação com as condições recomendadas. As comparações com as condições estabelecidas pelo fornecedor foram feitas através da avaliação da viabilidade.

### 3.3.1. Linhagem M-NFS-60

Nesta linhagem, foram utilizadas 2 condições teste: a linhagem suplementada com 12 ng/mL de M-CSF e como controle, um outro grupo cultivado apenas com meio de cultura, ou seja, sem M-CSF (Meio RPMI base suplementado com 10% SFB e 0,05 mM de β-mercaptoetanol). Os demais procedimentos para cultivo desta linhagem foram mantidos como descritos no item 3.2.1.

Ainda, se a sobrevivência se apresentou superior a 80%, as células com as condições alteradas foram avaliadas se estas condições alterariam a resposta das células no ensaio de potência com Filgrastim.

### 3.3.2. Linhagem Kasumi-1

Na linhagem Kasumi-1, foram utilizadas 3 condições teste: cultivada com 10% de SFB, cultivada com 5% de SFB e como controle, um outro grupo cultivado apenas com meio de cultura, ou seja, 0% de SFB (Meio RPMI 1640 base) foi utilizado. Os demais procedimentos para cultivo desta linhagem foram mantidos como descritos no item 3.2.2.

Ainda, se a sobrevivência se apresentou superior a 70%, as células com as condições alteradas foram avaliadas se estas condições alterariam a resposta das células no ensaio de potência com Filgrastim.

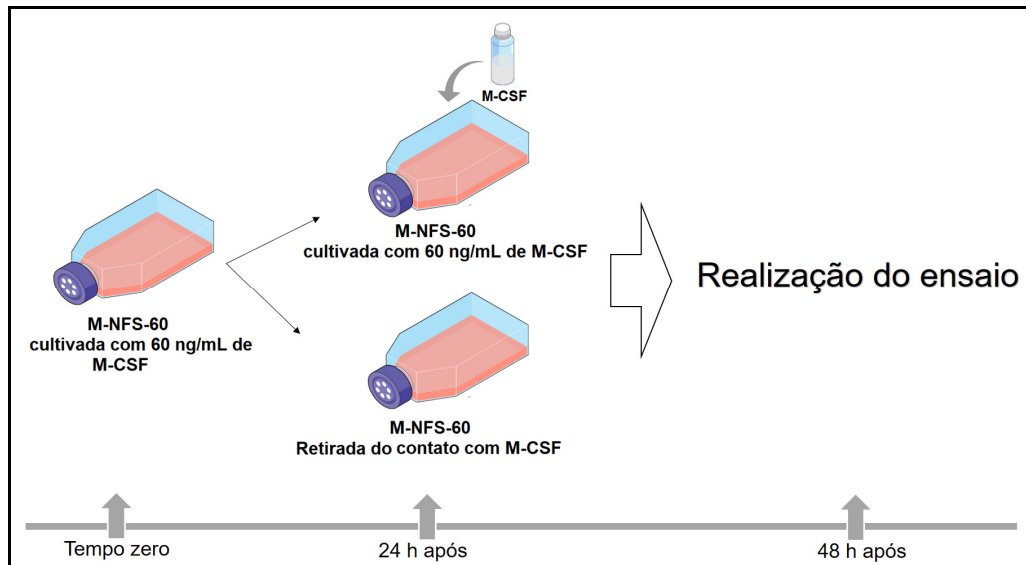
## 3.4. ENSAIO DE MTT

O ensaio de MTT foi baseado no ensaio que faz parte do controle de qualidade biológico validado que consta na monografia do Filgrastim da Farmacopéia Européia (PHARMACOPEIA, 2014). Para cada linhagem celular, foram utilizadas diferentes condições experimentais, descritas abaixo.

### 3.4.1. Condições experimentais com a linhagem M-NFS-60

A densidade de células para este ensaio segundo a Farmacopéia Européia é de  $3,5 \times 10^5$  células/ mL. Para realização do ensaio, foram testadas duas condições: as células utilizadas foram retiradas diretamente da cultura, ou seja, mantidas em cultivo com a suplementação de M-CSF de forma contínua; e as células retiradas do contato com a citocina M-CSF por 48 h e mantidas em meio sem citocinas por 24 h, ou seja, privadas de M-CSF por 24 h, conforme apresentado na **Figura 16**. A influência da retirada da citocina foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e ANOVA da regressão. A concentração de citocina M-CSF (12 ng/mL) utilizada no cultivo na da linhagem também foi avaliada e comparada com a concentração recomendada (60 ng/mL de M-CSF).

**Figura 16.** Representação esquemática da avaliação da influência da citocina M-CSF no ensaio de MTT.



Autoria própria.

#### 3.4.2. Condições experimentais com a linhagem Kasumi-1

A concentração de células para este ensaio foi determinada através de ensaios pilotos. Foram testadas as densidades:  $1 \times 10^4$  células/mL ( $10^3$  células/poço);  $1 \times 10^5$  células/mL ( $10^4$  células/poço);  $5 \times 10^5$  células/mL ( $5 \times 10^4$  células/poço) e  $1 \times 10^6$  células/mL ( $10^5$  células/poço). A avaliação da melhor densidade foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Neste ensaio descrito no compêndio, células devem ser adicionada a placa de cultivo de 96 poços (área de  $0,33 \text{ cm}^2$  por poço) em um volume de  $100 \mu\text{L}$  e expostas ao Filgrastim (Granulokine®) para construção de uma curva concentração-resposta com concentração inicial em  $800 \text{ UI/mL}$  ou  $8 \text{ ng/mL}$  e 9 diluições subsequentes com fator de diluição de 1:2 através de uma diluição seriada, completando o volume de  $200 \mu\text{L}$  por poço.

Após a adição das células e do medicamento, a placa de 96 poços de fundo chato deve ser colocada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  por 48 h. Os poços presentes na borda da placa foram preenchidos com  $200 \mu\text{L}$  de PBS estéril.

Após 48 horas de ensaio, foi adicionado à placa  $20 \mu\text{L}$  da solução de MTT (Sigma-Aldrich, Alemanha) na concentração de  $5 \text{ mg/mL}$  em PBS estéril, volume equivalente a 10% do volume total do poço.

Depois de 4 h em contato com a solução de MTT a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, as células metabolizaram o sal em cristais insolúveis roxos. A placa foi lavada 2x com 150 µL de PBS para retirada do sobrenadante, e posteriormente os cristais foram solubilizados com 200 µL de uma solução ácida-álcoólica (0,05 M HCl em Isopropanol) (DE OLIVEIRA, 2010) e mensurados em espectrofotômetro Versa max da Molecular devices no comprimento de onda de 570 nm, sendo o resultado expresso em densidade ótica (D.O.).

A placa utilizada no ensaio foi de 96 poços estéril com tampa para cultura de células, em fundo chato sem nenhum tratamento. Todas as amostras foram analisadas em quatro réplicas, sendo necessário para o ensaio descrito na farmacopéia apenas em três réplicas.

### 3.5. QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO COM CFSE

Este ensaio foi baseado no trabalho de Lyons (2000). O ensaio foi realizado com apenas 5 pontos da curva estipulada na Farmacopéia Européia, sendo os pontos 800 UI/mL, 200 UI/mL, 50 UI/mL, 12,5 UI/mL e 3,125 UI/mL, além disso, foram utilizados como controle: células sem marcação e células marcadas com CFSE sem estímulo afim de verificar a proliferação natural da linhagem.

Após a contagem celular (realizada conforme *item* 3.2), foi calculado a quantidade de células necessárias para o experimento. A quantidade de células necessária de cada linhagem foi a mesma utilizada no ensaio de MTT, sendo 3,5 x 10<sup>5</sup> células/ mL para a linhagem M-NFS-60 e 1 x 10<sup>6</sup> células/ mL para a linhagem Kasumi-1.

As células foram lavadas com PBS na proporção de 10x o volume de *pellet* e ressuspensas em uma solução contendo CFSE (Molecular Probes, Estados Unidos) e incubadas a 37°C durante 30 minutos (min) ao abrigo da luz.

Após este período de incubação (30 min), as células foram centrifugadas a 160 x *g* e lavadas com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB na proporção de 10x o volume de *pellet* para interrupção da marcação do CFSE.

O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em meio RPMI de acordo com as necessidades de cada linhagem e adicionadas a placa de 96 poços junto ao medicamento em diferentes concentrações (LYONS,

2000), além disso, foram realizados controles da proliferação natural da linhagem, ou seja, sem adição do medicamento.

A avaliação da proliferação celular foi realizada em 24 e 48 horas após incubação das células com Filgrastim. Após o período de incubação, as células foram retiradas dos poços e colocadas em tubos apropriados para o citômetro. A aquisição dos dados foi realizada no equipamento de citometria de fluxo FACScalibur em 530/30 nm.

### 3.6. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO COM IODETO DE PROPÍDIO

Este ensaio foi baseado no trabalho de De Oliveira (2013). Para a análise da proliferação celular foi realizado o ensaio com a marcação com iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich, Alemanha).

O ensaio em forma de curva foi realizado utilizando as seguintes concentrações de Filgrastim: 800 UI/mL, 200 UI/mL, 50 UI/mL, 12,5 UI/mL e 3,125 UI/mL, além disso, foram utilizados como controle: células sem marcação e células marcadas com PI sem estímulo afim de verificar o ciclo celular normal de cada linhagem. As células foram incubadas por 48 h com o medicamento em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A concentração celular utilizada foi a mesma nos ensaios de MTT para cada linhagem celular, sendo 3,5 x 10<sup>5</sup> células/ mL para a linhagem M-NFS-60 e 1 x 10<sup>6</sup> células/ mL para a linhagem Kasumi-1.

Em seguida, as células foram lavadas com 400 µL de PBS e ressuspensas em 200 µL de etanol 70° gelado (de 0°C a 7°C) por 1 h em geladeira (de 0°C a 7°C), para permeabilização das células.

Em seguida, as células foram lavadas 2x com 400 µL de PBS, o sobrenadante foi descartado e a ele foram adicionados 100 µL de Ribonuclease a 100 µg/mL sem DNase por 10 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Para marcação do DNA, 400 µL de iodeto de propídio a 50 µg/mL em PBS foram adicionados as amostras 30 min antes da aquisição (DE OLIVEIRA et al., 2013).

As células foram retiradas dos tubos tipo *ependorf* e colocadas em tubos apropriados para o citômetro. A aquisição dos dados foi realizada no equipamento de citometria de fluxo FACScalibur em 630/22 nm.



### 3.7. ENSAIO DE ATIVAÇÃO DO RECEPTOR COM MARCAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO STAT3 E STAT5 FOSFORILADAS

Este ensaio foi baseado no trabalho de De Oliveira (2013). Os anticorpos utilizados nesta dissertação possuem fluorescência PE da marca BD e por isso foram utilizados em amostras separadas. Os anticorpos utilizados foram Anti-STAT3 fosforilada pY705 mouse IgG2a e Anti-STAT5 fosforilada pY694 mouse IgG1.

Ainda, para avaliação da efetividade do bloqueio de marcações inespecíficas, foi utilizado um anticorpo PE isotipo controle IgG1 frente a cada uma das marcações.

Para a análise de ativação do receptor em cada linhagem celular, as células foram inicialmente estimuladas com apenas 800 UI/mL de Filgrastim para determinação do tempo de ativação de cada fator de transcrição. Os tempos observados de contato com o medicamento foram: 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A concentração de células utilizadas foi de 7 x 10<sup>5</sup> células/ mL para ambas linhagens.

Após a determinação do tempo ideal para cada linhagem, foi realizado o ensaio em forma de curva com 5 pontos: 800 UI/mL, 200 UI/mL, 50 UI/mL, 12,5 UI/mL e 3,125 UI/mL.

Além disso, foram utilizados como controle: células sem marcação e células marcadas com os anticorpos anti-STAT3 e anti-STAT5 fosforiladas (anti-STAT3p e anti-STAT5p) sem estímulo, afim de verificar o status da ativação basal de cada linhagem e a partir destas foi criado o *gate* para verificação de positividade das amostras em curva. O ponto de “corte” para o estabelecimento das células positivas para STATs foi com base na expressão basal destas nas linhagens celulares não estimuladas com Filgrastim.

Após a incubação com o medicamento, as células foram lavadas com 200 µL de PBS e fixadas com 200 µL de uma solução de 2% de paraformaldeído por 10 min. Novamente as células foram lavadas com 200 µL de PBS e ressuspensas em 200 µL de metanol 100% gelado (de -20°C a 0°C), para permeabilização de membrana por 10 min em banho de gelo.

Em seguida, foram adicionados 600 µL da solução bloqueadora (0,3% de BSA, 0,02% de azida sódica em PBS) para bloqueio de marcações inespecíficas e incubadas por 10 min a temperatura ambiente.

As células foram lavadas e ressuspensas nos respectivos anticorpos, uma amostra para cada marcação (Anti- pSTAT3 e Anti-pSTAT5), utilizando 5  $\mu$ L de cada anticorpo (segundo bula do fabricante) e incubadas por 30 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz (DE OLIVEIRA et al., 2013).

Após o período de incubação, as células foram retiradas dos tubos tipo *ependorf* e colocadas em tubos apropriados para o citômetro. A aquisição dos dados foi realizada no equipamento de citometria de fluxo FACScalibur em 585/42 nm.

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, todos os dados foram submetidos a um teste para verificação de valores discrepantes (*outliers*), quando a probabilidade máxima é de 99,7% os valores estarão a 3 desvios-padrão da média dos resultados, logo, foram considerados valores discrepantes os que alteravam a média significativamente, com variação de Z (resíduo estudentizado)  $\pm 3$ . Quando era observado a existência de valores discrepantes, estes eram retirados, sendo considerados como um desvio de qualidade na realização do ensaio. Se em um mesmo ensaio apresentasse mais de 30% das amostras com valores discrepantes, o ensaio era considerado inválido.

Além disso, foi avaliado se os dados apresentavam tendência a normalidade, através do teste estatístico de Shapiro-Wilk, quando o p-valor é superior a 0,05 a normalidade não é rejeitada, sendo assim, os dados seriam analisados como dados paramétricos (LOPES; CASTELO-BRANCO; SOARES, 2013). Caso apresentassem p-valor inferior a 0,05, os dados eram considerados não-normais e seriam analisados como dados não-paramétricos. As análises de citometria por apresentarem dados na forma de histograma, foram considerados como dados normais.

De acordo com cada desenho experimental, os ensaios possuíram uma análise estatística diferenciada de acordo com a sua metodologia e descritos nos itens a seguir.

#### 3.8.1. Padronização e otimização do cultivo das linhagens celulares

Os resultados da viabilidade celular foram calculados e apresentados em células viáveis ou mortas em:  $10^4$  por mL. Foi calculada a taxa de multiplicação celular ( $r$ ), que consiste em uma constante 3,32 multiplicada pelo logarítmico ( $\log$ ) do número de células no tempo determinado ( $N_h$ ) subtraído pelo  $\log$  do número de células iniciais, estes são divididos pelo tempo  $N$  menos o tempo inicial, com **Equação 1** abaixo.

**Equação 1.** Equação da taxa de multiplicação celular ( $r$ ).

$$r = 3,32 * \frac{(\log N_h - \log N_i)}{(t_2 - t_1)}$$

(PERES; CURI, 2005)

O tempo de dobramento (PDT – *population doubling time*) também foi calculado para cada linhagem, que consiste em 1 sobre a taxa de multiplicação celular, calculado conforme apresentado na **Equação 2**.

**Equação 2.** Equação do tempo de dobramento (PDT).

$$PDT = \frac{1}{r}$$

(PERES; CURI, 2005)

A taxa de multiplicação celular e o tempo de dobramento foram baseados em Peres e Curi (2005). Ainda, foram calculadas as razões entre o número de células vivas pelo número de células mortas e as razões entre os dias, calculados conforme a **Equação 3**.

**Equação 3.** Equações de razão.

$$\text{Razão} = \frac{N^{\circ} \text{ céls vivas}}{N^{\circ} \text{ céls mortas}}$$

$$\text{Razão} = \frac{N^{\circ} \text{ céls vivas ou mortas } D_x}{N^{\circ} \text{ céls vivas ou mortas } D_1}$$

Os softwares utilizados para análise estatística e esboço dos gráficos foram Microsoft Excel versão 2016 e GraphPad Prism versão 5.

A comparação entre grupos de interesse, o efeito da variação do tratamento e da variação dos dias, foi analisada através do teste estatístico *Two-way* ANOVA medidas repetidas, para verificar a existência de uma interação significativa entre as variáveis tempo e tratamento da linhagem (12 ng/mL ou 60 ng/mL de M-CSF para a linhagem M-NFS-60 e 5% de SFB, 10% de SFB e 20% de SFB para a linhagem Kasumi-1).

Se os dados apresentassem correlação significativa ( $p < 0,05$ ) de que alguma das variáveis (tempo ou tratamento ou ambas) tem influência nos dados obtidos, um teste *One-Way* ANOVA medidas repetidas deve ser realizado para verificar a diferença entre os grupos observando apenas uma variável, como o tempo, ou seja, seria comparada a diferença entre os grupos apenas em um dos dias. As análises foram realizadas tanto entre as células vivas quanto entre as células mortas de todos os grupos, conforme **Equação 3**.

Os softwares utilizados para análise estatística e esboço dos gráficos aqui apresentados foram Microsoft Excel versão 2016, IBM SPSS Statistics versão 22 e GraphPad Prism versão 5.

### 3.8.2. Ensaio de MTT

O ensaio deve ser padronizado atendendo aos critérios da Farmacopeia Européia e estabelecidos pela autora, sendo eles: desvio-padrão inferior a 0,2 entre as replicatas e  $R^2$  superior a 0,6. Além disso, a ANOVA da regressão deve ser significativa e o coeficiente de variação entre os diferentes experimentos deve ser inferior a 50% (WHO, 1997) para o ensaio ser considerado válido.

#### 3.8.2.1. Padronização do ensaio de MTT

Para cada linhagem utilizada, foi necessária a padronização do ensaio, como: número de células, utilização da citocina M-CSF e concentração da citocina M-CSF.

Foram avaliados os seguintes critérios para o estabelecimento da melhor relação na regressão entre a resposta e a concentração: maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e ANOVA da regressão significativa ( $p$ -valor $<0,05$ ). A

padronização que atendesse a estes critérios, seguiria adiante nos experimentos seguintes. Os gráficos foram apresentados pela razão entre a densidade ótica (D.O.) das amostras em curva pela D.O. do controle negativo, apresentado na **Equação 4** abaixo.

**Equação 4.** Equações de razão de D.O.

$$\text{Razão} = \frac{\text{média da D. O. amostra}}{\text{média da D. O. controle negativo}}$$

### 3.8.2.2. Realização do ensaio de MTT

Os ensaios de MTT foram realizados em forma de curva com diluição 1:2 iniciando a curva em 800 UI/mL, com 10 pontos de diluição em quadriplicata. Além dos critérios anteriormente estabelecidos como maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) em modelos de regressão válidos (como potência ou logarítmico) e ANOVA da regressão significativa ( $p\text{-valor} < 0,05$ ), foram realizadas análises do desvio-padrão (inferior a 0,2), se as inclinações das retas eram semelhantes, desvio de linearidade que deve se apresentar não significativo entre os experimentos e coeficiente de variação entre os experimentos independentes (CV%) inferior a 50%. Esta análise foi feita com no mínimo 3 experimentos independentes para determinar a relação a ser escolhida.

A inclinação da reta de cada curva foi analisada num gráfico de controle de ensaio, onde foi calculada a média e os limites superiores e inferiores, apresentados na **Equação 5**, sendo necessário previamente o cálculo da média das inclinações das retas e o desvio-padrão ( $\sigma$ ) entre elas.

**Equação 5.** Equações de limites superiores e inferiores para o gráfico de controle

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

$$\text{LCS} = \text{Média} + 3 * \sigma_{\bar{x}}$$

$$\text{LCI} = \text{Média} - 3 * \sigma_{\bar{x}}$$

(MONTGOMERY, 2009)

A apresentação dos resultados foi através da razão entre a D.O. observada na curva pela D.O. observada no controle (célula sem estímulo com o medicamento). O eixo X dos gráficos, foram apresentados na forma de Ln da concentração do medicamento em UI/mL.

Os softwares utilizados para análise estatística e esboço dos gráficos aqui apresentados foram Microsoft Excel versão 2016, IBM SPSS Statistics versão 22 e GraphPad Prism versão 5.

### 3.8.3. Ensaio de proliferação com CFSE

Foram adquiridos no citômetro 5000 eventos de cada amostra para análise estatística. Em cada análise, as amostras não estimuladas e marcadas com CFSE foram consideradas como controles, tanto no primeiro dia de marcação (D0), para avaliar o decaimento da fluorescência, quanto no dia do ensaio para avaliação da proliferação normal celular (D24 h e D48 h). As células sem marcação de CFSE foram utilizadas como controle de fluorescência basal celular.

A avaliação do melhor dia para o ensaio foi realizada utilizando como critério a maior e melhor diferença observada entre os grupos avaliados.

Sendo uma linhagem celular, a divisão das células ocorre de forma homogênea e por este motivo não é possível a estimação da proliferação por medição dos picos de divisão. A avaliação da concentração-resposta da proliferação foi avaliada através da média geométrica de fluorescência (MG).

Para comparação entre os grupos foi calculada a razão entre a Média geométrica da fluorescência do controle do D0 pela média geométrica da fluorescência das amostras de D24 h e D48 h, conforme apresentado na **Equação 6**.

**Equação 6.** Equação da razão entre as médias geométricas de fluorescência

$$\text{Razão} = \frac{\text{M.G. amostra 24h ou 48h}}{\text{M.G. controle D0}}$$

A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste *One-way* ANOVA, onde p-valor igual ou inferior a 0,05 é uma diferença estatística significativa.

A representação gráfica e análise estatística foi realizada através dos programas GraphPad Prism versão 5 e Kaluza Analysis 1.5a.

#### 3.8.4. Ensaio de ciclo celular com Iodeto de propídio

Foram adquiridos no citômetro 3500 eventos de cada amostra para análise estatística. Em cada análise, as amostras não estimuladas e marcadas com Iodeto de propídio foram consideradas como controles do ciclo celular regular da linhagem.

Como critério de comparação entre os grupos foi utilizado o percentual de células em cada gate das fases do ciclo celular. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste *Two-way* ANOVA medidas repetidas, quando este é significativo se faz necessário a comparação entre as fases do ciclo com o teste *One-way* ANOVA medidas repetidas.

A representação gráfica e análise estatística foi realizada através dos programas GraphPad Prism versão 5 e Kaluza Analysis 1.5a.

#### 3.8.5. Ensaio de ativação do receptor com marcação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT5 fosforiladas

Foram adquiridos no citômetro 2500 eventos de cada amostra para análise estatística. Em cada análise, as amostras não estimuladas e marcadas com os anticorpos foram consideradas como controles de fosforilação basal da linhagem e a intensidade de fluorescência foi considerada positiva a partir desta.

O melhor tempo de ativação do receptor foi considerado no qual houve maior percentual de células positivas no histograma.

Como critério de comparação foram utilizados os parâmetros: percentuais de células positivas para marcação e média de intensidade de fluorescência global (média geométrica da fluorescência). A visualização da concentração-resposta foi realizada através de uma análise da regressão de duas formas: em função das células positivas para marcação e, em função da média geométrica, seguindo os critérios de uma regressão estabelecidos no item 3.7.3.

A representação gráfica e análise estatística foi realizada através dos programas GraphPad Prism versão 5, IBM SPSS Statistics versão 22, Kaluza Analysis 1.5a e FlowJo versão 10.

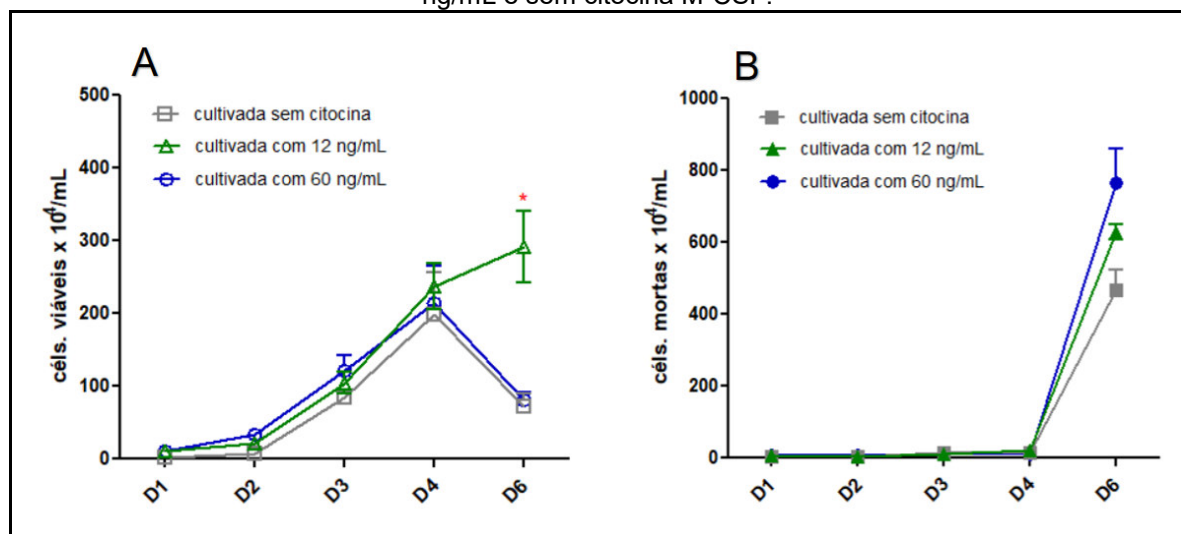
## 4. RESULTADOS

### 4.1. PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES

#### 4.1.1. Linhagem celular M-NFS-60

Com a finalidade de determinar o tempo ideal para sub-cultivo e realização de experimentos, além de avaliar a influência da citocina M-CSF na viabilidade e rendimento desta linhagem na cultura, a linhagem M-NFS-60 foi observada por 5 dias (D1, D2, D3, D4 e D6) após o estabelecimento da cultura e foi realizada a contagem celular para avaliar sua proliferação e o número de células mortas, com o auxílio de câmara de Neubauer e o corante azul de tripan, estes resultados se apresentam a seguir, na **Figura 17**.

**Figura 17.** Curva de crescimento da linhagem M-NFS-60 cultivada com 60 ng/mL de M-CSF, 12 ng/mL e sem citocina M-CSF.



No gráfico A, foram apresentadas o número de células viáveis x 10<sup>4</sup> por mL no eixo Y, e no eixo X os dias de observação destas condições. No gráfico B, foram apresentadas o número de células mortas x 10<sup>4</sup> por mL no eixo Y, e no eixo X os dias de observação destas condições. No eixo X são apresentados os dias em que foram realizadas as contagens do número de células em triplicada, apresentado dos dados em média com desvio. As culturas foram observadas e contadas no decorrer de 6 dias, mas somente avaliada no total de 5 dias. As células M-NFS-60 deste experimento foram cultivadas com o padrão de 60 ng/mL de M-CSF, também com 12 ng/mL de M-CSF e sem o uso da citocina M-CSF e foram sub-cultivadas com a concentração inicial de 2,5 x 10<sup>4</sup> células por mL. \* representa diferença estatística significativa (p-valor = 0,006) no teste *One-way* ANOVA medidas repetidas no D6 entre os grupos com pós-teste de Bonferroni. 3 réplicas por amostra.



Inicialmente as células foram inseridas em uma nova cultura com a concentração de  $2,5 \times 10^4$  células/mL e com o decorrer dos dias foi notada uma taxa de multiplicação celular ( $r$ ) entre os dias de aproximadamente 2,5 e o tempo de dobramento (PDT – *population doubling time*) foi em média 0,52 dias para a linhagem M-NFS-60 cultivada com 60 ng/mL de M-CSF (em azul no **gráfico A**), sendo esta a concentração recomendada e utilizada como parâmetro comparativo.

As células cultivadas com 60 ng/mL de M-CSF apresentaram o maior número de células viáveis no D4 conforme observado no gráfico A apresentado na **Figura 17**. A razão entre o dia com maior rendimento (4º dia) e o dia zero (dia do início da cultura) foi de 85,7. O 6º dia apresentou uma diminuição no número de células viáveis com razão e número de células equivalente ao 2º dia de cultivo, mostrando assim, que posteriormente ao 4º dia há uma diminuição do número de células viáveis.

As células cultivadas sem o uso de citocina M-CSF (em cinza no **gráfico A**) apresentaram uma curva de crescimento semelhante a curva das células cultivadas com 60 ng/mL de M-CSF em todos os dias em que a cultura foi observada. Já as células cultivadas com 12 ng/mL de M-CSF (em verde no **gráfico A**) apresentaram um perfil diferente de crescimento quando comparado com os outros grupos, onde no 6º dia de cultivo é observado um aumento do número de células viáveis, diferente dos outros grupos em que neste dia é observado um decaimento no número de células viáveis.

Quando os dados do **Gráfico A (figura 16)** foram submetidos ao teste *Two-Way ANOVA* medidas repetidas para verificar a existência de uma interação significativa entre as variáveis tempo e tratamento, o resultado do teste indicou uma interação significativa tanto para o tempo ( $p$ -valor = 0,0035) quanto para o tratamento ( $p$ -valor < 0,0001), indicando que ambos os fatores são capazes de influenciar no número de células viáveis observadas.

Visando um melhor entendimento desta interação, foi realizado um teste *One-way ANOVA* medidas repetidas nos dias considerados críticos para a cultura, 4º dia e 6º dia, para verificação se a diferença entre os grupos era significativa em cada um dos dias.

Os resultados deste teste demonstraram que não há diferença significativa entre os grupos no 4º dia de cultivo ( $p$ -valor = 0,8656), indicando que a citocina M-CSF não é capaz de influenciar no número de células viáveis até este dia. Porém,

quando o teste foi realizado entre os grupos no 6º dia de cultivo, houve uma diferença significativa entre os grupos ( $p$ -valor = 0,006), onde a redução da citocina M-CSF de 60 ng/mL para 12 ng/mL parece influenciar no número de células deste dia, prolongando a sobrevivência celular.

