

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ANA PAULA DE ARAUJO

Desenvolvimento de Metodologia para Mapeamento Peptídico da
Eritropoetina Humana Recombinante visando o
Controle em Processo da Produção em Bio-Manguinhos

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Tecnologia de
Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A663

Araújo, Ana Paula de.

Desenvolvimento de metodologia para mapeamento peptídico da Eritropoetina Humana Recombinante visando o controle em processo da produção em Bio-Manguinhos. / Ana Paula de Araújo. – Rio de Janeiro, 2011.

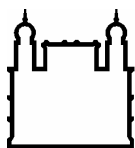
xi, 91f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.
Bibliografia: f. 84-88

1. Eritropoetina humana recombinante. 2. Controle em processo. 3. Mapeamento peptídico. 4. Cromatografia de fase reversa. I. Título.

CDD 615.36

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Macromoléculas, sob a orientação do Prof. Dr. Jose Godinho da Silva Junior e do Prof. Dr. Eduardo Ruback dos Santos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA MAPEAMENTO
PEPTÍDICO DA ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE VISANDO
O CONTROLE EM PROCESSO DA PRODUÇÃO EM BIO-MANGUINHOS

ORIENTADORES: Prof. Dr. Jose Godinho da Silva Junior e Prof. Dr. Eduardo Ruback
dos Santos

Dissertação apresentada e defendida por
ANA PAULA DE ARAUJO
e aprovada pela Comissão Julgadora em 07 de junho de 2011

Prof^a. Dr^a. Luciana Helena Maia Porte
Instituto Multidisciplinar/UFRRJ

Prof. Dr. Jonas Enrique Aguilar Perales
Instito Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Prof. Dr. Hilton Jorge Nascimento
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ
Presidente da Banca Examinadora

Rio de Janeiro
2011

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus avós que sempre me incentivaram e me apoiaram em minhas escolhas, e aos quais devo todas as vitórias que conquistei.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força e capacidade para seguir buscando meus objetivos.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) pelo apoio institucional para a realização desta pós-graduação.

À coordenação e à secretaria do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos pela oportunidade de aprendizado e capacitação profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jose Godinho da Silva Junior por toda dedicação concedida à minha dissertação e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador Dr. Eduardo Ruback dos Santos pelo apoio dado.

Ao meu revisor, Dr. Hilton Jorge Nascimento, pela atenção, pelo aprendizado e por toda ajuda dedicada ao meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Macromoléculas, Renata Chagas Bastos, Ana Paula Dinis Ano Bom, Renato Marins Ferreira, Priscila Muniz da Paz, Izabella Sodré Buty da Silva e Angela Marina de Souza Silva, por me ajudarem sempre que precisei e pela amizade construída.

Ao Dr. André Teixeira da Silva Ferreira e ao Laboratório de Toxinologia do IOC/FIOCRUZ pela realização dos ensaios de espectrometria de massa.

À Cláudia Maria da Conceição e à Debora Elias de Oliveira pelas colaborações prestadas ao meu projeto.

A todos os professores e amigos do MPTI turma 2009 pelo aprendizado adquirido e pelos bons e difíceis momentos que dividimos.

Aos meus pais, Ely de Araujo e Wania Tiengo de Araujo, ao meu irmão, Bruno de Araujo, aos meus avós, Osvaldo Antônio Tiengo e Maria Dulce da Silva Tiengo, por todo amor, carinho, compreensão, dedicação e ajuda, dispensados a mim em todos os momentos da minha vida. Por entenderem que mesmo longe, eles estão juntos de mim, em meu coração.

Às minhas queridas amigas pelo carinho, pela amizade incondicional e pela compreensão que sempre tiveram comigo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Bio-Manguinhos.....	1
1.1.1 - A Produção de Biofármacos.....	2
1.1.2 - A Transferência de Tecnologia para a Produção da Eritropoetina.....	3
1.2 - A Eritropoetina.....	4
1.2.1 - A Eritropoetina Humana Recombinante (rHuEPO).....	6
1.2.2 - O Processo Produtivo da rHuEPO	8
1.3 - O Controle em Processo.....	10
1.4 - Mapeamento Peptídico da rHuEPO	11
2- OBJETIVOS	15
2.1 - Objetivo Geral.....	15
2.2 - Objetivos Específicos.....	15
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 - Obtenção da amostra de rHuEPO.....	16
3.2 - Avaliação da homogeneidade protéica da amostra de rHuEPO.....	16
3.2.1 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida.....	16
3.2.2 - Cromatografia de fase reversa em coluna C4.....	17
3.3 - Caracterização físico-química da rHuEPO	18
3.3.1 - Quantificação protéica da amostra de rHuEPO.....	18
3.3.2 - Determinação do peso molecular da rHuEPO.....	19
3.3.3 - Determinação do ponto isoelétrico da rHuEPO	20
3.3.4 - Determinação da mobilidade eletroforética da rHuEPO.....	21
3.4 - Padronização da hidrólise enzimática da rHuEPO.....	22
3.4.1 – Obtenção dos peptídeos trípticos teóricos da rHuEPO.....	22
3.4.2 - Avaliação da atividade enzimática da tripsina	22
3.4.3 - Preparação das amostras de rHuEPO para a hidrólise tríptica.....	23
3.4.4 - Determinação do tempo de hidrólise.....	24
3.4.5 - Determinação da relação enzima/substrato	25
3.4.6 - Avaliação do uso das endoproteinases Arg-C e Lys-C	26
3.5 – Otimização da cromatografia de fase reversa dos peptídeos trípticos da rHuEPO	27
3.5.1 - Avaliação do gradiente cromatográfico de eluição	27
3.5.2 - Avaliação da coluna cromatográfica de fase reversa C18.....	28

3.6 - Análise dos peptídeos trípticos da rHuEPO por espectrometria de massa.....	29
3.7 - Especificidade da metodologia desenvolvida	29
4 – RESULTADOS	31
4.1 - Avaliação da homogeneidade protéica da amostra de rHuEPO.....	31
4.1.1 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida.....	31
4.1.2 - Cromatografia de fase reversa em coluna C4.....	34
4.2 - Caracterização físico-química da rHuEPO	37
4.2.1 - Quantificação protéica da amostra de rHuEPO.....	37
4.2.2 - Determinação do peso molecular da rHuEPO.....	38
4.2.3 - Determinação do ponto isoeletrico da rHuEPO	41
4.2.4 - Determinação da mobilidade eletroforética da rHuEPO.....	46
4.3 - Padronização da hidrólise enzimática da rHuEPO.....	48
4.3.1 - Obtenção dos peptídeos trípticos teóricos da rHuEPO	48
4.3.2 - Avaliação da atividade enzimática da tripsina	49
4.3.3 - Preparação das amostras de rHuEPO para a hidrólise tríptica.....	51
4.3.4 - Determinação do tempo de hidrólise.....	52
4.3.5 - Determinação da relação enzima/substrato	54
4.3.6 - Avaliação do uso das endoproteínases Arg-C e Lys-C	56
4.4 – Otimização da cromatografia de fase reversa dos peptídeos trípticos da rHuEPO	59
4.4.1 - Avaliação do gradiente cromatográfico de eluição	59
4.4.2 - Avaliação da coluna cromatográfica de fase reversa C18.....	61
4.5 - Análise dos peptídeos trípticos da rHuEPO por espectrometria de massa.....	67
4.6 - Especificidade da metodologia desenvolvida	71
5- DISCUSSÃO.....	74
5.1 - Homogeneidade protéica e caracterização físico-química da rHuEPO	74
5.2 - Padronização da hidrólise enzimática da rHuEPO.....	77
5.3 – Otimização da cromatografia de fase reversa dos peptídeos trípticos da rHuEPO	80
5.4 - Análise dos peptídeos trípticos da rHuEPO por espectrometria de massa.....	81
5.5 - Especificidade da metodologia desenvolvida	82
6- CONCLUSÕES.....	83
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs - Absorvância

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Arg - Arginina

Asn - Asparagina

Asp - Ácido aspártico

BHK - Rim de hamster jovem (*Baby hamster kidney*)

Bio-Manguinhos - Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos

BPF - Boas Práticas de Fabricação

BSA - Albumina de soro bovina

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

CHCA - Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico

CHO - Ovário de hamster chinês (*Chinese hamster ovary*)

CIM - *Centro de Inmunología Molecular*

CIPBR - Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnóstico

Cys - Cisteína

DTT - Ditioneitol

E/S - Enzima/Substrato

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPO - Eritropoetina

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

Glu - Ácido glutâmico

HCl - Ácido clorídrico

His - Histidina

HPLC-RP - Cromatografia líquida de alto desempenho por fase reversa

IEF-PAGE - Focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida

IFA - Insumo farmacêutico ativo

Lys - Lisina

MALDI - *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*

MM - Massa molecular

MS - Espectrometria de massa (Mass spectrometry)

NaCl - Cloreto de sódio

NATIVE-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas

p/p - Peso por peso

pI - Ponto isoelétrico

PM - Peso molecular

R² - Coeficiente de correlação

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RE - Resolução Específica

Rf - Mobilidade eletroforética relativa

rHuEPO - Eritropoetina humana recombinante

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

Ser - Serina

SUS - Sistema Único de Saúde

TFA - Ácido trifluoroacético

TOF - *Time of flight*

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

UI - Unidade internacional

v/v - Volume por volume

VC - Volume de coluna

WHO - *World Health Organization*

RESUMO

A eritropoetina (EPO) é um hormônio produzido, principalmente, pelos rins, que regula a produção de células vermelhas do sangue. Trata-se de uma glicoproteína com 166 aminoácidos, três sítios de N-glicosilação e um de O-glicosilação. Apresenta massa molecular na faixa de 30-34 kDa, sendo aproximadamente 40% correspondente aos glicídeos. A EPO está disponível como agente terapêutico produzido através da tecnologia do DNA recombinante em cultura de células de mamíferos. A EPO humana recombinante (rHuEPO) é usada para o tratamento de anemia associada à insuficiência renal crônica. Devido a relevância médica da rHuEPO, sua produção está sendo nacionalizada através do processo de transferência de tecnologia do *Centro de Inmunología Molecular* (CIM), de Cuba, para o Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos)/FIOCRUZ. O controle de qualidade sobre o processo produtivo da rHuEPO e seu produto final é bastante rigoroso. Neste contexto, o mapeamento peptídico é um dos mais importantes ensaios usados no controle em processo da produção de proteínas recombinantes. Este ensaio assegura a integridade da estrutura primária das proteínas ao final das etapas de suas purificações. Sendo assim, o objetivo desta dissertação de mestrado foi definir uma metodologia de mapeamento peptídico da rHuEPO, visando o controle de processo da produção deste biofármaco em Bio-Manguinhos. Previamente, a preparação da rHuEPO fornecida pelo CIM foi avaliada quanto a sua homogeneidade e caracterizada por eletroforeses em gel de poliacrilamida, cromatografia de fase reversa, cromatofocalização e espectrometria de massa. Para obter os peptídeos da rHuEPO, a hidrólise enzimática desta glicoproteína com a enzima tripsina foi avaliada em diferentes tempos de incubação e com relações enzima/substrato distintas. O fracionamento dos peptídeos foi feito por cromatografia líquida de fase reversa em coluna C18, empregando-se diferentes colunas cromatográficas e gradientes de eluição. As principais frações peptídicas isoladas da cromatografia de fase reversa foram analisadas por espectrometria de massa a fim de comprovar a identidade dos peptídeos trípticos da rHuEPO. A especificidade da metodologia desenvolvida foi avaliada através da comparação dos perfis peptídicos do hidrolisado tríptico da rHuEPO e do quimotripsinogênio A. A hidrólise tríptica usando-se relação enzima/substrato de 1/50 (p/p), concentração de rHuEPO de 1 mg/mL e incubação de 1 hora a 37°C hidrolisou mais de 99% da glicoproteína. As colunas cromatográficas de fase reversa Hi-Pore RP 318, Vydac 218TP C18 e Delta Pak C18 se mostraram aptas para o fracionamento dos peptídeos trípticos da rHuEPO. Em comparação à metodologia usada no CIM, o tempo de incubação de hidrólise foi reduzido em, pelo menos, 2 horas e a duração da corrida cromatográfica para obtenção do mapa peptídico diminuiu em, pelo menos, 1 hora e 42 minutos. Na análise por espectrometria de massa das frações isoladas da cromatografia de fase reversa, seis peptídeos trípticos da rHuEPO foram observados. Tais frações peptídicas foram identificadas como pertencentes à EPO humana pelo programa *Mascot Search Results*. Dessa forma, ficou estabelecida uma metodologia de mapeamento peptídico específica, simples e rápida para ser utilizada no controle em processo da produção da rHuEPO em Bio-Manguinhos.

ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) is a hormone produced mainly by the kidney that regulates the production of red blood cells. It is a glycoprotein with 166 amino acids, three N-glycosylation and one O-glycosylation sites. It has a molecular weight in the range of 30-34 kDa, being approximately 40% of its content corresponding to carbohydrates. EPO is available as a therapeutic agent produced by recombinant DNA technology in mammalian cell culture. The recombinant human EPO (rHuEPO) is used to treat anemia associated with chronic renal disease. Due to rHuEPO medical relevance, its production technology is a subject of transference from the *Centro de Inmunología Molecular* (CIM), Cuba, to the *Instituto de Tecnologia em Imunobiologicos (Bio-Manguinhos)/FIOCRUZ*. The quality control over production process of rHuEPO and its final product is quite rigorous. In this context, peptide mapping is one of the most important tests used in process control of recombinant proteins production. This test ensures the primary structure integrity of a protein after its purification processes. Thus, the objective of this dissertation was to define a methodology for peptide mapping of rHuEPO aiming to be used in the process control of this biopharmaceutical production in Bio-Manguinhos. Previously, the preparation of rHuEPO provided by CIM was characterized by polyacrylamide gel electrophoresis, reversed phase chromatography, chromatofocusing and mass spectrometry. In order to obtain rHuEPO peptides, the enzymatic hydrolysis of this glycoprotein with the enzyme trypsin was assessed at different incubation times and enzyme/substrate ratio. Peptides fractionation was performed by reverse phase liquid chromatography, using distincts C18 columns and elution gradients. The main peptide fractions from reversed phase chromatography were analyzed by mass spectrometry to confirm the identity of rHuEPO tryptic peptides. The specificity of the developed methodology was evaluated by comparing peptides profiles from rHuEPO and Chymotrypsinogen A tryptic hydrolysates. The tryptic digestion using enzyme/substrate ratio of 1/50 (w/w), substrate concentration of 1 mg/mL and incubation for 1 hour at 37°C hidrolysated more than 99% of the glicoprotein. The reversed phase columns Hi-Pore RP 318, Vydac 218TP C18 e Delta Pak C18 were able to fractionate the rHuEPO tryptic peptides. Compared to the methodology used in CIM, the hydrolysis incubation time was reduced by at least 2 hours and the chromatographic running time to obtain the peptide map was decreased by at least 1 hour and 42 minutes. The mass spectrometry analysis of the fractions isolated from reversed-phase chromatography showed six tryptic peptides of rHuEPO. These peptide fractions were identified as belonging to human EPO by the program Mascot Search Results. Thus it was established an specific, simple and fast peptide mapping methodology to use in process control of rHuEPO in Bio-Manguinhos.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Bio-Manguinhos

A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) é uma instituição vinculada ao Ministério da Saúde, que promove diferentes atividades na área da saúde, a saber: desenvolvimento de pesquisas, prestação de serviços hospitalares e ambulatoriais de referência, fabricação de vacinas, medicamentos, reagentes e *kits* de diagnóstico, ensino e formação de recursos humanos, informação e comunicação em saúde, ciência e tecnologia, controle da qualidade de produtos e serviços e implementação de programas sociais (Fiocruz, 2010a).

