

## **BIO.01 - Propostas de metodologias alternativas ao MTT para ensaio de potência do biofármaco Filgrastim**

Nathália Vinagre<sup>1\*</sup>; Fausto Ferraris<sup>1</sup>; Ana Cristina Almeida Nogueira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Fiocruz/INCQS;

<sup>2</sup>Fiocruz/IOC.

### **Introdução:**

O Filgrastim é um biofármaco constante na lista de medicamentos 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 G-CSF). Atualmente, este biomedicamento não possui monografia na Farmacopeia Brasileira.

### **Objetivo:**

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 farmacopeia através da utilização de citometria de fluxo por ensaios de proliferação e marcação intracelular e testar uma linhagem humana (Kasumi-1) como alternativa à linhagem murina (M-NFS-60) sugerida pela FE.

### **Metodologia:**

Foram realizados ensaios padronizados pela FE de MTT com a linhagem M-NFS-60 e com a linhagem sugerida Kasumi-1.

Ensaio de CFSE com diferentes concentrações do produto e submetidos à citometria de fluxo com ambas as linhagens.

Ensaio de ativação do receptor do Filgrastim por citometria de fluxo com ambas as linhagens.

Comparação dos métodos através de análises estatísticas.

### **Resultado:**

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 com CFSE, 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. 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.

### **Conclusão:**

Os ensaios de proliferação por CFSE foram padronizados, porém os mesmos não foram capazes de apresentar uma dose-resposta em relação a proliferação das células, considerados portanto não adequados para ensaio de potência deste biofármaco. 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. Além disso, este ensaio seria capaz de reduzir o tempo de ensaio de 48h para apenas 2h.

**Palavras-chave:** Ensaio de potência; Controle de qualidade; Biofármaco