O número de células mortas (**gráfico B - figura 17**) no decorrer dos dias D1 e D4 se manteve entre  $7,4 \times 10^4$  células/mL e  $12,57 \times 10^4$  células/mL, não apresentando variação significativa entre os dias. Os dias 3 e 4 apresentaram os menores percentuais e menores números de células mortas (inferiores a 12%), ao mesmo tempo estes dias apresentaram o maior número de células viáveis suplementadas com 60 ng/mL de M-CSF, conforme observado no **gráfico A (figura 17)**, evidenciando que os dias ideais para repique e realização de experimentos estaria entre esses dias. A razão entre o número de células viáveis pelo número de células mortas do 4º dia foi de 17 para as células cultivadas com 60 ng/mL de M-CSF e de 11,4 para as células cultivadas com 12 ng/mL de M-CSF.

No 6º dia de cultivo, onde foi observado uma diminuição no número de células viáveis, houve um aumento significativo do número de células mortas, alcançando o número de  $764 \times 10^4$  células/mL com um alto percentual de células mortas (próximo a 90%). Quando realizado o teste *Two-Way* ANOVA medidas repetidas para verificar a existência de uma interação significativa entre as variáveis tempo e tratamento, o resultado do teste indicou uma interação significativa somente para o tempo ( $p$ -valor = 0,0001) indicando que apenas o tempo influencia no número de células mortas observadas.

A fim de confirmar esta observação, foi realizado o teste *One-way* ANOVA medidas repetidas nos dias considerados críticos para a cultura, 4º dia e 6º dia, onde os resultados indicaram que não há diferença significativa entre os grupos, demonstrando que independente do tratamento o número de células mortas observado não foi diferente entre os grupos.

Se o percentual de células mortas for levado em consideração, o grupo cultivado com 12 ng/mL de M-CSF apresentou o menor percentual, em torno de 68% contra percentuais do grupo cultivado com 60 ng/mL e o grupo sem citocina superiores a 80%, sendo por esta avaliação o grupo cultivado com 12 ng/mL significativamente diferente dos outros grupos. Logo, apesar do alto percentual de mortalidade nas células cultivadas com 12 ng/mL de M-CSF a menor concentração de citocina parece ter prologando a sobrevivência celular.

Desta maneira, o 4º dia de cultivo parece ser o ideal para repique de cultura e experimentos seguintes e de acordo com o método de avaliação, a concentração da citocina M-CSF parece não influenciar no número de células viáveis e no percentual de células mortas até este dia, sendo possível a redução da citocina de 60ng/mL para 12ng/mL a fim de reduzir os custos do cultivo.

Para uma avaliação se esta redução da concentração da citocina de cultivo M-CSF afetaria a resposta celular, as células cultivadas com 60ng/mL de M-CSF e as células cultivadas com 12ng/mL foram comparadas nos ensaios de concentração-resposta com o Filgrastim por MTT apresentados posteriormente no item (4.2.1.3).

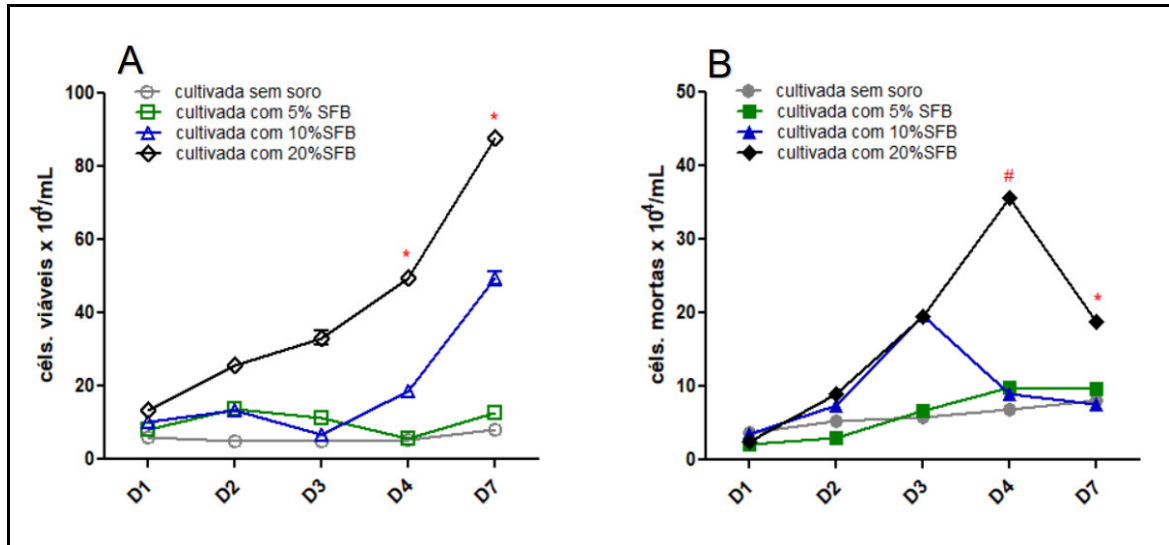
#### 4.1.2. Linhagem celular Kasumi-1

Com a finalidade de determinar o tempo ideal para sub-cultivo e realização de experimentos, além de avaliar a influência da concentração de soro fetal bovino (SFB) na viabilidade e rendimento desta linhagem, a linhagem Kasumi-1 foi observada por 5 dias (D1, D2, D3, D4 e D7) após o estabelecimento da cultura e foi realizada a contagem celular para avaliar sua proliferação e o número de células mortas, com o auxílio de câmara de Neubauer e o corante azul de tripan, estes resultados se apresentam na **figura 18**.

Inicialmente as células foram inseridas em uma nova cultura com a concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL e com o decorrer dos dias foi notada uma taxa de multiplicação celular ( $r$ ) entre os dias de aproximadamente 0,87 e o tempo de dobramento (PDT – *population doubling time*) foi em média 1,27 dias para a linhagem Kasumi-1 cultivada com 20% SFB (em preto no **gráfico A, figura 18**), sendo esta a concentração recomendada utilizada como parâmetro comparativo, visto que é a concentração recomendada pelo fabricante.

Apresentando um diferente perfil de crescimento quando comparado a linhagem M-NFS-60, padronizada para ensaios farmacopeico com o Filgrastim, a linhagem Kasumi-1 apresenta um crescimento mais lento.

**Figura 18.** Curva de crescimento da linhagem Kasumi-1 cultivada com 20% SFB, 10% SFB, 5% SFB e sem soro.



No gráfico A, foram apresentadas o número de células viáveis x 10<sup>4</sup> por mL no eixo Y, e no eixo X os dias de observação destas condições. No gráfico B, foram apresentadas o número de células mortas x 10<sup>4</sup> por mL no eixo Y, e no eixo X os dias de observação destas condições. No eixo X são apresentados os dias em que foram realizadas as contagens do número de células em triplicada, apresentado dos dados em média com desvio. As culturas foram observadas e contadas no decorrer de 7 dias, mas somente avaliada no total de 5 dias. As células Kasumi-1 deste experimento foram cultivadas com o padrão de 20% de SFB, também com 10% de SFB, 5% de SFB e sem o uso de soro. Foram sub-cultivadas com a concentração inicial de 10 x 10<sup>4</sup> células por mL. \* representa diferença estatística significativa (p-valor < 0,05) no teste *One-way* ANOVA medidas repetidas para os dias em questão entre os grupos com pós-teste de Bonferroni. # representa diferença estatística significativa (p-valor < 0,05) no teste *T-student* entre os dias 4 e 7 das células cultivadas com 20% SFB. 3 réplicas por amostra.

O maior número de células viáveis para as duas maiores concentrações de soro (20% e 10% de SFB) foi obtido no 7<sup>o</sup> dia de cultivo (D7) conforme observado no **gráfico A** apresentado na **Figura 18**. O crescimento desta linhagem parece ser de forma linear já que a razão entre o número de células viáveis do grupo cultivado com 20% de SFB em relação ao número de células inicial segue uma tendência linear (D1 – 1,34; D2 – 2,5; D3 – 3,3; D4 – 4,9; D7 – 8,7) onde a maior razão foi obtida no último dia de cultivo (D7) de 8,7.

As células cultivadas sem soro (em cinza na **figura 18 A**) apresentam um padrão de curva de crescimento e mortalidade quase que linear, onde o crescimento e a mortalidade se mostram próximas e baixo rendimento celular, mostrando que o soro é essencial para a proliferação desta linhagem. As células cultivadas com uma menor concentração de soro que a recomendada (5 e 10% SFB) apresentam um perfil também diferente da curva de crescimento da linhagem com 20% SFB, onde as células cultivadas com 5% SFB (verde na **figura 18 A**) se mostram semelhantes a cultivada sem soro.

As células cultivadas com 10%SFB (azul na **figura 18 A**) se apresentam com um perfil similar as cultivadas com 20%SFB (em preto na **figura 18 A**), porém com um menor rendimento no número de células viáveis.

Quando os dados do **gráfico A (figura 18)** foram submetidos ao teste *Two-Way* ANOVA medidas repetidas para verificar a existência de uma interação significativa entre as variáveis tempo e tratamento, o resultado do teste indicou uma interação significativa tanto para o tempo ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ) quanto para o tratamento ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ), indicando que ambos os fatores são capazes de influenciar no número de células viáveis observadas.

Visando um melhor entendimento desta interação, foi realizado um teste *One-way* ANOVA medidas repetidas nos dias considerados críticos para a cultura, 4º dia e 7º dia, para verificação se a diferença entre os grupos era significativa em cada um dos dias. Os resultados deste teste demonstraram que há diferença significativa entre todos os grupos no 4º dia de cultivo ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ), indicando que a concentração de soro influencia diretamente na obtenção de células viáveis, o único grupo que não apresentou diferença estatística no pós-teste de Bonferroni foi entre o grupo sem soro e o grupo suplementado apenas com 5% de SFB. O mesmo resultado foi visualizado no 7º dia de cultivo, demonstrando a importância de suplementação para esta cultura para viabilidade celular.

O número de células mortas (**gráfico B figura 18**) no decorrer dos dias D1 e D4 aumenta numericamente, porém, a razão do dia posterior pelo dia anterior vai diminuindo, sendo menor que 1 no dia 7, com razão de 0,52 em relação ao dia 4 para as células suplementadas com a quantidade recomendada, 20% de SFB.

Os dados do número de células mortas foram submetidos ao teste *Two-Way* ANOVA medidas repetidas para verificar a existência de uma interação significativa entre as variáveis tempo e tratamento, o resultado do teste indicou uma interação significativa tanto para o tempo ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ) quanto para o tratamento (quantidade de soro) ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ), indicando que ambos os fatores são capazes de influenciar no número de células mortas observadas.

O dia 7 de cultivo apresentou o menor percentual e menor número de células mortas (inferiores a 18%) e que ao mesmo tempo este dia apresentou o maior número de células viáveis, evidenciando que o dia ideal para repique e realização de experimentos seria o 7º dia de cultura, visto que a razão entre o número de células

viáveis pelo número de células mortas destes dias foi de 4,66 para as células mantidas em 20% de SFB.

No **gráfico B (figura 18)** a comparação do número de células mortas entre os grupos com diferentes concentrações de soro, é observado que as células cultivadas com 10% de SFB também apresentam um pico de mortalidade (D3), porém anterior ao pico de mortalidade observado nas células cultivadas com 20% SFB (D4).

Quando submetido ao teste *One-way ANOVA* medidas repetidas no dia 7 de cultivo, os resultados mostraram uma diferença significativa entre as células cultivadas com 20% de SFB e os demais grupos, que apesar de apresentar uma redução do número de células mortas em relação ao 4º dia, ainda é significativamente diferente dos outros grupos. A fim de verificar se a diferença entre os dias D7 e D4 do grupo cultivado com 20% de SFB era significativa, foi realizado um teste *T-student*, onde o resultado demonstrou que há uma redução no número de células mortas significativa.

Sendo assim, foi definido para os experimentos seguintes que o repique da linhagem Kasumi-1 fosse realizado no dia 7 pós-cultivo, justamente pelo maior número de células viáveis e os menores percentuais de mortalidade. Além disso, a tentativa de redução de soro não foi positiva, demonstrando a necessidade da linhagem ser mantida com 20% de SFB.

Para realização dos ensaios seguintes com esta linhagem, foi considerado ideal um percentual de células mortas inferior a 20%, conforme observado no dia de cultivo D7, e o mesmo foi atendido durante os ensaios a seguir.

## 4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS DIFERENTES LINHAGENS CELULARES FRENTE AO ESTIMULO DE FILGRASTIM PELO ENSAIO DE MTT

### 4.2.1. Linhagem celular M-NFS-60

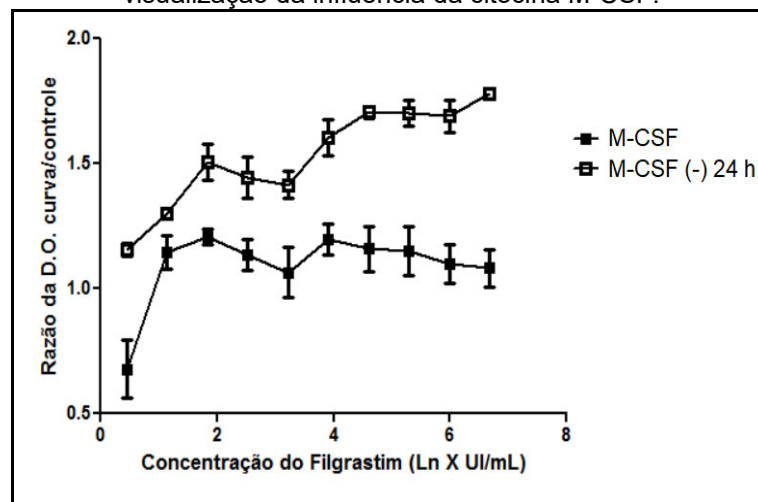
#### 4.2.1.1. *Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: influência da citocina M-CSF no ensaio*

Com o objetivo de avaliar a influência da citocina M-CSF utilizada no cultivo celular da linhagem M-NFS-60 na resposta destas células ao estímulo com Filgrastim, foram realizados ensaios de MTT de duas formas: Realizados com as

células mantidas em cultivo de forma contínua com a citocina; e, realizados com as células que foram retiradas da citocina por 24 h antes da realização do ensaio, sendo mantidas apenas em meio RPMI suplementado conforme descrito na metodologia.

Para a escolha da melhor forma de manutenção da linhagem M-NFS-60 para realização deste ensaio, os resultados das curvas foram comparados através do cálculo da significância da ANOVA da regressão e avaliação do  $R^2$  em diversos modelos de regressão. Os melhores modelos de regressão quanto a ANOVA da regressão e ao  $R^2$  foram logarítmico e em potência, estando de acordo com o estabelecido para modelos de linhas paralelas. Abaixo foi apresentado a comparação das curvas com o uso de citocina no modelo logarítmico na **figura 19**.

**Figura 19.** Metabolização de MTT na linhagem M-NFS-60 cultivada com 60ng/mL para visualização da influência da citocina M-CSF.



Ensaio de MTT realizado com curva das diluições do Filgrastim frente a linhagem M-NFS-60 cultivadas com 60ng/mL de M-CSF. M-CSF (quadrado preenchido) - as células com citocina até o ensaio foram mantidas de forma contínua no meio de cultivo com a citocina M-CSF. M-CSF (-) 24 h - foram mantidas com citocina até 48 h antecedente ao ensaio, nas 24 h anteriores ao ensaio as células foram mantidas em meio RPMI sem citocina. Após este procedimento as células permaneceram em contato com o Filgrastim por 48 h. O eixo X é apresentado no formato de Ln da concentração por mL, apresentados 2 experimentos independentes (realizados em 3 réplicas).

As células que foram mantidas com a citocina M-CSF até o momento do ensaio apresentaram uma curva com um  $R^2$  de 0,152 e uma ANOVA da regressão de 0,2667, não apresentando uma resposta dependente da concentração de Filgrastim.

Já as células mantidas com a citocina até 48 h antecedente ao experimento e nas 24 h anteriores ao experimento foram mantidas sem a citocina, somente em

meio RPMI suplementado, apresentaram uma curva com  $R^2$  de 0,8743 com uma ANOVA da regressão altamente significativa (0,000), apresentando uma boa correlação entre concentração-resposta.

O  $R^2$  mostra que manter as células em cultivo com a citocina até o momento do experimento pode influenciar diretamente na resposta das células ao estímulo com o Filgrastim, além disso, os dados apresentaram grande desvio entre as replicatas.

Diante do observado, a ausência da citocina por 24 h no cultivo da linhagem M-NFS-60 demonstra beneficiar a resposta das células aos estímulos com Filgrastim pela observação da ANOVA da regressão ser altamente significativa e por apresentar coeficientes de determinação para os modelos aceitos de logarítmica e potência superiores a 0,6 conforme estabelecido pela autora, já que no compêndio internacional nada é abordado sobre  $R^2$ .

Desta forma, nos experimentos descritos a seguir, 24 h antes da realização do ensaio, as células foram retiradas do contato com a citocina, sendo mantidas somente em meio RPMI suplementado.

#### *4.2.1.2. Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: precisão intra e inter ensaios*

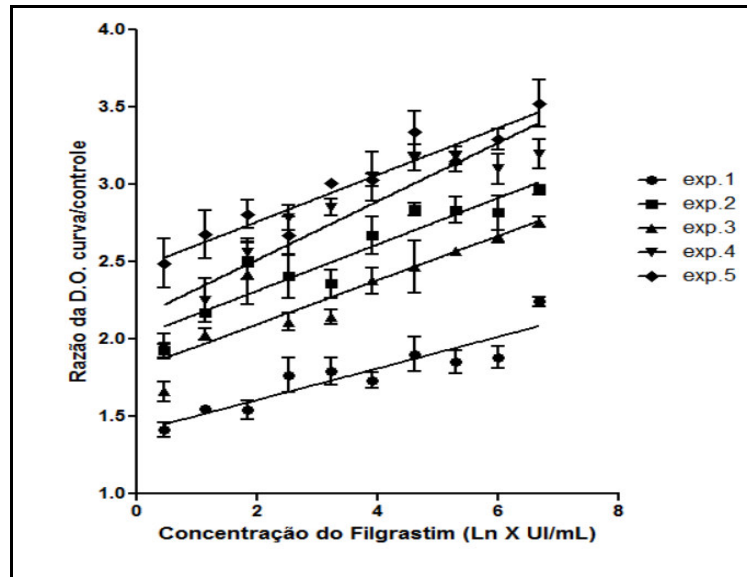
Com o intuito de reproduzir o ensaio farmacopeico, foi realizado o cultivo da linhagem M-NFS-60 até 48h com a citocina M-CSF antecedente ao ensaio de MTT. Nas 24h anteriores ao ensaio, foi mantida em cultivo apenas com o meio RPMI suplementado sem a adição da citocina. Não foi verificada aumento do percentual de morte com a retirada da citocina.

Foram realizados um total de 5 ensaios independentes de MTT. Para verificação da precisão intra ensaio foram avaliados o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a ANOVA da regressão e desvio padrão entre as replicatas.

Para verificação da precisão inter ensaio foram avaliados a inclinação da reta e o coeficiente de variação (CV%) entre os ensaios. Para os ensaios serem considerados precisos não devem apresentar diferença estatística entre as replicatas e entre a inclinação da reta.

Abaixo na **Figura 20** foram apresentadas as curvas iniciando em 800 UI/mL com 9 réplicas de Filgrastim com uma linha de tendência para melhor observação da tendência da curva.



**Figura 20.** Ensaio de MTT com a linhagem M-NFS-60 cultivada em 60 ng/mL de citocina

Ensaio de MTT realizado com curva das diluições do Filgrastim frente a linhagem M-NFS-60 cultivadas com 60 ng/mL de M-CSF. Nas 24 h anterior a realização do ensaio, a linhagem foi retirada do contato com a citocina, após este procedimento as células permaneceram em contato com o Filgrastim por 48 h. O eixo X é apresentado no formato de Ln da concentração por mL de Filgrastim, e o eixo Y é apresentado em forma de razão da densidade ótica (D.O.) da curva dividida pela D.O. do controle (célula sem Filgrastim) apresentados 5 experimentos independentes (realizados em 4 réplicas).

Nota-se visualmente que as curvas apresentam uma tendência a linhas paralelas com uma regressão com correlação positiva. Os resultados estatísticos desta comparação intra e entre experimentos foram apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Resultado dos parâmetros avaliados para cada ensaio realizado.

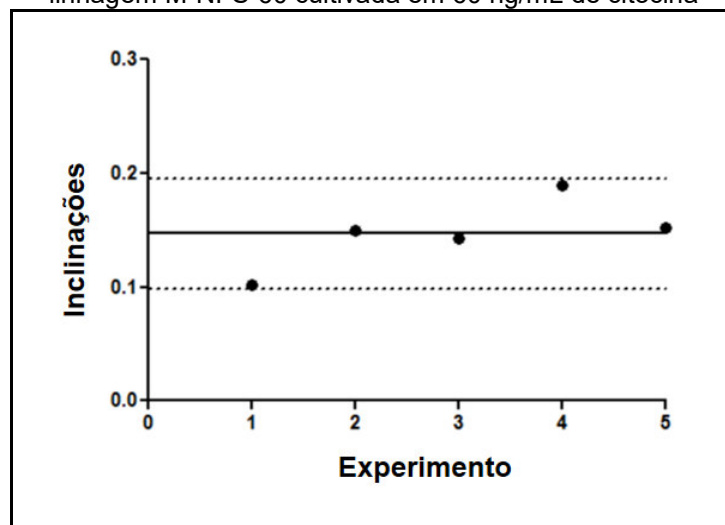
Ensaio	ANOVA da regressão	R <sup>2</sup>	Desvio-padrão entre as replicatas
Exp.1	0,0002	0,8466	0,11681 ± 0,0527
Exp.2	0,0001	0,8743	0,09969 ± 0,0578
Exp.3	0,0004	0,8097	0,1299 ± 0,10539
Exp.4	0,0002	0,8447	0,11571 ± 0,03773
Exp.5	0,0001	0,9042	0,17599 ± 0,08599

Todos os experimentos apresentaram um R<sup>2</sup> suficiente de acordo com os critérios estabelecidos nesta dissertação, sendo superiores a 0,6. Além disso, todas as regressões apresentaram ANOVA da regressão significativa e desvios-padrão inferiores a 0,2. O coeficiente de variação da inclinação da reta entre os ensaios foi

de 21%, sendo considerado dentro dos valores estabelecidos pela OMS para ensaios biológicos (WHO, 1997).

As inclinações das curvas se apresentaram próximas e não são significativamente diferentes entre si, demonstrando que todos os experimentos realizados apresentam inclinações da reta semelhantes. As inclinações também foram analisadas em um gráfico de controle de ensaio, apresentado na **figura 21**.

**Figura 21.** Gráfico de controle de ensaio: Inclinações das curvas dos 5 experimentos de MTT com a linhagem M-NFS-60 cultivada em 60 ng/mL de citocina



Valores da inclinação das curvas plotados em um gráfico de controle de ensaio, onde no eixo X são apresentados os experimentos, com valores respectivos das inclinações no eixo Y. Os limites superiores e inferiores foram calculados baseados na média e no desvio-padrão dos valores de inclinação obtidos.

Diante destes resultados, os 5 experimentos realizados com a linhagem M-NFS-60 em dias diferentes se apresentam semelhantes, com  $R^2$  variando de 0,80 a 0,90, através da ANOVA da regressão significativa, coeficiente de variação dentro do estabelecido por normas internacionais (WHO, 1997) e além disso, a inclinação das curvas são semelhantes estatisticamente, mostrando que há uma precisão tanto intra ensaio como inter ensaio, sendo assim, os resultados apresentados sugerem que a padronização do ensaio farmacopeico teve sucesso.

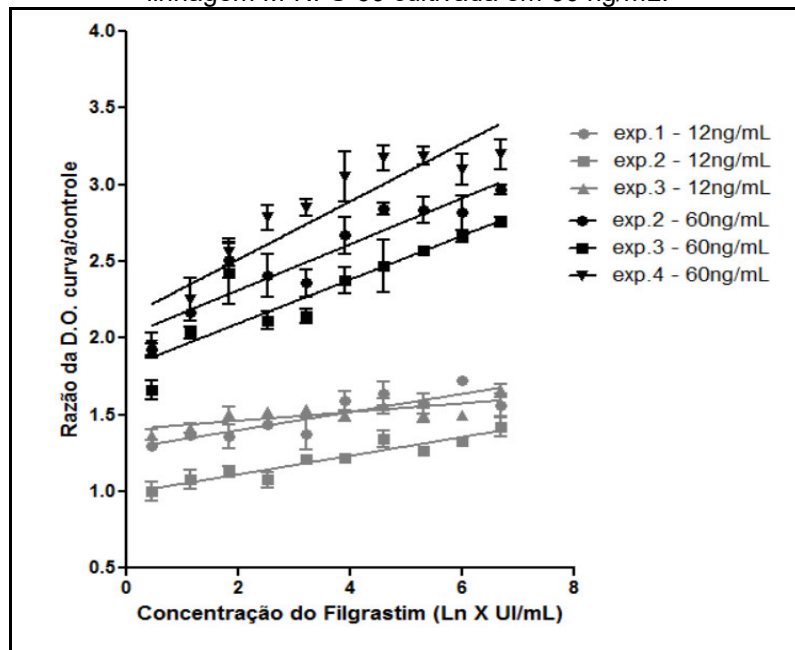
#### 4.2.1.3. Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: teste com diferentes concentrações da citocina M-CSF no cultivo da linhagem

A fim de avaliar se a redução da quantidade de citocina M-CSF no cultivo da linhagem M-NFS-60 seria capaz de alterar a sua resposta ao Filgrastim no ensaio de

MTT, os ensaios com o cultivo de 60 ng/mL de M-CSF foram considerados como padrões e foram então comparados a 3 ensaios com o cultivo de 12 ng/mL de M-CSF.

Neste ensaio, as células também foram retiradas do cultivo com a citocina M-CSF por 24 h que antecedem ao ensaio. Todos os 3 ensaios com o cultivo de 12 ng/mL da citocina M-CSF foram expostos juntos na **Figura 22**.

**Figura 22.** Ensaio de MTT com a linhagem M-NFS-60 cultivada em 12 ng/mL de citocina contra a linhagem M-NFS-60 cultivada em 60 ng/mL.



Ensaio de MTT realizado com curva das diluições do Filgrastim frente a linhagem M-NFS-60 cultivadas com 12 ng/mL de M-CSF em cinza e 60 ng/mL em preto. Nas 24 h anterior a realização do ensaio, a linhagem foi retirada do contato com a citocina, após este procedimento as células permaneceram em contato com o Filgrastim por 48 h. O eixo X é apresentado no formato de Ln da concentração por mL, apresentados 3 experimentos independentes de cada (realizados em 4 réplicas).

Apesar dos experimentos realizados com células mantidas em cultivo com 12 ng/mL apresentar certa relação concentração-resposta, a mesma é visivelmente diferente das células cultivadas com 60 ng/mL. Os resultados estatísticos desta comparação intra e inter experimentos foi apresentada na **Tabela 2**.

Apenas um experimento apresentou o  $R^2$  inferior ao estabelecido pela autora de 0,6, sendo o 3º experimento com células cultivadas com 12 ng/mL de M-CSF. Todas as regressões apresentaram através da ANOVA da regressão significativa e desvios-padrão inferiores a 0,2. O coeficiente de variação entre os ensaios foi de

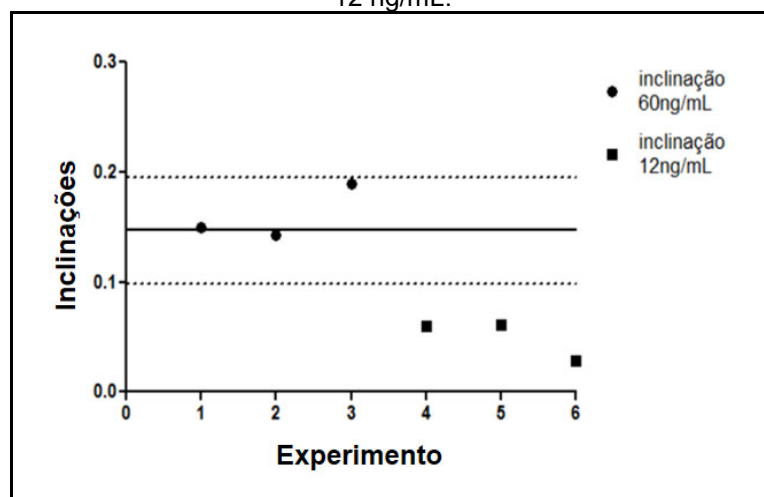
60,8%, sendo considerado fora dos valores estabelecidos pela OMS para ensaios biológicos (WHO, 1997).

**Tabela 2.** Resultado dos parâmetros avaliados para cada ensaio realizado com 12 ng/mL de M-CSF contra ensaios com 60 ng/mL de M-CSF.

Ensaio	ANOVA da regressão	R <sup>2</sup>	Desvio-padrão entre as replicatas
Exp.1 12ng/mL	0,0011	0,7575	0,11007 ± 0,06002
Exp.2 12ng/mL	0,0001	0,9042	0,08169 ± 0,03991
Exp.3 12ng/mL	0,0108	0,5767	0,06692 ± 0,02613
Exp.2 60ng/mL	0,0001	0,8743	0,09969 ± 0,0578
Exp.3 60ng/mL	0,0004	0,8097	0,1299 ± 0,10539
Exp.4 60ng/mL	0,0002	0,8447	0,11571 ± 0,03773

Apesar de as inclinações das curvas se apresentarem próximas e não são significativamente diferentes entre si, as inclinações referentes as curvas com 12ng/mL estão fora limites inferiores do controle estabelecidos pelo ensaio com 60ng/mL de M-CSF. As inclinações também foram analisadas em um gráfico de controle de ensaio, apresentado abaixo na **Figura 23**.

**Figura 23.** Gráfico de controle de ensaio: Inclinações das curvas dos 6 experimentos de MTT com a linhagem M-NFS-60 cultivada em 60 ng/mL de citocina e comparados com a linhagem cultivada com 12 ng/mL.