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) é uma unidade técnico-científica da Fiocruz e foi fundado em 1976. Bio-Manguinhos produz e desenvolve imunobiológicos para atender às demandas da saúde pública, sendo o maior fornecedor de imunobiológicos do Ministério da Saúde. Este instituto é uma referência no setor, ocupando uma posição de destaque no mercado. Sua linha de produtos é composta por vacinas, *kits* de reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos (Fiocruz, 2010b).

Para atender aos programas nacionais de saúde pública, Bio-Manguinhos conta com um dos maiores e mais modernos parques industriais de vacinas da América Latina, cumpre as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e têm a chancela da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para seus produtos. Bio-Manguinhos recebeu o prêmio de Melhor Instituição de Saúde Pública do Mundo, concedido pela *World Federation of Public Health Associations* (WFPHA), em 2006 (Fiocruz, 2010b).

O Instituto atua no desenvolvimento e na produção de biofármacos, os quais fazem parte do Programa de Medicamentos Excepcionais do Ministério da Saúde, através de uma parceria com a Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. A distribuição de biofármacos garante à população acesso gratuito a produtos de alta tecnologia e permite a redução dos gastos do Ministério Saúde (Fiocruz, 2010b).

Bio-Manguinhos é comprometido com os avanços na área de saúde e o acesso da população a imunobiológicos, assumindo um papel estratégico para o Brasil. Tanto sua

produção quanto seus investimentos em pesquisa e desenvolvimento propiciam a geração de novas tecnologias e produtos, conhecimento e economia de divisas para o país. Ao atender às demandas do país, o Instituto ganha cada vez mais credibilidade e legitima parcerias importantes (Fiocruz, 2010b).

A Fiocruz, por ser um pólo de desenvolvimento tecnológico, mantém acordos de transferência de tecnologia com empresas e instituições de pesquisa nacionais e estrangeiras, adquirindo conhecimentos necessários para a realização das suas atividades, como a produção de medicamentos, vacinas e kits diagnóstico (Fiocruz, 2010b).

1.1.1 - A Produção de Biofármacos

Os biofármacos são medicamentos obtidos, por via de regra, pelo emprego industrial de microorganismos ou células, modificados geneticamente, para a produção de determinadas substâncias de aplicação terapêutica, principalmente, proteínas. Esta tecnologia permite reproduzir proteínas idênticas ou muito semelhantes às naturais e, também, elaborar outras totalmente novas com, por exemplo, maior atividade biológica, maior vida média ou menos efeitos colaterais (Andersen & Krummen, 2002).

A produção de proteínas recombinantes envolve uma série de etapas, começando pela identificação e caracterização genética da proteína e de suas propriedades bioquímicas e pela definição dos requisitos estruturais para sua atividade funcional como, por exemplo, processamentos pós-traducionais e formação de heterodímeros. A produção propriamente dita envolve a escolha do vetor de expressão e das células produtoras em função da complexidade de processamento molecular necessário à obtenção da proteína funcional, o aperfeiçoamento do bioprocessamento de produção e o desenvolvimento de procedimentos para separação, purificação e preparo da proteína para uso médico (Fiocruz, 2010b).

Bio-Manguinhos assumiu um grande desafio tecnológico, em 2004, quando decidiu atuar na produção e desenvolvimento de biofármacos, firmando acordo com Cuba para a transferência da tecnologia de produção da Eritropoetina humana recombinante (chamada comercialmente de Alfaepoetina) e do Interferon alfa humano recombinante. Nesse momento, Bio-Manguinhos começou a escrever um importante capítulo na história do fornecimento de insumos para a saúde à população brasileira, uma vez que a implantação desta nova linha torna esses medicamentos de alto valor agregado acessíveis à população, proporciona a redução da dependência de importação

e aumenta a capacitação tecnológica e industrial do país, atendendo, prioritariamente, à demanda nacional (Fiocruz, 2010b).

Com a transferência de tecnologia para a produção destes biofármacos, que fazem parte da lista de medicamentos excepcionais do Governo Federal, Bio-Manguinhos tornou-se um dos fornecedores do Programa de Medicamentos Excepcionais do Ministério da Saúde. A distribuição de biofármacos permite à população o acesso gratuito a produtos de elevada tecnologia, fortalecendo os princípios de universalidade, integralidade e equidade que norteiam as ações do Sistema Único de Saúde (SUS). O Instituto contribui, assim, para a redução do alto impacto econômico das doenças que necessitam de tratamento com os medicamentos chamados excepcionais (Ministério da Saúde, 2010).

1.1.2 - A Transferência de Tecnologia para a Produção da Eritropoetina

A produção do biofármaco Eritropoetina humana recombinante, em Bio-Manguinhos, está em processo de transferência de tecnologia com o *Centro de Inmunología Molecular (CIM)*, situado em Havana, Cuba. O modelo de transferência prevê três etapas. A primeira é a obtenção do registro do produto Eritropoetina Humana Recombinante junto à Anvisa e o fornecimento do produto ao Ministério da Saúde. Nesta etapa, o produto é fornecido pelo CIM envasados em frascos (embalagem primária) e sem rótulo (*naked vial*), para posterior rotulagem em Bio-Manguinhos. A segunda etapa é a implantação do processamento final em Bio-Manguinhos através da transferência da informação técnica de formulação e envase do produto. Essa etapa é subdividida em duas fases: 1) recebimento do formulado, sendo o processamento final feito por Bio-Manguinhos; 2) recebimento do insumo farmacêutico ativo (IFA), sendo a formulação e o processamento final realizados em Bio-Manguinhos. A terceira etapa é a transferência de informação técnica para a nacionalização da produção do IFA da eritropoetina humana recombinante, sendo esta realizada nas instalações do Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnóstico (CIPBR) (Bio-Manguinhos, 2008).

Esse processo foi iniciado em agosto de 2004 com a assinatura do contrato de transferência de tecnologia entre o CIM e Bio-Manguinhos. A partir de dezembro de 2004, os Comitês Técnicos, que tem o objetivo de repassar as informações tecnológicas, e os Comitês Regulatórios começaram a acontecer regularmente. A primeira etapa do processo de transferência de tecnologia foi concluída em abril de 2005 e a segunda etapa teve a primeira fase cumprida em

março de 2006. A fase dois da segunda etapa e a terceira etapa precisam da conclusão das obras da área de formulação e do CIPBR para serem cumpridas. O CIPBR, que será uma das mais modernas plantas de protótipos para desenvolvimento de vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico do país, foi programado para ser executado em três fases. A primeira fase (construção do edifício) já foi concluída. Dois terços da segunda (instalação dos sistemas de ar condicionado e sua automação) foram realizados. A terceira etapa (execução das instalações de arquitetura, elétrica, tubulação) está em andamento (Bio-Manguinhos, 2009).

A construção do CIPBR conta com recursos do Fundo Tecnológico do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e apoio da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos e da Secretaria de Vigilância em Saúde. Este centro faz parte da política estratégica nacional de desenvolvimento em saúde. O CIPBR permitirá, ainda, a produção de lotes experimentais em condições de Boas Práticas de Fabricação e com qualidade assegurada para uso terapêutico (Bio-Manguinhos, 2009).

1.2 - A Eritropoetina

A Eritropoetina (EPO) é um hormônio que atua na medula óssea como um regulador primário da eritropoiese em mamíferos. A eritropoiese é a produção de células vermelhas sanguíneas (conhecidas como eritrócitos ou hemácias) a partir de células eritróides progenitoras, as quais se localizam na medula óssea. Como os eritrócitos não possuem núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria nem ribossomos, essas células não são capazes de se dividirem em mamíferos adultos, sendo a eritropoiese o único caminho para a formação de novos eritrócitos (Choi et al., 1996).

A EPO é produzida, principalmente, nos rins em adultos e no fígado durante a vida fetal, e é mantido na circulação sanguínea em uma concentração entre 130 e 230 pg/mL de soro. Como a EPO é produzida, majoritariamente, nos rins, o mau funcionamento deste órgão ocasiona uma produção insuficiente do hormônio e, conseqüentemente, o corpo não é capaz de transportar oxigênio suficiente para os tecidos (Lin et al., 1985; Choi et al., 1996).

A síntese natural deste hormônio é, geralmente, estimulada pela baixa concentração de oxigênio nos tecidos (hipóxia), diminuição da concentração de hemácias (anemia de diferentes origens) e maior demanda tecidual por oxigênio. Essas condições fazem as células renais aumentarem a produção e a secreção de eritropoetina na corrente sanguínea, levando à

estimulação da eritropoiese na medula óssea e, por fim, ao aumento do número de hemácias no sangue. A maior concentração sanguínea de hemácias melhora a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos (Lin et al., 1985; Choi et al., 1996).

A EPO é uma glicoproteína de 166 resíduos de aminoácidos, apresentando em sua estrutura três sítios de N-glicosilação (Asn24, Asn38 e Asn83) e um de O-glicosilação (Ser126), além de duas pontes dissulfeto, sendo uma entre Cys7 e Cys161 e outra entre Cys29 e Cys33 (Figura 1.1). No entanto, a forma ativa do hormônio, que circula no plasma e interage com as células-alvo, sofre um processo proteolítico no C-terminal perdendo o último resíduo de arginina, portanto, a EPO ativa apresenta 165 aminoácidos. Sua estrutura terciária é globular, caracterizada por quatro hélices α e duas folhas β anti-paralelas (Figura 1.2) (Wang et al., 1985; Lai et al., 1986; Recny et al., 1987; Choi et al., 1996).

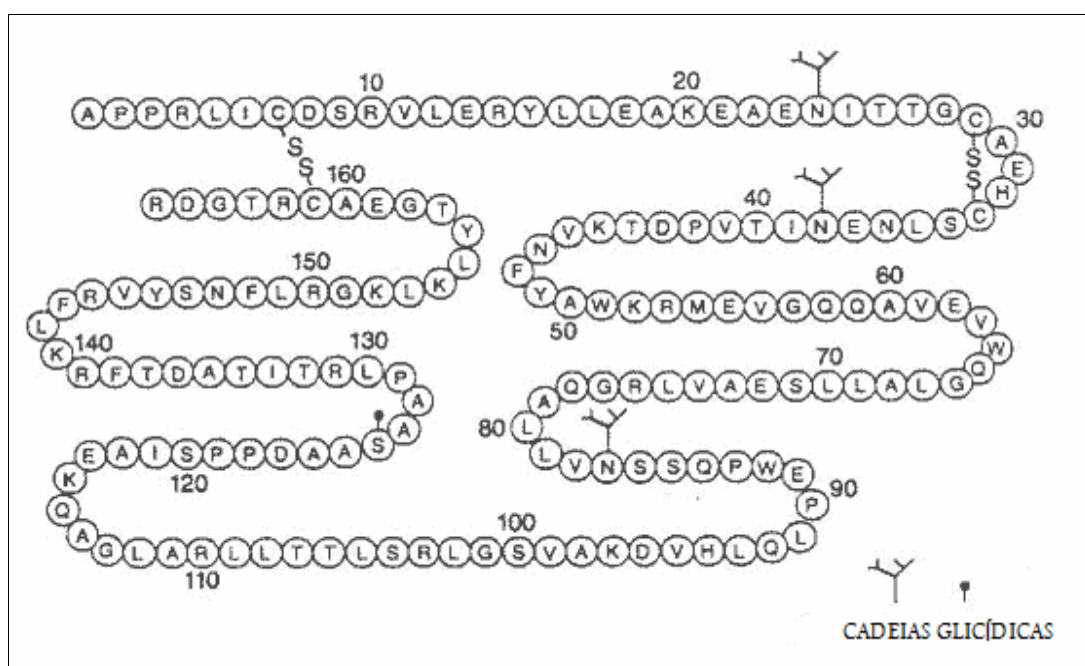


Figura 1.1: Estrutura primária da eritropoetina humana, mostrando as pontes dissulfeto e os sítios de glicosilação (Adaptada de Lai et al., 1986).

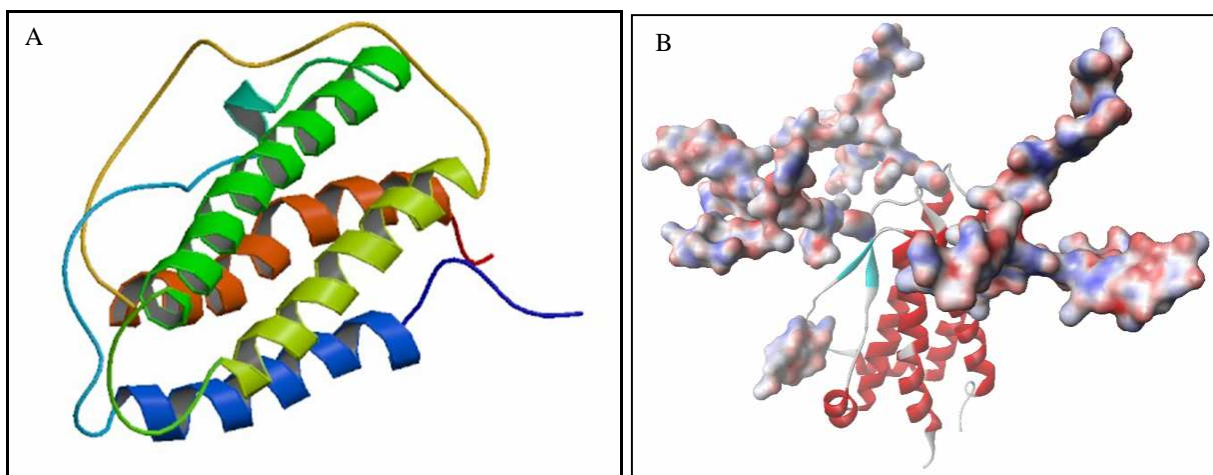


Figura 1.2: Estrutura tridimensional da eritropoetina humana. A: Representação da cadeia polipeptídica. B: Representação da cadeia polipeptídica e das cadeias glicídicas. (Fontes: Cheetham et al., 1998; NCBI, 2010)

O ponto isoelétrico da EPO varia entre 4,5 e 5,0 e sua massa molecular é de, aproximadamente, 30-34 KDa (dependendo do padrão de glicosilação), sendo 18 KDa correspondente à cadeia peptídica. Cerca de 40% da massa molecular da EPO glicosilada consiste de glicídeos. (Wang et al., 1985; Lai et al., 1986; Choi et al., 1996).