Valores da inclinação das curvas plotados em um gráfico de controle de ensaio, onde no eixo X são apresentados os experimentos, com valores respectivos das inclinações no eixo Y. Os limites superiores e inferiores foram calculados baseados na média e no desvio-padrão dos valores de inclinação obtidos dos experimentos representativos com células cultivadas com 60 ng/mL de M-CSF, as inclinações das curvas das células cultivadas com 12 ng/mL foram adicionadas ao gráfico como comparativo.

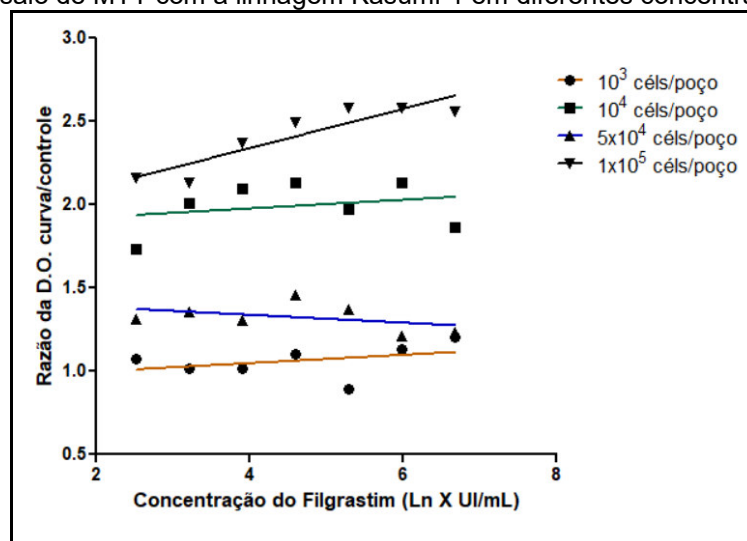
Desta forma, o cultivo da linhagem M-NFS-60 com 12 ng/mL de M-CSF parece influenciar de forma negativa sua resposta ao ensaio de MTT para controle de qualidade do medicamento Filgrastim, pois apresentou desvios na inclinação das curvas e o coeficiente de variação foi superior a 50%, sendo superior a variação aceita pela OMS (WHO, 1997).

#### 4.2.2. Linhagem celular Kasumi-1

##### 4.2.2.1. Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: determinação do número de células utilizadas

Com o intuito de padronizar o ensaio de MTT para avaliação da resposta ao Filgrastim com a linhagem Kasumi-1, foi necessário a realização da padronização da densidade celular a ser utilizada nestes ensaios. As células em diferentes densidades foram inseridas na placa em réplicas de três, e foram colocadas em contato com o Filgrastim em curva, iniciando em 800 UI/mL, seguindo uma diluição seriada de mais 6 pontos. Foram realizados testes com 4 concentrações de célula por poço:  $1 \times 10^3$  células;  $1 \times 10^4$  células;  $5 \times 10^4$  células e  $1 \times 10^5$  células, apresentados na **Figura 24** a seguir.

**Figura 24.** Ensaio de MTT com a linhagem Kasumi-1 em diferentes concentrações celulares.



Curva das diluições do Filgrastim frente a linhagem Kasumi-1 após 48 h em diferentes concentrações celulares. O eixo X é apresentado no formato de Ln da concentração por mL. São apresentados em linha de tendência.

A forma de avaliação destas curvas foi através dos  $R^2$  mais próximos a 1 e significância da ANOVA da regressão, os dados foram apresentados na **Tabela 3** abaixo.

**Tabela 3.** Curvas de estimação entre experimentos com diferentes concentrações celulares.

Modelos	Conc. $10^3$		Conc. $10^4$		Conc. $5 \times 10^4$		Conc. $10^5$	
	ANOVA	$R^2$	ANOVA	$R^2$	ANOVA	$R^2$	ANOVA	$R^2$
Logarítmico	0,412	0,138	0,570	0,069	0,095	0,458	0,000	0,893
Potência	0,469	0,109	0,555	0,074	0,098	0,453	0,000	0,883

Conforme observado na tabela acima, somente a densidade celular de  $10^5$  células por poço da linhagem Kasumi-1 foi capaz de apresentar modelos de regressão com nível de significância da ANOVA próximos ou inferiores a 0,05 e em ambos os modelos aceitos para linhas paralelas o  $R^2$  foi superior a 0,8 indicando uma boa correlação concentração-resposta nesta densidade de células por poço.

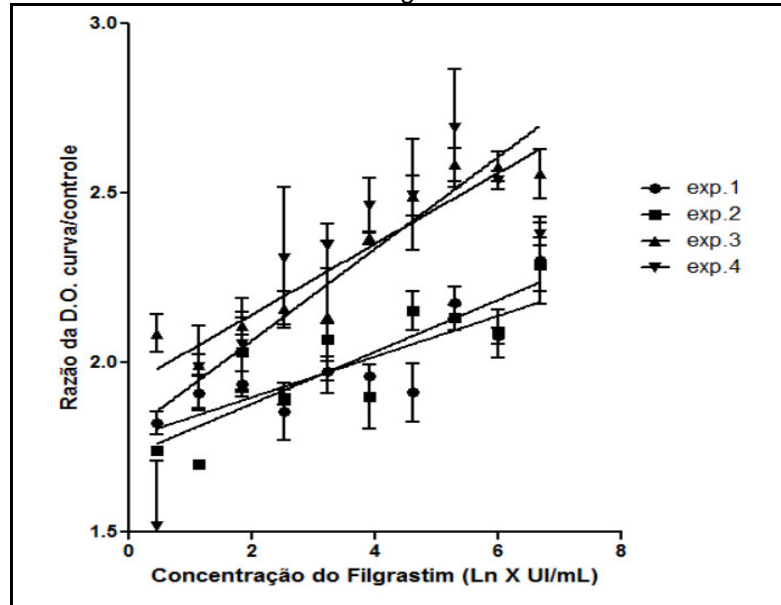
Sendo assim, a densidade celular de  $10^5$  células por poço da linhagem Kasumi-1 foi capaz de apresentar uma relação concentração-resposta em alguns modelos de regressão e apresentou significância da mesma em quase todos os modelos. Por este motivo, esta foi a densidade celular de escolha para os ensaios seguintes de MTT com a linhagem Kasumi-1.

#### 4.2.2.2. Padronização do ensaio de MTT farmacopeico: precisão intra e inter ensaios

Com o intuito de padronizar o ensaio farmacopeico de MTT para o biofármaco Filgrastim para a linhagem Kasumi-1, foram realizados um total de 4 ensaios independentes de MTT. Para verificação da precisão intra ensaio foram avaliados o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a ANOVA da regressão e desvio padrão entre as replicatas. Para verificação da precisão inter ensaio foram avaliados a inclinação da reta e o coeficiente de variação (CV%) entre os ensaios. Para os ensaios serem considerados precisos não devem apresentar diferença estatística entre as replicatas e entre a inclinação da reta.

Na **Figura 25** foram apresentadas as curvas iniciando em 800 UI/mL com diluições seriadas com uma linha de tendência para melhor observação da tendência da curva.

**Figura 25.** Ensaio de MTT com a linhagem Kasumi-1 cultivada com 20%SFB.



Ensaio de MTT realizado com curva das diluições do Filgrastim frente a linhagem Kasumi-1 cultivadas com 20%SFB. As células permaneceram em contato com o Filgrastim por 48h. O eixo X é apresentado no formato de Ln da concentração por mL de Filgrastim, e o eixo Y é apresentado em forma de razão da densidade ótica (D.O.) da curva dividida pela D.O. do controle (célula sem Filgrastim) apresentados 4 experimentos independentes (realizados em réplicas de 3).

Nota-se visualmente que as curvas apresentam uma tendência ao paralelismo com uma regressão com correlação positiva. Os resultados estatísticos desta comparação intra e inter experimentos foram apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Resultado dos parâmetros avaliados para cada ensaio realizado.

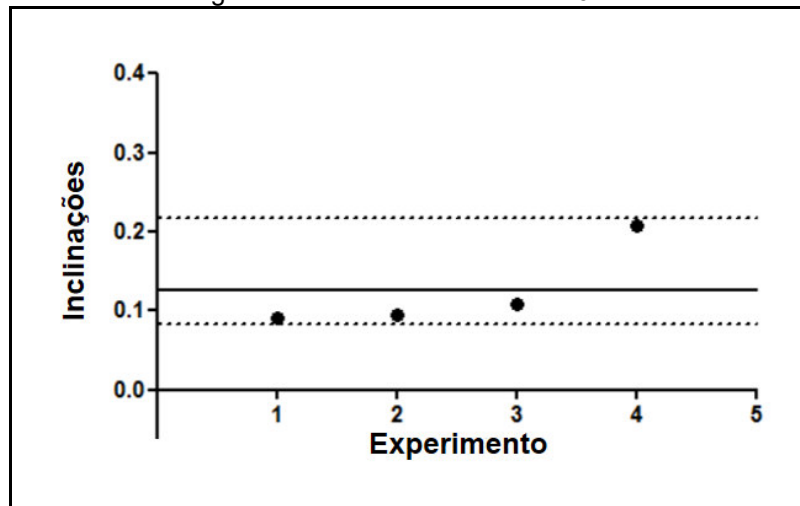
Ensaio	ANOVA da regressão	R <sup>2</sup>	Desvio-padrão entre as replicatas
Exp.1	0,0025	0,8376	0,09006 ± 0,06481
Exp.2	0,0015	0,8570	0,09578 ± 0,06244
Exp.3	0,0001	0,9401	0,10931 ± 0,10232
Exp.4	0,0029	0,8315	0,20867 ± 0,11379

Todos os experimentos apresentaram um R<sup>2</sup> suficiente de acordo com os critérios estabelecidos nesta dissertação, sendo superiores a 0,8. Além disso, todas

as regressões apresentaram ANOVA da regressão significativa e desvios-padrão inferiores a 0,2. O coeficiente de variação da inclinação da reta entre os ensaios foi de 44,3%, sendo considerado dentro dos valores estabelecidos pela OMS para ensaios biológicos (WHO, 1997).

As inclinações das curvas se apresentaram próximas e não são significativamente diferentes entre si, demonstrando que todos os experimentos realizados apresentam inclinações da reta semelhantes. As inclinações também foram analisadas em um gráfico de controle de ensaio, apresentado na **Figura 26**.

**Figura 26.** Gráfico de controle de ensaio: Inclinações das curvas dos 4 experimentos de MTT com a linhagem Kasumi-1 cultivada com 20%SFB



Valores da inclinação das curvas plotados em um gráfico de controle de ensaio, onde no eixo X são apresentados os experimentos e suas inclinações, com valores respectivos no eixo Y. Os limites superiores e inferiores foram calculados baseados na média e no desvio-padrão dos valores de inclinação obtidos.

Diante destes resultados, os 4 experimentos realizados com a linhagem Kasumi-1 em dias diferentes se apresentam semelhantes, com  $R^2$  variando de 0,80 a 0,90, ANOVA da regressão significativa, coeficiente de variação dentro do estabelecido por normas internacionais e além disso, a inclinação das curvas são semelhantes estatisticamente, mostrando que há uma precisão tanto intra ensaio como inter ensaio.



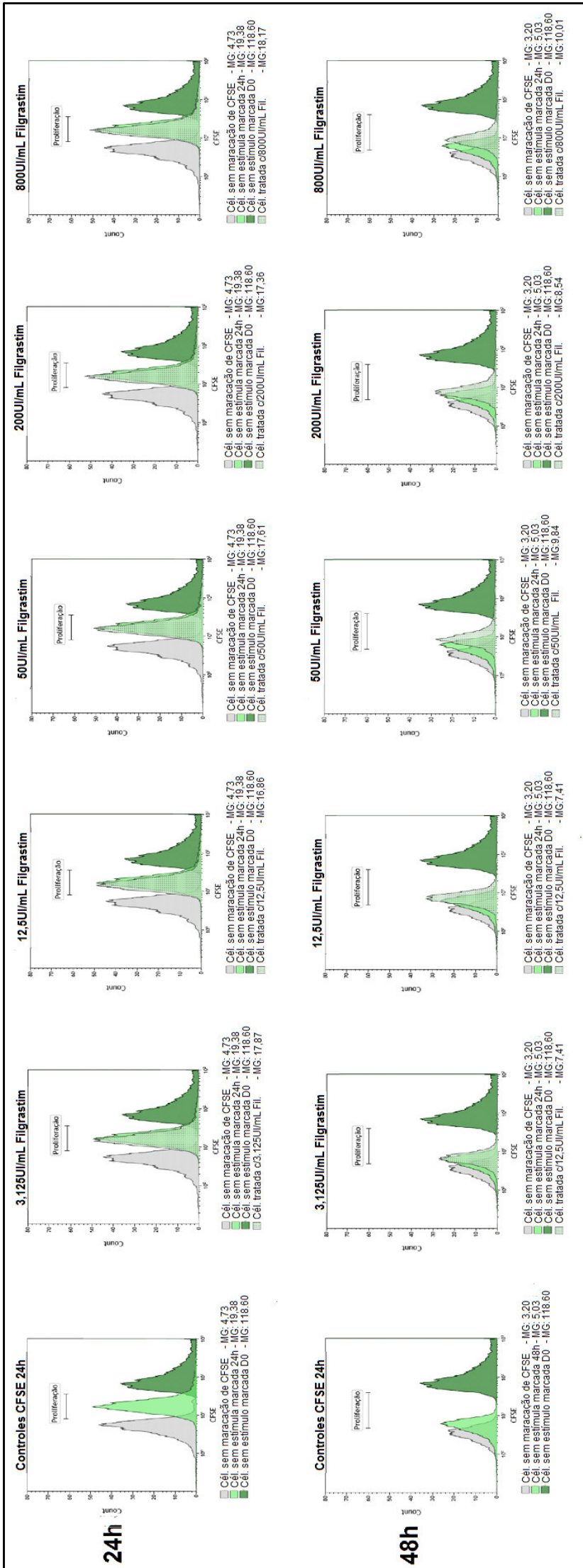
### 4.3. QUANTIFICAÇÃO DA PROFILERAÇÃO CELULAR NAS DIFERENTES LINHAGENS POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO COM CFSE

#### 4.3.1. Curva do Filgrastim com a linhagem celular M-NFS-60

Com o intuito de reproduzir a visualização concentração-resposta observada no ensaio de MTT da linhagem M-NFS-60 frente a diferentes concentrações de Filgrastim, o ensaio de CFSE foi realizado nos tempos de 24 h e 48 h das células marcadas e em contato com o Filgrastim. Os histogramas das células sem CFSE (autofluorescência), células sem estímulo (marcadas com CFSE), células marcadas com CFSE D0 e células estimuladas com Filgrastim em diferentes doses, para cada tempo (24 h e 48 h) foram apresentadas na **Figura 27**.

Foi observada proliferação, tanto em células sem estímulo e marcadas com CFSE, quanto em células que foram estimuladas com Filgrastim em diferentes concentrações. Nos histogramas apresentados na **Figura 27**, foi observado que a proliferação não foi dependente do estímulo, visto que as médias geométricas de fluorescência foram semelhantes entre os estímulos e as células sem estímulo marcada com CFSE.

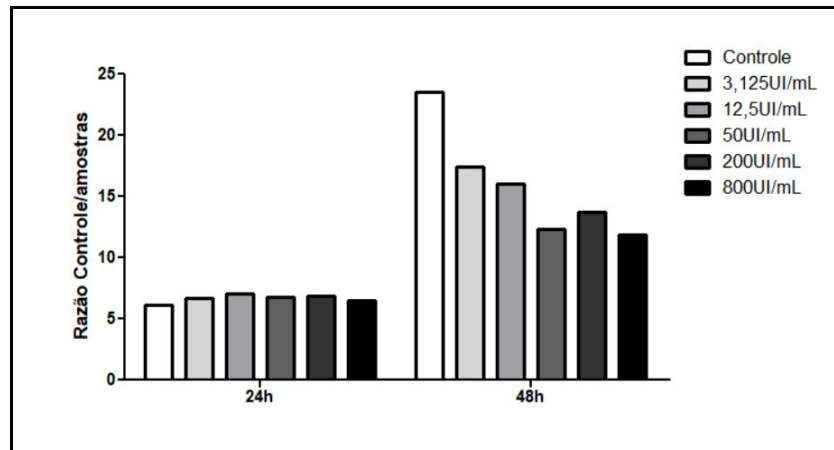
**Figura 27.** Histogramas do ensaio de CFSE da linhagem M-NFS-60 em contato 24 h e 48 h com o Filgrastim.



Curva das diluições do Filgrastim em 24 h e 48 h de contato com a linhagem M-NFS-60. Célula sem marcação indica fluorescência basal da linhagem; Células marcadas D0 indica a marcação de CFSE sem proliferação logo após a marcação; Células controle marcadas D24 h e D48 h indica as células marcadas sem estímulo, sendo esta a proliferação normal da linhagem. Em seguida, as células marcadas em contato com o Filgrastim por 24 h e 48 h da menor dose para maior dose. Os gates foram marcados a partir dos controles apresentados.

Foi estabelecido que a média geométrica de fluorescência da célula marcada D0 seria dividida pela média geométrica de fluorescência obtida após o ensaio para cada dose, assim, seria possível obter uma razão e esta seria analisada e comparada graficamente, apresentados na **Figura 28**.

**Figura 28.** Razão das médias geométricas das células em proliferação no ensaio de CFSE com a linhagem M-NFS-60 em contato 24h e 48h com o Filgrastim.



Razão entre a média geométrica de fluorescência inicial e a média geométrica de fluorescência das amostras 24h e 48h após o contato com o Filgrastim.

Foi observado que em 24 h não houve diferenças visíveis entre as diversas doses de Filgrastim, não sendo observada uma relação concentração-resposta (Linear  $R^2=0,662$  com ANOVA da regressão não significativa  $=0,263$ ). Além disso, no histograma é possível visualizar que a diferença entre as células negativas (autofluorescentes) e células positivas (marcadas com CFSE) no primeiro dia é muito pequena, e conforme o passar de 24 h de ensaio o controle, ou seja, células sem estímulo, apresenta cerca de 16,68% destas se sobrepondo as células autofluorescentes, este fato pode resultar em uma interpretação errônea do número de células que se multiplicaram ou células que não foram marcadas por CFSE.

Em 48 h de ensaio, as células marcadas sem estímulo já apresentaram uma proliferação tão alta que mais de 80% das células encontram-se se sobrepondo as células autofluorescentes. As demais células com diferentes concentrações de Filgrastim também apresentaram um percentual superior a 30% sobrepondo as células autofluorescentes, por este motivo é complicado estimar a real proliferação das células em função do decaimento do CFSE. Não foi observado uma relação concentração-resposta nos experimentos de 48 h tanto dos percentuais quanto da

razão, que parecem em determinada dose atingir um platô, sugerindo que o aumento de dose poderia estar inibindo a proliferação ou ainda aumentando a apoptose devido a alta concentração de Filgrastim.

Não há diferença significativa entre as amostras quando submetidas ao teste *One-way* ANOVA, tanto em relação aos percentuais quanto em relação a razão em ambos os ensaios de 24h e 48h. Não é observado em ambos os ensaios de 24h e 48h uma proliferação lenta, com picos sequenciais. Como se trata de uma linhagem padronizada que apresenta uma taxa de proliferação constante, é possível notar um deslocamento contínuo de todo o pico das células marcadas.

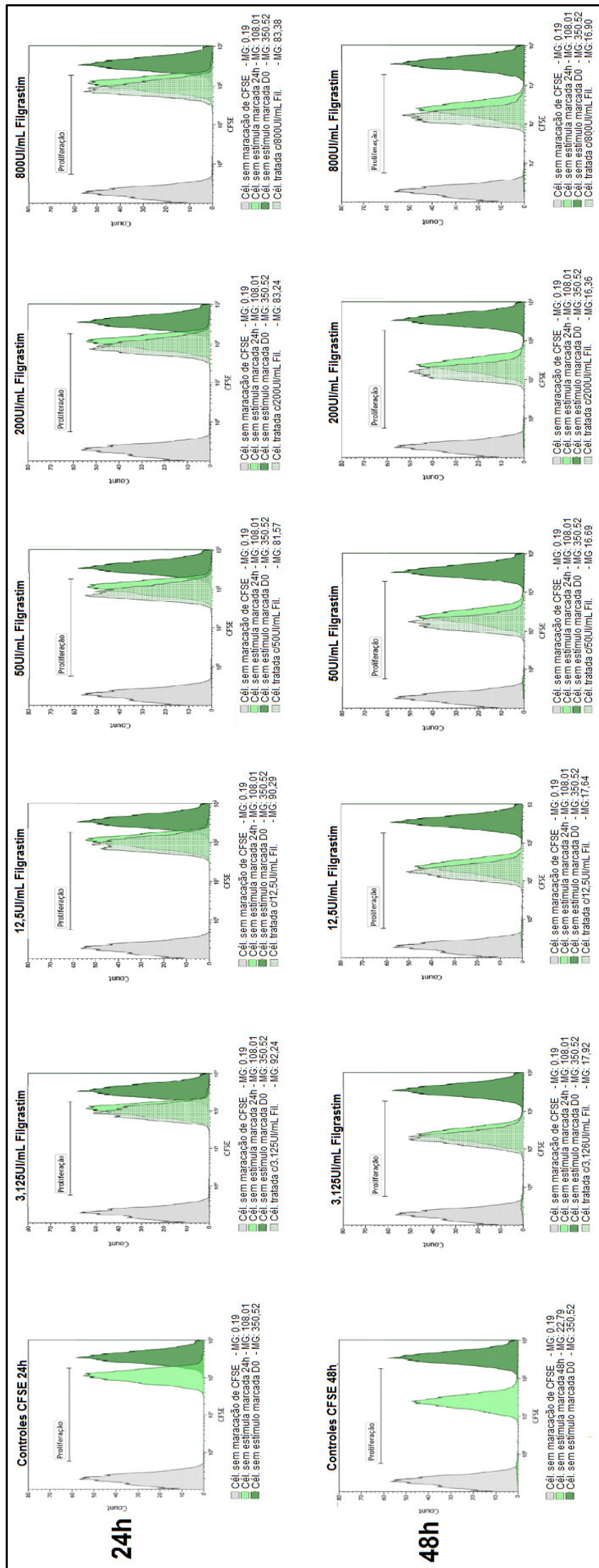
As células estimuladas com Filgrastim também foram contadas manualmente com o auxílio da câmara de Neubauer e o corante azul de tripan para fins de controle de ensaio, e novamente não ficou clara uma relação concentração-resposta, apresentando  $R^2$  inferior a 0,5, sendo contrário ao observado no ensaio de MTT. Estes resultados sugerem que a concentração-resposta visualizados no ensaio de MTT com esta linhagem frente ao medicamento Filgrastim poderiam estar relacionados com outros mecanismos celulares, como sua ativação.

Sendo assim, apesar do ensaio de CFSE ser considerado um ensaio sensível, a visualização da proliferação com esta linhagem celular frente ao medicamento Filgrastim não foi efetiva para estimação de uma concentração-resposta.

#### 4.3.2. Curva do Filgrastim com a linhagem celular Kasumi-1

Com o intuito de reproduzir a visualização concentração-resposta observada no ensaio de MTT da linhagem Kasumi-1 frente a diferentes concentrações de Filgrastim, o ensaio de CFSE foi realizado nos tempos de 24 h e 48 h das células marcadas e em contato com o Filgrastim. Os histogramas das células sem CFSE (autofluorescência), células sem estímulo (marcadas com CFSE), células marcadas com CFSE D0 e células estimuladas com Filgrastim em diferentes doses, para cada tempo (24 h e 48 h), os histogramas da curva foram apresentados a seguir na **Figura 29**.

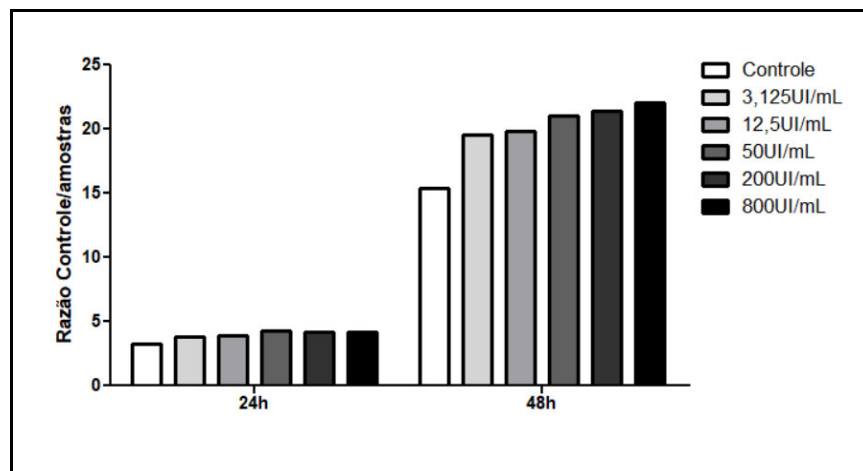
**Figura 29.** Histogramas do ensaio de CFSE da linhagem Kasumi-1 em contato 24 h e 48 h com o Filgrastim.



Curva das diluições do Filgrastim em 24 h e 48 h de contato com a linhagem Kasumi-1. Célula sem marcação indica fluorescência basal da linhagem; Células marcadas D0 indica a marcação de CFSE sem proliferação logo após a marcação; Células controle marcadas D24 h e D48 h indicam as células marcadas sem estímulo, sendo esta a proliferação normal da linhagem. Em seguida, as células marcadas em contato com o Filgrastim por 24 h e 48 h da menor dose para maior dose. Os gates foram marcados a partir dos controles apresentados.

Ao observar a proliferação celular após 24 h de contato com o Filgrastim, pode se notar que com o aumento da dose, houve uma diminuição na média geométrica de fluorescência até a dose de 50 UI/mL, aumentando assim a razão entre o controle D0 e as amostras. Após esta concentração, parece que houve uma estabilização da proliferação. Já após 48 h de contato com o Filgrastim, foi possível observar que com o aumento da dose, houve um aumento no deslocamento do pico de proliferação para a esquerda do gráfico, possivelmente demonstrando uma concentração-resposta. Para confirmação da mesma, foi realizado uma razão das células controles pelas amostras e apresentadas no gráfico na **Figura 30** abaixo.

**Figura 30.** Razão das médias geométricas das células em proliferação no ensaio de CFSE com a linhagem Kasumi-1 em contato 24 h e 48 h com o Filgrastim.



Razão entre a média geométrica de fluorescência inicial e a média geométrica de fluorescência das amostras 24 h e 48 h após o contato com o Filgrastim.

Os resultados das razões apresentadas acima, quando submetidos ao teste *One-way ANOVA* demonstraram diferença significativa em ambos os tempos entre os grupos. Porém, quando analisados na forma de regressão, 24 h de contato com o Filgrastim resultou em uma regressão logarítmica com  $R^2 = 0,6$ , porém com ANOVA da regressão não significativa. Já a razão de 48 h de contato apresentou uma regressão logarítmica com  $R^2 = 0,972$  e com ANOVA da regressão significativa ( $p\text{-valor} = 0,002$ ), sendo possível a observação de uma tendência a uma curva concentração-resposta conforme observado no ensaio de MTT.

Diferentemente dos resultados apresentados com a linhagem M-NFS-60, a linhagem Kasumi-1 apresenta uma discreta proliferação possível de quantificação em relação a linhagem padronizada, e esta observação é mais acentuada após 48 h

de contato com o Filgrastim, com a observação de uma relação concentração-resposta.

As células estimuladas com Filgrastim também foram contadas manualmente com o auxílio da câmara de Neubauer e o corante azul de tripan para fins de controle de ensaio, e novamente não ficou claro uma relação concentração-resposta, apresentando  $R^2$  inferior a 0,5. Levantando novamente a hipótese de que os resultados de concentração-resposta visualizados no ensaio de MTT se devem a outros fatores de estimulação celular, como ativação.

Sendo assim, apesar do ensaio de CFSE ser considerado um ensaio sensível, a visualização da proliferação com esta linhagem celular frente ao medicamento Filgrastim não foi efetiva para estimação de uma concentração-resposta no tempo de 24 h de contato, porém, o tempo de 48 h de contato apresentou uma relação concentração-resposta em logarítmico considerável.

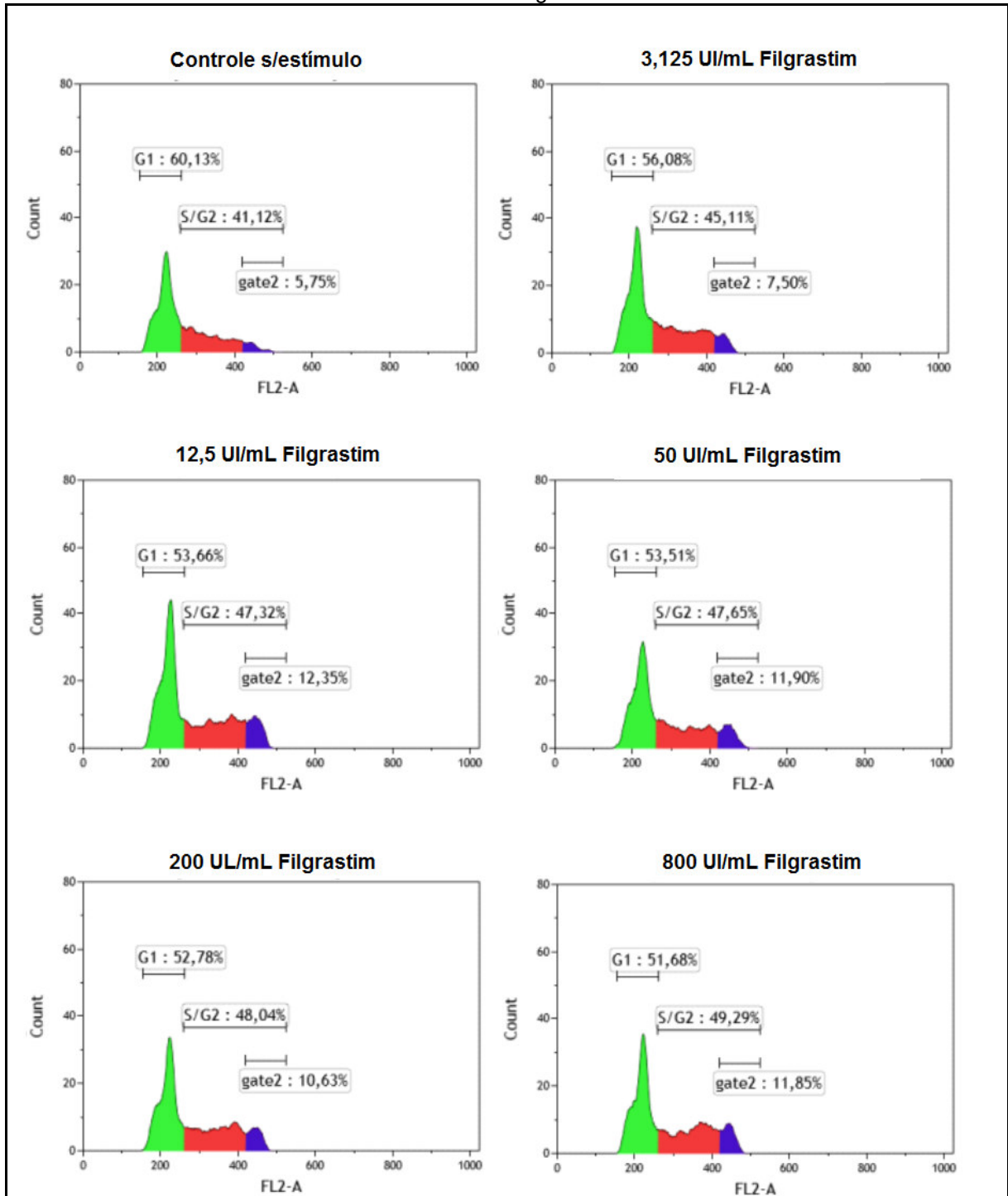
#### 4.4. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DAS DIFERENTES LINHAGENS POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO COM IODETO DE PROPÍDIO

##### 4.4.1. Ensaio de ciclo celular com a linhagem M-NFS-60

Objetivando mimetizar as observações vistas no ensaio de MTT e para comparação com os resultados do ensaio de CFSE frente ao estímulo com Filgrastim, foi realizado o ensaio com o iodeto de propídio, um intercalante de DNA, no tempo de 48h com a linhagem M-NFS-60. Os histogramas representativos foram apresentados na próxima **Figura 31**.



**Figura 31.** Resultado gráfico do ensaio de Iodeto de propídio (PI) da linhagem M-NFS-60 em contato 48 h com o Filgrastim.

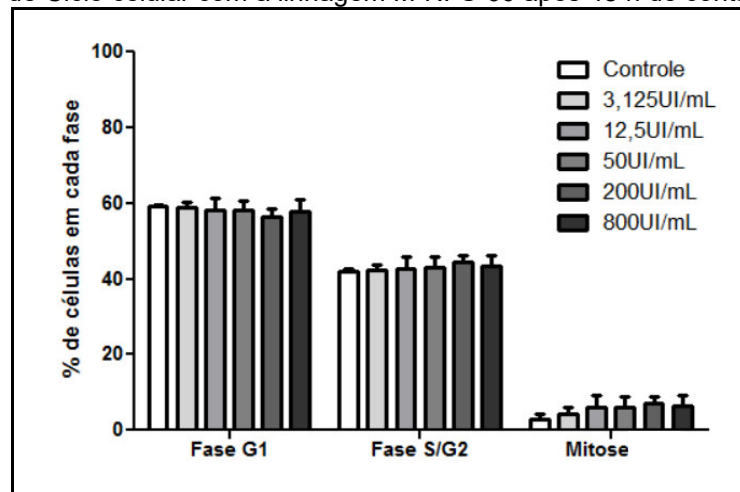


Curva das diluições do Filgrastim em 48 h de contato com a linhagem M-NFS-60. Células controle indica as células marcadas sem estímulo, sendo este o ciclo celular normal da linhagem. Em seguida, as células marcadas em contato com o Filgrastim por 48h da menor dose para maior dose. Os *gates* foram marcados a partir do controle.

Para melhor observação do comportamento das fases do ciclo celular frente a diferentes concentrações do estímulo com Filgrastim, as fases foram apresentadas na **Figura 32**.



**Figura 32.** Ensaio de Ciclo celular com a linhagem M-NFS-60 após 48 h de contato com o Filgrastim



Percentual de células em cada fase do ciclo celular após 48 h de contato com diferentes doses de Filgrastim.

Os dados apresentados na **Figura 32**, quando submetidos ao teste *Two-way* ANOVA medidas repetidas não demonstrou diferença significativa apenas entre as fases. A fim de estudar melhor este resultado, foi realizado o teste *One-way* ANOVA medidas repetidas entre os grupos em cada fase, e novamente em nenhuma das fases foi observada diferença estatística entre as doses de Filgrastim. Além disso, quando aplicado aos modelos de regressão, nenhum dos modelos foi considerado adequado ( $R^2$  inferior a 0,5).

Apesar disso, é possível uma observação visual de uma tendência discreta na diminuição da fase G1 e fase S com o tratamento; e um aumento na fase G2 com o aumento das doses. Este dado sugere que a visualização da proliferação com o tratamento pode ser lenta e seria necessário um tempo maior que 48 h.

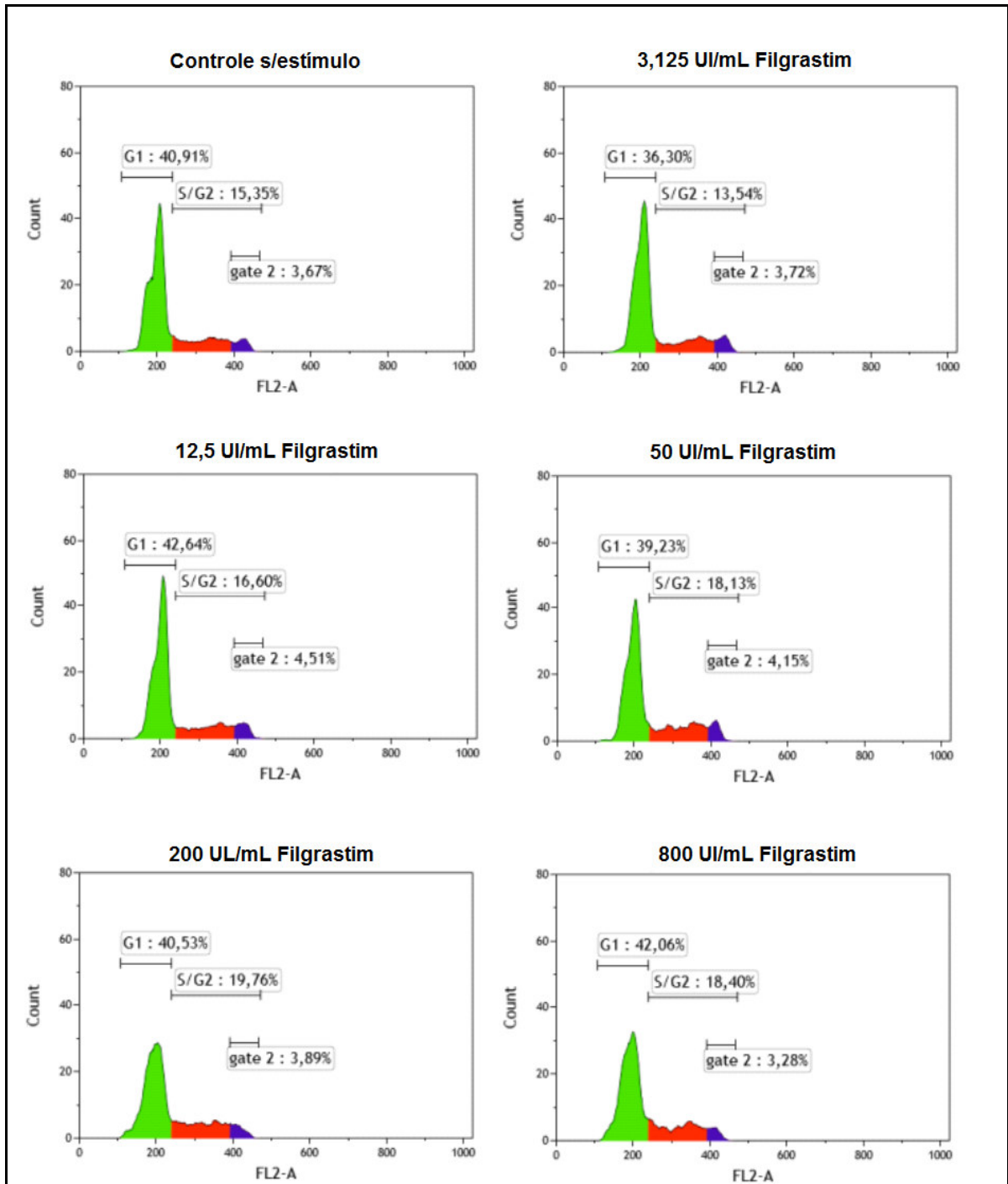
Sendo assim, não foi possível estabelecer uma relação de concentração-resposta com as diferentes concentrações de Filgrastim e as fases do ciclo celular, indicando que talvez o ensaio com iodeto de propídio não seja adequado para esta observação na linhagem M-NFS-60.

#### 4.4.2. Ensaio de ciclo celular com a linhagem Kasumi-1

A fim de comparar os resultados visualizados no ensaio de proliferação com CFSE e de MTT, foi realizado o ensaio com o PI, com diferentes concentrações de

Filgrastim com 48 h de contato com a linhagem Kasumi-1. Os histogramas representativos foram apresentados na próxima **Figura 33**.

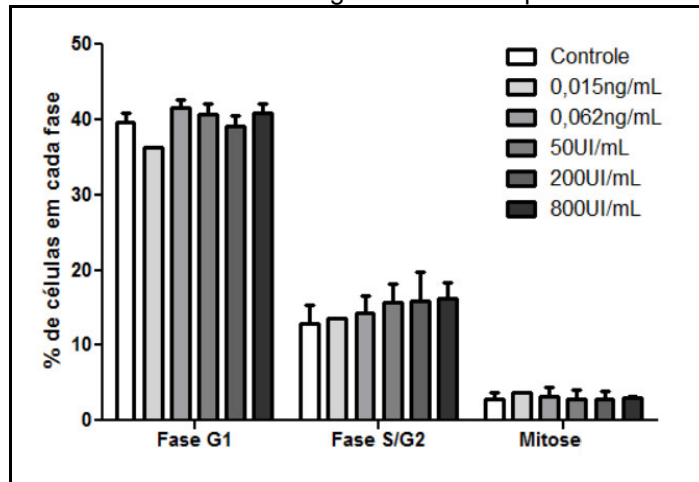
**Figura 33.** Resultado gráfico do ensaio de Iodeto de propídio (PI) da linhagem Kasumi-1 em contato 48 h com o Filgrastim.



Curva das diluições do Filgrastim em 48 h de contato com a linhagem Kasumi-1. Células controle indica as células marcadas sem estímulo, sendo este o ciclo celular normal da linhagem. Em seguida, as células marcadas em contato com o Filgrastim por 48 h da menor dose para maior dose. Os *gates* foram marcados a partir do controle.

Para melhor observação do comportamento das fases do ciclo celular frente a diferentes concentrações do estímulo com Filgrastim, as fases foram apresentadas na **Figura 34**.

**Figura 34.** Ensaio de Ciclo celular com a linhagem Kasumi-1 após 48 h de contato com Filgrastim



Percentual de células em cada fase do ciclo celular após 48 h de contato com diferentes doses de Filgrastim.

Os dados apresentados na **Figura 34**, quando submetidos ao teste *Two-way* ANOVA medidas repetidas não demonstrou diferença significativa entre os grupos, tanto em razão do tratamento como em razão das diferentes fases. O que se pode notar é que o ciclo celular da Kasumi-1 normal apresenta a maioria das células em fase G1 e poucas células nas fases seguintes, independente do tratamento. Quando aplicado aos modelos de regressão, nenhum dos modelos foi considerado adequado ( $R^2$  inferior a 0,5) para ambas as fases.

Novamente, pode-se se fazer uma observação de uma possível tendência a diminuição da fase G1 com o tratamento e o aumento da fase S/G2, sugerindo que a visualização da proliferação com o tratamento pode ser lenta e seria necessário um tempo maior que 48h de contato com o Filgrastim para visualizar mudanças significativas nos percentuais dentro de cada fase.

Não foi possível estabelecer uma relação de concentração-resposta com as diferentes concentrações de Filgrastim e as fases do ciclo celular, indicando que talvez o ensaio com iodeto de propídio não seja adequado para esta observação na linhagem Kasumi-1.

## 4.5. ENSAIO DE ATIVAÇÃO DO RECEPTOR COM MARCAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO STAT3 E STAT5 FOSFORILADAS

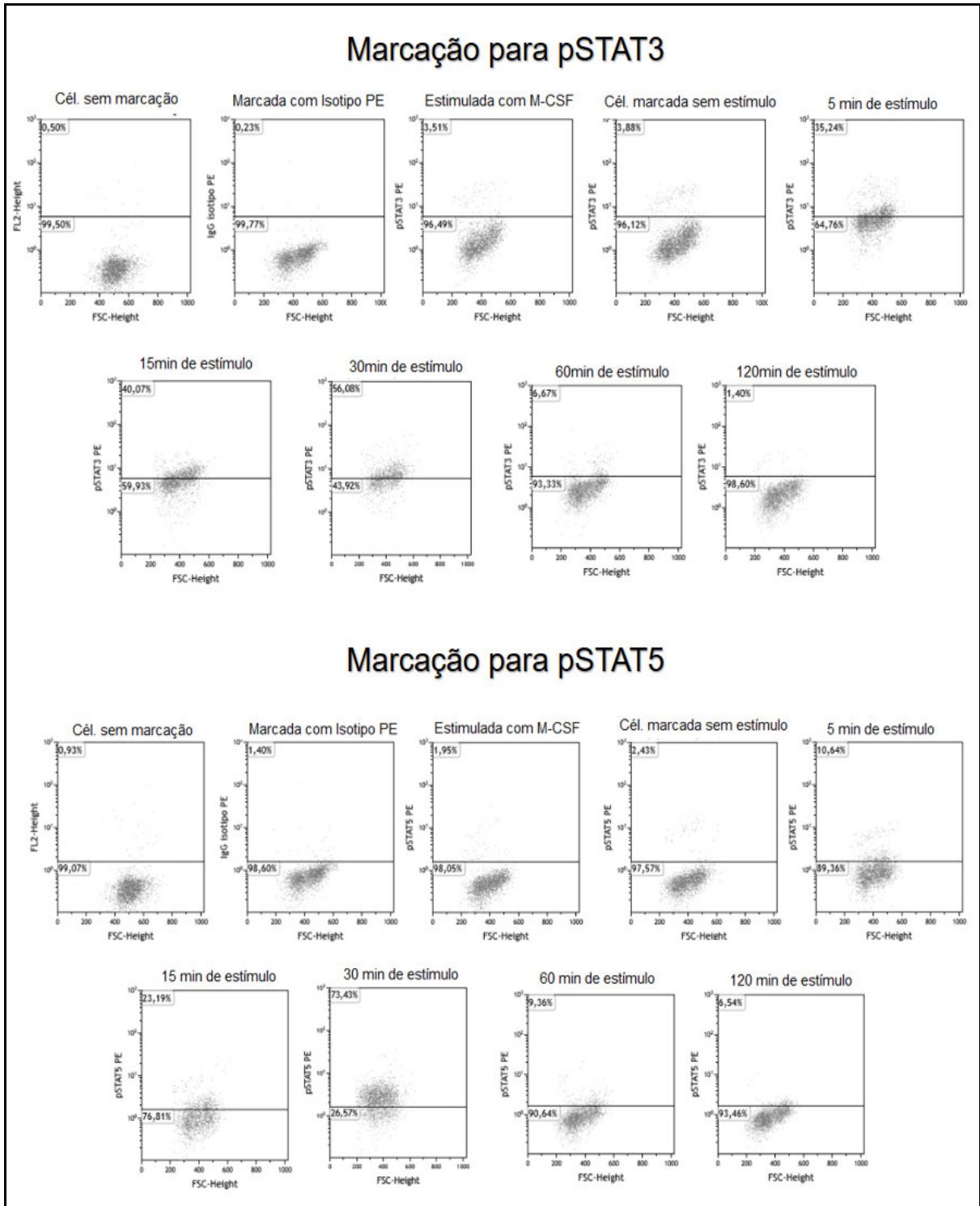
### 4.5.1. Cinética de ativação dos fatores de transcrição

#### 4.5.1.1. Linhagem M-NFS-60

A fim de determinar o melhor tempo de contato da linhagem com o Filgrastim para visualização da ativação de dois fatores de transcrição envolvidos na via das Janus quinase do receptor farmacológico de G-CSF (STAT3 e STAT5 fosforiladas), foi realizada uma cinética com os tempos de contato da linhagem com o Filgrastim de 5 min, 15 min, 30 min, 60 min e 120 min. O melhor tempo foi determinado pelo maior percentual de células positivas, os gráficos da cinética de ativação das STATs para linhagem M-NFS-60 encontram-se nas **Figura 35**.

Em ambos os ensaios é possível notar que com o passar do tempo, houve um aumento do número de células positivas, sendo o pico no tempo de 30 min. Após o período de 30 min é possível observar que há um decaimento no número de células positivas. Como o tempo de 30 min apresentou maior percentual de células positivas, tanto para STAT3 (56%) quanto para STAT5 (73%), esse foi o tempo de escolha para os ensaios posteriores.

**Figura 35.** Ensaio de Cinética de ativação do fator de transcrição pSTAT3 e pSTAT5 com a linhagem M-NFS-60



Cinética com doses fixas de Filgrastim (4ng/mL) para avaliação do melhor tempo de exposição e ativação do receptor. Cél. Sem marcação indica células sem estímulo e sem marcação com anticorpos; Marcada com Isotipo PE indica a efetividade do bloqueio para marcações inespecíficas; Estimulada com M-CSF indica células marcadas com anti-STAT3 e anti-STAT5 e que foram estimuladas com M-CSF; Cél. Marcada sem estímulo indica as células que não foram estimuladas mas são marcadas com anti-STAT3 e anti-STAT5, demonstrando a ativação basal; Demais, indicam os tempos avaliados. Os *gates* foram marcados a partir do controle.

#### 4.5.1.2. Linhagem Kasumi-1

A fim de determinar o melhor tempo de contato da linhagem Kasumi-1 com o Filgrastim para visualização da ativação de dois fatores de transcrição envolvidos na via das Janus quinase do receptor farmacológico de G-CSF (STAT3 e STAT5 fosforiladas), visto que como se trata de uma linhagem humana o perfil de ativação possa ser diferente, foi realizada uma cinética com os tempos de contato da linhagem com o Filgrastim de 5 min, 15 min, 30 min, 60 min e 120 min. O melhor tempo foi determinado pelo maior percentual de células positivas, os gráficos da cinética de ativação das STATs para linhagem Kasumi-1 encontram-se nas **Figura 36**.

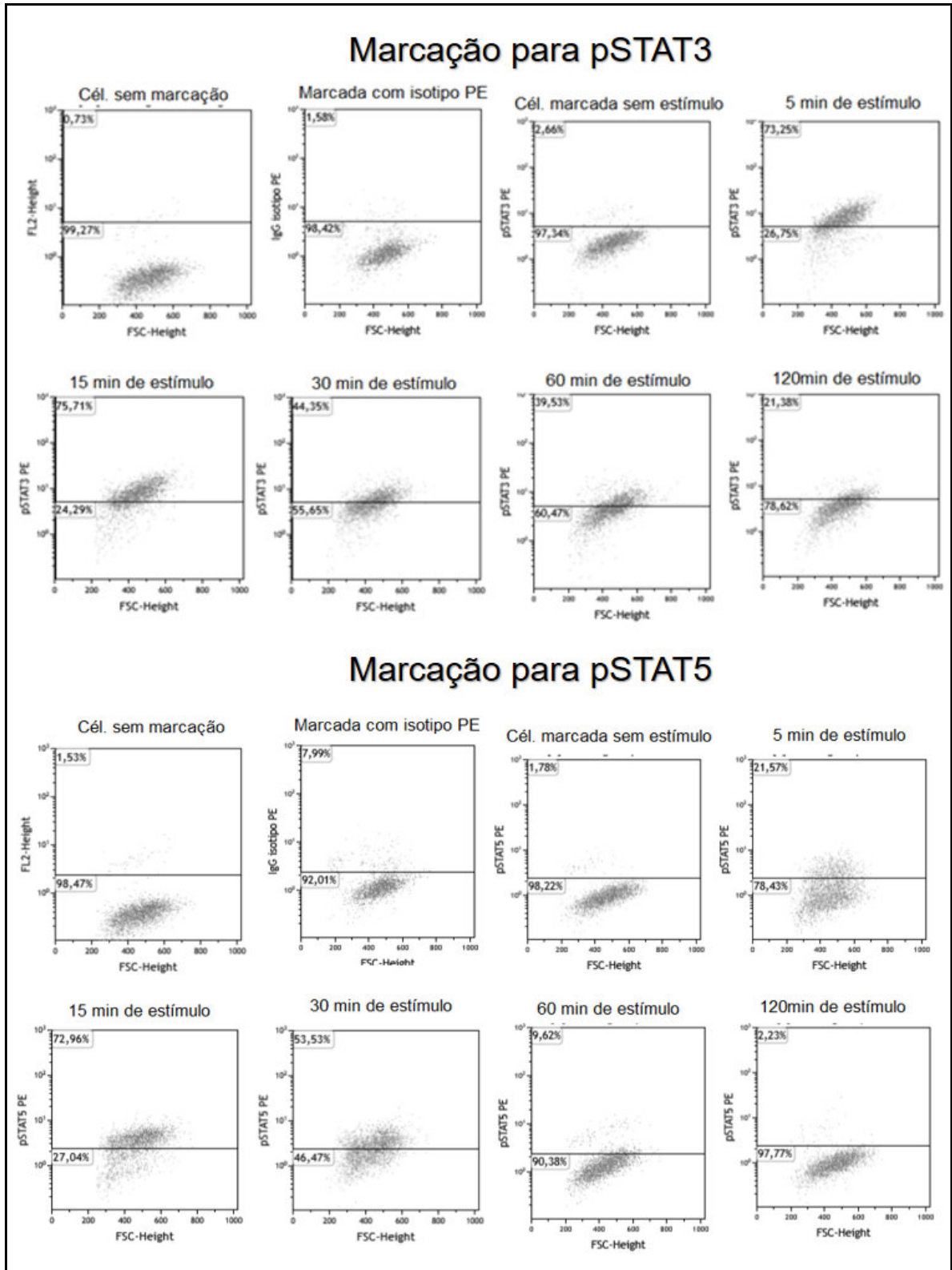
Ao observar a marcação para anti-STAT3 foi possível notar que em 5 minutos de contato com o medicamento já há uma forte sinalização, onde cerca de mais de 70% das células estimuladas são positivas para a marcação. Esta expressão permanece até o tempo de 15 minutos de estímulo. Após 15 minutos, foi observado um decaimento no percentual de células marcadas, indicando que com o passar do tempo há uma diminuição da expressão deste fator de transcrição STAT3 na linhagem Kasumi-1.

Já com a marcação para anti-STAT5 foi possível observar que após 5 minutos 21% das células foram positivas para marcação, este percentual é aumentado até o tempo de 15 minutos, onde observou-se um percentual de aproximadamente 72% de células positivas.

Também no tempo de 15 minutos, o fator de transcrição STAT5 parece atingir o seu maior percentual de células positivas, e posteriormente a esse tempo há uma diminuição tempo-dependente da ativação até atingir novamente os níveis basais após 2 horas de estímulo.

Diante destes resultados, foram considerados os melhores tempos que apresentaram maior percentual de células positivas para a marcação com os anticorpos, sendo para ambos o tempo de 15 min de contato com Filgrastim.

**Figura 36.** Ensaio de Cinética de ativação do fator de transcrição pSTAT3 e pSTAT5 com a linhagem Kasumi-1.



Cinética com doses fixas de Filgrastim (4ng/mL) para avaliação do melhor tempo de exposição e ativação do receptor. Cél. Sem marcação indica células sem estímulo e sem marcação com anticorpos; Marcada com Isotipo PE indica a efetividade do bloqueio para marcações inespecíficas; Cél. Marcada sem estímulo indica as células que não foram estimuladas mas são marcadas com anti-STAT3 e anti-STAT5, demonstrando a ativação basal; Demais, indicam os tempos avaliados. Os gates foram marcados a partir do controle de células da linhagem Kasumi-1.

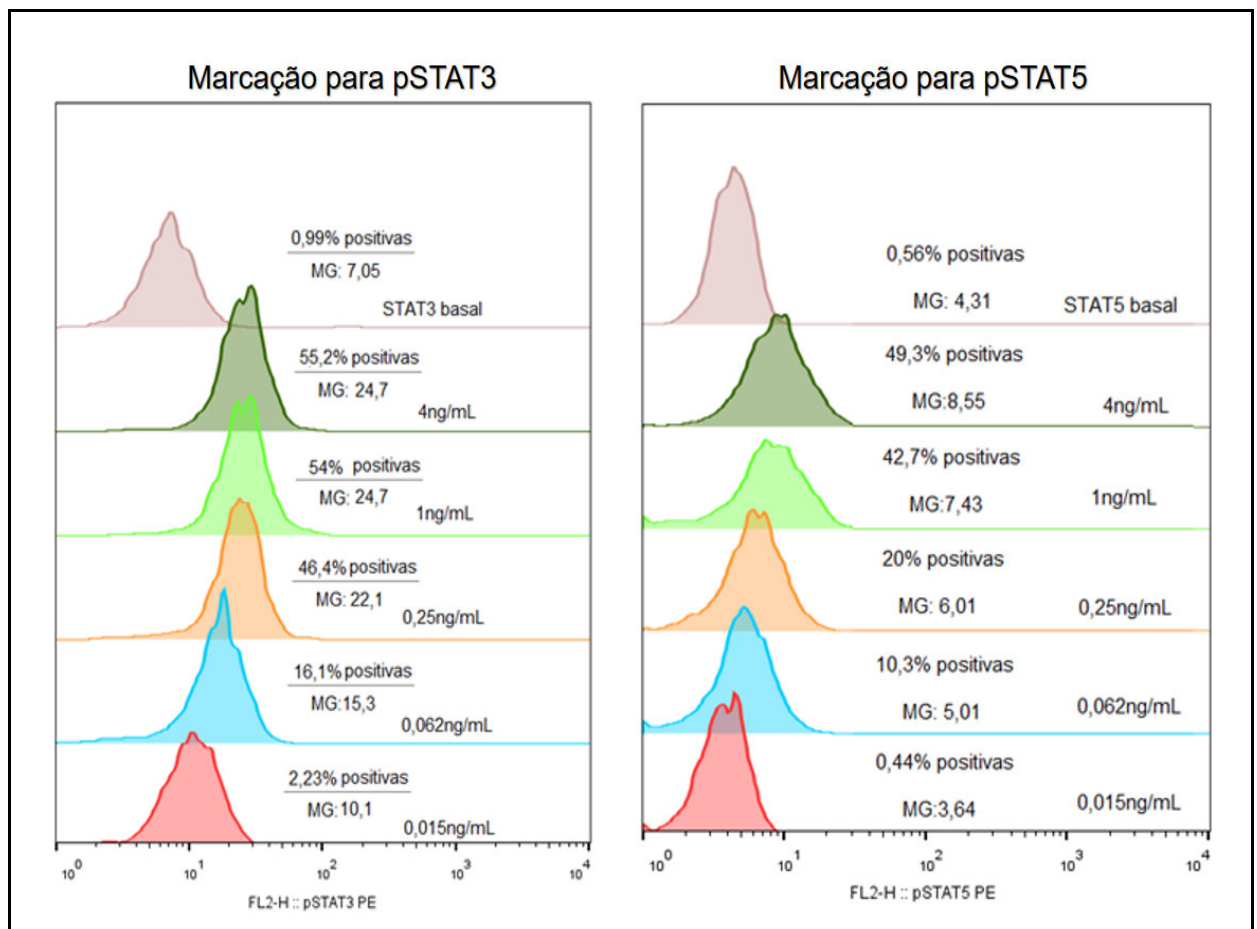
#### 4.5.2. Curva de ativação dos fatores de transcrição com diferentes doses de Filgrastim

Com o propósito de verificar se existe uma correlação entre concentração-resposta do estímulo com Filgrastim e a ativação dos fatores de transcrição pSTAT3 e pSTAT5, foi realizada uma curva com 5 concentrações baseadas no tempo de contato estabelecido no item anterior.

##### 4.5.2.1. Linhagem M-NFS-60

Para a linhagem M-NFS-60 foi estabelecido o tempo de contato da célula com o Filgrastim de 30 minutos. Os gráficos representativos da curva de ativação para ambas as STATs foram apresentados na **Figura 37**.

**Figura 37.** Ensaio de STAT3 e STAT5 em curva com o Filgrastim com a linhagem M-NFS-60.



Curva de diluição com o Filgrastim em diferentes concentrações em contato com o medicamento por 30min. Os *gates* foram marcados a partir do controle de células da linhagem M-NFS-60.



Nos resultados apresentados para a fosforilação da STAT3 foi visualizado um efeito concentração-resposta bastante significativo. Com a maior dose de 4ng/mL mais de 50% das células se mostraram positivas para a marcação com STAT3. Quando as concentrações são submetidas aos modelos de regressão, o modelo logarítmico foi adequado com  $R^2$  de 0,89 e ANOVA da regressão significativa. É observado, porém, que entre as doses mais altas estas alcançam um platô na expressão da STAT fosforilada.

Da mesma forma, com a marcação para STAT5 também é possível a observação de um efeito concentração-resposta com o aumento da concentração de Filgrastim. O modelo de regressão logarítmico apresentou-se adequado com  $R^2$  de 0,968 e ANOVA da regressão altamente significativa (0,002).