1.2.1 - A Eritropoetina Humana Recombinante (rHuEPO)

Com a finalidade de se obter grandes quantidades desse hormônio, o gene da EPO humana foi identificado, clonado e expresso, com sucesso, em células de mamíferos, como as linhagens de células de rim de hamster jovem (BHK) e ovário de hamster chinês (CHO). A EPO humana recombinante (rHuEPO), assim sintetizada, apresenta a cadeia peptídica idêntica àquela da glicoproteína natural e certa heterogeneidade quanto às cadeias glicídicas. Apesar dessa diferença na estrutura glicídica, a atividade biológica é equivalente ao hormônio natural (Lin et al., 1985; Choi et al., 1996).

Atualmente, a rHuEPO é utilizada com fins terapêuticos, para o tratamento de anemias em pacientes que apresentam insuficiência renal crônica, pacientes com AIDS em regime terapêutico com Zidovudina e pacientes oncológicos em quimioterapia (Fiocruz, 2010b).

Assim como ocorre em outras proteínas glicosiladas, a rHuEPO é encontrada como uma mistura de isoformas, relacionadas à fração variável de glicídeos presentes na proteína. Essa heterogeneidade está associada à ausência ou à presença de ácido siálico nas extremidades das cadeias glicídicas (Sasaki et al., 1987; Gokana et al., 1997). Uma molécula de rHuEPO pode

possuir até 14 moléculas de ácido siálico, quando as três cadeias glicídicas de N-glicosilação são tetraantenárias. As moléculas de ácido siálico são necessárias para que o hormônio atinja seus sítios-alvo. Quando os resíduos de ácido siálico terminais presentes nas cadeias glicídicas da rHuEPO são removidos, o tempo de meia-vida da glicoproteína no plasma torna-se muito pequeno, impedindo assim que a rHuEPO desempenhe seu papel na manutenção dos níveis de eritrócitos. Isso se deve ao fato de os hepatócitos apresentarem alto reconhecimento para galactose, que é o glicídeo exposto na ausência dos resíduos de ácido siálico (Figura 1.3). Dessa forma, a rHuEPO é rapidamente reconhecida pelos receptores hepáticos, metabolizada e excretada do organismo (Lin et al., 1985; Fukuda et al., 1989; Choi et al., 1996).

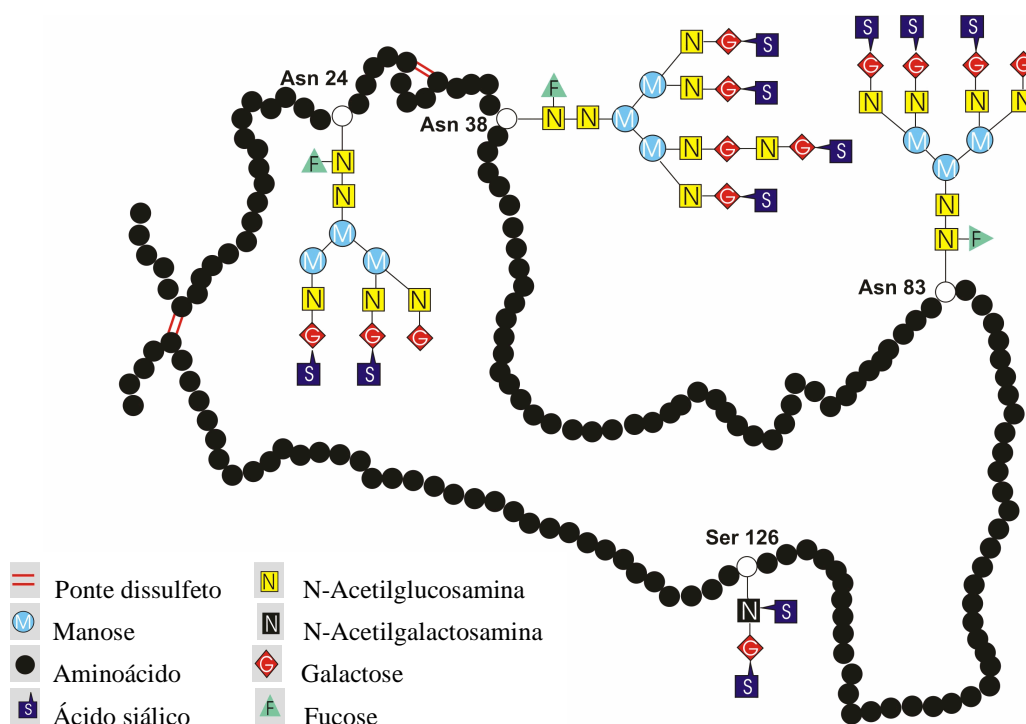


Figura 1.3: Esquema das cadeias glicídicas de N-glicosilação e O-glicosilação mais comumente presentes na molécula de rHuEPO (Adaptado de NCBI, 2011).

A complexa estrutura glicosidada da rHuEPO torna imprescindível uma cuidadosa manutenção das condições operacionais ótimas durante o processo produtivo, de modo a minimizar problemas de heterogeneidade e, conseqüentemente, maximizar o rendimento em termos das isoformas de maior atividade biológica (Moraes et al., 2008).

1.2.2 - O Processo Produtivo da rHuEPO

A linhagem celular utilizada como hospedeira para a transfecção do cDNA da EPO foi CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*), que são células de ovário de hamster chinês extraídas do tecido epitelial. Essas células podem ser adaptadas para o crescimento em suspensão, o que as tornam, atualmente, o principal tipo de célula empregado na produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico. Além disso, essa linhagem celular tem capacidade metabólica de realizar a glicosilação das proteínas, apresentando padrões de glicosilação similares aos padrões humanos equivalentes (Moraes et al., 2008).

No *Centro de Inmunología Molecular* (CIM), o processo de fermentação para crescimento das células e, conseqüentemente, produção da rHuEPO é feito em biorreatores do tipo tanque agitado, tendo a velocidade de agitação, a temperatura, o pH e a concentração de oxigênio controlados. A utilização deste tipo de biorreator é mais um motivo para o emprego das células CHO, uma vez que apresentam maior robustez e resistência ao cisalhamento em relação às outras linhagens celulares. O modo de fermentação que se emprega no biorreator de produção é a perfusão, com alimentação e extração contínua do meio e retenção parcial de células através de um filtro rotatório. O meio de cultivo utilizado é o HyQ PF-CHO, o qual é livre de proteínas (Bio-Manguinhos, 2005).

A purificação da rHuEPO, presente no sobrenadante retirado dos biorreatores, é feita em sete etapas, no CIM. A primeira etapa é uma cromatografia de afinidade usando a matriz cromatográfica Blue Sepharose Fast Flow e a coluna cromatográfica Isopack 630/500, com objetivo de capturar a rHuEPO e eliminar parcialmente os principais contaminantes do sobrenadante. Nesta cromatografia, as proteínas se unem de forma reversível com o corante Cibacron Blue 3G, o qual foi acoplado covalentemente à matriz Sepharose Fast Flow (Bio-Manguinhos, 2005).

A segunda etapa da purificação é uma cromatografia de exclusão e peneiração molecular usando a matriz Sephadex G-25 e a coluna BPG 450/1000, com o objetivo de trocar o tampão da amostra para a próxima etapa, que é uma cromatografia de afinidade por quelatos metálicos. A terceira etapa, então, é feita com a matriz Chelating Sepharose Fast flow e a coluna BPG 300/500, visando a eliminação total da fração de contaminantes que não foram removidos nas etapas anteriores de purificação. Nessa cromatografia de afinidade, ocorre formação de um complexo metálico entre os íons Cu^{++} e os grupos imidazol da matriz cromatográfica, o qual adsorve reversivelmente os grupos histidina expostos das proteínas (Bio-Manguinhos, 2005).

A quarta etapa é outra cromatografia de exclusão e peneiração molecular usando a matriz Sephadex G-25 e a coluna Quick Scale 200/950, com o objetivo de trocar o tampão da amostra para a próxima etapa, que é uma cromatografia de troca iônica. A quinta etapa da purificação utiliza o gel Q Sepharose Fast Flow e a coluna BPG 100/500, com o objetivo de separar as isoformas da rHuEPO ácidas (biologicamente ativas) das básicas, reter os ácidos nucléicos e concentrar o produto (Bio-Manguinhos, 2005).

A sexta etapa de purificação também é uma cromatografia de exclusão e peneiração molecular, usando a matriz Superdex 200 e a coluna BPG 100/950, com o objetivo de colocar a rHuEPO na solução de formulação. E, por fim, a sétima etapa é uma filtração esterilizante realizada com membranas inertes de 0,2 μm de porosidade, com a finalidade de manter o produto livre de contaminação microbiana até que se submeta ao processo de formulação e ajuste da concentração para a sua forma farmacêutica final (Bio-Manguinhos, 2005).

A união de dois a quatro lotes de produto purificado constitui um lote de Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), o qual deve conter entre 400 e 800 milhões de UI de rHuEPO por lote. Os lotes de IFA são submetidos aos controles de qualidade e, de acordo com o resultado do teste de potência da rHuEPO, o produto é formulado através de uma diluição para obter a concentração final desejada (2.000 UI ou 4.000 UI por mL). Em seguida, o produto formulado final é filtrado em membrana de 0,2 μm e armazenado em um frasco estéril e apirogênico a 4°C até a realização do envase (Bio-Manguinhos, 2005). Um resumo do processo produtivo descrito acima é mostrado na Figura 1.4.

O produto final a granel é envasado em frascos de 1 mL em ambiente classe 100, inspecionados visualmente e etiquetados. O armazenamento do produto é feito em câmara fria (4°C) em uma área de quarentena até a sua liberação pelo Departamento de Controle de Qualidade (Bio-Manguinhos, 2005).

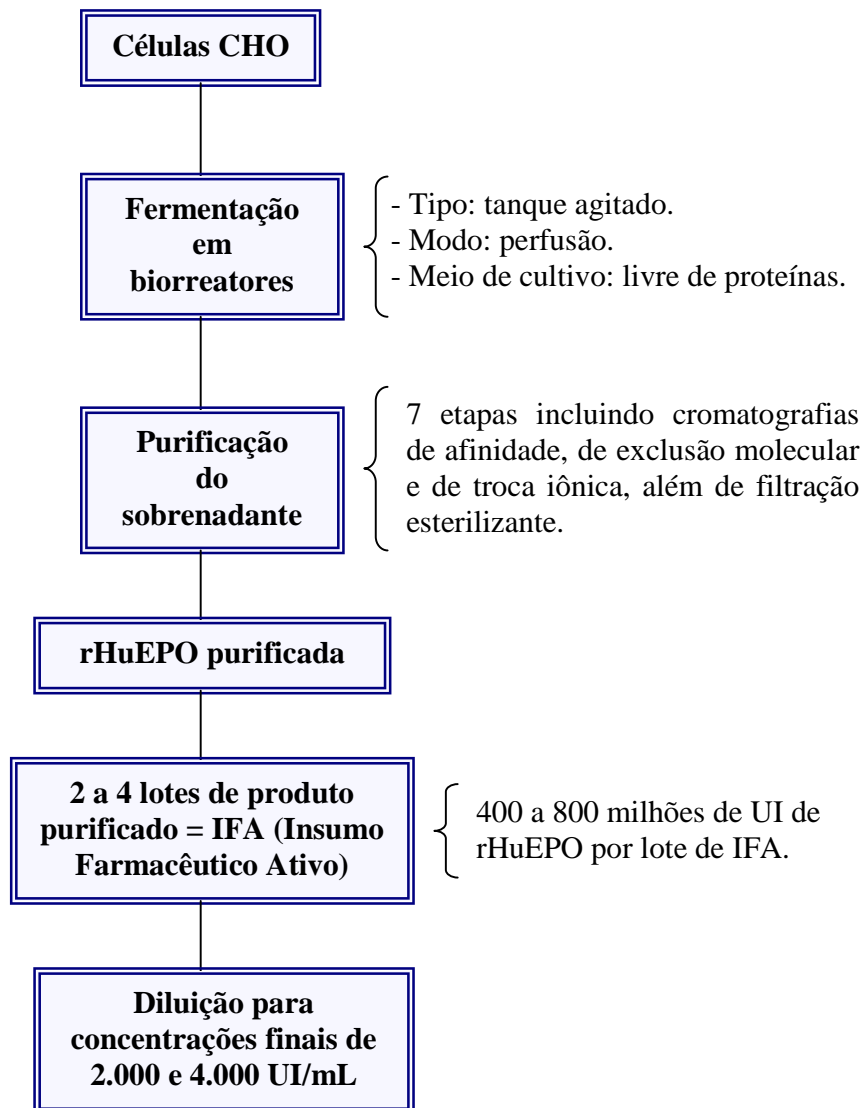


Figura 1.4: Esquema do processo produtivo da rHuEPO empregado no *Centro de Imunología Molecular (CIM)*.

1.3 - O Controle em Processo

O controle em processo dos biofármacos durante as etapas de produção (*upstream*) e purificação (*downstream*) é fundamental para assegurar o bom desempenho dos processos e para garantir que os produtos estejam em conformidade com as especificações exigidas. Para isso, um conjunto de verificações é estabelecido no processo produtivo a fim de monitorá-lo e, se necessário, ajustá-lo. Os ensaios de controle de qualidade são realizados nos subprodutos, gerados em cada etapa de obtenção do produto final, de acordo com as normas de BPF descritas na RDC da Anvisa nº 17/2010 (Brasil, 2010).

A atividade de Controle em Processo é parte das ações de Garantia da Qualidade, inserida na unidade de produção, cujos resultados orientam a tomada de decisão para dar prosseguimento ao processo produtivo. Entende-se o controle de processo como uma ferramenta da qualidade aplicada diretamente na produção dos insumos. Os controles do ambiente e dos equipamentos também podem ser considerados parte integrante do controle em processo, segundo a RDC 17/2010 (Brasil, 2010).

O controle em processo visa atender à demanda analítica em amostras coletadas ao longo do processo produtivo e monitorar os resultados gerados a fim de evidenciar não-conformidades e propor ações corretivas. São atribuições do controle em processo a medição analítica dos princípios ativos e dos reagentes utilizados na produção, com o objetivo de verificar a consistência dos lotes produzidos (WHO, 1992).

No CIM, o Controle em Processo realiza os seguintes ensaios para a preparação de rHuEPO, após as etapas de purificação: determinação da concentração de proteínas pela técnica de espectrofotometria, pureza pelo método de cromatografia em fase reversa, pureza pela análise do conteúdo de dímeros e componentes de alto peso molecular, mapeamento de peptídeos, determinação do conteúdo de ácido siálico, cromatografia fase reversa em super D, identidade mediante eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida e *Western blot*, identidade pela análise de distribuição de isoformas mediante focalização isoeletrica, determinação de DNA contaminante, determinação de proteínas contaminantes, e determinação da concentração de EPO em sobrenadante por ELISA (Bio-Manguinhos, 2005).

Os ensaios físico-químicos fornecem o conhecimento detalhado sobre uma única característica. Desse modo, para uma completa avaliação da proteína, faz-se necessário usar uma combinação destas metodologias, uma vez que estes ensaios não provem informação suficiente separadamente (Bio-Manguinhos, 2005).

Nesta dissertação de mestrado, apenas o ensaio de mapeamento peptídico da rHuEPO foi objeto de estudo, visando a otimização de sua metodologia. No entanto, para a caracterização físico-química da rHuEPO foram utilizadas técnicas eletroforéticas e cromatográficas.

1.4 - Mapeamento Peptídico da rHuEPO

O mapeamento peptídico é uma técnica aplicada no estudo de caracterização físico-química de proteínas e consiste, basicamente, em uma hidrólise enzimática seguida de análise dos fragmentos peptídicos gerados. Esta análise pode ser realizada por Eletroforese em Gel de

Poliacrilamida (PAGE), Eletroforese Capilar (CE), Cromatografia Líquida de Alto Desempenho por fase reversa (HPLC-RP) e Espectrometria de Massa (MS) (Judd, 2002; European Pharmacopoeia, 2007).

O método de mapeamento peptídico mais sensível para identificação de proteínas é aquele acoplado ao espectrômetro de massas, o qual utiliza um banco de dados de seqüências de aminoácidos para identificar a proteína, baseando-se na massa molecular dos peptídeos constituintes (Egelhofer et al., 2002).

O mapa de peptídeos de uma proteína é considerado a sua impressão digital, uma vez que gera um perfil altamente específico para cada proteína. O mapeamento peptídico permite analisar a identidade de uma proteína quando se realiza comparação com algum padrão. No caso da produção de proteínas recombinantes, como a rHuEPO, quando se compara com lotes anteriores do mesmo produto, tal técnica permite determinar a homogeneidade da preparação purificada e a estabilidade da seqüência primária da proteína e, conseqüentemente, a estabilidade genética do organismo produtor (Garnick et al., 1988; Moraes et al., 2008).

O princípio da análise por mapa de peptídeos é bastante simples. Se duas proteínas têm seqüências primárias idênticas, então a clivagem de cada proteína com uma endoproteinase sítio-específica gera fragmentos peptídicos idênticos. Inversamente, se as proteínas a serem comparadas diferem na seqüência primária, então, a clivagem dará origem a peptídeos diferentes. O grau de semelhança nos peptídeos gerados reflete o grau de similaridade na estrutura primária das proteínas comparadas (Deutscher, 1990).

O mapeamento peptídico pode ser separado em três etapas: purificação das proteínas a serem estudadas, hidrólise das proteínas com endoproteinases sítio-específicas e fracionamento dos peptídeos obtidos (Deutscher, 1990).

No contexto da identificação de rHuEPO, a hidrólise enzimática pode ser realizada por enzimas proteolíticas como a tripsina e as endoproteinases Lys-C, Glu-C e Arg-C. Normalmente, a tripsina é escolhida por ter um custo acessível e por apresentar uma especificidade alta em relação ao substrato, catalisando a hidrólise das ligações C-terminais dos resíduos de lisina e arginina. Seu centro ativo é um sítio aniônico constituído da tríade catalítica His57, Ser195 e Asp102, ao qual ligam-se substratos ou inibidores hidrofóbicos. A clivagem ocorre mais lentamente quando há um resíduo ácido (aspartil e/ou glutamyl) vicinal ao resíduo de lisina ou arginina, devido ao efeito de repulsão em relação ao centro ácido da tripsina, e não ocorre quando o resíduo de lisina ou arginina está ligado a uma prolina ou hidroxiprolina (Oliveira et al., 1993;

Stone & Williams, 2002a). As endoproteínases Lys-C, Glu-C e Arg-C clivam as proteínas apenas no C-terminal dos resíduos de lisina, ácido glutâmico e arginina, respectivamente. Sendo assim, essas enzimas geram um número menor de peptídeos da rHuEPO em comparação com a tripsina.

Após a digestão enzimática da proteína, utiliza-se a HPLC-RP para fracionar os peptídeos gerados. A capacidade da cromatografia líquida de fase reversa para resolver misturas complexas de peptídeos em um curto período de tempo torna esse método a escolha para o fracionamento do hidrolisado protéico. Além disso, a precisão desta técnica permite uma rigorosa comparação da estrutura primária, com a vantagem de que os peptídeos podem ser recuperados para análises adicionais (Stone & Williams, 2002b; Judd, 2002).

Normalmente, os peptídeos que possuem menos de 30 resíduos de aminoácidos são separados com base em seu conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e as suas posições relativas de eluição podem ser previstas com razoável precisão a partir dos coeficientes de retenção publicados. Considerando que as proteínas muitas vezes mantêm algum grau de enovelamento nas condições utilizadas para a cromatografia de fase reversa, o parâmetro mais relevante, neste caso, é a hidrofobicidade superficial, e não, a total. Embora os peptídeos maiores e as proteínas possam ser separados em cromatografia líquida de fase reversa, às vezes, sua forte ligação, cinética lenta de liberação da matriz, propensão para agregar e relativa insolubilidade na fase móvel habitual (ácido trifluoroacético em acetonitrila) resultam em picos largos e/ou aparecimento do pico em sucessivas corridas cromatográficas. Esses problemas, raramente, são vistos com peptídeos com menos do que 30 resíduos de comprimento (Stone & Williams, 2002b).

O número de frações observadas no mapa peptídico da rHuEPO pode variar devido a diferenças nas condições de hidrólise enzimática ou na estrutura tridimensional da proteína nativa. As frações cromatográficas da rHuEPO são classificadas em dois padrões, peptídeos não-glicosilados e peptídeos glicosilados. Os peptídeos não-glicosilados apresentam picos estreitos, enquanto os peptídeos glicosilados geram picos largos e não-gaussianos (Choi et al., 1996).

A cromatografia de fase reversa apresenta excelente reprodutibilidade, o que possibilita o uso do mapeamento peptídico comparativo para detecção de pequenas alterações entre proteínas idênticas, como mutações pontuais e sítios de modificação química e pós-traducional (Stone & Williams, 2002b). O mapeamento peptídico é capaz de detectar pequenas diferenças entre proteínas em um ou vários aminoácidos, porém a detecção efetiva dependerá de quanto tais variações são capazes de alterar o perfil peptídico (Moraes et al., 2008). A heterogeneidade glicídica da rHuEPO pode gerar diferenças no mapa peptídico desta glicoproteína, já que a

presença ou ausência de um glicídeo pode afetar o tempo de retenção do peptídeo que possuir cadeia glicídica (Dionex Corporation, 1994).

O mapeamento peptídico é um dos mais importantes ensaios feitos pelo Controle de Processo da produção de rHuEPO, pois permite analisar a integridade da estrutura primária dessa glicoproteína, ao final de cada etapa de produção. Após a nacionalização da produção de rHuEPO em Bio-Manguinhos, o mapeamento peptídico será aplicado no controle de processo para liberação do produto intermediário, chamando de Insumo (ou ingrediente) Farmacêutico Ativo (IFA). Entretanto, a metodologia utilizada no CIM dispende um tempo longo para ser aplicada como um ensaio para controle em processo, levando cerca de seis horas para obtenção do mapa peptídico da rHuEPO. Tal metodologia pode ser otimizada, em relação ao tempo de análise, tanto na parte da hidrólise enzimática quanto no fracionamento dos peptídeos.

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia de mapeamento peptídico para a Eritropoetina Humana Recombinante (rHuEPO), visando o controle de processo do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) deste biofármaco na produção em Bio-Manguinhos.

2.2 - Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização físico-química da rHuEPO oriunda do *Centro de Inmunología Molecular*;
- Estabelecer as condições reacionais mais adequadas de hidrólise enzimática das amostras de rHuEPO;
- Determinar as melhores condições cromatográficas de fracionamento dos peptídeos da rHuEPO, utilizando cromatografia líquida de fase reversa em coluna C18;
- Analisar as principais frações peptídicas da cromatografia de fase reversa do hidrolisado trípico da rHuEPO por espectrometria de massa;
- Avaliar a metodologia desenvolvida através do parâmetro de validação Especificidade, pertinente aos testes de identificação.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) da Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos)/FIOCRUZ.

Para todos os experimentos realizados neste trabalho, foram utilizados reagentes químicos com grau de pureza analítico ou para HPLC e água oriunda do sistema Milli-Q[®].

3.1 - Obtenção da amostra de rHuEPO

A amostra de insumo farmacêutico ativo (IFA) da rHuEPO (Lote 3342/P1001) utilizada para a realização deste trabalho, juntamente com o seu certificado de qualidade, foi cedida pelo *Centro de Immunología Molecular (CIM)*, situado em Havana, Cuba. A solução do IFA de rHuEPO apresentava a seguinte composição nominal: rHuEPO 1,267mg/mL, NaCl 100mM, citrato de sódio 20mM, ácido cítrico 0,36mM e Tween 20 a 0,02%, com pH 6,9.

3.2 - Avaliação da homogeneidade protéica da amostra de rHuEPO

3.2.1 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

A análise da homogeneidade protéica das amostras de IFA da rHuEPO foi feita através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, utilizando o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, na sigla em inglês), conforme descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de poliacrilamida com concentração de 12% (*stacking gel* de 4%), em um sistema de eletroforese vertical Mini-Protean III (Bio-Rad Laboratories), com espaçadores de 0,75cm de espessura.

As massas crescentes de rHuEPO, variando de 1 µg a 16 µg de proteína total, e a mistura de padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad Laboratories), cujas proteínas são miosina (192.775 Da), β-galactosidase (117.905 Da), albumina de soro bovino (99.261 Da),

ovalbumina (54.145 Da), anidrase carbônica (37.783 Da), inibidor de tripsina de soja (29.460 Da), lisozima (20.198 Da) e aprotinina (7.441 Da), foram aplicadas na eletroforese.

A corrida eletroforética foi realizada com corrente constante de 20 mA, voltagem de 200 V e duração de 60 minutos.

O gel foi revelado com solução aquosa do corante de Coomassie Blue R350 (PhastGel Blue R, GE Healthcare) 0,1% em metanol 30% e ácido acético 10%. Após uma hora no corante, o gel foi descorado por meio de lavagens sucessivas com solução aquosa de metanol 30% e ácido acético 10%. Em seguida, o gel foi digitalizado e a imagem obtida foi analisada pelo programa ImageMaster[®] (GE Healthcare).

3.2.2 - Cromatografia de fase reversa em coluna C4

Os ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa utilizando uma coluna C4 (HPLC-RP-C4, na sigla em inglês) foram realizados de acordo com Lindsay (1997) e Conceição (2003). Foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência Äkta 10 purifier (GE Healthcare) com uma coluna Delta Pak C4 3,9x150mm 5 μ 300Å (Waters).

O sistema de eluição foi gradiente binário, com ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água milli-Q como eluente A e acetonitrila 80% com TFA 0,08% como eluente B. O gradiente utilizado foi 1 volume de coluna (VC; 1,79 mL) em 0% do eluente B, 8,5 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 2 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B (reequilíbrio).

Foram utilizados o fluxo de trabalho de 0,5 mL/min e o volume de injeção de 100 μ L. As detecções no ultravioleta foram feitas a 220 nm e 280 nm.

A amostra de rHuEPO foi preparada com adição de 30 μ L de solução de TFA 1% a 270 μ L de solução de IFA da rHuEPO 1,227 mg/mL. A concentração final da solução de rHuEPO com TFA 0,1% foi 1,1 mg/mL. O pH da solução contendo a amostra foi testado com fitas de leitura de pH (Macherey-Nagel) para confirmar a acidez do meio.

Os picos cromatográficos do ensaio foram coletados e submetidos a SDS-PAGE, que foi realizada segundo Laemmli (1970) e Wyckoff et al (1977), e seguindo as recomendações do manual do equipamento PhastSystem[®] (Pharmacia Biotech, 1990). Foi utilizado um gel pronto deste sistema com gradiente de concentração 8-25%.

A mistura de padrões de peso molecular Prestained Broad Range[®], a solução original da rHuEPO (solução-mãe), a fração do pico 1 (tubo 4) e a fração do pico 2 (tubo 9) foram aplicados

no gel com o pente de aplicação para 6 amostras, cujo volume de aplicação é 4 μ L. A corrida eletroforética foi realizada no PhastSystem[®] com corrente constante de 10 mA, voltagem de 250 V e duração de 30 minutos.

O gel desta eletroforese foi revelado com nitrato de prata, de acordo com o Método *Color Prata* (Silva Junior, 2001), e digitalizado. A imagem obtida do gel foi analisada pelo programa ImageMaster[®].

3.3 - Caracterização físico-química da rHuEPO

As técnicas descritas a seguir tiveram a finalidade de estimar alguns parâmetros físico-químicos da eritropoetina humana recombinante (rHuEPO) e de avaliar a homogeneidade da amostra de IFA da rHuEPO.

3.3.1 - Quantificação protéica da amostra de rHuEPO

Para a estimativa da concentração de proteínas da amostra de IFA da rHuEPO, foram utilizados o método de Folin-Lowry modificado e o método espectrofotométrico de absorção a 280 nm, o qual é utilizado no *Centro de Inmunología Molecular* (Peterson, 1983; Waterborg, 2002; Ahmed, 2005).

Método de Folin-Lowry modificado

A quantificação protéica pelo método de Folin-Lowry modificado foi feita de acordo com Peterson (1983) e Waterborg (2002), utilizando a albumina de soro bovino (BSA, na sigla em inglês) como padrão protéico para a construção da curva de calibração. As soluções de BSA nas concentrações de 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL e a amostra de rHuEPO foram lidas em triplicatas. O branco foi feito com água Milli-Q.

O *kit* de reagentes *DC Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories) foi usado para as reações de quantificação protéica, tendo uma solução tampão de tartarato de cobre como o reagente A e o reagente de Folin diluído 1:1 (v/v) em água como o reagente B. Para cada amostra (25 μ L), utilizou-se 125 μ L do reagente A e 1 mL do reagente B. Após 15 minutos de reação, as amostras

tiveram suas absorvâncias determinadas a 750 nm em cubeta de quartzo de 1 cm no espectrofotômetro DU[®] 730 UV/VIS (Beckman Coulter).

Método espectrofotométrico de absorção a 280 nm

A leitura da absorvância a 280 nm da amostra de IFA da rHuEPO foi realizada no espectrofotômetro DU[®] 730 UV/VIS, usando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de espessura e água Milli-Q como branco. A partir do valor de absorvância, estimou-se a concentração da solução, em mg/mL, usando o coeficiente de extinção a 280 nm (ϵ_{280}) de $0,7435 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$, determinado pelo *Centro de Inmunología Molecular* (CIM, 2007), segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Concentração protéica (mg/mL)} = \text{Abs}_{280} / 0,7435$$

O uso desta fórmula é possível quando o caminho óptico (l) for igual a 1 cm, sendo obtida da fórmula original de absorvância: $\text{Abs}_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$, onde C é a concentração do analito (Ahmed, 2005).

3.3.2 - Determinação do peso molecular da rHuEPO

Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

O peso molecular (PM) da rHuEPO foi estimado a partir da mobilidade eletroforética observada da glicoproteína por SDS-PAGE, utilizando um gel pronto do PhastSystem[®] com gradiente de concentração 8-25% (Laemmli, 1970; Wyckoff et al., 1977; Pharmacia Biotech, 1990).