Novamente é observado que não há grandes diferenças entre as maiores doses. A menor dose parece não responder ao Filgrastim, já que se compara a ativação basal da célula. A curva mostrou efeito positivo a partir da concentração de 0,062ng/mL de Filgrastim e de forma bem definida até 1ng/mL.

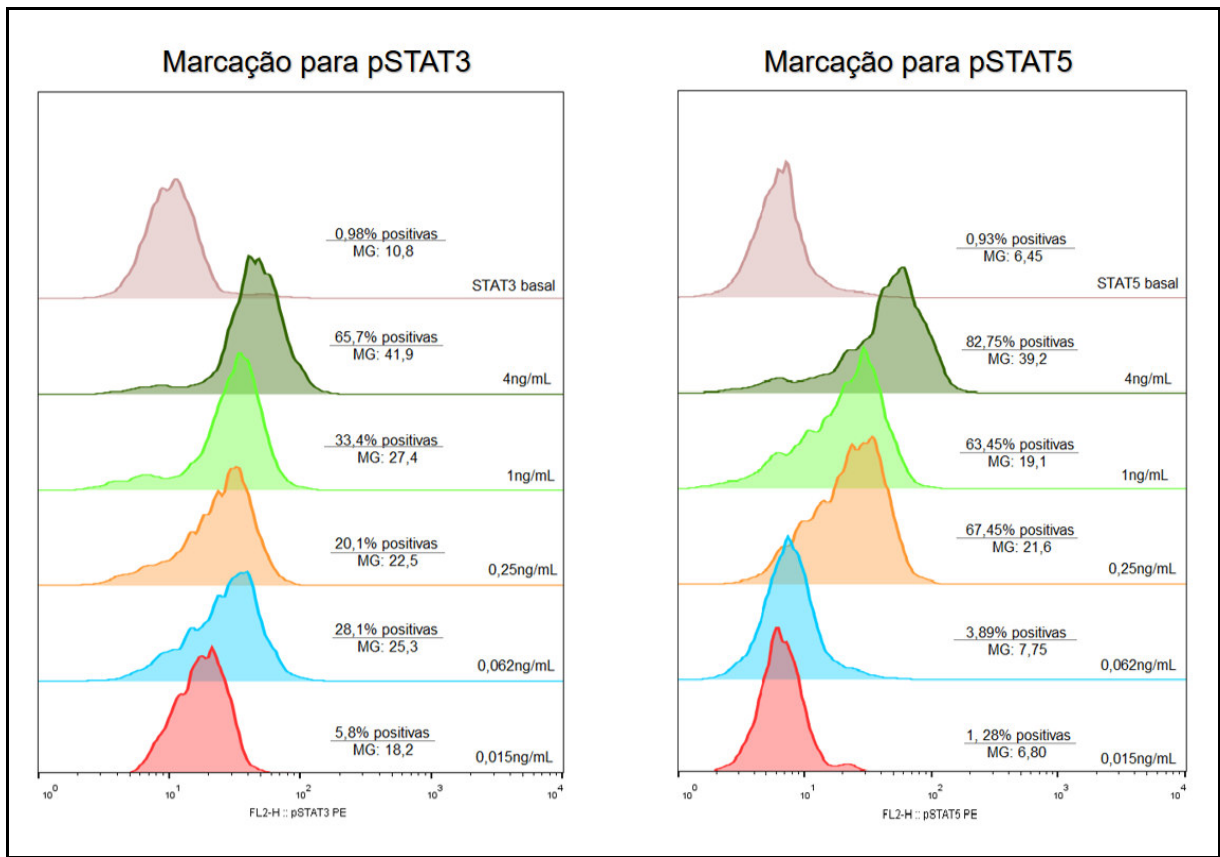
Além disso, a relação resposta de células positivas marcadas para a STAT5 apresenta uma relação concentração-resposta de forma linear no modelo logarítmico, diferente da marcação para STAT3 que se apresenta com uma tendência sigimóide.

Ambas as STATs apresentaram-se adequadas para avaliação da ativação do receptor em células da linhagem M-NFS-60, tanto na rapidez de realização do ensaio, como na observação de uma concentração-resposta mais evidente.

#### 4.5.2.2. *Linhagem Kasumi-1*

Para a linhagem Kasumi-1 foi estabelecido o tempo de contato da célula com o Filgrastim de 15 minutos. Os gráficos representativos da curva de ativação para ambas as STATs foram apresentados na **Figura 38**.

**Figura 38.** Ensaio de STAT3 e STAT5 em curva com o Filgrastim com a linhagem Kasumi-1.



Curva de diluição com o Filgrastim em diferentes concentrações em contato com o medicamento por 15min. Os *gates* foram marcados a partir do controle de células da linhagem Kasumi-1.

Nos resultados apresentados para a fosforilação da STAT3, apesar de possuir uma ativação basal alta, a visualização de um efeito concentração-resposta é bastante significativo, exceto o ponto de 0,25 ng/mL que destoou dos resultados. Com a maior dose de 4 ng/mL cerca de 65% se mostram positivas para a marcação com STAT3. Quando os resultados foram submetidos ao teste de modelos de regressão, diferentemente dos outros resultados, a STAT3 para Kasumi-1 se adequou melhor a curva linear com  $R^2$  de 0,872 e ANOVA da regressão significativa, porém, o modelo logarítmico, adequado as STATs da linhagem anteriormente descrita também apresentou bons resultados com  $R^2$  de cerca 0,7 e ANOVA da regressão significativa.

Na marcação para STAT5 é possível observar um efeito concentração-resposta com o aumento da concentração do Filgrastim. Novamente a concentração de 0,25 ng/mL apresenta-se levemente superior a concentração de 1 ng/mL, sendo a única destoante dos resultados. Apesar disso, apresentou modelo de regressão logarítmico com  $R^2$  de 0,845 e ANOVA da regressão significativa.

Ambas as STATs apresentaram-se adequadas para avaliação da ativação do receptor. Em especial a correlação da concentração-resposta exibida pela STAT5 foi superior a STAT3.

#### 4.6. COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS E LINHAGENS

A fim de comparar o perfil de respostas entre os ensaios que apresentaram uma correlação significativa, foram realizadas comparações entre os mesmos apresentados a seguir. Por fim, foram realizadas comparações entre as linhagens nos ensaios com correlação significativa. A comparação foi realizada somente comparando inclinações da reta,  $R^2$  da regressão e ANOVA da regressão, a análise estatística não foi possível pois seria necessário a utilização de um padrão de referência para uma comparação adequada dos métodos.

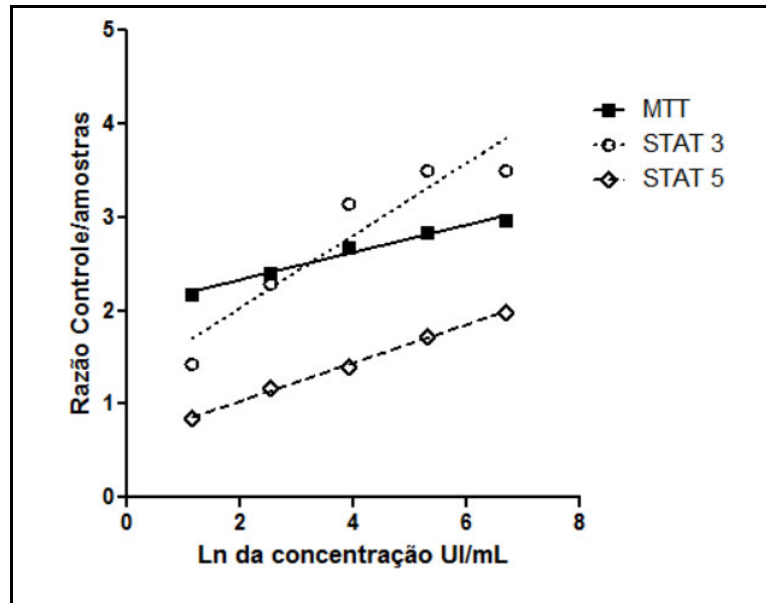
##### 4.6.1. Comparação de ensaios com a linhagem M-NFS-60

A comparação foi realizada através das razões entre os controles e amostras de 5 pontos da curva frente ao Filgrastim, sendo as concentrações comparadas: 3,125 UI/mL, 12,5 UI/mL, 50 UI/mL, 200 UI/mL e 800 UI/mL de Filgrastim. Foram utilizados para comparação os experimentos que apresentaram melhor  $R^2$  e ANOVA da regressão significativa.

Para a linhagem M-NFS-60 foram realizadas comparações entre os ensaios de MTT com cultivo em 60 ng/mL de citocina M-CSF com retirada da linhagem em contato com a citocina por 24 h e os ensaios de citometria para STATs fosforiladas, já que os ensaios de CFSE e PI não apresentaram uma correlação significativa entre concentração-resposta. A comparação gráfica foi apresentada na **Figura 39**.

Considerando a avaliação de todos como uma curva de regressão em logarítmico, os  $R^2$  foram de 0,9811 para MTT, 0,8888 para STAT3 e 0,9978 para STAT5. As inclinações da reta foram de 0,1460, 0,3868 e 0,2049, respectivamente. Todas as ANOVAS da regressão foram significativas.

**Figura 39.** Comparação entre o ensaio de MTT e STATs em forma de curva com Filgrastim para linhagem M-NFS-60.



Comparação da média do experimento 2 de MTT com o experimento 2 de STAT3 e com o experimento 1 de STAT5 da linhagem M-NFS-60.

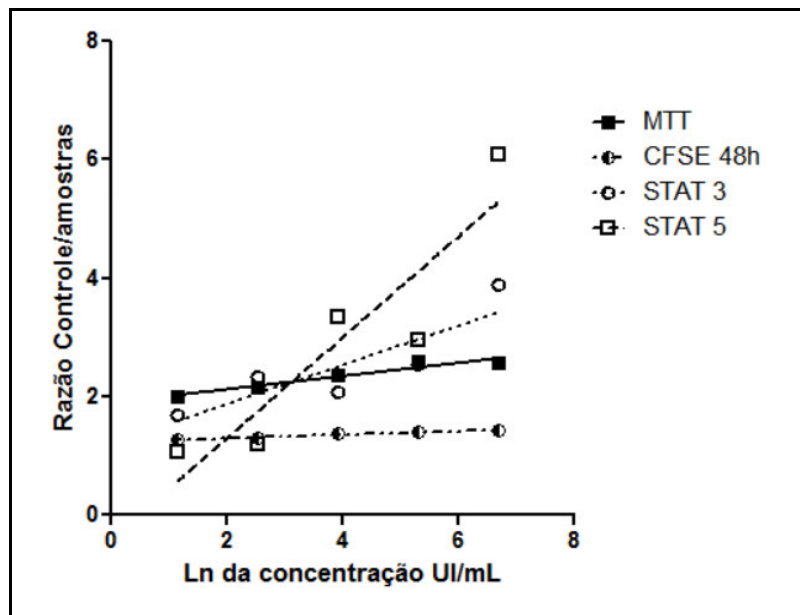
Conforme observado na **Figura 39**, o ensaio de marcação da STAT3 fosforilada apresentou maior inclinação, porém com a menor correlação. O ensaio de marcação com a STAT5 por outro lado, apresentou a segunda maior inclinação da reta com o melhor coeficiente de determinação, sendo visualmente comparado ao ensaio de MTT pela direção das linhas quase paralelas.

#### 4.6.2. Comparação de ensaios com a linhagem Kasumi-1

Da mesma forma que o item anterior, a comparação foi realizada através das razões entre os controles e amostras de 5 pontos da curva frente ao Filgrastim, sendo as concentrações comparadas: 3,125 UI/mL, 12,5 UI/mL, 50 UI/mL, 200 UI/mL e 800 UI/mL de Filgrastim. Foram utilizados para comparação os experimentos que apresentaram melhor  $R^2$  e ANOVA da regressão significativa.

Para a linhagem Kasumi-1 foram realizadas comparações entre os ensaios de MTT com cultivo com 20% SFB, o ensaio de CFSE 48 h e os ensaios de citometria para STATs fosforiladas. Os ensaios de CFSE 24 h e PI não foram considerados por não apresentarem uma correlação significativa entre concentração-resposta. A comparação gráfica foi apresentada na **Figura 40**.

**Figura 40.** Comparação entre o ensaio de MTT, CFSE 48 h e STATs em forma de curva com Filgrastim para linhagem Kasumi-1.



Comparação da média do experimento 3 de MTT com o experimento 2 CFSE, experimento 1 de STAT3 e com o experimento 1 de STAT5 da linhagem Kasumi-1.

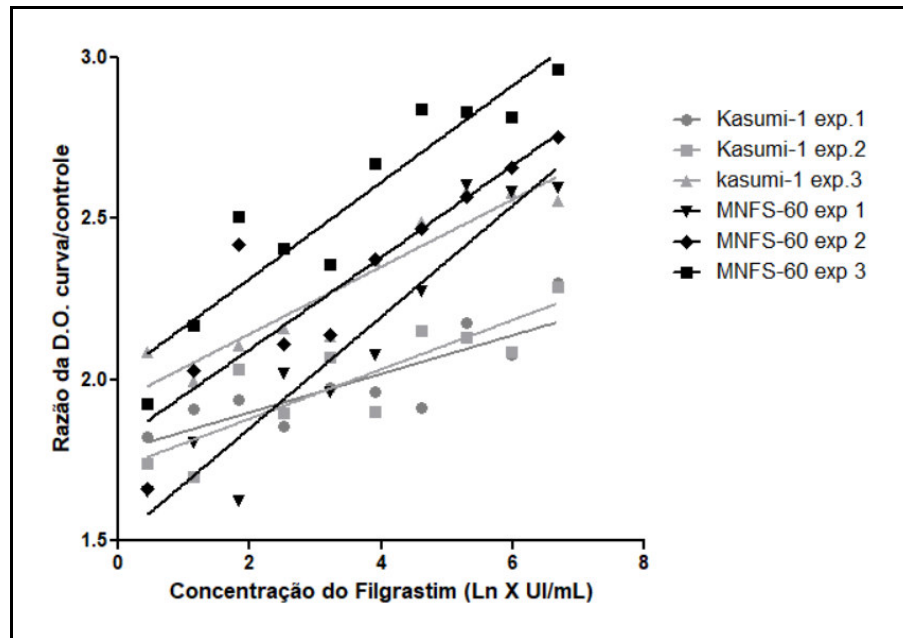
Na avaliação da regressão, os experimentos apresentaram os seguintes  $R^2$  para curva em logarítmico: 0,9263 para MTT, 0,9717 para CFSE 48 h, 0,7592 para STAT3 e 0,8445 para STAT5. As inclinações da reta foram de 0,1117, 0,0306, 0,3306 e 0,8516, respectivamente. Todas as ANOVAS da regressão foram significativas. Conforme se pode observar, o ensaio de marcação da STAT5 fosforilada apresentou maior inclinação com uma boa correlação entre os eixos, sendo um dos ensaios mais promissores para visualização de uma concentração-resposta.

#### 4.6.3. Comparação entre as linhagens no ensaio de MTT

No intuito de comparar a resposta do mesmo ensaio nas duas linhagens utilizadas neste trabalho, foram analisados os três melhores ensaios de MTT nas duas linhagens, utilizando como critério os experimentos que apresentaram melhores coeficientes de determinação ( $R^2$ ). Estes foram comparados graficamente entre si. A apresentação dos resultados foi através da média de cada ponto da curva para cada experimento e em seguida as médias de cada ponto foram divididas pelo

valor da densidade óptica da média do controle (célula sem Filgrastim), apresentados na **Figura 41**.

**Figura 41.** Comparação da razão das linhagens no ensaio de MTT.



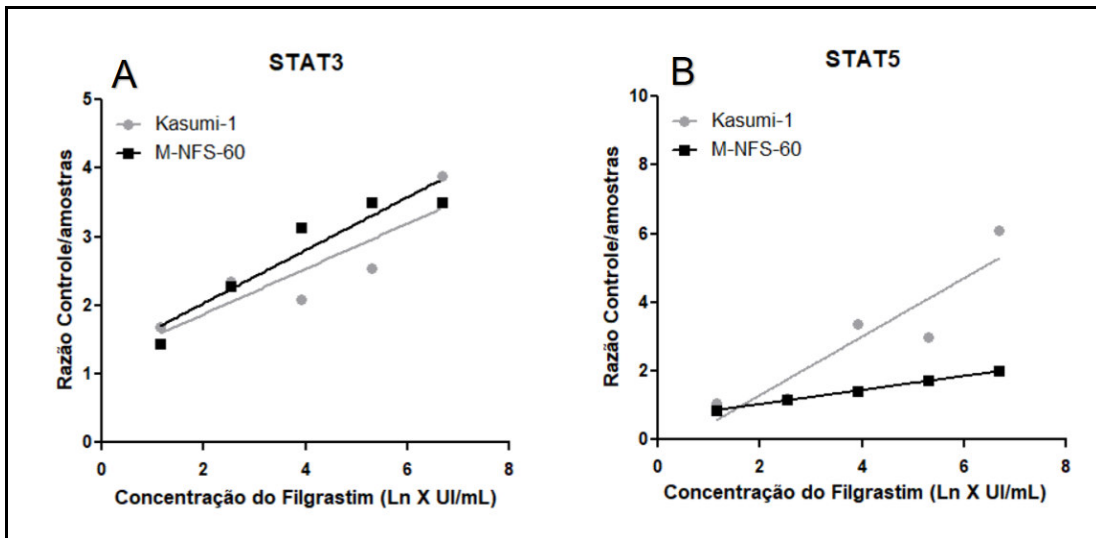
Comparação de 3 experimentos de cada linhagem. No eixo Y apresentada a razão da densidade óptica da curva pela densidade óptica do controle (célula sem estímulo). Cada ponto da curva apenas apresentado em média. Eixo X a concentração de Filgrastim em Ln em UI/mL.

Cada curva na forma de razão foi submetida ao teste de estimação de modelo da regressão e todos os experimentos foram adequados ao modelo de regressão logarítmico, com  $R^2$  superior a 0,7 e ANOVA da regressão significativa. As curvas apresentam uma similaridade dos perfis entre si, porém, ao que parece as células possuem uma intensidade de resposta diferente, quando comparada as inclinações das curvas, os experimentos com a Kasumi-1 apresentaram inclinações menores que a linhagem M-NFS-60, sendo diferente significativamente uma linhagem da outra.

#### 4.6.4. Comparação entre as linhagens no perfil de ativação das pSTAT3 e pSTAT5

Os ensaios representativos de cada linhagem para cada marcação das STATs fosforiladas foram comparados graficamente e apresentados a seguir em relação ao percentual de células positivas para cada marcação, a comparação foi apresentada na **figura 42**.

**Figura 42.** Comparação do percentual de células positivas para cada STATs em cada linhagem



Apresentação da razão entre controle e amostra para as STATs fosforiladas. Eixo Y razão entre controle e amostra. Eixo X Ln da concentração de Filgrastim em UI/mL. Apenas um experimento representativo de cada linhagem e para cada marcação para esta representação gráfica. No gráfico esquerda, as células Kasumi-1 e células M-NFS-60 marcadas para pSTAT3. No gráfico a direita, as células Kasumi-1 e M-NFS-60 marcadas para pSTAT5.

Conforme descrito nos resultados de cada linhagem, a marcação para pSTAT3 (**gráfico A**), ambas as linhagens apresentam um perfil de resposta similar, onde ambas demonstraram regressões significativas, sendo para pSTAT3 o melhor resultado da linhagem M-NFS-60 com  $R^2$  de 0,879 contra a linhagem Kasumi-1 com  $R^2$  de 0,789 no modelo de regressão logarítmica e com ANOVA da regressão significativa em ambas. As inclinações das retas foram para as linhagens M-NFS-60 e Kasumi-1 0,3868 e 0,3306, respectivamente, sendo consideradas estatisticamente iguais.

Já no **gráfico B** foram comparadas as marcações para pSTAT5, onde ambas as linhagens demonstram regressões em forma de logarítmico. Para pSTAT5 a linhagem M-NFS-60 apresentou  $R^2$  de 0,973 contra  $R^2$  de 0,850 da linhagem Kasumi-1, que apesar de apresentar um coeficiente de determinação inferior a linhagem M-NFS-60, a mesma apresentou um maior número de células positivas. Além disso, as inclinações das retas foram: 0,8516 para a Kasumi-1 e 0,2049 para M-NFS-60, indicando que a linhagem Kasumi-1 possui uma resposta mais acentuada, e que apesar de diferentes numericamente, não apresentaram diferença significativa entre elas.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizados o estabelecimento e a padronização do cultivo de duas linhagens: M-NFS-60 e Kasumi-1 no INCQS. Além disso, foi padronizado o ensaio de MTT com estas linhagens frente ao medicamento Filgrastim em forma de curva. Também foram realizados 3 métodos por citometria de fluxo para avaliação da atividade de Filgrastim nas linhagens estabelecidas, onde foram avaliados proliferação celular, ciclo celular e ativação do receptor de G-CSF. Dos métodos estabelecidos, os ensaios de proliferação celular por citometria de fluxo se mostrou adequado apenas para linhagem Kasumi-1 em 48 h de contato com o medicamento. Já os ensaios de ativação do receptor de G-CSF se mostraram adequados para ambas as linhagens.

A linhagem M-NFS-60 teve seu cultivo padronizado no laboratório com sucesso de acordo com as especificações da ATCC e do fornecedor (BCRJ), onde seu meio de cultivo é composto de RPMI 1640 com 10% SFB e recomendado o uso da citocina M-CSF na concentração de 60 ng/mL. Em relação a sua curva de crescimento, apresentou baixa mortalidade nos dias 3 e 4 de cultivo, sendo assim considerados ideais para experimentos e sub-cultivo, após este tempo, as células apresentaram um grande percentual de mortalidade. Este fato pode ser explicado devido ao aumento da confluência com o passar dos dias, há uma redução na mortalidade, observada pela maior razão entre células vivas e mortas, este dado já é bem descrito na literatura, onde em cultura de células de linhagens tumorais a confluência da cultura influencia diretamente na proliferação celular e sua sobrevivência (PERES; CURI, 2005).

Nesta linhagem, visando a economia e redução de possíveis interferências nos ensaios, a quantidade de citocina utilizada para o cultivo foi reduzida cerca de 5 vezes da concentração usual, sendo tratada em vez de 60ng/mL de M-CSF apenas com 12 ng/mL de M-CSF. Os ensaios de otimização da cultura celular da linhagem M-NFS-60 mostraram que independente da concentração da citocina M-CSF, há proliferação e o percentual de morte não apresenta diferença significativa entre os grupos, este fato pode ser resultado já era esperado, visto que com o passar do tempo linhagens imortalizadas possuem uma alta capacidade de multiplicação, onde o tratamento seria capaz de influenciar apenas no rendimento do número de células (VUNJAK-NOVAKOVIC; FRESHNEY, 2005).



Para a linhagem M-NFS-60, o recomendado pela ATCC é um cultivo com 60 ng/mL de M-CSF, sendo assim, o esperado era que com a redução da concentração da citocina, a mesma influenciasse diretamente na proliferação, porém este fato não foi observado. Esta redução foi baseada em um breve resumo da literatura em que foi possível obter uma grande quantidade de células e baixo percentual de morte com a redução da citocina de cultivo (M-CSF), semelhantes aos observados nesta dissertação (MIRANDA et al., 2008).

Surpreendentemente, quando houve a extrapolação dos dias de cultivo para 6 dias, as células cultivadas com 12 ng/mL de M-CSF apresentaram diferença significativa tanto entre o grupo controle (célula apenas com meio), quanto com o grupo tratado com 60 ng/mL de M-CSF em relação ao número de células viáveis. Este fato pode ser explicado porque altas doses de citocina podem saturar os receptores rapidamente e ativar uma proliferação exagerada, resultando em um rápido decaimento da proliferação pelo alto consumo do meio ou ainda a alta concentração de M-CSF possa ser tóxica por um período longo de exposição. A senescência natural da célula juntamente com um estímulo de proliferação, como o M-CSF, em altas concentrações podem contribuir para diminuição da proliferação celular (MARTÍNEZ SALAZAR, 2009; MUNN; ARMSTRONG, 1993). Além disso, o M-CSF parece inibir a caspase-9, um dos indutores de apoptose, sendo assim a concentração de M-CSF não poderia influenciar na proliferação, e sim na sobrevivência (KELLEY et al., 1999).

Dados da literatura indicam que altas concentrações de M-CSF podem estimular a proteólise celular e suprimir a resposta imune, o que poderia justificar a menor taxa de multiplicação celular no 6º dia (D6) para as células tratadas com 60ng/mL (HELD et al., 1996; HUME; MACDONALD, 2012). Outra hipótese é que com a maior quantidade de citocina disponível, a linhagem autorregularia a proliferação através da internalização do receptor de M-CSF e o mesmo seria destruído, sendo assim, o grupo com maior quantidade de citocina sofreria mais esse efeito, reduzindo a quantidade de células nos dias subsequentes (HUME; MACDONALD, 2012). Entretanto, estudos sobre o receptor farmacológico do Filgrastim, o G-CSF receptor, são interessantes para confirmação destas hipóteses, sendo necessárias investigações sobre a quantificação deste receptor na superfície das linhagens estudadas, bem como sua presença ou internalização frente a diferentes concentrações da citocina de cultivo, o M-CSF.

A linhagem Kasumi-1 teve seu cultivo padronizado de acordo com as especificações da ATCC, com o meio RPMI 1640 com 20% SFB. A curva de crescimento desta linhagem apresentou um aumento no número de células mortas até o 4º dia de cultivo e somente após este dia há uma redução do número de células mortas e um aumento no número de células viáveis, demonstrando que com o aumento da confluência há uma redução na mortalidade.

Foi observado que esta linhagem possui altas exigências nutricionais e a confluência é um ponto crucial para o sucesso da cultura (ASOU et al., 1991). Na literatura é relatado que linhagens tumorais podem exigir um alto percentual de soro fetal bovino e que a redução do mesmo pode influenciar no rendimento da cultura (LANGDON, 2004).

Também visando a economia e redução de possíveis interferências nos ensaios, a quantidade de soro fetal bovino utilizada para o cultivo foi reduzida 50% da concentração usual, sendo cultivada em vez de 20% de SFB apenas com 10% de SFB, além de uma terceira condição com 5% de SFB. Esta redução foi proposta pela grande quantidade de soro aumentar o custo do ensaio e a possibilidade de interferência no ensaio, já que o soro contém naturalmente fatores de crescimento e outras citocinas que podem influenciar na proliferação celular, consequentemente no ensaio de potência para este biofármaco. Os ensaios demonstraram que a redução de soro reduziu o número de células viáveis de forma significativa, e, portanto, não foi possível a otimização da cultura da linhagem Kasumi-1 com redução do SFB, pois esta influenciou diretamente no número de células, bem como no percentual de células mortas.

A fim de evitar os “efeitos de borda” ou “*edge effects*” descrito em diversos trabalhos, caracterizados como a diferença de temperatura nas bordas e maior taxa de evaporação (BURT; CARTER; KRICKA, 1979; LAU et al., 2015), os poços de toda a borda das placas de 96 poços não foram utilizados nos ensaios e neles foi adicionado 200µL de PBS estéril.

Para realização da estimativa da potência farmacológica do Filgrastim, deve ser feita a comparação dos valores da curva de uma padrão contra a curva da amostra e a análise através do teste estatístico de paralelismo (FLEETWOOD; BURSA; YELLOWLEES, 2015; HAUCK et al., 2005; LIAO; TIAN; CAPEN, 2011; USP PHARMACOPOEIA, 2015), porém, nesta dissertação não foi possível utilizar o

padrão de referência internacional, sendo utilizado como padrão o medicamento de referência nacional e internacional Granulokine®.

No ensaio de MTT com a linhagem M-NFS-60, a linhagem recomendada pela farmacopeia europeia (PHARMACOPEIA, 2014), não consta nenhum dado sobre o uso da citocina M-CSF durante o ensaio com o Filgrastim. Já que ambas as citocinas são da mesma classe, foi realizado experimentos para verificar a influência desta citocina na resposta da linhagem M-NFS-60 ao Filgrastim (G-CSF recombinante). Foi observado que as células cultivadas continuamente com M-CSF até o momento do ensaio (identificadas graficamente como “M-CSF”) apresentaram uma resposta inferior e com R<sup>2</sup> muito baixo. Já as células cultivadas com a citocina M-CSF até 48 h anterior ao ensaio (identificadas graficamente como “M-CSF(-) 24 h”), e mantidas em meio de cultura sem citocina por 24h anterior ao ensaio apresentaram uma resposta superior.

Este fato pode ser explicado devido a citocina M-CSF e o Filgrastim (G-CSF recombinante) serem citocinas da mesma classe (fatores de crescimento de colônia) e por este motivo possuem pontos em comum na cascata de sinalização dos seus receptores, como ativação de tirosinas cinases (COREY; ANDERSON, 1999) e pela idêntica sequência de proteínas ativadas (Ras / Raf / MEK / ERK), que culminam na proliferação celular em linhagens progenitoras (JACK; ZHANG; FRIEDMAN, 2009).

Também é descrito que em células mieloides ambas as citocinas atuam na diferenciação e proliferação celular (BARBOSA et al., 2014), sugerindo que apesar de possuírem receptores diferentes e atuarem especificamente em células com diferentes perfis, como monócitos e granulócitos, ambas as citocinas podem agir em células ainda não amadurecidas, como é o caso da linhagem M-NFS-60, e desencadearem o mesmo efeito, a ativação e proliferação celular. Sendo assim, o cultivo com a citocina M-CSF poderia estar reduzindo a resposta ao Filgrastim devido a esta interação com a sinalização para proliferação celular.

Quanto a precisão do ensaio de MTT com a linhagem M-NFS-60, a mesma foi alcançada, pois os desvio-padrão intra ensaio e os coeficientes de determinação se adequaram aos estabelecidos como critérios nesta dissertação, já que na monografia deste medicamento estes critérios não são abordados. O coeficiente de variação encontra-se abaixo dos 50%, considerados como ideais de acordo com os critérios da OMS para ensaios biológicos *in vitro* (WHO, 1997). As demais variações observadas estão dentro dos padrões já que ensaios biológicos estão sujeitos a

grande variação de valores e por este motivo o ensaio de paralelismo é utilizado, pois não leva em consideração os valores e sim a similaridade entre a angulação e tendência entre as curvas (GEIGERT, 2004; LIAO; TIAN; CAPEN, 2011).

Conforme reportado, a quantidade de citocina M-CSF parece não influenciar no rendimento celular e no percentual de mortalidade. Para avaliar se a concentração de cultivo M-CSF seria capaz de influenciar na resposta celular ao Filgrastim, as células cultivadas com 12ng/mL de M-CSF e cultivadas com 60ng/mL de M-CSF foram submetidas ao ensaio de MTT na forma de curva. Os experimentos realizados com as células cultivadas com 12ng/mL de M-CSF apresentaram uma resposta inferior estatisticamente as células cultivadas com 60ng/mL de M-CSF, isto porque a inclinação da reta ficou próximo aos limites de aceitação, onde alguns experimentos ficaram fora dos limites de controle do ensaio. Por este motivo, o ensaio de MTT com células cultivadas com 12ng/mL de M-CSF não foi considerado válido, sendo assim, não é recomendado a utilização destas células para este tipo de ensaio.

O motivo desta observação é desconhecido, pois a redução da citocina não influenciou na proliferação celular. Teoricamente, a redução de M-CSF não influenciaria na resposta ao G-CSF por se tratar de citocinas que se ligam a diferentes receptores. Uma hipótese é de que a diminuição de M-CSF, apesar de não influenciar na proliferação basal da célula, poderia influenciar na sua resposta a um estímulo proliferativo, pois com a redução da citocina M-CSF, haveria uma diminuição nos receptores de membrana de proliferação e uma menor sinalização de C/EBP- $\beta$ , sendo assim, este poderia ser superado por C/EBP- $\alpha$ , já que ambos estão presentes ao final da cascata de sinalização de ambos os receptores para proliferação M-CSFR e G-CSFR (BOURETTE; ROHRSCHEIDER, 2000; JACK; ZHANG; FRIEDMAN, 2009; STANLEY; CHITU, 2014; TOUW; PALANDE; BEEKMAN, 2013).

A linhagem Kasumi-1 foi descrita e validada para o ensaio de potência com o medicamento Filgrastim por Chandavarkar e colaboradores(2009). Neste trabalho foi visto que a resposta a linhagem Kasumi-1 foi estatisticamente semelhante a linhagem M-NFS-60, considerada padrão para o ensaio de potência do Filgrastim (CHANDAVARKAR et al., 2009). Pela falta de dados na literatura sobre este uso da Kasumi-1, foi necessário a padronização da densidade celular a ser utilizada no ensaio, já que esta linhagem responde melhor com uma confluência alta. Os

resultados demonstraram que com a maior concentração há uma melhor observação da linearidade. Também foi atendida a precisão intra e inter ensaios de acordo com a OMS (WHO, 1997).

Vale lembrar que para o ensaio de paralelismo para controle de qualidade, ou seja, a comparação de um padrão com amostras, os critérios que devem ser levados em conta além da ANOVA da regressão,  $R^2$ , teste de paralelismo com a comparação de valores F e F crítico, é importante avaliar a potência calculada e o intervalo de confiança, pois ambos são critérios estabelecidos nos compêndios internacionais para qualquer fármaco e biofármaco, sendo no caso do Filgrastim a potência estimada não deve ser inferior a 80% e não deve ser maior que 125% da potência declarada, ainda, o limite de confiança (95%) não deve ser menor que 74% e não mais que 136% da potência estimada (PHARMACOPEIA, 2014).

No caso do ensaio de paralelismo, estes últimos critérios podem ser avaliados previamente através do cálculo de uma terceira variável *dummie* em que se é avaliado a angulação das retas e sua distância, onde o resultado pode mostrar que além de paralelas as retas são colineares, onde não são significativamente diferentes, podendo ser mais uma variável a ser analisada, visto que é descrito erros no ensaio de paralelismo (FLEETWOOD; BURSA; YELLOWLEES, 2015; HAUCK et al., 2005).

A linhagem M-NFS-60 quando submetida ao ensaio de proliferação celular por CFSE não demonstrou diferença significativa entre as médias geométricas de fluorescência das células estimuladas com Filgrastim, tanto em 24h de contato quanto em 48h de contato, mostrando que a linhagem M-NFS-60 não responde de forma proliferativa de forma quantificável ao Filgrastim por CFSE, diferindo dos resultados observados no ensaio de MTT, em que se é observado uma relação concentração-resposta significativa.

Conforme descrito na introdução, o ensaio de MTT é capaz de avaliar a proliferação de forma indireta através do metabolismo mitocondrial do sal de MTT, em relação a esses resultados, pode-se dizer que o que está sendo mensurado no ensaio de MTT não é a proliferação celular e sim sua ativação, que apresenta uma relação concentração-resposta que é visualizada neste ensaio.

Além disso, a célula M-NFS-60 é de origem linfóide e possivelmente teria um perfil diferente de resposta ao G-CSF quando comparado a uma linhagem mielóides, já que é descrito o efeito do G-CSF em linfócitos em uma resposta inflamatória

atuando como potencial ativador, mas não estimulando a proliferação (EYLES et al., 2006). Como se trata de uma linhagem linfóide, a baixa proliferação em 24h e 48h pode ser explicada pela linhagem utilizada responder desta maneira.

Já a linhagem Kasumi-1, diferentemente dos resultados apresentados com a linhagem M-NFS-60, apresenta uma relação concentração-resposta discreta por proliferação em relação a linhagem padronizada em 48h de contato. Este fato pode ser explicado pois a Kasumi-1 se trata de uma linhagem mielóide, que responderia ao G-CSF como estímulo proliferativo (BENDALL; BRADSTOCK, 2014b; LORD; WOOLFORD; MOLINEUX, 2001; TOUW; PALANDE; BEEKMAN, 2013).

Novamente, existe uma diferença de resposta ao Filgrastim na linhagem Kasumi-1 quando a curva é avaliada entre o ensaio de MTT e CFSE, onde o ensaio de MTT apresenta uma relação concentração-resposta superior ao ensaio de CFSE, sugerindo que a proliferação pode não ser a melhor forma de avaliação do biofármaco Filgrastim, já que no MTT sabe-se que é estimado vários fatores entre eles a proliferação celular, o metabolismo mitocondrial, a ativação celular, entre outros (WANG; HENNING; HEBER, 2010). Sendo assim, um ensaio sensível como citometria e verificação do decaimento da fluorescência para estimação da proliferação talvez não seja a melhor forma de avaliar a potência farmacológica deste biofármaco.

No ensaio de ciclo celular com iodeto de propídio, em ambas a linhagens não foi visualizada diferença estatística com o estímulo de Filgrastim nas fases do ciclo celular, sendo observado apenas tendências, estando de acordo com os resultados observados no CFSE. Sendo assim, foram realizados 2 ensaios diferentes para avaliação da proliferação celular que não foi observada, desta forma, pode se dizer que a proliferação celular parece não ser a melhor forma de avaliar a potência farmacológica do biofármaco Filgrastim.

No ensaio de MTT em ambas as linhagens foi observada uma relação concentração-resposta significativa, sendo assim, foi levantada a hipótese de que os resultados observados no ensaio de MTT (padronizado pela farmacopéia) não são devidos a proliferação celular frente ao Filgrastim, mas sim a ativação celular em decorrência da ativação do receptor específico de G-CSF consequentemente levando a ativação celular e não a uma proliferação com característica concentração-resposta. A fim de confirmar esta teoria, foi realizado experimentos

com a marcação de fatores da cascata de sinalização do receptor de G-CSF, específico ao Filgrastim.

Para uma avaliação da influência da citocina de cultivo M-CSF na ativação do receptor de Filgrastim (G-CSF recombinante), as células foram estimuladas com M-CSF e marcadas com anticorpos anti-STAT3 fosforilada e anti-STAT5 fosforilada na linhagem M-NFS-60. Em ambos os ensaios é possível notar que a estimulação com M-CSF não demonstra ativação de nenhuma das STATs, este fato já era esperado visto que a cascata de sinalização do receptor de M-CSF, citocina utilizada para o crescimento da linhagem, parece ter como ativação preferencialmente outras vias que não das Janus-cinases. Além do mais, a ativação de STAT3 na cascata de sinalização deste receptor é prevalente apenas em linhagens mielóides (BOURETTE; ROHRSCHEIDER, 2000; STANLEY; CHITU, 2014), sendo assim, este foi utilizado como controle.

Para ambas a linhagens, M-NFS-60 e Kasumi-1, tanto na marcação anti-STAT3 quanto na marcação anti-STAT5 fosforiladas foi possível notar uma ativação basal das linhagens, justificado pelas funções desempenhadas por estes fatores em outras funções celulares, porém, a STAT5 apresentou menor nível de ativação, quase comparado ao controle sem marcação. Na literatura é descrito que a STAT5 seria mais específica e sensível a ativação do receptor de G-CSF devido a sua proximidade com a parte inicial do mesmo, já a STAT3 apresenta uma ativação basal mais alta pois está relacionada com o final da cascata de ativação e poderia ter outros receptores em comum (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; KENDRICK; BOGOYEVITCH, 2007; PANOPOULOS; WATOWICH, 2008). Dados da literatura sugerem tempos diferentes para ativação destes fatores de transcrição, mas o mesmo varia para cada linhagem celular (HERMANS et al., 1999; ZHANG et al., 2010).

Nas maiores doses de Filgrastim, tanto na média geométrica quanto no percentual de células positivas há pouca diferença. Este fato pode ser explicado porque em doses mais altas pode haver a saturação dos receptores de G-CSF e a resposta ser similar em doses que atinjam esse limiar de saturação quando se trata do STAT3, já que o mesmo está relacionado a outras vias de sinalização (RÉBÉ et al., 2013; ZHANG et al., 2010).

Já ativação de STAT5 é proximal e está relacionada com a ligação específica do receptor de G-CSF, além disso, a ativação de STAT5 está relacionada com

outras vias do receptor de G-CSF e por este motivo, esta ativação apresenta-se mais fortemente quando observado em western-blot quando comparado a outras STATs, como a STAT3 (DONG et al., 1998; TIAN et al., 1996).

Particularmente a linhagem Kasumi-1 parece ter uma ativação do receptor mais rapidamente que a linhagem M-NFS-60, tanto para STAT3 quanto para STAT5. Segundo Agarwal e colaboradores (2015), a STAT3 em linhagens mielóides e neutrófilos é um dos primeiros fatores ativados após a ligação com o receptor de G-CSF, por este motivo, com 5 minutos já é possível notar um percentual alto de células positivas (AGARWAL et al., 2015). A cinética de ativação para a STAT5 apresenta-se diferente para cada linhagem, já foi descrito que dependendo do tipo de célula utilizado, a ativação da STAT5 pode ser detectada até horas depois, por este motivo o estudo cinético em cada linhagem é importante (DONG et al., 1998).

Para ambas as linhagens a marcação de STATs fosforiladas apresentou uma relação concentração-resposta em logarítmico com boa correlação.

Para melhor comparação de métodos seria necessário a utilização de um padrão de referência internacional. Porém, de acordo com os resultados observados nessa dissertação, é necessário um estudo mais aprofundado da relação da proliferação com a resposta ao Filgrastim.

Os ensaios de MTT foram padronizados, mas é necessária a realização de uma validação do ensaio para ambas as linhagens. O ensaio é de fácil execução e consegue estimar uma concentração-resposta com o medicamento Filgrastim. Porém, como já descrito, este ensaio possui grande variabilidade e é passível de erros (TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987; WANG; HENNING; HEBER, 2010). Já o ensaio de ativação do receptor de G-CSF pela marcação de fatores de transcrição STAT3 e STAT5 fosforiladas mostrou uma boa relação concentração-resposta e tem a necessidade de ser realizados mais estudos, juntamente com o padrão, para confirmação dos resultados e validação do mesmo. A determinação da potência por citometria de fluxo por fatores de transcrição já foi relatada na literatura (DE OLIVEIRA et al., 2012), sendo uma forma mais rápida de estimativa da potência, onde o resultado poderia ser observado em menos de 24h, diferente do ensaio de MTT que demora 48h.

A linhagem Kasumi-1 parece ser promissora para realização de ensaios de potência farmacológica com o medicamento Filgrastim, visto que é de linhagem mielóide e humana conforme já relatado.



## 6. PERSPECTIVAS

A linhagem Kasumi-1 se mostrou promissora para realização dos ensaios de potência do medicamento Filgrastim e que apresenta custos de manutenção inferiores a da linhagem atualmente sugerida pela farmacopéia, M-NFS-60, porém, são necessários mais ensaios para validação desta linhagem para que a Kasumi-1 possa ser sugerida como linhagem alternativa para o ensaio de potência. Além disso, é visualizado que após o dia 7 de cultivo há uma melhora no rendimento da cultura, sendo necessário então um prolongamento do estudo da sua curva de crescimento.

È necessário um estudo mais aprofundado das respostas celulares frente ao Filgrastim por MTT, pois mesmo com a recomendação da farmacopéia europeia de 10 diluições 1:2, a curva utilizada não esgota a resposta celular ao Filgrastim, visto que o menor ponto da curva ainda apresenta resposta quando comparado ao controle negativo (sem estímulo).

Nos ensaios de CFSE e PI após a realização da padronização apresentada nesta dissertação, seria interessante a realização de testes envolvendo o uso do padrão USPC de referência .

Os ensaios relatados nesta dissertação foram realizados com o medicamento de referência nacional e internacional (Granulokine®). No entanto, visando uma validação dos métodos descritos, desenvolvidos e padronizados neste trabalho, faz-se necessária a utilização do padrão de referência USPC, mas que devido ao seu alto custo não foi utilizado nos ensaios de desenvolvimento e padronização desta dissertação.

## 7. CONCLUSÃO

A linhagem M-NFS-60 teve seu cultivo estabelecido e padronizado com sucesso no INCQS. Apesar do cultivo com 12ng/mL de citocina M-CSF não afetar o número de células totais obtidas na cultura, o mesmo parece influenciar na resposta ao ensaio de potência por MTT e por este motivo não deve ser utilizado.

A linhagem Kasumi-1 teve seu cultivo estabelecido e padronizado no INCQS. A melhor condição de cultivo permanece com a concentração de soro fetal bovino em 20%, conforme recomendado

O ensaio de MTT foi padronizado para ambas as linhagens se apresentou reprodutível, pois os experimentos não apresentaram diferenças estatísticas entre os mesmos. Para linhagem M-NFS-60, ficou estabelecido que a linhagem deve ficar privada da citocina M-CSF por 24 h antecedentes ao ensaio. Quanto a linhagem Kasumi-1 o ensaio de MTT se mostrou com uma boa relação concentração-resposta, indicando que esta linhagem pode ser utilizada futuramente para ensaios de potência com o Filgrastim.

Os ensaios padronizados de ciclo celular com iodeto de propídio não foram adequados para ambas as linhagens, pois não foi capaz de visualizar uma curva em concentração-resposta. Já os ensaios padronizados de proliferação celular com CFSE, se mostraram eficientes apenas para a linhagem humana Kasumi-1 em 48 h, observando uma resposta similar ao do ensaio de MTT. Para a linhagem M-NFS-60, o CFSE não apresentou sensibilidade adequada para visualização de uma resposta dependente da concentração.

O ensaio de ativação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT5 fosforiladas se apresentaram com fortes tendências a uma concentração-resposta, confirmando a hipótese descrita de que o ensaio de MTT visualiza para este biofármaco, mais a ativação celular do que a proliferação propriamente dita. Além disso, este ensaio se apresenta promissor para avaliação da qualidade biológica do Filgrastim, tanto em relação a especificidade do ensaio quanto no tempo de obtenção do resultado, sendo este inferior a 48 h.

Por fim, foi possível atingir todos os objetivos deste trabalho, como desenvolvimento, estabelecimento e padronização dos ensaios de MTT, CFSE, PI e ativação do receptor farmacológico pela cascata de sinalização com os fatores STAT3 e STAT5, ficando em pendência a validação destes ensaios com o padrão de

referência. Os ensaios por citometria de fluxo com a marcação dos fatores de sinalização STAT3 e STAT5 se mostraram promissores para verificação de potência do biofármaco Filgrastim.

Além disso, os métodos aqui padronizados podem ser aplicados a outros biofármacos que possuem o mesmo mecanismo de ação farmacológico, como derivados do Filgrastim : Pegfilgrastim, Lenograstim, entre outros.

## REFERÊNCIAS

AAPRO, M. S. et al. 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 1, p. 8–32, 2011.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAIS, S. Células e tecidos do sistema imune. In: **Imunologia celular e molecular**. 7<sup>o</sup> edição ed. [s.l.: s.n.]. p. 15–17.

AGARWAL, S. et al. G-CSF promotes neuroblastoma tumorigenicity and metastasis via STAT3-dependent cancer stem cell activation. **Cancer Research**, v. 75, n. 12, p. 2566–2579, 2015.

ALBERTS, B. et al. Química celular e biossíntese. In: **Biologia molecular da célula**. 5<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010a. p. 45–124.

ALBERTS, B. et al. O ciclo celular. In: **Biologia molecular da célula**. 5 ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010b. p. 1053–1114.

AMGEN. **Product monograph: Neupogen**Amgen Canada Inc. Mississauga: [s.n.].

ANVISA. **Registro de produtos biológicos: bases legais e guias**. 1<sup>o</sup> edição ed. Brasília: ANVISA, 2011.

ASOU, H. et al. Establishment of a Human Acute Myeloid Leukemia Cell Line (Kasumi-1) With 8;2 1 Chromosome Translocation. **Blood**, v. 77, n. 9, p. 2031–2036, 1991.

AULTON, M. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. ed. [s.l.] Grupo A, 2005.

AVIS, K. E.; WAGNER, C. M.; WU, V. L. **Biotechnology: Quality assurance and validation**. 1<sup>o</sup> ed. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1999.

BARAHUIE, F. et al. Development of drug delivery systems based on layered hydroxides for nanomedicine. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 5, p. 7750–7786, 2014.

BARBOSA, C. M. V. et al. PLCg2 and PKC are important to myeloid lineage commitment triggered by M-SCF and G-CSF. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 1, p. 42–51, 2014.

BARREDA, D. R.; HANINGTON, P. C.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 509–554, 2004.

BATH, P. M.; SPRIGG, N. Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. **Cochrane**

**Database of Systematic Reviews**, v. 3, n. 6, p. CD005207, 2006.

BENDALL, L. J.; BRADSTOCK, K. F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 355–367, 2014a.

BENDALL, L. J.; BRADSTOCK, K. F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 4, p. 355–67, ago. 2014b.

BIERMAN, H. R. Characteristics of leukopoietin G in animals and man. **Leukopoiesis in Health and Disease**, v. 113, p. 753–765, 1964.

BOETTCHER, S. et al. Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. **Blood**, v. 124, n. 9, p. 1393–1403, 2014.

BOURETTE, R. P.; ROHRSCHEIDER, L. R. Early events in M-CSF receptor signaling. **Growth factors**, v. 17, n. 3, p. 155–166, 2000.

BRADLEY, T. R.; METCALF, D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. **Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.**, v. 44, p. 287–300, 1966.

BRANDÃO, C. M. R. et al. Gastos do Ministério da Saúde do Brasil com Medicamentos de Alto Custo: Uma Análise Centrada no Paciente. **Value in Health**, v. 14, n. 5 SUPPL., p. S71–S77, 2011.

BRASIL. **Lei Nº 5.991 de 17 de dezembro de 1973**. Brasil, 1973.

BRASIL. **Lei Nº 6.360, de 23 de setembro de 1976**. Brasil, 1976.

BRASIL. **Constituição Federal** Brasil, 1988.

BRASIL. **Lei Nº 8078, de 11 de setembro de 1990**. Brasil, 1990a.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Lei n. 8.080, de 19 de setembro de 1990.**, 1990b.

BRASIL. **Política Nacional de medicamentos**. Brasília, Brasil, 2002.

BRASIL. **ANVISA, RDC nº 17, de 16 de abril de 2010**. Brasil, 2010.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Programa de Assistência farmacêutica e insumos estratégicos**. Disponível em:  
<<http://www.portaldatransparencia.gov.br/PortalTransparenciaGDProgramaPesquisaAcao.asp?ano=2016&textoPesquisaPrograma=&codigoPrograma=1293>>. Acesso em: 27 set. 2016a.

BRASIL. **ANVISA, Resolução RE Nº 2063 de 29 de julho de 2016**. Brasil, 2016b.

BRAVERY, C. A. et al. Potency assay development for cellular therapy products: An ISCT\* review of the requirements and experiences in the industry. **Cytotherapy**, v. 15, n. 1, p. 9–19, 2013.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. [s.l.] McGraw Hill, 2012.

BUSHNELL, T. **Cell proliferation**. Disponível em: <<https://expertcytometry.com>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

CAIN, D. W. et al. Inflammation triggers emergency granulopoiesis through a density-dependent feedback mechanism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

CARVALHO, T. T. et al. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-induced mechanical hyperalgesia in mice: Role for peripheral TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10. **European journal of pharmacology**, v. 749, p. 62–72, 15 fev. 2015.

CFF. **A assistência farmacêutica no SUS**. 1. ed. Brasília: Conselho Federal de Farmácia, 2010.

CHANDAVARKAR, N. M. et al. **Novel use of an indicator cell line for bioassay**USA, 2009.

CLOGSTON, C. L. et al. Detection and quantitation of recombinant granulocyte colony-stimulating factor charge isoforms: Comparative analysis by cationic-exchange chromatography, isoelectric focusing gel electrophoresis, and peptide mapping. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 375–383, 1992.

CNHAOBIO. **Cell viability assay kit**. Disponível em: <<http://www.biopcr.com/Shop/cellbioch/60991.html>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

CODEVILLA, C. F. et al. Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 26, n. 2, 2004.

CODEVILLA, C. F. et al. Validation of an SEC-HPLC Method for the Analysis of rhG-CSF in Pharmaceutical Formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 17, p. 2689–2698, 2005.

CONNAS. **Assistência farmacêutica no SUS**. 1. ed. Brasília: Ministério da saúde, 2007.

COREY, S. J.; ANDERSON, S. M. Src- related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. **Blood**, v. 93, n. 3, p. 761–779, 1999.

CRAWFORD, J. et al. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung

cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, p. 164–170, 1991.

CROBU, D. et al. Preclinical and clinical phase I studies of a new recombinant Filgrastim (BK0023) in comparison with Neupogen®. **BMC Pharmacol Toxicol**, v. 15, n. 7, 2014.

CROUCH, S. P. M. et al. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, p. 81–88, 1993.

DE OLIVEIRA, E. R. A. **Estudo da atividade biológica do interferon alfa-2b em células Hep-2C para aplicação em ensaios de determinação de potência**. [s.l.] FIOCRUZ, 2010.

DE OLIVEIRA, E. R. A. et al. Potency determination of recombinant IFN-alpha based on phosphorylated STAT1 using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 375, n. 1–2, p. 271–275, 2012.

DE OLIVEIRA, E. R. A. et al. Reduction of cell viability induced by IFN-alpha generates impaired data on antiviral assay using Hep-2C cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 400–401, n. 1, p. 97–105, 2013.

DEFREES, S. et al. GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in Escherichia coli. **Glycobiology**, v. 16, n. 9, p. 833–843, 2006.

DEITCH, A. D.; LAW, H.; WHITE, R. D. A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. **The Journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 967–972, 1982.

DONG, F. et al. Stimulation of Stat5 by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is modulated by two distinct cytoplasmic regions of the G-CSF receptor. **Journal of immunology**, v. 161, n. 12, p. 6503–9, 1998.

EYLES, J. L. et al. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils - forgotten mediators of inflammatory disease. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, p. 500–510, 2006.

FARAJI, F. et al. The Structural Characterization of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 1, n. 1, p. 15–19, 2010.

FDA. **Guidance for Industry: Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products** **Biotechnology Law Report, FDA**. [s.l.: s.n.].

FLEETWOOD, K.; BURSA, F.; YELLOWLEES, A. Parallelism in practice: approaches to parallelism in bioassays. **PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA**, v. 69, n. 2, p. 248–63, 2015.

FRAMPTON, J. E.; LEE, C. R.; FAULDS, D. Filgrastim. A review of its

pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. **Drugs**, v. 48, n. 5, p. 731–760, 1994.

FRANCISCO-CRUZ, A. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. **Medical Oncology**, v. 30, n. 774, p. 1–14, 2013.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1185–1197, 2013.

GABRILOVE, J. L. et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. **The new england journal of medicine**, v. 318, n. 22, p. 1414–1422, 1988.

GARNICK, R. L.; SOLLI, N. J.; PAPA, P. A. The role of quality control in biotechnology: an analytical perspective. **Analytical chemistry**, v. 60, n. 23, p. 2546–2557, 1988.

GASCON, P. Presently available biosimilars in hematology-oncology - Part II: G-CSF. **Oncologie**, v. 13, n. 5, p. 213–217, 2011.

GEIGERT, J. **The challenge of CMC Regulatory compliance for biopharmaceuticals**. New York: Plenum, 2004.

GUARDABASSO, V.; RODBARD, D.; MUNSON, P. J. A model-free approach to estimation of relative potency in dose-response curve analysis. **American Journal of Physiology**, v. 252, n. 15, p. E357–E364, 1986.

GUPTA, V. et al. **Basic and Applied Aspects of Biotechnology**. 1. ed. Singapore: Springer Nature, 2017.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high throughput screening. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 703–710, 2004.

HAMILTON, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 7, p. 533–544, 2008.

HAUCK, W. W. et al. Assessing Parallelism Prior to Determining Relative Potency. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 59, p. 127–137, 2005.

HEIL, G. et al. A randomized double-blind, placebo-controlled, phase III study of Filgrastim in Remission induction and consolidation therapy for adults with de novo acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4710–4718, 1997.

HELD, P. **Luminescent determination of ATP concentrations**.



HELD, T. K. et al. Kinetics and dose dependence of macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation and activation of murine mononuclear phagocytes in situ: differences between lungs, liver, and spleen. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 16, n. 2, p. 159–168, 1996.

HERMANS, M. et al. Sustained receptor activation and hyperproliferation in response to granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in mice with a severe congenital neutropenia/acute myeloid leukemia-derived mutation in the G-CSF receptor gene. **J Exp Med**, v. 189, n. 4, p. 683–692, 1999.

HOGGATT, J.; PELUS, L. M. New G-CSF agonists for neutropenia therapy. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 23, n. 1, p. 21–35, 2014.

HÖGLUND, M. Glycosylated and non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF)-what is the difference? **Medical oncology**, v. 15, n. 4, p. 229–33, 1998.

HONG, S.-Y. et al. Production of bioactive human granulocyte-colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 47, n. 1, p. 68–73, 2006.

HUME, D. A.; MACDONALD, K. P. A. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. **Blood**, v. 119, n. 8, p. 1810–1820, 2012.

ICHIKAWA, Y.; PLUZNIK, D. H.; SACHS, L. In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. **PNAS**, v. 56, p. 488–495, 1966.

JACK, G. D.; ZHANG, L.; FRIEDMAN, A. D. M-CSF elevates c-Fos and phospho-C/EBP $\alpha$ (S21) via ERK whereas G-CSF stimulates SHP2 phosphorylation in marrow progenitors to contribute to myeloid lineage specification. **Blood**, v. 114, n. 10, p. 2172–2180, 2009.

KELLEY, T. W. et al. Macrophage Colony-stimulating Factor Promotes Cell Survival through Akt / Protein Kinase B \*. **The journal of biological chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26393–26398, 1999.

KENDRICK, T. S.; BOGOYEVITCH, M. A. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by the granulocyte colony-stimulating factor receptor: mechanisms and functional consequences. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 591–607, 2007.

KIMURA, A. et al. SOCS3 Is a physiological negative regulator for granulopoiesis and Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 8, p. 6905–6910, 2004.

KLIMENKO, O. V; SHTILMAN, M. I. Transfection of Kasumi-1 cells with a new type of polymer carriers loaded with miR-155 and antago-miR-155. **Cancer gene therapy**, v. 20, n. 4, p. 237–41, abr. 2013.

KOLESNIKOV, A. A. The mitochondrial genome. The nucleoid. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 10, p. 1057–1065, 2016.

KUDRYASHEVA, N. S. Bioluminescence and exogenous compounds: Physico-chemical basis for bioluminescent assay. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, n. 1, p. 77–86, 2006.

KYONO, W.; COATES, T. D. A practical approach to neutrophil disorders. **Pediatric Clinics of North America**, v. 49, n. 5, p. 929–971, 2002.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas : finalmente “ compatíveis ”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LANGDON, S. P. **Cancer cell culture: methods and protocols**. [s.l: s.n.].

LAYTON, J. E.; HALL, N. E. The interaction of G-CSF with its receptor. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 3181–3189, 2006.

LIAO, J. J. Z.; TIAN, Y.; CAPEN, R. C. Assessing similarity in bioanalytical methods. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 65, n. 1, p. 55–62, 2011.

LIESCHKE, G. J. et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. **Blood**, v. 84, n. 6, p. 1737–1746, 1994.

LIONGUE, C.; WARD, A. C. Granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in myeloid malignancy. **Frontiers in oncology**, v. 4, n. May, p. 93, 2014.

LIU, F. et al. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. **Immunity**, v. 5, n. 5, p. 491–501, 1996.

LOPES, M. .; CASTELO-BRANCO, V. T. .; SOARES, J. B. Utilização dos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificação da normalidade para materiais de pavimentação. **Transportes**, v. 21, n. September 2016, p. 59–66, 2013.

LORD, B. I.; WOOLFORD, L. B.; MOLINEUX, G. Kinetics of Neutrophil Production in Normal and Neutropenic Animals during the Response to Filgrastim (r-metHu G-CSF) or Filgrastim SD/01 (PEG-r-metHu G-CSF). **Clinical cancer research**, v. 7, n. 1, 2001.

LORENCE, A. **Recombinant gene expression reviews and protocols**. 3<sup>o</sup> ed. New York: Humana Press, 2012.