Foram aplicadas na eletroforese a mistura de padrões protéicos de peso molecular Prestained Broad Range[®] e a solução dessalinizada de rHuEPO 1 mg/mL em triplicata, com o pente de aplicação de 4 μL para 6 amostras. A corrida eletroforética foi realizada no PhastSystem[®] com corrente constante de 10 mA, voltagem de 250 V e duração de 30 minutos.

O gel, após a eletroforese, foi revelado com o corante Coomassie Blue R350, conforme procedimento previamente descrito, digitalizado e analisado pelo programa ImageMaster[®].

Espectrometria de massa

A solução dessalinizada de rHuEPO foi analisada por espectrometria de massa, usando o espectrômetro de massa AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems), no Laboratório de Toxinologia do IOC e mantido pelo Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde (PDTIS/FIOCRUZ) e Rede Proteômica do Rio de Janeiro. A fonte de ionização foi do tipo MALDI (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*).

As amostras foram levadas à secura sob vácuo no SpeedVac (Savant), por duas horas, sem aplicação de temperatura. Depois, foram ressuspensas com 2,0 µL de solução de acetonitrila 50% e TFA 0,1% e centrifugada. Na placa modelo 28571, foram aplicados 0,3 µL de amostra e 0,3 µL da matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) sobre a amostra. Para a obtenção da massa molecular da rHuEPO, o espectro de massa obtido foi gerado em modo linear.

3.3.3 - Determinação do ponto isoelétrico da rHuEPO

Focalização isoelétrica

O ponto isoelétrico (pI) da rHuEPO foi estimado por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE, na sigla em inglês), conforme Vesterberg (1969) e Phamacia Biotech (1990). Foi utilizado um gel de poliacrilamida pronto do PhastSystem®, usando-se um gradiente com faixa de pH 3 a 9.

Foi utilizada a mistura de padrões de pI 3 a 10 Broad (GE Healthcare), cujas proteínas são amiloglicosidase (3,50), inibidor de tripsina de soja (4,55), β-lactoglobulina A (5,20), anidrase carbônica B bovina (5,85), anidrase carbônica B humana (6,55), mioglobina ácida de cavalo (6,85), mioglobina básica de cavalo (7,35), lectina ácida de lentilha (8,15), lectina intermediária de lentilha (8,45), lectina básica de lentilha (8,65) e tripsinogênio (9,30). A solução dessalinizada de rHuEPO na concentração de 1,5 mg/mL foi aplicada no gel em duplicata, com o pente de aplicação de 4 µL para 6 amostras.

A corrida eletroforética foi realizada no PhastSystem® com corrente constante de 2,5 mA, voltagem de 2.000 V e duração de 30 minutos.

A revelação do gel foi feita com o reagente de nitrato de prata (Merck Chemicals), de acordo com o protocolo *Sensitive silver staining* do PhastSystem® (Phamacia Biotech, 1990). O gel revelado foi digitalizado e a imagem obtida foi analisada pelo programa ImageMaster®.

Cromatofocalização

O pI da rHuEPO foi estimado também por cromatofocalização, de acordo com Deutscher (1990), no cromatógrafo líquido de alta eficiência Äkta 10 *purifier*, utilizando a coluna Mono-P HR 20/5 5x200mm (GE Healthcare).

O sistema de eluição foi gradiente binário, com solução de imidazol 25 mM pH 7,0 como eluente A e solução Polybuffer 74 (GE Healthcare) 1:20 em água Milli-Q pH 3,0 como eluente B. O gradiente empregado foi 5 volume de coluna (VC) com o eluente A (para equilibrar a coluna) e 20 VC com o eluente B. O fluxo de trabalho foi 1,0 mL/min, o volume de injeção foi 100 µL e a detecção foi no ultravioleta a 280 nm.

Antes da solução dessalinizada da rHuEPO 0,5 mg/mL, uma solução de padrões de pI 2,5 a 6,5 (GE Healthcare) foi injetada, utilizando o mesmo gradiente, a fim de avaliar o gradiente de pH. As proteínas padrão para pI foram pepsinogênio (2,80), amiloglicosidase (3,50), vermelho de metila (3,75), glicose oxidase (4,15), inibidor de tripsina de soja (4,55), β-lactoglobulina A (5,20), anidrase carbônica B bovina (5,85) e anidrase carbônica B humana (6,55). As cromatofocalizações foram feitas em duplicata.

A coluna cromatográfica foi regenerada com três injeções consecutivas de 1 mL da solução de NaCl 2 M, a fim de deslocar anfólitos que tenham ficado adsorvidos na coluna mono P, aumentando o pH.

3.3.4 - Determinação da mobilidade eletroforética da rHuEPO

A mobilidade eletroforética relativa (Rf) da rHuEPO foi estimada por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida (NATIVE-PAGE, na sigla em inglês), utilizando um gel pronto do PhastSystem[®] com gradiente de concentração 8-25% (Pharmacia Biotech, 1990).

Foram aplicadas soluções de rHuEPO em concentrações decrescentes, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL, com o pente de aplicação de 4 µL para 6 amostras. A corrida eletroforética foi realizada no PhastSystem[®] com corrente constante de 10 mA, voltagem de 400 V e duração de 30 minutos.

O gel foi revelado com o corante Coomassie Blue R350, conforme procedimento já descrito, digitalizado e analisado pelo programa ImageMaster[®].

3.4 - Padronização da hidrólise enzimática da rHuEPO

3.4.1 – Obtenção dos peptídeos trípticos teóricos da rHuEPO

Para a estimativa dos possíveis peptídeos gerados na hidrólise tríptica da rHuEPO, utilizou-se o programa PeptideCutter[®] (ExPASy Proteomics Server, 2010; Gasteiger et al., 2005), que realiza simulações de hidrólises enzimáticas. O número de peptídeos teóricos gerados na hidrólise do substrato EPO pela enzima tripsina e as suas seqüências de aminoácidos foram fornecidos pelo referido programa. A seqüência primária da eritropoetina humana foi obtida no banco de dados *Protein Brookhaven* ligado ao ExPaSy, identificado por *EPO_HUMAN* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Seqüência primária da Eritropoetina Humana, obtida pelo programa PeptideCutter[®].

Nome da Proteína	Eritropoetina Humana
Seqüência Primária (166 aminoácidos)	A ¹ PPRLICDSR ¹⁰ VLERYLLEAK ²⁰ EAENITTGCA ³⁰ EHCSLN ENIT ⁴⁰ VPDTKVNIFYA ⁵⁰ WKRMEVGGQA ⁶⁰ VEVWQGLALL ⁷⁰ SEAVLRGQAL ⁸⁰ LVNSSQPWEP ⁹⁰ LQLHVDKAVS ¹⁰⁰ GLRSLT TLLR ¹¹⁰ ALGAQKEAIS ¹²⁰ PPDAASAAPL ¹³⁰ RTITADTFRK ¹⁴⁰ LFRVYSNFLR ¹⁵⁰ GKLKLYTGEA ¹⁶⁰ CRTGDR ¹⁶⁶

3.4.2 - Avaliação da atividade enzimática da tripsina

A tripsina utilizada para hidrolisar a rHuEPO, neste projeto, foi a *Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade* (Promega, L: 306283), a qual é uma tripsina de origem suína modificada por metilação redutiva, para minimizar a autólise, e adicionada de TPCK (*tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone*), para inativar a quimotripsina. Segundo o fabricante da enzima (Promega), a enzima reconstituída com ácido acético 50 mM é estável por 30 dias, se armazenada a -20°C.

Uma solução de tripsina foi preparada com a adição de 500 µL de solução de ácido acético 50 mM no frasco contendo 100 µg da enzima liofilizada. A atividade enzimática da tripsina foi avaliada com a solução recém-preparada e após 30 dias de armazenamento a -20°C. A avaliação da atividade da enzima foi feita através do grau de hidrólise, tendo a proteína BSA

como substrato. As condições de hidrólise foram relação tripsina/BSA de 1/50 (p/p), concentração de substrato igual a 1,0 mg/mL e incubação de 1 hora a 37°C.

Para a digestão enzimática, foram adicionados 10 µL da solução de tripsina 0,2 mg/mL (recém-preparada e com 30 dias) a 100 µL de solução de BSA 1 mg/mL. A incubação foi realizada no banho-maria MultiTemp III (GE Healthcare). A reação de hidrólise foi interrompida com adição de 100 µL de solução de TFA 1%.

Foi feita uma solução de BSA com tripsina sem incubação, nomeada de tempo zero (t_0), para servir como referência. No caso, a solução de TFA 1% (100 µL) foi adicionada imediatamente após a adição da solução de tripsina (10 µL).

O grau de hidrólise da BSA pela tripsina foi estabelecido através da área do pico referente a BSA, no tempo zero (t_0) e após 1 hora de hidrólise (t_{1h}), obtido na cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa utilizando uma coluna C18 (HPLC-RP-C18, na sigla em inglês).

Os ensaios de HPLC-RP-C18 foram realizados de acordo com Lindsay (1997). O cromatógrafo líquido de alta eficiência Äkta 10 *purifier* foi utilizado com a coluna Hi-Pore[®] RP-318 250 mm x 4.6 mm (Bio-Rad Laboratories).

O sistema de eluição foi gradiente binário, com TFA 0,1% como eluente A e acetonitrila 80% com TFA 0,08% como eluente B. O gradiente empregado foi 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B (reequilíbrio). O fluxo de eluição foi 0,8 mL/min, o volume de injeção foi 100 µL e a detecção no ultravioleta foi feita a 220 nm. Neste ensaio, todas as amostras foram avaliadas em triplicatas.

3.4.3 - Preparação das amostras de rHuEPO para a hidrólise trípica

A solução de IFA da rHuEPO foi dessalinizada por cromatografia de exclusão e peneiração molecular, utilizando a coluna HiTrap[™] Desalting Sephadex G25 5mL (GE Healthcare) em HPLC Äkta 100 *purifier* (Amersham Pharmacia Biotech, 1998).

O eluente utilizado foi água Milli-Q, com fluxo de 5 mL/min usando-se 3 volumes de coluna para eluição. O volume de injeção foi de 2,0 mL em cada corrida cromatográfica realizada. As frações cromatográficas em que o pico da rHuEPO eluiu foram reunidos.

A estimativa da concentração de rHuEPO na solução final dessalinizada foi realizada através do método espectrofotométrico de absorção a 280 nm, conforme descrito no item 3.3.1.

Alíquotas equivalentes a 50 µg de rHuEPO foram preparadas e levadas à secura sob vácuo no SpeedVac (Savant) por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, as alíquotas foram armazenadas em geladeira (4-8°C).

3.4.4 - Determinação do tempo de hidrólise

A hidrólise enzimática da rHuEPO foi feita com a enzima tripsina (Promega, *Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade*, L: 306283), numa relação enzima/substrato (E/S) de 1/50 (p/p) e concentração do substrato rHuEPO de 1 mg/mL (European Pharmacopoeia, 2007).

A tripsina liofilizada (100 µg) foi solubilizada em 500 µL de solução de ácido acético 50 mM, a qual é indicada pelo fabricante, produzindo uma solução de tripsina 0,2 mg/mL. As alíquotas secas de 50 µg de rHuEPO foram ressuspensas com 50 µL da solução tampão de hidrólise Tris-HCl 100mM, pH 8,5 (1 mg/mL de rHuEPO).

Para a reação hidrolítica, foram adicionados 5 µL da solução de tripsina 0,2 mg/mL aos 50 µL de solução de rHuEPO 1 mg/mL. A incubação foi realizada no banho-maria MultiTemp III a 37°C por diferentes períodos de tempo. Foram testados os tempos de 0 minuto (branco), 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1 hora e 30 minutos, 2 horas, 3 horas e 24 horas, a fim de determinar o menor tempo de incubação que gera um perfil peptídico adequado. Foram feitas triplicatas para cada tempo de incubação. A reação de hidrólise foi interrompida com adição de 50 µL de solução de TFA 10% (CIM, 2008; Stone & Williams, 2002a).

Uma solução de rHuEPO com tripsina sem incubação, nomeada de tempo zero (t_0), foi feita para obtenção da área do pico da rHuEPO equivalente a 100% da glicoproteína. No caso, a solução de TFA 10% (50 µL) foi adicionada antes da adição da solução de tripsina (5 µL).

A eficiência da hidrólise trípica foi avaliada pelo perfil peptídico observado através da cromatografia de fase reversa em coluna C18 (HPLC-RP-C18) dos hidrolisados da rHuEPO. Foram considerados os seguintes parâmetros: o grau de hidrólise atingido (porcentagem de proteína hidrolisada) e número de picos cromatográficos gerados. Através das áreas dos picos referentes à rHuEPO observada para os hidrolisados, a porcentagem de rHuEPO consumida pela tripsina foi calculada.

Os ensaios de HPLC-RP-C18 foram realizados de acordo com Lindsay (1997), utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência Äkta 10 purifier (GE Healthcare) com a coluna Hi-Pore® RP-318 250 mm x 4.6 mm (Bio-Rad Laboratories). O sistema de eluição foi um gradiente

binário, com TFA 0,1% como eluente A e acetonitrila 80% com TFA 0,08% como eluente B. O gradiente empregado foi 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B (reequilíbrio).

Foram utilizados o fluxo de trabalho de 0,8 mL/min, o volume de injeção de 100 μ L e a detecção no ultravioleta a 220 nm. Como o volume final das soluções de hidrólise foi 105 μ L (50 μ L de solução de rHuEPO + 5 μ L da solução de tripsina + 50 μ L de solução de TFA 1%) e as injeções de amostra no HPLC foram feitas manualmente com seringa Hamilton de 250 μ L, as amostras tiveram que ser diluídas 1,3 vezes, através da adição de 31,5 μ L de água Milli-Q, para que o volume fosse suficiente para injetar 100 μ L.

3.4.5 - Determinação da relação enzima/substrato

Para a determinação da menor quantidade de tripsina que geraria um grau de hidrólise satisfatório (mais de 99% de rHuEPO hidrolisada), a hidrólise enzimática da rHuEPO foi feita conforme descrito no item 3.4.4. No entanto, neste ensaio, o tempo de incubação foi fixado em 1 hora e a relação enzima/substrato (E/S) variou. As relações tripsina/rHuEPO usadas foram 1/50 (p/p), 1/75 (p/p), 1/100 (p/p) e 1/125 (p/p). As amostras foram feitas em triplicatas para cada relação E/S testada, conforme indicado na Tabela 3.2.

Foi feita uma solução de rHuEPO com tripsina sem incubação (t_0), em triplicata, para cada relação E/S usada. Para esta amostra, a solução de TFA 10% (50 μ L) foi adicionada imediatamente após a adição da solução de tripsina (5 μ L).

Tabela 3.2: Composição das amostras do ensaio de determinação da relação enzima/substrato adequada para a hidrólise triptica da rHuEPO.

Sol. rHuEPO 1 mg/mL	Sol. Tripsina 0,2 mg/mL	Relação Tripsina/rHuEPO (p/p)
50 μ L (\equiv 50 μ g)	5 μ L (\equiv 1 μ g)	1/50
50 μ L (\equiv 50 μ g)	3,35 μ L (\equiv 0,67 μ g)	1/75
50 μ L (\equiv 50 μ g)	2,5 μ L (\equiv 0,5 μ g)	1/100
50 μ L (\equiv 50 μ g)	2 μ L (\equiv 0,4 μ g)	1/125

A eficiência da hidrólise trípica foi avaliada pelo perfil peptídico observado através da cromatografia de fase reversa em coluna C18 dos hidrolisados da rHuEPO. Foram considerados os parâmetros grau de hidrólise atingido e número de peptídeos ou picos gerados. Os ensaios de HPLC-RP-C18 foram realizados conforme descrito no item 3.4.4.