LU, X.; BERGELSON, S. Development of a sensitive potency assay to measure the anti-proliferation effect of an anti-HER2 antibody. **Journal of**

**Immunological Methods**, v. 415, p. 80–85, 2014.

LYONS, A. .; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **J. immunol Methods**, v. 171, n. 1, p. 131–137, 1994.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1–2, p. 147–154, 2000.

MADEIRA, L. S. **Prospecção tecnológica através de depósitos de patentes para produção de proteínas terapêuticas de interesse brasileiro**. [s.l.] UFRJ, 2013.

MANZ, M. G.; BOETTCHER, S. Emergency granulopoiesis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 5, p. 302–314, 2014.

MARTÍNEZ SALAZAR, M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 11, n. 2, p. 152–166, 2009.

MATTES, M. J. Apoptosis assays with lymphoma cell lines: problems and pitfalls. **British journal of cancer**, v. 96, n. 6, p. 928–36, 2007.

MELLO, A. L. et al. **Vigilância sanitária de medicamentos e correlatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1993.

MELLSTEDT, H.; NIEDERWIESER, D.; LUDWIG, H. The challenge of biosimilars. **Annals of Oncology**, v. 19, n. 3, p. 411–419, 2008.

METCALF, D. Cell ± cell signalling in the regulation of blood cell formation and function. **Immunology and Cell Biology**, v. 76, p. 441–447, 1998.

MIRE-SLUIS, A R. et al. Biological assays: their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. **Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 24, n. 4, p. 351–62, 1996.

MONTGOMERY, D. C. **Introduction to statistical quality control**. 6º edição ed. [s.l.] Jonh Wiley & Sons, Inc, 2009.

MORAIS, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais : de biofármacos a terapia gênica**. [s.l: s.n.].

MORSTYN, G. et al. Filgrastim ( r-metHuG-CSF ) in the 21st Century : SD / 01. **Acta Haematologica**, v. 105, p. 151–155, 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journam of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MULINARI, F. F. **Produção e caracterização físico-química e biológica da proteína recombinante Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos Humano**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2012.

MUNN, D. H.; ARMSTRONG, E. Cytokine regulation of human monocyte differentiation in vitro: the tumor-cytotoxic phenotype induced by macrophage colony-stimulating factor is developmentally regulated by gamma-interferon. **Cancer Research**, v. 53, n. 11, p. 2603–2613, 1993.

NICOLA, N. A. et al. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. **J Biol Chem.**, v. 258, n. 14, p. 9017–23, 1983.

NICOLETTI, I. et al. A Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow-cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, n. 2, p. 271–279, 1991.

NOVAK, U. et al. Aberrant Activation of JAK / STAT Pathway Components in Response to G-CSF , Interferon- $\alpha$  /  $\beta$  and Interferon- $\gamma$  in NFS-60 Cells. **Growth factors**, v. 13, p. 251–260, 1996.

NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 3, n. 3, p. 67–70, 2001.

OECD. **Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method**. Paris: [s.n.].

ONO, M. Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim). **European Journal of Cancer**, v. 30, n. 3, p. S7-11, 1994.

ORMEROD, M. G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1–2, p. 73–80, 2002.

PANOPOULOS, A. D. et al. STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3682–3690, 2006.

PANOPOULOS, A. D.; WATOWICH, S. S. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and “emergency” hematopoiesis. **Cytokine**, v. 42, n. 3, p. 277–288, 2008.

PERES, C. M.; CURTI, R. **Como Cultivar Células**. 1. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.

PHARMACOPEIA, E. Statistical Analysis of results of biological assays and tests. In: **pharmacopoeia european**. 8.0 ed. [s.l.: s.n.]. p. 607–635.

PHARMACOPEIA, E. **Filgrastim monography**. [s.l.: s.n.].

PIOVESAN, M. **A construção política da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. [s.l.] FIOCRUZ, 2002.

PORAT, Y. et al. Critical elements in the development of cell therapy potency assays for ischemic conditions. **Cytotherapy**, n. August 2014, 2015.

RÉBÉ, C. et al. STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. **Landes bioscience**, v. 2, n. 1, p. e23010, 2013.

RIEGER, A. M. et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 50, p. 37–40, 2011.

ROFAIL, P. et al. Pegfilgrastim: a review of the pharmacoeconomics for chemotherapy-induced neutropenia. **Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research**, v. 12, n. 6, p. 699–709, 2012.

ROZENFELD, S. **Fundamentos da vigilância sanitária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000.

SALAS, I. **Regressão Linear Múltipla Variáveis Binárias Relações Não-Lineares**. [s.l.: s.n.].

SHELLEKENS, H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 6, p. 457–62, 2002.

SCHOOL OF LIFE SCIENCE. **Proliferation by FACS**. Disponível em: <<http://www.lifesci.dundee.ac.uk/technologies/flow-cytometry-cell-sorting/techniques/proliferation>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

SCOTT, I.; YOULE, R. J. Mitochondrial fission and fusion. **Essays in biochemistry**, v. 47, n. October, p. 85–98, 2010.

SEKHON, B. S. Biopharmaceuticals: An overview. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 1–19, 2010.

SETO, R. C. Selling the Pharm: The risks, benefits, and regulation of biopharmaceuticals. **Environs**, v. 27, p. 443–465, 2004.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. 4 ed. ed. New Jersey: Wiley-Liss, 2003.

SKRLIN, A. et al. Comparison of the physicochemical properties of a biosimilar filgrastim with those of reference filgrastim. **Biologicals**, v. 38, n. 5, p. 557–566, 2010.

SOUZA, L. M. et al. Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor : Effects on Normal and Leukemic Myeloid Cells. **Science**, v. 232, n. 23, p. 61–66, 1986.

STANLEY, E. R.; CHITU, V. CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells. **CSH perspectives**, v. 6, p. 1–21, 2014.

STEWART, W. P. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. **the lancet**, v. 342, p. 153–157, 1993.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 2–3, 2001.

SVEIKATA, A. et al. Comparison of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of two recombinant granulocyte colony-stimulating factor formulations after single subcutaneous administration to healthy volunteers. **Medicina**, v. 50, n. 3, p. 144–149, 2014.

SZE, A. et al. SAMHD1 host restriction factor: A link with innate immune sensing of retrovirus infection. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 24, p. 4981–4994, 2013.

THOMAS, D.; VADAS, M.; LOPEZ, A. Regulation of haematopoiesis by growth factors - emerging insights and therapies. **Expert opinion on biological therapy**, v. 4, n. 6, p. 869–79, 2004.

TIAN, S. S. et al. Multiple signaling pathways induced by granulocyte colony-stimulating factor involving activation of JAKs, STAT5, and/or STAT3 are required for regulation of three distinct classes of immediate early genes. **Blood**, v. 88, n. 12, p. 4435–4444, 1996.

TOUW, I. P.; PALANDE, K.; BEEKMAN, R. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor Signaling. Implications for G-CSF Responses and Leukemic Progression in Severe Congenital Neutropenia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 61–73, 2013.

TSUCHIYA, M. et al. Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony-stimulating factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 20, p. 7633–7637, 1986.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British journal of cancer**, v. 56, p. 279–285, 1987.

USP PHARMACOPOEIA. **Monographs: Filgrastim**. [s.l: s.n.].

VAN DE LOOSDRECHT, A. A. et al. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. **Journal of immunological methods**, v. 174, p. 311–320, 1994.

- VANZ, A. L. et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 13, 2008.
- VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FRESHNEY, R. I. **Basic principles of cell culture**. [s.l: s.n.].
- WALSH, G. Current Status of Biopharmaceuticals: Approved Products and Trends in Approvals. In: **Modern biopharmaceuticals**. 1<sup>o</sup> ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p. 172–314.
- WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1241–1252, 2006.
- WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. 1–12, 2010.
- WHO. **WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp. 15. Validation of analytical assays**. Switzerland, 1997.
- WHO. Biological products. In: **Quality assurance of pharmaceuticals**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 2007. p. 409.
- WOO, J.; BAUMANN, A.; ARGUELLO, V. Recent advancements of flow cytometry: new applications in hematology and oncology. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 14, n. 1, p. 67–81, 2013.
- YANG, B. B.; KIDO, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegfilgrastim. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 50, n. 5, p. 295–306, 2011.
- ZAMARAEVA, M. V et al. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. **Cell death and differentiation**, v. 12, n. 11, p. 1390–7, 2005.
- ZHANG, B. **Issues to Consider When Developing Potency Assays for Biologic Products** CASSS Bioassays 2014: Scientific Approaches and Regulatory Strategies. **Anais...** Washington: FDA, 2014
- ZHANG, H. et al. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. **Blood**, v. 116, n. 14, p. 2462–2471, 2010.

1000 mL of water. Adjust with phosphoric acid to a pH of  $2.50 \pm 0.05$ .

**Solution B:** Methanol and *Solution A* (2:3)

**Solution C:** Methanol and *Solution A* (7:3)

**Mobile phase:** See *Table 10*.

**Table 10**

Time (min)	Solution B (%)	Solution C (%)
0	100	0
40	100	0
41	0	100
65	0	100
66	100	0
90	100	0

**Diluent:** Methanol and water (1:1)

**Standard stock solution:** 0.18 mg/mL of USP Benzoic Acid RS in *Diluent*

**Standard solution:** 0.0216 mg/mL of USP Benzoic Acid RS in *Diluent*, prepared from the *Standard stock solution*

**Sensitivity solution:** 1.08 µg/mL of USP Benzoic Acid RS in *Diluent*, prepared from the *Standard solution*

**Sample solution:** Weigh and finely powder 9 Tablets, and quantitatively transfer the ground powder to a 500-mL volumetric flask, with the aid of 200 mL of *Diluent*. Sonicate for 10 min, and add an additional 100 mL of *Diluent*. Shake by mechanical means for 30 min, dilute with *Diluent* to volume, and mix. Pass a portion of the solution through a polypropylene or polysulfone membrane filter of 0.45-µm pore size, and discard at least the first 10 mL of the filtrate.

#### Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

**Mode:** LC

**Detector:** UV 215 nm

**Column:** 4.6-mm × 25-cm; 5-µm packing L1

**Flow rate:** 1 mL/min

**Injection volume:** 10 µL

#### System suitability

**Samples:** *Standard solution* and *Sensitivity solution*

#### Suitability requirements

**Tailing factor:** NMT 2.0, *Standard solution*

**Relative standard deviation:** NMT 5.0%, *Standard solution*

**Signal-to-noise ratio:** NLT 10, *Sensitivity solution*

#### Analysis

**Samples:** *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the amount of each impurity as a percentage of the label claim of pseudoephedrine hydrochloride in the portion of Tablets taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times (1/F) \times 100$$

$r_U$  = peak response of individual impurities from the *Sample solution*

$r_S$  = peak response of benzoic acid from the *Standard solution*

$C_S$  = concentration of USP Benzoic Acid RS in the *Standard solution* (mg/mL)

$C_U$  = nominal concentration of pseudoephedrine hydrochloride in the *Sample solution* (mg/mL)

$F$  = relative response factor for each impurity (see *Table 11*)

#### Acceptance criteria

**Individual impurities:** See *Table 11*.

**Total impurities:** The combined total impurities from *Procedure 3* and *Procedure 4* is NMT 0.3%.

**Table 11**

Name	Relative Retention Time	Relative Response Factor <sup>a</sup>	Acceptance Criteria, NMT (%)
Benzaldehyde	0.43	0.40	0.1
Benzoic acid	0.55	1.0	0.1
Ephedrone <sup>b</sup>	0.97	—	—
Pseudoephedrine	1.0	0.52	—
Individual unspecified impurity	—	0.52 <sup>c</sup>	0.1

<sup>a</sup> Response factors relative to benzoic acid.

<sup>b</sup> Ephedrone is not quantitated in this method. A separate method is used for the quantitation of this impurity.

<sup>c</sup> The response factor of pseudoephedrine relative to that of benzoic acid is used in the calculation of individual unspecified impurities.

#### ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in well-closed containers, and store at controlled room temperature.
- **LABELING:** When more than one *Dissolution Test* is given, the labeling states the test used only if *Test 1* is not used. If a test for *Organic Impurities* other than *Procedure 1* is used, the labeling states with which *Procedures* the article complies.
- **USP REFERENCE STANDARDS (11)**
  - USP Benzoic Acid RS
  - USP Fexofenadine Hydrochloride RS
  - USP Fexofenadine Related Compound A RS
  - Benzenoacetic acid, 4-[1-oxy-4-[4-(hydroxydiphenylmethyl)-1-piperidinyl]butyl]- $\alpha,\alpha$ -dimethyl.  $C_{32}H_{37}NO_4$  499.65
  - USP Pseudoephedrine Hydrochloride RS

## Filgrastim

MTPLGPASSL POSFLKCLE QVRKIQDGA ALQERLCATY KLCHPEELVL  
LGHSLGIPWA PLSSCPSSQAL QLACGLSQLH SGLFLYQGLL QALEGISPEL  
GPTLDTLQLD VADFATTIQW QMEELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAE  
GVLVASHLQS FLEVSRYRVLK HLAQP

$C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$   
[121181-53-1].

18,799 daltons

#### DEFINITION

Filgrastim is a recombinant form of human granulocyte colony-stimulating factor (r-metHuG-CSF). It is a single chain, 175 amino acid nonglycosylated polypeptide produced by *Escherichia coli* bacteria transfected with a gene encoding a methionyl human granulocyte colony-stimulating factor. When prepared as a drug substance, it contains NLT 0.9 mg/mL of Filgrastim. Formulation contains one or more suitable buffering and/or stabilizing agents. The presence of host cell DNA and protein in Filgrastim is process-specific. The capability of the process to clear host-derived DNA and protein requires validation and is determined by validated methods. It has a biological potency of NLT 80% and NMT 125% relative to standard on a mass-to-mass basis.

#### IDENTIFICATION

- **A.** It meets the requirements in the *Assay*.
- **B.** The retention time of the major peak of the *Sample solution* corresponds to that of the *Standard solution*, as obtained as directed in the test for *Organic Impurities, Related Compounds*.
- **C. PEPTIDE MAPPING**  
(See *Biotechnology-Derived Articles—Peptide Mapping* (1055).)



**Solution A:** Water and trifluoroacetic acid (1000:1)  
**Solution B:** Transfer 100 mL of water to a 1000-mL volumetric flask, add 1 mL of trifluoroacetic acid, and dilute with acetonitrile to volume.  
**Mobile phase:** See the gradient table below.

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	98	2
2	98	2
30	70	30
75	40	60
90	2	98
100	2	98
101	98	2
120	98	2

**Tris buffer:** Prepare a 0.5 M solution of tris(hydroxymethyl) aminomethane solution, and adjust with hydrochloric acid to a pH of 8.1.

**Methylamine solution:** Dissolve 0.27 g of methylamine hydrochloride in 10 mL of water.

**DTT solution:** 30.9 mg/mL of dithiothreitol in water, freshly prepared

**Digestion solution:** Dissolve 0.30 g of urea in 200  $\mu$ L of *Tris buffer*, 100  $\mu$ L of *Methylamine solution*, 50  $\mu$ L of *DTT solution*, and 420  $\mu$ L of water. Overlay with nitrogen, and use immediately.

**Endoproteinase Glu-C solution:** 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L of Endoproteinase Glu-C in water. Use immediately.

**TFA solution:** Water and trifluoroacetic acid (100:5)

**Standard solution:** Prepare a solution containing 80  $\mu$ g of USP Filgrastim RS and 200  $\mu$ L of *Digestion solution* in a suitable tube. Add water to a final volume of 390  $\mu$ L. Add 10  $\mu$ L of *Endoproteinase Glu-C solution*. Cap the tube, mix well, and incubate at approximately 25° for 18 h. Add 18  $\mu$ L of *TFA solution*.

**Sample solution:** Proceed as directed for the *Standard solution*.

#### Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

**Mode:** LC

**Detector:** UV 214 nm

**Column:** 2.1-mm  $\times$  25-cm; packing L26

**Column temperature:** 40°

**Flow rate:** 0.2 mL/min

**Injection size:** 70  $\mu$ L

#### Analysis

**Samples:** *Standard solution* and *Sample solution*  
 [NOTE—Condition the *Chromatographic system* by running at least two blank gradient programs before injecting the digests. Separately inject the *Standard solution*, *Sample solution*, and *Standard solution* again, and record the responses of each peak.]

**System suitability requirements:** Eight major peaks should be present in each chromatogram as illustrated in the reference chromatogram provided with USP Filgrastim RS. The absolute difference in retention time of each of the eight major peaks between the two *Standard solution* chromatograms must be  $\leq 0.5$  min. The difference in retention time of each of the eight major peaks between the *Sample solution* chromatogram and the average of the *Standard solution* chromatograms must be  $\leq 0.5$  min. The relative difference in peak height of each of the eight major peaks between the two *Standard solution* chromatograms must be  $\leq 15\%$ .

**Acceptance criteria:** The chromatographic profile of the *Sample solution* is similar to that of the *Standard solution*. The relative difference in peak height between the normalized sample peak height (normalized by total peak height versus the average total peak height of the *Standard solution* chromatograms) and the average

standard peak height of each of the eight major peaks must be  $\leq 15\%$ .

#### ASSAY

##### • POTENCY

**Medium A:**<sup>1</sup> RPMI 1640 modified to contain 2 mM L-glutamine, 2 g/L of sodium bicarbonate, 4.5 g/L of glucose, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, and 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). The 2-mercaptoethanol is prepared fresh and added immediately before use.

**Medium B:** RPMI 1640 modified to contain 2 mM L-glutamine, 2 g/L of sodium bicarbonate, 4.5 g/L of glucose, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, and 1% heat-inactivated FBS. The 2-mercaptoethanol is prepared fresh and added immediately before use.

**Medium C:** Prepare a mixture of *Medium A* with 20 ng/mL of interleukin 3 (IL-3).

**Medium D:** Prepare a mixture of *Medium A* with 1 ng/mL of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF).

**Substrate solution:** Reconstitute the luminescence substrate<sup>2</sup> with the supplied buffer. Aliquot the solution and store below  $-65^\circ$  for up to 2 months.

**Standard solution:** 0.5 ng/mL of USP Filgrastim RS in *Medium B*. [NOTE—Do not use single step dilutions of more than 1:100 and smaller transfer volumes than 40  $\mu$ L while performing serial dilutions. Mix gently and thoroughly (do not vortex).]

**Positive control solution:** 10 ng/mL of USP Filgrastim RS in *Medium B*

**Sample solution:** 0.5 ng/mL of Filgrastim in *Medium B*. [NOTE—Do not use single step dilutions of more than 1:100 and smaller transfer volumes than 40  $\mu$ L while performing serial dilutions. Mix gently and thoroughly (do not vortex).]

**Cell culture preparation:** Adapt M-NFS-60 cells (ATCC CRL-1838) to growth in G-CSF. Culture the cells at 5% CO<sub>2</sub> and 37°. Cells should be passaged two times per week and reseeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/mL for 3 days or  $1 \times 10^4$  cells/mL for 4 days. Passage the cultures in *Medium C* until passage two. Transfer the cells into *Medium D*, and passage the cultures until passage 11. After passage 11, the cells are defined as G-CSF adapted and can be used in the *Assay* or can be banked. Bank the cells at a density of approximately  $1.5 \times 10^6$  cells/mL in banking medium (90% FBS, 10% DMSO). Upon thawing the banked cells, culture the cells for 2–3 passages in *Medium D* before using in the *Assay*.

**Cell suspension:** Wash the cells twice with phosphate buffered saline (PBS), and adjust the cell concentration to  $1 \times 10^5$  cells/mL in *Medium B*.

**Preparation of cells for analysis:** Use a 96-well flat-bottomed black microtiter plate (optically clear well bottoms) with wells arranged in eight rows (labeled A through H) with 12 wells (numbered 1 to 12) in each row. Place 50  $\mu$ L of *Cell suspension* into all wells of the 96-well microtiter plate except the wells of column 1 (A1–H1, blank). Column 1 is filled with 50  $\mu$ L of *Medium B*. Incubate the plate at 37° in the incubator until the *Standard solution* and the *Sample solution* are ready, for a maximum of 1 h.

**Preparation of diluted Standard solution and Sample solution:** Use a 96-well round-bottom microtiter plate with wells arranged in eight rows (labeled A through H) with 12 wells (numbered 1 to 12) in each row. Dispense 100  $\mu$ L of *Medium B* into each well of the plate except column 12 (wells A12–H12, positive control) and A2–A10. Pipet 200  $\mu$ L of *Standard solution* into wells A3, A6, and A9; and 200  $\mu$ L of *Sample solution*

<sup>1</sup> A suitable RPMI 1640 medium is available from ATCC (catalog no. 30-2001), or use an equivalent formulation.

<sup>2</sup> A suitable substrate is available from Promega (Cell Titer Glo-Luminescence Kit, catalog no.: G7572) or equivalent.

into wells A2, A5, and A8. Two samples can be prepared on one plate. The second sample can be added to wells A4, A7, and A10. Pipet 100  $\mu$ L of *Positive control solution* into all wells of the last column (A12–H12). Using a multi-channel pipet (12 channels), perform two-fold dilutions on the plate. Aspirate 100  $\mu$ L from the first row (A2–A10), transfer to the second row, and mix three times. Then aspirate 100  $\mu$ L from the second row, transfer to the third row, and mix three times. Repeat this procedure across the entire plate until row H. Discard the 100  $\mu$ L aspirated from the last row.

**Analysis:** Using a multi-channel pipet, transfer 50  $\mu$ L from each well of the round-bottom microtiter plate (containing the *Standard solution* and *Sample solution* serial dilutions, blanks, and positive and negative controls) into the same well of the black microtiter plate containing the cell suspension starting with the lowest concentration. Mix three times. Incubate the black microtiter plate in a humidified CO<sub>2</sub> incubator for 31  $\pm$  2 h at 37° with 5% CO<sub>2</sub>. Add 100  $\mu$ L of reconstituted *Substrate solution* to all wells. Incubate the plate for 15 min at room temperature while gently agitating the plate on a plate shaker. Incubate the plate for an additional 15 min at room temperature without shaking. Read the plate in a microtiter plate luminescence reader.

**System suitability criteria:** The signal-to-noise ratio between the mean chemiluminescence signal of the positive control and the mean chemiluminescence signal of the negative control (A11–H11) should be  $\geq 3$ . The number of technical outliers may not exceed four per curve.

**Calculations:** For each sample, first calculate the relative potency of Filgrastim (in percent) using statistical methods for parallel-line assays, then calculate potency in IU/mL. The statistical tests for linearity, slope, and parallelism for each sample compared to the standard have to be passed at the 95% level. The confidence limit must be within 75% and 133% of the estimated potency.

**Acceptance criteria:** The mean estimated potency is NLT 80% and NMT 125% of the stated potency.

## IMPURITIES

### Organic Impurities

#### • RELATED COMPOUNDS

**Solution A:** Water and trifluoroacetic acid (1000:1)

**Solution B:** Transfer 100 mL of water to a 1000-mL volumetric flask, add 1 mL of trifluoroacetic acid, and dilute with acetonitrile to volume.

**Mobile phase:** See the gradient table below.

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	60	40
30	20	80
35	20	80
45	60	40
55	60	40

**Standard solution:** 0.75 mg/mL of USP Filgrastim RS in water

**Sample solution:** 0.75 mg/mL of Filgrastim in water

#### Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

**Mode:** LC

**Detector:** UV 215 nm

**Column:** 4.6-mm  $\times$  15-cm; packing L26

**Column temperature:** 60°

**Flow rate:** 0.8 mL/min

**Injection size:** 33  $\mu$ L

#### System suitability

**Sample:** *Standard solution*

#### Suitability requirements

**Relative retention times:** About 0.91 for oxidized Filgrastim 1, about 0.98 for oxidized Filgrastim 2, and about 1.04 for reduced Filgrastim relative to the major peak

**Relative standard deviation:** The relative standard deviation of the total area (main peak and minor product related peaks, excluding the void peak) and the relative standard deviation of the retention time of the major Filgrastim peak for replicate injections are NMT 5%.

#### Analysis

**Samples:** *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of oxidized Filgrastim 1, oxidized Filgrastim 2, Filgrastim, and reduced Filgrastim in the portion of Filgrastim taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_T) \times 100$$

$r_U$  = peak response for each impurity

$r_T$  = sum of the responses of all the peaks

#### Acceptance criteria

**Individual impurities:** NMT 1.0% of reduced Filgrastim is found, and NMT 2.0% of total impurities is found.

#### • IMPURITIES WITH CHARGES DIFFERENT FROM FILGRASTIM

(See *Biotechnology-Derived Articles—Isoelectric Focusing* (1054).)

**1 M phosphoric acid solution:** Dilute 6.8 mL of 85% phosphoric acid with water to a final volume of 100 mL.

**1 M sodium hydroxide solution:** Dilute 10 mL of 10 M sodium hydroxide with water to a final volume of 100 mL.

**Anolyte solution:** Add 10 mL of 1 M phosphoric acid solution to 90 mL of water to obtain a 0.1 M phosphoric acid solution.

**Catholyte solution:** Add 10 mL of 1 M sodium hydroxide solution to 90 mL of water to obtain a 0.1 M sodium hydroxide solution.

**Initiator:** Measure 0.072 g of potassium persulfate to 10 mL of water to obtain a 0.72% potassium persulfate solution.

**Fixing solution:** Mix 35 g of sulfosalicylic acid and 100 g of trichloroacetic acid in 1000 mL of water.

**Gel wash:** Prepare a solution containing, in each L, 400 mL of absolute methanol, 100 mL of glacial acetic acid, and water.

**Coomassie staining solution:** Measure 1.25 g of Coomassie Brilliant Blue R-250 into 1 L of *Gel wash*.

**Coomassie destaining solution:** Prepare a solution containing, in each L, 75 mL of absolute methanol, 100 mL of glacial acetic acid, and water.

**Reference solution A:** 1 mg/mL of USP Filgrastim RS in water

**Reference solution B:** Dilute *Reference solution A* with water to obtain a concentration of 20  $\mu$ g/mL of USP Filgrastim RS.

**Reference solution C:** 3 mg/mL of USP Filgrastim RS in water

**Reference solution D:** Use an isoelectric point (pI) calibration solution, in the pI range of 2.5–6.5, prepared according to the manufacturer's instructions.

**Sample solution:** 1 mg/mL of Filgrastim in water

**Gel:** Prepare a 6% T (total acrylamide), 0.16% C (bisa-crylamide) gel containing 0.3 g/mL of urea, 1.5% pH

3–10 ampholytes, 3.7% pH 5–7 ampholytes, and 0.05% Initiator.

**Analysis:** Gel electrophoresis is carried out on a horizontal gel apparatus at 10° and a constant power setting of 10 W (voltage and current are allowed to vary). Pre-focus the gel for 20–40 min. Apply 10 µL of *Sample solution* (10 µg), *Reference solution A* (10 µg), *Reference solution B* (0.2 µg), and *Reference solution C* (30 µg) to separate lanes on the gel. Apply about 10 µL of *Reference solution D* to each side of the gel. Focus the gel for about 2.5 h at 10° at a constant power setting of 10 W (voltage and current are allowed to vary). Remove the gel from the apparatus, place in a sufficient volume of *Fixing solution* to submerge the gel, and rock gently for NLT 15 min. Decant, and repeat wash in *Fixing solution* for an additional 15 min. Remove the *Fixing solution*, and submerge the gel in *Gel Wash* with gentle mixing for NLT 30 min. Decant the *Gel Wash* solution, and immerse the gel in *Coomassie staining solution* with gentle mixing for 15–60 min. Remove the *Coomassie staining solution*, rinse the gel with *Coomassie destaining solution*, and submerge the gel in fresh *Coomassie destaining solution*. Continue rocking the gel in *Coomassie destaining solution* until the background is clear and *Reference solution B* is still visible. Visually examine the gel.

**System suitability requirements:** The isoelectric point markers are distributed along the entire length of the gel; no artifacts obscure visualization of the bands; and *Reference solution B* must be visible.

**Acceptance criteria:** The major band in the *Sample solution* focuses at the same position as the major band in *Reference solution A*. Minor bands present in the *Sample solution* are also observed in *Reference solution C* and, based on visual estimates, are less intense or equal to *Reference solution B*. There are no bands observed in the *Sample solution* that are not present in *Reference solution C*.

• **IMPURITIES WITH MOLECULAR WEIGHT DIFFERENT FROM THAT OF FILGRASTIM**

(See *Biotechnology-Derived Articles—Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (1056).)

**4X SDS sample buffer (nonreducing conditions):** Prepare a solution containing, in each mL, 80 mg of sodium dodecyl sulfate and 30 mg of tris(hydroxymethyl)aminomethane. Adjust with hydrochloric acid to a pH of 6.8. Add 0.80 mg/mL of bromophenol blue and 0.4 mL/mL of glycerol.

**4X SDS sample buffer (reducing conditions):** Prepare a solution containing, in each mL, 80 mg of sodium dodecyl sulfate, 30 mg of tris(hydroxymethyl)aminomethane, and 38.5 mg of dithiothreitol. Adjust with hydrochloric acid to a pH of 6.8. Add 0.80 mg/mL of bromophenol blue and 0.4 mL/mL of glycerol.

**1X SDS sample buffer (nonreducing conditions):** Dilute 1 volume of the *4X SDS sample buffer (nonreducing conditions)* with 3 volumes of water.

**1X SDS sample buffer (reducing conditions):** Dilute 1 volume of the *4X SDS sample buffer (reducing conditions)* with 3 volumes of water.

**Gel wash I:** Prepare a solution containing, in each L, 400 mL of absolute methanol, 100 mL of glacial acetic acid, and water.

**Gel wash II:** Prepare a solution containing, in each L, 100 mL of 95% ethanol, 50 mL of glacial acetic acid, and water.

**Reducer solution:** Prepare a solution containing 2 mg of dithiothreitol in 400 mL of water. [NOTE—Prepare this solution immediately before use, and protect it from light. This amount of solution is sufficient for two slab gels.]

**Silver nitrate solution:** Measure 0.68 g of silver nitrate in 400 mL of water, and mix well. [NOTE—Prepare this solution immediately before use, and protect it from

light. This amount of solution is sufficient for two slab gels.]

**Developer:** To 500 mL of water add 18.6 g of sodium carbonate monohydrate and 0.5 mL of formaldehyde. [NOTE—Prepare this solution fresh at the time of use. This amount of solution is sufficient for two slab gels.]

**Acetic acid solution:** Prepare a solution containing, in each L, 50 mL of glacial acetic acid and water.

**Running buffer:** Prepare a buffer solution containing 1 g of sodium dodecyl sulfate, 3.03 g of tris(hydroxymethyl)aminomethane, and 14.4 g of glycine per L.

**Gel**

**Resolving gel:** Use a 1.5-mm thick, 10%–20% polyacrylamide gradient gel [10%–20% T, 2.6% C (bisacrylamide)].

**Stacking gel:** 4% T (total acrylamide), 2.6% C (bisacrylamide)

**Reference solution A:** Dilute 25 µg of USP Filgrastim RS with 25 µL of *4X SDS sample buffer* and sufficient water to obtain 100 µL of a solution containing a 250-µg/mL preparation of USP Filgrastim RS in 1X SDS sample buffer. Prepare both a reduced and a nonreduced *Reference solution A* using the appropriate *4X SDS sample buffer*. Heat reduced sample at approximately 65° for 5–10 min. Do not heat the nonreduced sample.

**Reference solution B:** Prepare both a reduced and a nonreduced *Reference solution B* by diluting *Reference solution A* (1:100) with the appropriate 1X SDS sample buffer to obtain a 2.5-µg/mL preparation of USP Filgrastim RS. Heat reduced sample at approximately 65° for 5–10 min. Do not heat the nonreduced sample.

**Reference solution C:** Dilute 75 µg of USP Filgrastim RS with 25 µL of *4X SDS sample buffer* and sufficient water to obtain 100 µL of a solution containing a 750-µg/mL preparation of USP Filgrastim RS in 1X SDS sample buffer. Prepare both a reduced and a nonreduced *Reference solution C* using the appropriate *4X SDS sample buffer*. Heat reduced sample at approximately 65° for 5–10 min. Do not heat the nonreduced sample.

**Reference solution D:** Use a solution of molecular weight markers suitable for calibrating SDS-polyacrylamide gels in the range of 14.4–94 kDa.

**Sample solution:** Dilute 25 µg of the sample to be tested with 25 µL of *4X SDS sample buffer* and sufficient water to obtain 100 µL of a solution containing a 250-µg/mL preparation of the test article in 1X SDS sample buffer. Prepare both a reduced and a nonreduced *Sample solution* using the appropriate *4X SDS sample buffer*. Heat reduced sample at approximately 65° for 5–10 min. Do not heat the nonreduced sample.

**Analysis:** Separately apply 20 µL of the *Sample solution*, *Reference solution A*, *Reference solution B*, and *Reference solution C* into separate lanes of the gel. Apply about 20 µL of *Reference solution D* to each side of the gel.

[NOTE—Reduced and nonreduced samples should either be run on separate gels or on the same gel if separated by at least three lanes containing 1X SDS sample buffer (nonreducing).] Perform the electrophoresis using a constant voltage of 125 V. [NOTE—Current and power are allowed to vary throughout the run.] Remove the gel from the apparatus after the tracking dye begins to approach the anode end of the gel, place the gel in a sufficient volume of *Gel Wash I* to submerge the gel, and mix gently for NLT 1 h. Decant the *Gel Wash I*, and immerse the gel in a similar volume of *Gel Wash II*. After 15 min of gentle mixing, decant, and wash the gel for an additional 15 min in *Gel Wash II*. Wash the gel twice for 15 min each with the *Reducer solution* followed by two washes of 15 min each in the *Silver nitrate solution*. Rinse twice with water, and decant. Transfer the gel to a clear container containing a sufficient volume of the *Developer* to immerse the gel, and rock the container changing the *Developer* frequently

(10–15 s) until the molecular weight markers and *Reference standard B* become visible. When the gel is visibly stained, wash immediately with the *Acetic acid solution*. Rinse the gel repeatedly with *Acetic acid solution* to remove the *Developer*, then rock gently for approximately 30 min. Visually examine the gel.

**System suitability requirements:** No artifacts obscure visualization of the bands, and *Reference solution B* must be visible.

**Acceptance criteria:** The main band in the *Sample solution* migrates to the same position as the main band in *Reference solution A*. Minor bands present in the *Sample solution* are also observed in *Reference solution C* and, based on visual estimates, are less intense or equal to *Reference solution B*. There are no bands observed in the *Sample solution* that are not present in *Reference solution C*.

• **LIMIT OF HIGH MOLECULAR WEIGHT PROTEINS**

**Mobile phase:** Add 11.5 g of concentrated phosphoric acid to 800 mL of water. Adjust with 10 N sodium hydroxide to a pH of 2.5, and dilute with water to 1000 mL. Filter, and degas.

**Column conditioning solution:** Dissolve 18 mg of bovine serum albumin (BSA) in 9 mL of water.

**Resolution solution:** Dissolve about 1 mg of USP Filgrastim RS in 0.33 mL of 0.25 M sucrose, mix gently, and transfer to a 1.5-mL polypropylene tube. Incubate at 55° for 20 min. Place the sample on ice for 5 min, then vortex at high speed for 30 s. Dilute to 0.3 mg/mL with 0.25 M sucrose, and inject within 1 h. The dimer can be regenerated from a previously heated 3-mg/mL sample. Store the previously heated sample overnight in a refrigerator, vortex at high speed for 30 s, dilute to 0.3 mg/mL with 0.25 M sucrose, and inject within 1 h.

**Standard solution:** 0.3 mg/mL of USP Filgrastim RS in water

**Sample solution:** Dilute Filgrastim with water to 0.3 mg/mL.

**Chromatographic system**

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

**Mode:** LC

**Detector:** UV 214 nm

**Column:** 7.8-mm × 30-cm; packing L59

**Column temperature:** Ambient

**Flow rate:** 1 mL/min

**Injection size:** 40 µL

**System suitability**

**Samples:** *Column conditioning solution*, *Resolution solution*, and *Standard solution*

**Suitability requirements**

**Column solution peak response:** Chromatograph the *Column conditioning solution* 3–10 times. The peak response of the final consecutive injections should be constant.

**Relative retention times:** Chromatograph the *Resolution solution* two times, and record the peak responses. The relative retention times are about 0.5 for Filgrastim aggregate, 0.9 for Filgrastim dimer, and 1.0 for Filgrastim monomer.

**Relative standard deviation:** The relative standard deviation of the total area (main peak and minor product related peaks, excluding the void peak) for replicate injections of the *Standard solution* is NMT 3%. The relative standard deviation of the retention time of the major Filgrastim peak for replicate injections of the *Standard solution* is NMT 3%.

**Analysis**

**Samples:** *Standard solution* and *Sample solution*

Measure the areas of the main peak and of the peaks eluting prior to the main peak, excluding the solvent peaks.

Calculate the percentage of aggregates (peaks eluting

before dimer), dimer, and monomer in the portion of Filgrastim taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_T) \times 100$$

$r_U$  = individual peak response of aggregates, dimer, and monomer

$r_T$  = sum of the responses of all the peaks

**Acceptance criteria**

**Individual impurities:** NMT 0.5% of aggregate is found, and NMT 2.0% of total high molecular weight impurities is found.

**SPECIFIC TESTS**

• **PROTEIN CONCENTRATION**

(See *Biotechnology-Derived Articles—Total Protein Assay* (1057).)

**5% Sorbitol solution, pH 3.25:** Prepare a 5% solution of sorbitol in water, and adjust with hydrochloric acid to a pH of 3.25.

**Sample solution:** Dilute the Filgrastim in *5% Sorbitol solution, pH 3.25* to obtain a solution with a concentration between 0.2 and 1.7 mg/mL.

**Blank:** *5% Sorbitol solution, pH 3.25*

**Instrumental conditions**

**Mode:** UV-Vis

**Analytical wavelengths:** 280, 320, and 350 nm

**Cell:** Quartz spectrophotometric cell of path length 1 cm

**Analysis**

**Sample:** *Sample solution*

Calculate the sample absorbance at 320 nm as a percentage of the absorbance at 280 nm:

$$\text{Result} = (A_{320}/A_{280}) \times 100$$

$A_{320}$  = absorbance value of the *Sample solution* at 320 nm

$A_{280}$  = absorbance value of the *Sample solution* at 280 nm

If the absorbance at 320 nm is less than 5.0% of the absorbance at 280 nm, calculate the protein concentration of the Filgrastim sample:

$$\text{Result} = A_{280} \times DF/0.86$$

$A_{280}$  = absorbance value of the *Sample solution* at 280 nm

$DF$  = dilution factor of the *Sample solution*

If the absorbance at 320 nm is more than 5.0% of the absorbance at 280 nm, calculate the protein concentration of the Filgrastim sample:

$$\text{Result} = \{A_{280} - [(3.3435 \times A_{320}) - (2.3435 \times A_{350})]\} \times DF/0.86$$

$A_{280}$  = absorbance value of the *Sample solution* at 280 nm

$A_{320}$  = absorbance value of the *Sample solution* at 320 nm

$A_{350}$  = absorbance value of the *Sample solution* at 350 nm

$DF$  = dilution factor of the *Sample solution*

• **MICROBIAL ENUMERATION TESTS (61) AND TESTS FOR SPECIFIED MICROORGANISMS (62):** The total aerobic count does not exceed 0 cfu/10 mL of the substance solution.

• **BACTERIAL ENDOTOXINS TEST (85):** It contains NMT 2 USP Endotoxin Units per mg of drug substance.

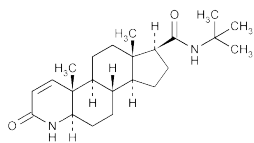
**ADDITIONAL REQUIREMENTS**

• **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in tight containers. Store between 2° and 8°. Protect from light during long-term storage.

• **LABELING:** Label to indicate the content of the drug substance in g per container. The labeling states that the material is of recombinant DNA origin.

- **USP REFERENCE STANDARDS** (11)  
USP Endotoxin RS  
USP Filgrastim RS

## Finasteride



$C_{23}H_{36}N_2O_2$  372.54  
4-Azaandrost-1-ene-17-carboxamide, *N*-(1,1-dimethylethyl)-3-oxo-, (5 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-*N*-*tert*-Butyl-3-oxo-4-aza-5 $\alpha$ -androst-1-ene-17 $\beta$ -carboxamide [98319-26-7].

» Finasteride contains not less than 98.5 percent and not more than 101.0 percent of  $C_{23}H_{36}N_2O_2$ , calculated on the anhydrous basis.

**Packaging and storage**—Preserve in tight containers, and store at controlled room temperature.

**USP Reference standards** (11)—  
USP Finasteride RS

### Identification—

**A:** *Infrared Absorption* (197M).

**B:** The retention time of the major peak in the chromatogram of the *Assay preparation* corresponds to that in the chromatogram of the *Standard preparation*, as obtained in the *Assay*.

**Specific rotation** (781S): between  $-56.0^\circ$  and  $-60.0^\circ$ , determined at 405 nm.

*Test solution:* 10 mg per mL, in methanol.

**Water Determination, Method I** (921): not more than 0.3%.

**Residue on ignition** (281): not more than 0.1%.

### Delete the following:

- **Heavy metals, Method II** (231): 0.001%. • (Official 1-Jan-2018)

### Chromatographic purity—

**Mobile phase**—Prepare a filtered and degassed mixture of water, tetrahydrofuran, and acetonitrile (8:1:1). Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

**Diluting solution**—Prepare a solution of water and acetonitrile (1:1).

**Standard solution**—Dissolve an accurately weighed quantity of USP Finasteride RS in *Diluting solution*, and dilute quantitatively, and stepwise if necessary, with *Diluting solution* to obtain a solution having a known concentration of about 1.0 mg per mL.

**Test solution**—Transfer about 100 mg of Finasteride, accurately weighed, to a 100-mL volumetric flask, dissolve in and dilute with *Diluting solution* to volume, and mix.

**Chromatographic system** (see *Chromatography* (621))—The liquid chromatograph is equipped with a 210-nm detector and a 4.6-mm  $\times$  30-cm column that contains 4- $\mu$ m packing L1. The flow rate is about 1.5 mL per minute. The column temperature is maintained at 60°. Chromatograph the *Standard solution*, and record the peak responses as directed for

*Procedure:* the column efficiency is not less than 10,000 theoretical plates; and the tailing factor is not more than 1.3.

**Procedure**—Inject a volume (about 15  $\mu$ L) of the *Test solution* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the peak responses. Calculate the percentage of each impurity in the portion of Finasteride taken by the formula:

$$100(r_i / r_s)$$

in which  $r_i$  is the peak response for each impurity, and  $r_s$  is the sum of the responses of all peaks: not more than 0.5% of any individual impurity is found; and not more than 1.0% of total impurities is found.

### Assay—

**Mobile phase**—Prepare a filtered and degassed mixture of water and tetrahydrofuran (4:1). Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

**Diluting solution**—Prepare a solution of water and acetonitrile (1:1).

**Standard preparation**—Dissolve an accurately weighed quantity of USP Finasteride RS in *Diluting solution*, and dilute quantitatively, and stepwise if necessary, with *Diluting solution* to obtain a solution having a known concentration of about 200  $\mu$ g per mL.

**Assay preparation**—Transfer about 20 mg of Finasteride, accurately weighed, to a 100-mL volumetric flask, dissolve in and dilute with *Diluting solution* to volume, and mix.

**Chromatographic system** (see *Chromatography* (621))—The liquid chromatograph is equipped with a 215-nm detector and a 3.0-mm  $\times$  3.0-cm column that contains 3- $\mu$ m packing L7. The flow rate is about 3 mL per minute. Chromatograph the *Standard preparation*, and record the peak responses as directed for *Procedure:* the column efficiency is not less than 1800 theoretical plates; the tailing factor is not more than 1.3; and the relative standard deviation for replicate injections is not more than 1.0%.

**Procedure**—Separately inject equal volumes (about 10  $\mu$ L) of the *Standard preparation* and the *Assay preparation* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the responses for the major peaks. Calculate the quantity, in mg, of  $C_{23}H_{36}N_2O_2$  in the portion of Finasteride taken by the formula:

$$100C(r_u / r_s)$$

in which  $C$  is the concentration, in mg per mL, of USP Finasteride RS in the *Standard preparation*; and  $r_u$  and  $r_s$  are the peak responses obtained from the *Assay preparation* and the *Standard preparation*, respectively.

## Finasteride Tablets

» Finasteride Tablets contain not less than 95.0 percent and not more than 105.0 percent of finasteride ( $C_{23}H_{36}N_2O_2$ ).

**Packaging and storage**—Preserve in tight, light-resistant containers, and store at controlled room temperature.

**USP Reference standards** (11)—  
USP Finasteride RS

**Identification**—The retention time of the major peak in the chromatogram of the *Assay preparation* corresponds to that in the chromatogram of the *Standard preparation*, as obtained in the *Assay*.

**Status:** You are viewing the legally effective version.

Updated Ph. Eur. 9.1, effective 01/04/2017

## Filgrastim Concentrated Solution

[General Notices](#)

(Ph. Eur. monograph 2206)

```

MTP LGPASSL  PQSFLLKCLE  QVRKIQGDGA  ALQEKLCATY
  |           |           |           |
KLCHPEELVL  LGHSLGIPWA  PLSSCPSQAL  QLAGCLSQLH
  |           |           |           |
SGLFLYQGLL  QALEGISPEL  GPTLDTLQLD  VADFATTIWQ
  |           |           |           |
QMEELGMAPA  LQPTQGAMPA  FASAFQRRAG  GVLVASHLQS
  |           |           |           |
FLEVS YRVLR  HLAQP
  
```

$C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$  18 799 121181-53-1

### Action and use

Recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor

Ph Eur

### DEFINITION

Solution of a protein having the primary structure of the granulocyte colony-stimulating factor plus 1 additional amino acid, an *N*-terminal methionine (r-met HU G-CSF). In contrast to its natural counterpart, the protein is not glycosylated. Human G-CSF is produced and secreted by endothelium, monocytes and other immune cells. The protein stimulates the differentiation and proliferation of leucocyte stem cells into mature granulocytes.

### Content

Minimum 0.9 mg of protein per millilitre.

### Potency

Minimum 0.9 10<sup>8</sup> IU per milligram of protein.

### PRODUCTION

*Filgrastim* concentrated solution is produced by a method based on recombinant [DNA](#) (rDNA) technology, using bacteria as host cells.

*Prior to release, the following tests are carried out on each batch of the final bulk product, unless exemption has been granted by the competent authority.*

#### Host-cell-derived proteins

The limit is approved by the competent authority.

#### Host-cell- or vector-derived [DNA](#)

The limit is approved by the competent authority.

### CHARACTERS

#### Appearance

Clear, colourless or slightly yellowish liquid.

### IDENTIFICATION

- It shows the expected biological activity (see Assay).
- Examine the electropherograms obtained in the test for impurities with charges differing from that of *filgrastim*.

**Results** The principal band in the electropherogram obtained with the test solution is similar in position to the principal band in the electropherogram obtained with reference solution (a).

C. Examine the chromatograms obtained in the test for impurities with molecular masses higher than that of *filgrastim*.

**Results** The principal peak in the chromatogram obtained with the test solution is similar in retention time to the principal peak in the chromatogram obtained with the reference solution.

D. Examine the electropherograms obtained under both reducing and non-reducing conditions in the test for impurities with molecular masses differing from that of *filgrastim*.

**Results** The principal band in the electropherogram obtained with test solution (a) is similar in position to the principal band in the electropherogram obtained with reference solution (b).

E. Examine the chromatograms obtained in the test for related proteins.

**Results** The principal peak in the chromatogram obtained with the test solution is similar in retention time and shape to the principal peak in the chromatogram obtained with the reference solution.

F. Peptide mapping (2.2.55).

#### SELECTIVE CLEAVAGE OF THE PEPTIDE BONDS

**Test solution** Introduce a volume of the preparation to be examined corresponding to 25 g of protein into a [polypropylene](#) tube. Add 25 L of a 0.1 mg/mL solution of [glutamyl endopeptidase for peptide mapping R](#). Dilute to 100 L with [0.02 M sodium phosphate buffer solution pH 8.0 R](#), stopper the tube and incubate at about 37 C for 17 h. Cool to 2-8 C until analysis.

**Reference solution** Prepare at the same time and in the same manner as for the test solution but using [filgrastim CRS](#) instead of the preparation to be examined.

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION. [Liquid chromatography \(2.2.29\)](#).

Column:

— size:  $l = 0.10 \text{ m}$ ,  $\phi = 2.1 \text{ mm}$ ;

— stationary phase: [octadecylsilyl silica gel for chromatography R](#) (5 m) with a pore size of 20 nm;

— temperature: 60 C.

Mobile phase:

— mobile phase A: dilute 0.5 mL of [trifluoroacetic acid R](#) in 950 mL of [water R](#), add 50 mL of [acetonitrile for chromatography R](#) and mix;

— mobile phase B: dilute 0.5 mL of [trifluoroacetic acid R](#) in 50 mL of [water R](#), add 950 mL of [acetonitrile for chromatography R](#) and mix;

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 8	97 → 94	3 → 6
8 - 25	94 → 66	6 → 34
25 - 40	66 → 10	34 → 90
40 - 45	10	90

Flow rate 0.2 mL/min.

Detection Spectrophotometer at 215 nm.

Injection 10 L.

**System suitability** The chromatogram obtained with the reference solution is similar to the chromatogram of *filgrastim* digest supplied with [filgrastim CRS](#).

**Results** The profile of the chromatogram obtained with the test solution corresponds to that of the chromatogram obtained with the reference solution.

## TESTS

### Impurities with molecular masses higher than that of *filgrastim*

[Size-exclusion chromatography \(2.2.30\)](#): use the normalisation procedure.

**Solution A** Dissolve 4.1 g of [sodium acetate R](#) in 400 mL of [water R](#), adjust to pH 4.0 with [acetic acid R](#) and dilute to 500 mL with [water R](#).

*Test solution* Dilute the preparation to be examined with solution A to obtain a concentration of 0.4 mg/mL.

*Reference solution* Dilute [filgrastim CRS](#) with solution A to obtain a concentration of 0.4 mg/mL.

*Resolution solution* Mix a sample of the reference solution for about 30 s using a vortex mixer.

*Column:*

— size:  $l = 0.3 \text{ m}$ ,  $d = 7.8 \text{ mm}$ ;

— stationary phase: [hydrophilic silica gel for chromatography R](#) (5 m) of a grade suitable for fractionation of globular proteins in the relative molecular mass range of 10 000 to 500 000;

— temperature: 30 C.

*Mobile phase* Dissolve 7.9 g of [ammonium hydrogen carbonate R](#) in 1000 mL of [water R](#) and adjust to pH 7.0 with [phosphoric acid R](#); dilute to 2000 mL with [water R](#).

*Flow rate* 0.5 mL/min.

*Detection* Spectrophotometer at 215 nm.

*Injection* 20 L.

*Relative retention* With reference to the *filgrastim* monomer (retention time = about 19 min): aggregates = about 0.60; *filgrastim* oligomer 1 = about 0.75; *filgrastim* oligomer 2 = about 0.80; *filgrastim* dimer = about 0.85.

*System suitability* Resolution solution:

— retention time: *filgrastim* monomer = 17 min to 20 min;

— resolution: minimum 3 between the peaks due to the *filgrastim* dimer and the *filgrastim* monomer.

Calculate the percentage content of the dimer, oligomers and aggregates.

*Limits:*

— impurities with molecular masses higher than that of *filgrastim*, other than the dimer: maximum 0.5 per cent;

— total of impurities with molecular masses higher than that of *filgrastim*: maximum 2 per cent.

#### **Impurities with molecular masses differing from that of *filgrastim***

[Polyacrylamide gel electrophoresis \(2.2.31\)](#) under both reducing and non-reducing conditions.

*Gel dimensions* 1 mm thick.

*Resolving gel* 13 per cent acrylamide.

*Sample buffer (non-reducing conditions)* Mix equal volumes of [water R](#) and [concentrated SDS-PAGE sample buffer R](#).

*Sample buffer (reducing conditions)* Mix equal volumes of [water R](#) and [concentrated SDS-PAGE sample buffer for reducing conditions R](#) containing 2-mercaptoethanol as the reducing agent.

*Test solution (a)* Dilute the preparation to be examined with sample buffer to obtain a concentration of 100 g/mL.

*Test solution (b)* To 0.20 mL of test solution (a) add 0.20 mL of sample buffer.

*Test solution (c)* Dilute 0.20 mL of test solution (b) to 1 mL with sample buffer.

*Test solution (d)* Dilute 0.20 mL of test solution (c) to 1 mL with sample buffer.

*Test solution (e)* To 0.20 mL of test solution (d) add 0.20 mL of sample buffer.

*Reference solution (a)* Solution of molecular mass markers suitable for calibrating SDS-polyacrylamide gels in the range of 14.4-94 kDa.

*Reference solution (b)* Dilute [filgrastim CRS](#) with sample buffer to obtain a concentration of 100 g/mL.

*Sample treatment* Boil for 5 min.



*Application* 20 L.

*Detection* By silver staining.

*System suitability:*

- reference solution (a): the validation criteria are met;
- a band is seen in the electropherogram obtained with test solution (e);
- a gradation of intensity of staining is seen in the electropherograms obtained with test solutions (a) to (e).

*Limit:* test solution (a):

- *impurities with molecular masses lower or higher than that of filgrastim:* no band is more intense than the principal band in the electropherogram obtained with test solution (d) (2.0 per cent).

#### **Impurities with charges differing from that of filgrastim**

Isoelectric focusing ([2.2.54](#)).

*Test solution* Dilute the preparation to be examined with [water R](#) to obtain a concentration of 0.3 mg/mL.

*Reference solution (a)* Dilute [filgrastim CRS](#) with [water R](#) to obtain a concentration of 0.3 mg/mL.

*Reference solution (b)* Dilute [filgrastim CRS](#) with [water R](#) to obtain a concentration of 0.03 mg/mL.

*Reference solution (c)* Use an isoelectric point (pI) calibration solution, in the pI range of 2.5-6.5, prepared according to the manufacturers instructions.

*Focusing:*

- *pH gradient:* 4.5-8.0;
- *catholyte:* 1 M solution of [sodium hydroxide R](#);
- *anolyte:* 0.04 M solution of [glutamic acid R](#) in a 0.0025 per cent V/V solution of [phosphoric acid R](#);
- *application:* 20 L.

*Detection* As described in [2.2.54](#).

*System suitability:*

- in the electropherogram obtained with reference solution (c), the relevant isoelectric point markers are distributed along the entire length of the gel;
- in the electropherogram obtained with reference solution (a), the pI of the principal band is 5.7 to 6.3.

*Limit:*

- *any impurity:* no band is more intense than the principal band in the electropherogram obtained with reference solution (b) (10 per cent).

#### **Related proteins**

[Liquid chromatography \(2.2.29\)](#): use the normalisation procedure.

*Test solution* Dilute the preparation to be examined with [water for chromatography R](#) to obtain a concentration of 0.5 mg/mL.

*Reference solution (a)* Dilute the content of a vial of [filgrastim CRS](#) with [water for chromatography R](#) to obtain a concentration of 0.5 mg/mL.

*Reference solution (b)* To 250 L of reference solution (a), add 2.5 L of a 4.5 g/L solution of hydrogen peroxide. Mix and incubate at 25 °C for 30 min, then add 1.9 mg of [L-methionine R](#).

*Reference solution (c)* To 250 L of reference solution (a), add 0.25 mg of [dithiothreitol R](#). Mix and incubate at 35 °C for 60 min.

*Column:*

- *size:*  $l = 0.15 \text{ m}$ ,  $d = 4.6 \text{ mm}$ ;
- *stationary phase:* [butylsilyl silica gel for chromatography R](#) (5  $\mu\text{m}$ ) with a pore size of 30 nm;
- *temperature:* 60 °C.

**Mobile phase:**

- mobile phase A: dilute 1 mL of [trifluoroacetic acid R](#) in 1000 mL of [water for chromatography R](#);
- mobile phase B: dilute 1 mL of [trifluoroacetic acid R](#) in 100 mL of [water for chromatography R](#), then add 900 mL of [acetonitrile R](#);

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 30	60 → 20	40 → 80
30 - 35	20	80
35 - 45	20 → 60	80 → 40

**Flow rate** 0.8 mL/min.

**Detection** Spectrophotometer at 215 nm.

**Injection** 50 L of the test solution and reference solutions (b) and (c).

**Relative retention** With reference to *filgrastim* (retention time = about 23 min): oxidised *filgrastim* (form 1) = about 0.84; oxidised *filgrastim* (form 2) = about 0.98; reduced *filgrastim* = about 1.04.

**System suitability:** reference solution (b):

- **symmetry factor:** maximum 1.8 for the peak due to *filgrastim*;
- **peak-to-valley ratio:** minimum 2.0, where  $H_p$  = height above the baseline of the peak due to oxidised form 2 and  $H_v$  = height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to *filgrastim*.

**System suitability:** reference solution (c):

- **resolution:** minimum 1.5 between the peaks due to *filgrastim* and reduced *filgrastim*;
- **symmetry factor:** maximum 1.8 for the peak due to *filgrastim*.

**Limits:**

- **any impurity:** for each impurity, maximum 1.0 per cent;
- **total:** maximum 2.0 per cent.

**Bacterial endotoxins (2.6.14)**

Less than 2 IU in the volume that contains 1.0 mg of protein.

**ASSAY****Protein**

**Liquid chromatography (2.2.29)** as described in the test for related proteins with the following modification.

**Injection** Test solution and reference solution (a).

Calculate the content of *filgrastim* ( $C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$ ) taking into account the assigned content of  $C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$  in [filgrastim CRS](#).

**Potency**

The potency of the preparation to be examined is determined by comparison of the dilutions of the test preparation with the dilutions of the International Standard of *filgrastim* or with a reference preparation calibrated in International Units.

The International Unit is the activity contained in a stated amount of the appropriate International Standard. The equivalence in International Units of the International Standard is stated by the World Health Organization.

Carry out the assay using a suitable method such as the following, which uses the conversion of a tetrazolium salt (MTS) as a staining method. Alternative methods of quantifying cell proliferation, such as measurement of intracellular ATP by luciferase bioluminescence, have also been found suitable, and may be used as the assay readout, subject to appropriate validation. The assay conditions (for example, cell concentration, incubation time and dilution steps) are then adapted accordingly.

Use an established cell line responsive to *filgrastim*. M-NFS-60 cells ([ATCC](#) No. CRL-1838) that have been made sensitive to G-CSF have been found

suitable. Incubate with varying dilutions of test and reference preparations of *filgrastim*. Then incubate with a solution of *tetrazolium salt R*. This cytochemical stain is converted by cellular dehydrogenases to a coloured formazan product. The formazan is then measured spectrophotometrically.

Add 50 L of dilution medium to all wells of a 96-well microtitre plate. Add an additional 50 L of this solution to the wells designed for the blanks. Add 50 L of each solution to be tested in triplicate (test preparation and reference preparation at a concentration of about 800 IU/mL, plus a series of 10 twofold dilutions to obtain a standard curve). Prepare a suspension of M-NFS-60 cells containing  $7 \times 10^5$  cells per millilitre. Immediately before use, add 2-mercaptoethanol to a final concentration of 0.1 mM, and add 50 L of the prepared cell suspension to each well, maintaining the cells in a uniform suspension during addition.

Incubate the plate at 36.0-38.0 C for 44-48 h in a humidified incubator using 6 l per cent CO<sub>2</sub>. Add 20 L of a 5.0 g/L sterile solution of *tetrazolium salt R* to each well and reincubate for 4 h. Estimate the quantity of formazan produced using a microtitre well plate reader at 490 nm.

Calculate the potency of the preparation to be examined using a suitable statistical method, for example the parallel line assay ([5.3](#)).

The estimated potency is not less than 80 per cent and not more than 125 per cent of the stated potency. The confidence limits ( $P = 0.95$ ) are not less than 74 per cent and not more than 136 per cent of the estimated potency.

## LABELLING

*The label states:*

- the content, in milligrams of protein per millilitre;
- the potency, in International Units per milligram of protein.

---

Ph Eur

© Crown Copyright 2016