3.4.6 - Avaliação do uso das endoproteinas Arg-C e Lys-C

Um estudo comparativo da hidrólise enzimática foi feito utilizando outras enzimas sítio-específicas para clivar as ligações peptídicas da rHuEPO. As endoproteinas Arg-C (Roche) e Lys-C (Roche) foram utilizadas na hidrólise virtual da rHuEPO feita pelo programa PeptideCutter[®] (ExPASy Proteomics Server), para avaliar a viabilidade do emprego dessas enzimas na obtenção de um mapa peptídico da rHuEPO. Este programa forneceu o número de peptídeos produzidos e as suas sequências de aminoácidos.

Para a hidrólise enzimática utilizando a endoproteinase Arg-C, a enzima seca (5 µg) foi solubilizada em 25 µL de água Milli-Q, diluente indicado pelo fabricante (Roche Applied Science, 2011a), produzindo uma solução da endoproteinase Arg-C 0,2 mg/mL. O liofilizado da solução de ativação, que acompanha esta enzima, foi feita com adição de 100 µL do tampão de hidrólise Tris-HCl 100mM pH 8,5, resultando em uma concentração final de 50 mM de DTT e 5mM de EDTA. As alíquotas secas de 50 µg de rHuEPO foram ressuspensas com 30 µL da solução tampão de hidrólise Tris-HCl 100mM com pH 8,5 e 20 µL da solução de ativação, produzindo uma solução com concentração de 1 mg/mL de rHuEPO. Para a reação hidrolítica, foram adicionados 5 µL da solução de Arg-C 0,2 mg/mL aos 50 µL da solução de rHuEPO 1 mg/mL contendo solução de ativação (relação E/S igual a 1/50 p/p).

Para a hidrólise enzimática com a endoproteinase Lys-C, a enzima seca (5 µg) foi solubilizada em 25 µL de água Milli-Q, diluente indicado pelo fabricante (Roche Applied Science, 2011b), produzindo uma solução de Lys-C 0,2 mg/mL. As alíquotas secas de 50 µg de rHuEPO foram ressuspensas com 50 µL da solução tampão de hidrólise Tris-HCl 100mM com pH 8,5, produzindo uma solução com concentração de 1 mg/mL de rHuEPO. Para a reação hidrolítica, foram adicionados 5 µL da solução de Lys-C 0,2 mg/mL aos 50 µL desta solução de rHuEPO 1 mg/mL (relação E/S igual a 1/50).

A incubação de ambas hidrólises foi realizada no banho-maria MultiTemp III a 37°C por 1 hora. Foram feitas triplicatas para cada enzima. As reações de hidrólise foram interrompidas pela adição de 50 µL de solução de TFA 10% (Stone & Williams, 2002a; CIM, 2008).

A eficiência da hidrólise com as endoproteinases Arg-C e Lys-C foi avaliada pelo perfil peptídico observado através da cromatografia de fase reversa em coluna C18 dos hidrolisados da rHuEPO. Foram considerados os seguintes parâmetros: o grau de hidrólise atingido (porcentagem de proteína hidrolisada) e resolução dos picos cromatográficos. Os ensaios de HPLC-RP-C18 foram realizados conforme descrito no item 3.4.4.

3.5 – Otimização da cromatografia de fase reversa dos peptídeos trípticos da rHuEPO

3.5.1 - Avaliação do gradiente cromatográfico de eluição

As amostras peptídicas produzidas pela ação da tripsina foram resolvidas e fracionadas por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Judd, 2002; Silva Junior, 2004; European Pharmacopoeia, 2007). Foram empregados diferentes gradientes de eluição, com a finalidade de se determinar a melhor condição cromatográfica para obtenção do mapa peptídico, levando em conta a resolução cromatográfica e o tempo despendido.

Os ensaios de HPLC-RP-C18 foram realizados de acordo com Lindsay (1997), no cromatógrafo líquido de alta eficiência Äkta 10 *purifier* com a coluna Hi-Pore[®] RP-318.

O sistema de eluição foi gradiente binário, com TFA 0,1% como eluente A e acetonitrila 80% com TFA 0,08% como eluente B. Os gradientes que foram empregados são mostrados na Tabela 3.3. O fluxo de trabalho foi 0,80 mL/min, com exceção do gradiente 4, o qual empregou fluxo de 0,75 mL/min para simular o gradiente usado no *Centro de Inmunología Molecular*. O volume de injeção foi de 100 µL e a detecção foi feita no ultravioleta a 220 nm.

Para testar os gradientes propostos, foram injetadas amostras do hidrolisado tríptico da rHuEPO, na relação E/S de 1/50 (p/p) e com 1 hora de incubação, com o objetivo de verificar qual gradiente proporciona um perfil peptídico com a melhor resolução e no menor tempo.

Tabela 3.3- Gradientes de eluição utilizados no fracionamento dos peptídeos trípticos por HPLC-RP-C18.

Gradiente 1	1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B (equilíbrio da coluna), 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B (reequilíbrio)
Gradiente 2	1 VC em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente 0 a 55% de B, 0,5 VC em gradiente 55 a 70% de B, 1,5 VC em gradiente 70 a 85% de B, 0,5 VC em gradiente 85 a 100% de B, 0,5 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B
Gradiente 3	1 VC em 0% do eluente B, 10 VC em gradiente linear de 0 a 50% de B, 1,5 VC em gradiente linear de 50 a 100% de B, 0,5 VC em 100% de B e 1,5 VC em 0% de B
Gradiente 4	1,55 VC em 0% de B, 20,77 VC em gradiente 0 a 61% de B, 1,81 VC em gradiente 61 a 83% de B, 2,41 VC em gradiente 83 a 100% de B, 1,21 VC em gradiente 100 a 0% de B e 1,81 VC em 0% de B

3.5.2 - Avaliação da coluna cromatográfica de fase reversa C18

A fim de se obter o perfil cromatográfico dos peptídeos mais adequado para o mapa peptídico, outras colunas de fase reversa C18 foram testadas, além da Hi-Pore[®] RP-318 4.6 x 250 mm (Bio-Rad Laboratories). Foram utilizadas as colunas PepMap C18 2,1 x 100 mm (PerSeptive Biosystems), Delta Pak C18 3,9 x 150 mm (Waters) e Vydac 218TP C18 4,6 x 100 mm (Grace). Todas as colunas possuem tamanho de partícula igual a 5 μ .

Com a coluna PepMap C18, foram utilizados dois gradientes. O primeiro foi 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 5 VC em 0% de B (reequilíbrio). O segundo gradiente diferiu no gradiente linear de 0 a 100% de B que foi feito em 14 VC. Para eluição desta coluna usou-se o fluxo máximo de 0,2 mL/min.

Com a coluna Delta Pak C18, foi empregado o gradiente de 1 VC em 0% do eluente B, 14 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B (reequilíbrio), e o fluxo de trabalho de 0,8 mL/min.

Para a coluna Vydac 218TP C18, foram feitos dois gradientes. O primeiro foi 1 VC em 0% do eluente B, 14 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B (reequilíbrio). O segundo gradiente diferiu no gradiente linear de 0 a 100% de B que foi feito em 20 VC. O fluxo de trabalho usado foi 0,8 mL/min.

O volume de injeção foi de 100 µL e a detecção foi feita no ultravioleta a 220 nm, para todas as corridas cromatográficas realizadas nesse ensaio.

Visando verificar qual coluna de cromatografia de fase reversa forneceu a melhor resolução do mapa peptídico da rHuEPO, foram injetadas amostras referentes ao hidrolisado tríptico da rHuEPO na relação E/S de 1/50 (p/p) e com 1 hora de incubação, em triplicatas.

3.6 - Análise dos peptídeos trípticos da rHuEPO por espectrometria de massa

As quatro principais frações cromatográficas da fase reversa do hidrolisado tríptico da rHuEPO foram analisados por espectrometria de massa, usando o espectrômetro de massa AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems). A fonte de ionização foi do tipo MALDI (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*).

As amostras peptídicas dessalinizadas foram levadas à secura sob vácuo no SpeedVac (Savant), por duas horas, em temperatura ambiente. Em seguida, foram ressuspensas em 1,5 µL da solução de Acetonitrila 50% e TFA 0,1% e centrifugadas. Na placa modelo 28571, foram aplicados 0,3 µL de amostra e 0,3 µL da matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) sobre cada amostra. As amostras analisadas foram as frações cromatográficas referentes aos picos 6+7+8, pico 9, picos 10+11 e pico 12.

Os espectros de massa foram gerados em modo refletido e os resultados do tipo MS/MS foram analisados no programa *Mascot Search Results* (Matrix Science), função *MS/MS Ion Search*, com a finalidade de confirmar a identidade da proteína trabalhada.

3.7 - Especificidade da metodologia desenvolvida

A técnica desenvolvida para o mapeamento peptídico de rHuEPO por RP-HPLC foi avaliada quanto a sua especificidade, de acordo com a metodologia descrita na resolução RE da Anvisa nº 899/2003 (Brasil, 2003). Segundo esta resolução, a especificidade deve ser confirmada pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o composto alvo e de resultados negativos obtidos com amostras que não contém o composto alvo, e com compostos estruturalmente semelhantes.

O branco do hidrolisado tríptico de rHuEPO foi feito através do mesmo procedimento usado para obtenção do hidrolisado tríptico, porém sem a adição da rHuEPO. Foram adicionados

5 μL da solução de tripsina 0,2 mg/mL a 50 μL do tampão de hidrólise Tris-HCl 100mM com pH 8,5 sem a rHuEPO.

Um hidrolisado de quimotripsinogênio A (proteína que gera um número de peptídeos trípticos semelhante ao da rHuEPO) também foi feito para fins comparativos. Foram adicionados 5 μL da mesma solução de tripsina a 50 μL do tampão de hidrólise contendo 50 μg desta proteína.

A incubação das amostras, que foram feitas em triplicatas, foi realizada no equipamento de banho-maria termostaticado MultiTemp III (GE Healthcare) a 37°C por 1 hora. Após esse tempo, foram adicionados 50 μL de solução de TFA 10%.

Em seguida, as amostras foram avaliadas por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (HPLC-RP-C18), conforme descrito no item 3.4.4.

4 – RESULTADOS

4.1 - Avaliação da homogeneidade protéica da amostra de rHuEPO

4.1.1 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% da eritropoetina recombinante humana (rHuEPO, 1 µg a 16 µg) apresentou uma única banda eletroforética em todas as raias (Figura 4.1).

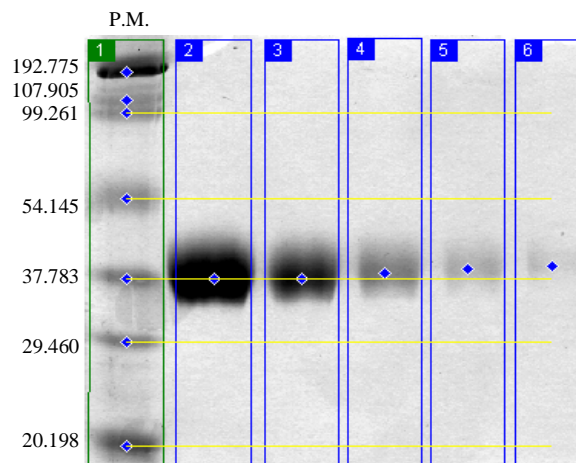


Figura 4.1: SDS-PAGE 12% da rHuEPO (1 µg a 16 µg), analisada pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained® Broad Range (Bio-Rad Laboratories). Raia 2: rHuEPO 16 µg. Raia 3: rHuEPO 8 µg. Raia 4: rHuEPO 4 µg. Raia 5: rHuEPO 2 µg. Raia 6: rHuEPO 1 µg.

Foram detectadas sete das oito proteínas do padrão de peso molecular Prestained® Broad Range, as quais geraram uma curva de calibração de peso molecular com R^2 igual a 0,9977 (Figuras 4.2A e 4.3). A aptotina tem massa molecular de 7.441 Da e, provavelmente, não ficou retida no gel 12%. Nas raias em que foram aplicadas diferentes massas de rHuEPO, foi detectada apenas um banda eletroforética (Figuras 4.2B-F).

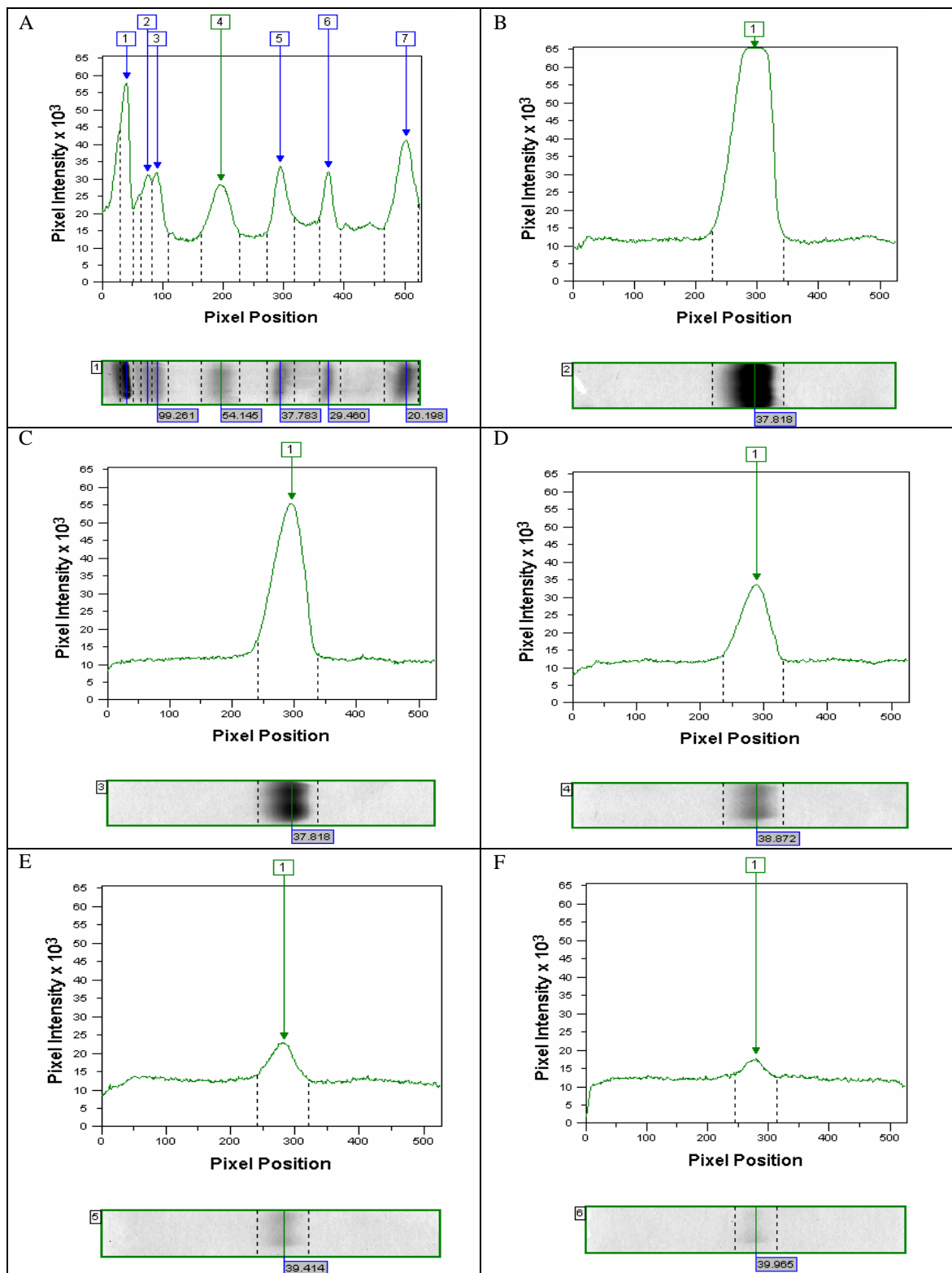


Figura 4.2: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12% do padrão de peso molecular (painel A) e da rHuEPO 16µg, 8 µg, 4 µg, 2 µg e 1 µg (painéis B, C, D, E e F, respectivamente), obtida pelo programa ImageMaster[®]. Os padrões de peso molecular detectados foram miosina (192.775 Da), β-galactosidase (117.905 Da), albumina de soro bovino (99.261 Da), ovalbumina (54.145 Da), anidrase carbônica (37.783 Da), inibidor de tripsina de soja (29.460 Da) e lisozima (20.198 Da).

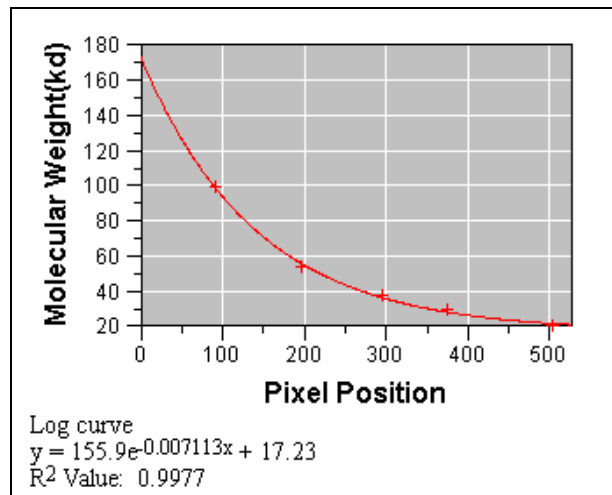


Figura 4.3: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12% da rHuEPO (1 μ g a 16 μ g), obtida pelo programa ImageMaster[®].

Por este experimento, a média das mobilidades eletroforéticas relativas (R_f) foi 0,549 e a média das massas moleculares estimadas foi 38.777 Da para a rHuEPO (Tabela 4.1).

As áreas das bandas foram determinadas e relacionadas com a massa aplicada de rHuEPO, gerando um equação linear (Figura 4.4), através da qual pode-se estimar a massa de rHuEPO em uma amostra desconhecida desta glicoproteína a partir da área da banda eletroforética obtida no gel de SDS-PAGE 12% feito sob as mesmas condições especificadas no item 3.2.1. Para a construção do gráfico e obtenção da equação linear, foi excluído o ponto referente a 1 μ g de rHuEPO aplicado (raia 6), pois a banda eletroforética gerada por esta massa é bastante fraca, o que gerou dificuldade para calcular a área.

Tabela 4.1: Valores de mobilidade eletroforética (R_f), massa molecular (MM) e área das bandas eletroforéticas observadas na SDS-PAGE 12% da rHuEPO (1 μ g a 16 μ g), gerados pelo programa ImageMaster[®].

Raia	Massa aplicada de rHuEPO	R_f	MM (Da)	Área
2	16 μ g	0,555	37.818	10668
3	8 μ g	0,563	37.818	8064
4	4 μ g	0,549	38.872	7224
5	2 μ g	0,54	39.414	6720
6	1 μ g	0,538	39.965	4536
	Média	0,549	38.777	
	Desvio padrão	0,010	0,96	

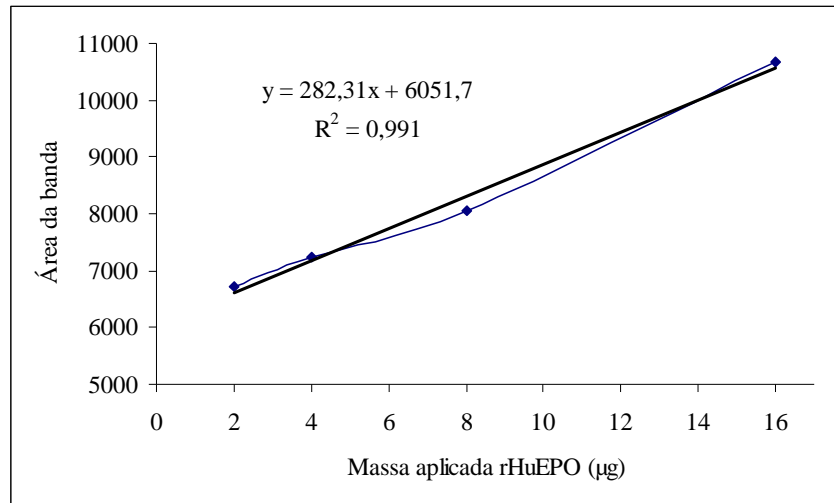


Figura 4.4: Relação entre a área da banda eletroforética obtida a partir da SDS-PAGE 12% com a respectiva massa de rHuEPO aplicada no gel.

Levando-se em consideração que uma única banda foi observada para a amostra de rHuEPO (1µg a 16 µg) e que a menor quantidade de proteína contaminante detectável seja 1 µg, por comparação com a intensidade da banda de rHuEPO 1 µg (raia 6, Figura 4.1), podemos estimar uma pureza, aproximada, de rHuEPO maior que 94% ($100 - 100/16$) na amostra.

4.1.2 - Cromatografia de fase reversa em coluna C4

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa utilizando a coluna Delta Pak C4 do IFA da rHuEPO apresentou dois picos cromatográficos, sendo o primeiro antes do início do gradiente linear (Pico 1, tempo de retenção 3,51 min) e o segundo no gradiente (Pico 2, tempo de retenção 11,10 min), como mostra a Figura 4.5.

As frações cromatográficas, referentes aos dois picos observados, foram coletadas e submetidas a uma SDS-PAGE 8-25% no PhastSystem[®] (Figura 4.6). As oito bandas eletroforéticas foram observadas no padrão de peso molecular Prestained[®] Broad Range da Bio-Rad (raia 1), as quais geraram uma curva de calibração de peso molecular com R^2 igual a 0,9782 (Figuras 4.7A e B). Na fração cromatográfica referente ao pico 1, não foram detectadas bandas eletroforéticas, o que sugere que este pico esteja relacionado aos sais presentes na amostra. O aumento da condutividade nessa fração confirma a presença de sais. Já na fração referente ao pico 2, uma banda em 33.516 de peso molecular foi observada, indicando que a rHuEPO eluiu nessa fração (Figura 4.7C e D).

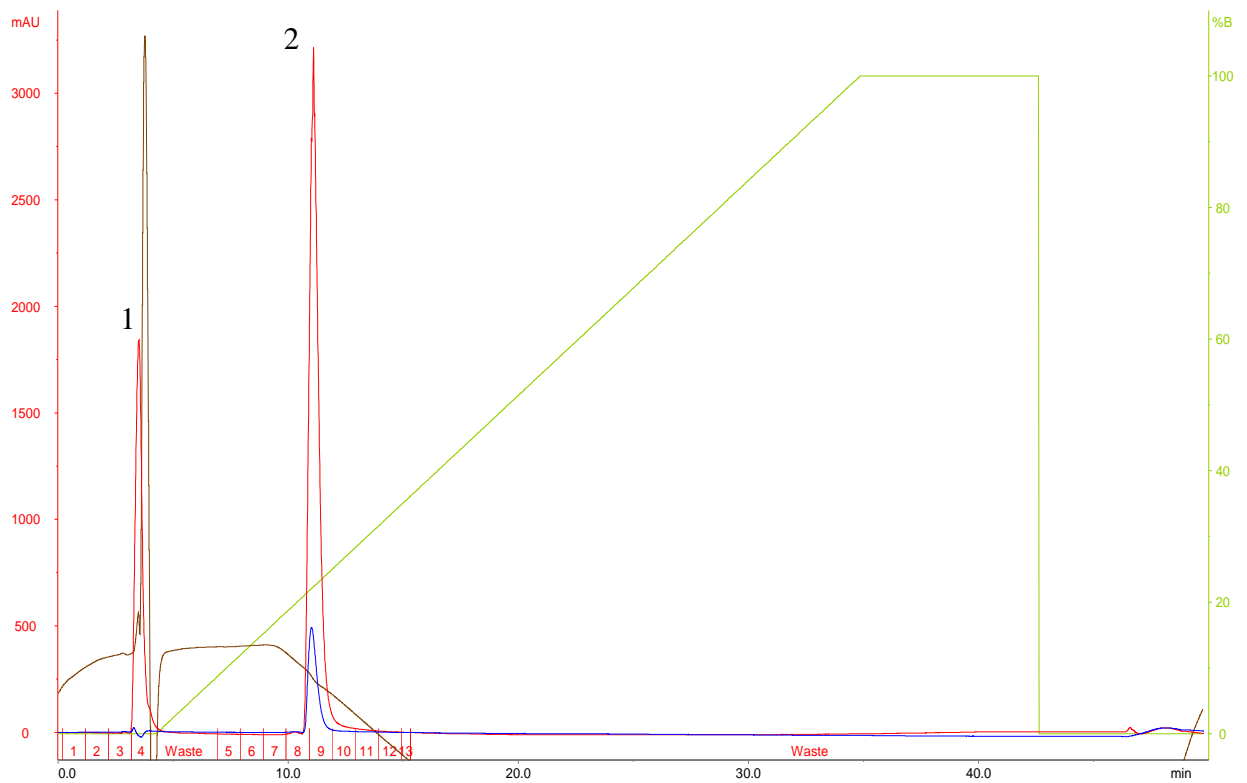


Figura 4.5: Cromatografia de fase reversa em coluna Delta Pak C4 da solução de rHuEPO. Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradiente: 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 8,5 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 2 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B. Absorção a 220 nm: vermelho. Absorção a 280 nm: azul. Condutividade: marrom.

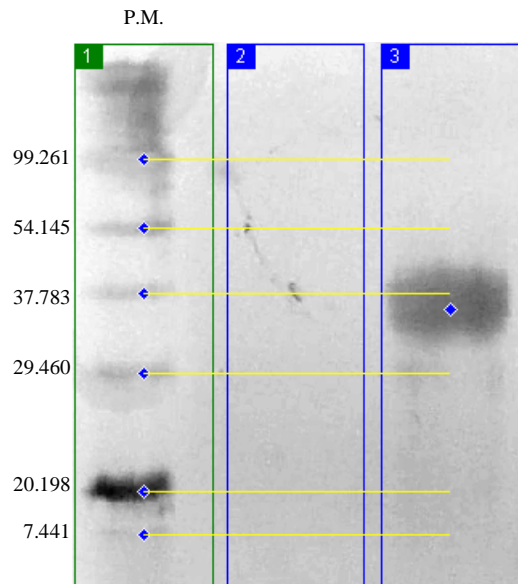


Figura 4.6: SDS-PAGE 8-25% das frações cromatográficas da rHuEPO oriundas da cromatografia de fase reversa em coluna Delta Pak C4, analisada pelo programa ImageMaster[®]. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad Laboratories). Raia 2: Fração do pico 1 (tubo 4). Raia 3: Fração do pico 2 (tubo 9).

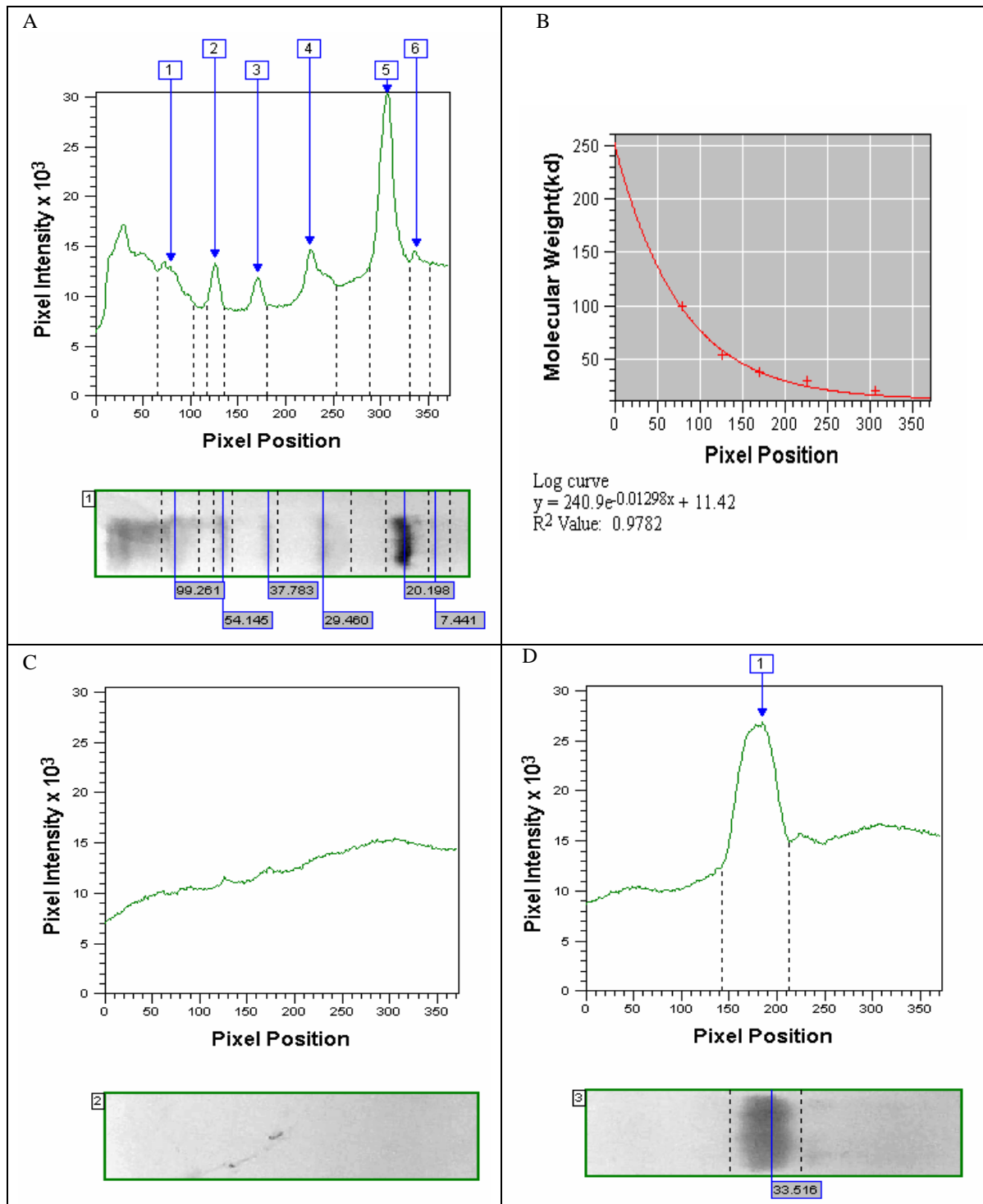


Figura 4.7: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 8-25% do padrão de peso molecular (painel A), juntamente com sua curva de calibração (painel B), e das frações cromatográficas referentes aos picos 1 e 2 (painéis C e D, respectivamente), obtida pelo programa ImageMaster[®]. Os padrões de peso molecular usados foram miosina (192.775 Da), β -galactosidase (117.905 Da), albumina de soro bovino (99.261 Da), ovalbumina (54.145 Da), anidrase carbônica (37.783 Da), inibidor de tripsina de soja (29.460 Da), lisozima (20.198 Da) e aprotinina (7.441 Da).

4.2 - Caracterização físico-química da rHuEPO

4.2.1 - Quantificação protéica da amostra de rHuEPO

Método de Folin-Lowry modificado

A curva padrão para o método de Folin-Lowry modificado foi feita com a proteína BSA, em concentrações variando de 0,20 a 1,00 mg/mL, em triplicatas (Tabela 4.2 e Figura 4.8).

Tabela 4.2: Média das leituras da absorvância a 750 nm das triplicatas das soluções de BSA usadas para a curva padrão.

Concentração BSA (mg/mL)	Absorvância a 750 nm
0,20	0,093
0,30	0,117
0,40	0,155
0,50	0,167
1,00	0,265

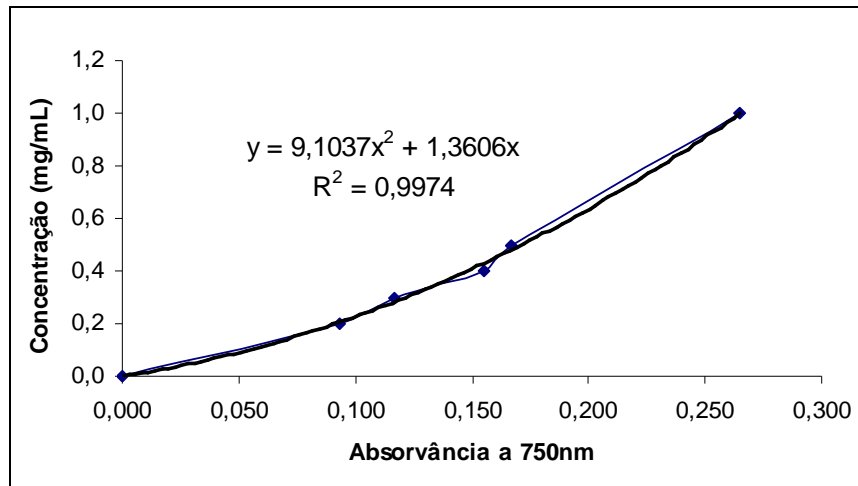


Figura 4.8: Curva de calibração para o método de Folin-Lowry modificado feita com soluções de BSA padrão.

A leitura da absorvância a 750 nm da solução original (sem diluição) da rHuEPO foi feita em triplicata, obtendo-se os seguintes valores: 0,280, 0,285 e 0,287. Através da equação obtida por regressão polinomial da curva de calibração, a concentração estimada de rHuEPO na solução foi 1,12 mg/mL, utilizando o valor médio de absorvância a 750 nm desta solução (0,284).

Método espectrofotométrico de absorção a 280 nm

A solução original da rHuEPO apresentou absorvância a 280 nm igual a 0,912. Utilizando o coeficiente de extinção de $0,7435 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$, a concentração encontrada de rHuEPO na solução foi 1,23 mg/mL.

4.2.2 - Determinação do peso molecular da rHuEPO

Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 8-25% da rHuEPO para estimativa do peso molecular (PM) é mostrada na Figura 4.9. Foram identificadas oito bandas do padrão de peso molecular (raia 1), cuja curva de calibração apresentou R^2 igual a 0,9920 (Figura 4.10A e 4.11). Uma única banda eletroforética foi identificada em cada raia onde foi aplicada a solução de rHuEPO (Figura 4.10B-D).

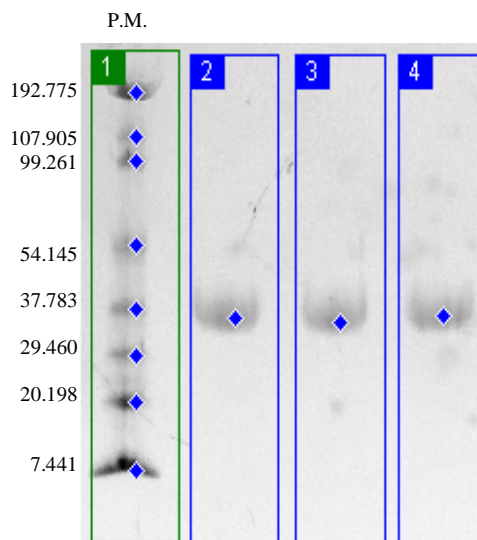


Figura 4.9: SDS-PAGE 8-25% da rHuEPO, analisada pelo programa ImageMaster[®]. Raia 1: Padrões de peso molecular Prestained[®] Broad Range (Bio-Rad Laboratories). Raias 2, 3 e 4: Solução de rHuEPO (triplicata).

Os valores de massa molecular estimados para as triplicatas foram 31.049 Da, 30.465 Da e 31.449 Da. A média do peso molecular calculada foi 30.988 para a rHuEPO.

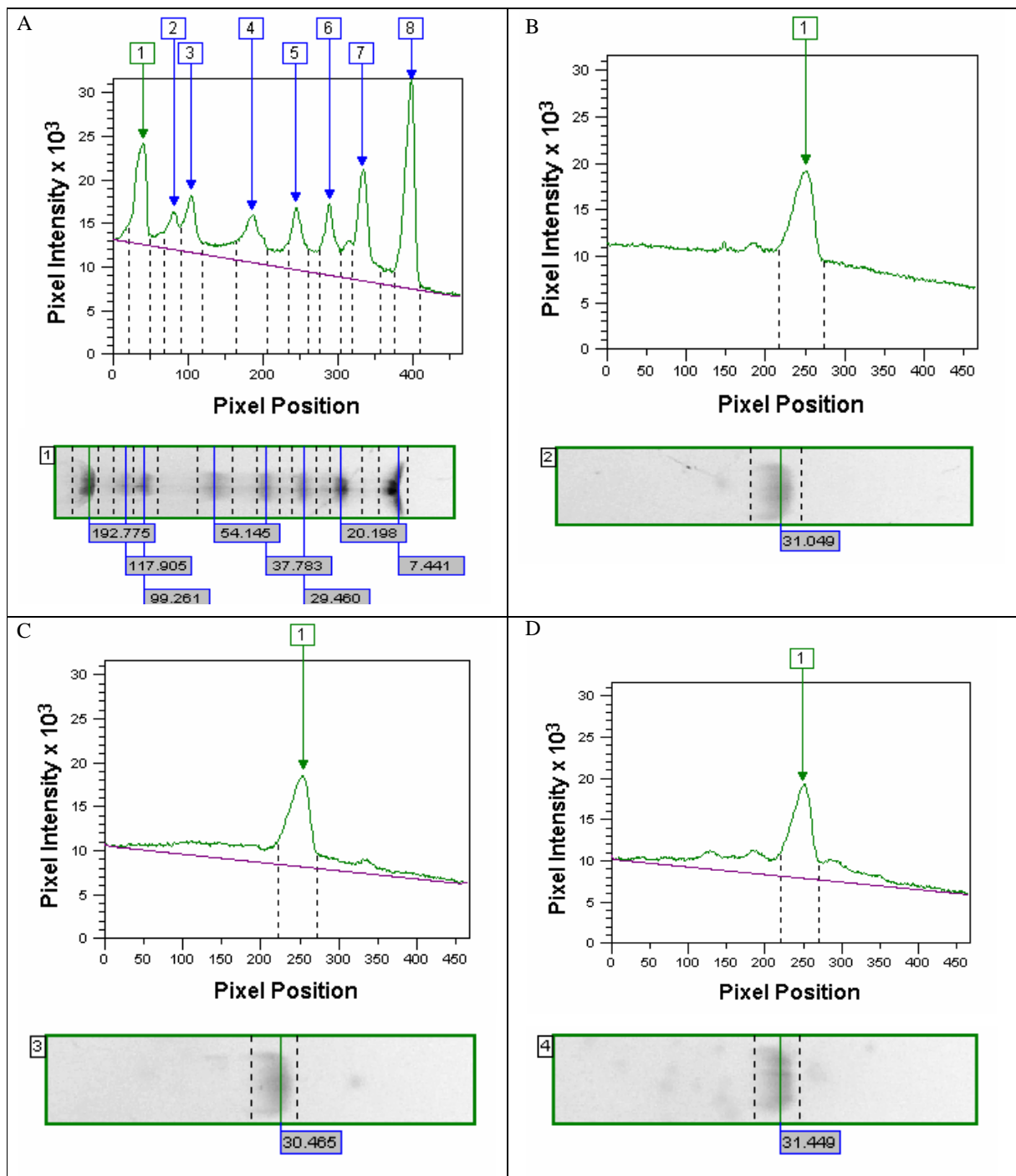


Figura 4.10: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 8-25% do padrão de peso molecular (painel A) e da rHuEPO em triplicata (painéis B, C e D), obtida pelo programa ImageMaster[®]. Os padrões de peso molecular usados foram miosina (192.775 Da), β -galactosidase (117.905 Da), albumina de soro bovino (99.261 Da), ovalbumina (54.145 Da), anidrase carbônica (37.783 Da), inibidor de tripsina de soja (29.460 Da), lisozima (20.198 Da) e aprotinina (7.441 Da).

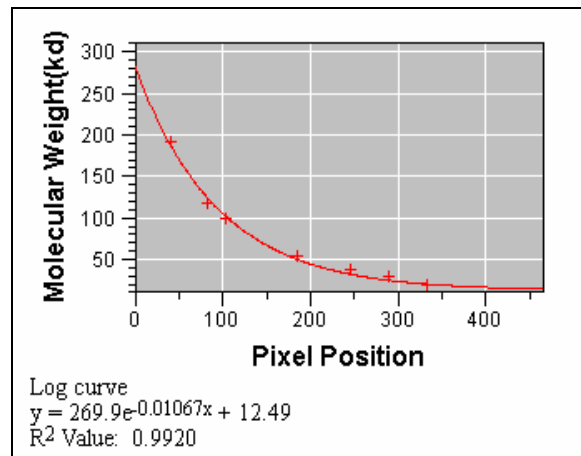


Figura 4.11: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 8-25% da rHuEPO, obtida pelo programa ImageMaster®.

Espectrometria de massa

O espectro de massa em modo linear para a rHuEPO apresentou as relações massa/carga de 26.878 Da para o íon base ($[MH]^+$), 13.303 Da para o íon duplamente carregado ($[MH]^{+2}$) e 9.040 Da para o íon triplamente carregado ($[MH]^{+3}$), como mostra a Figura 4.12.

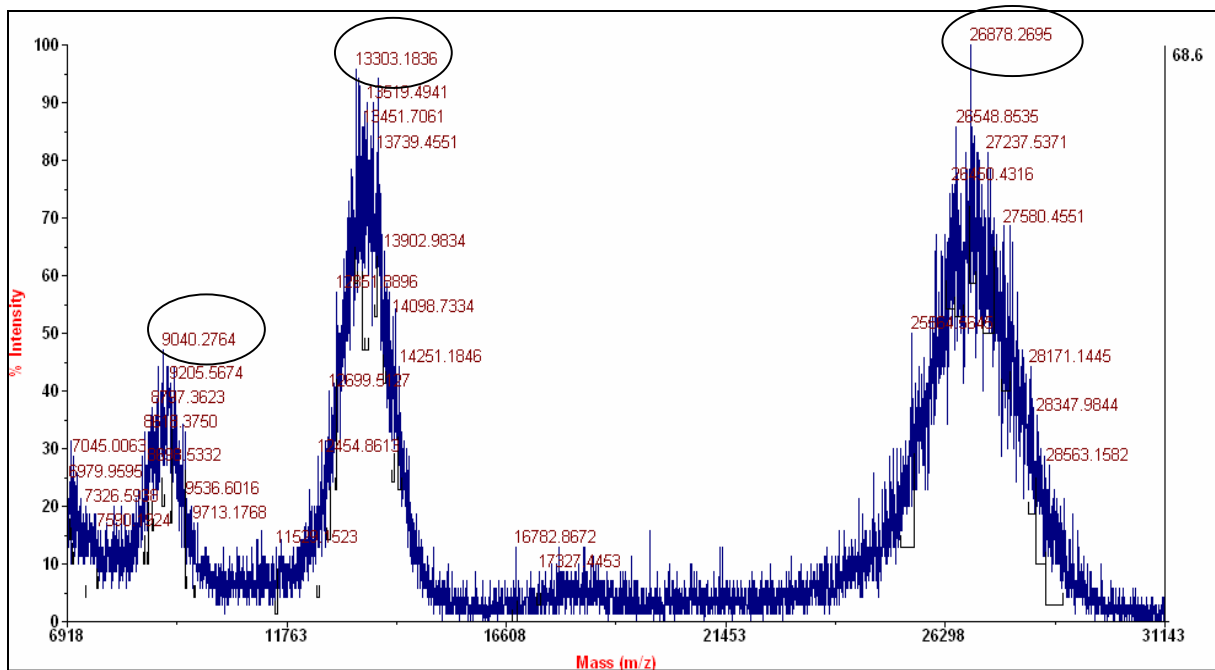


Figura 4.12: Espectrometria de massa em modo linear para a rHuEPO realizada no pelo espectrômetro de massas AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems), usando o sistema MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight*).

De acordo com o espectro de massa, a rHuEPO apresentou massa molecular de 26.878 Da, que é a massa encontrada para apenas uma carga.

4.2.3 - Determinação do ponto isoelétrico da rHuEPO

Focalização isoelétrica

A focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE) pH 3-9 da rHuEPO mostrou três bandas eletroforéticas, indicando a presença de, pelo menos, três isoformas da glicoproteína em questão (Figura 4.13). Foram observadas onze bandas dos padrões protéicos de ponto isoelétrico (pI) 3 a 10 da GE Healthcare, cuja curva de calibração apresentou R^2 igual a 0,9832 (Figura 4.14A-B). As três banda detectadas apresentaram pI de 4,05, 3,97 e 3,88, na primeira raia em que foi aplicada a rHuEPO, e pI de 4,02, 3,97 e 3,93, na segunda (Figura 4.14C-D). A estimativa do pI das três isoformas de rHuEPO encontradas indicou os valores médios de 3,91, 3,97 e 4,04.

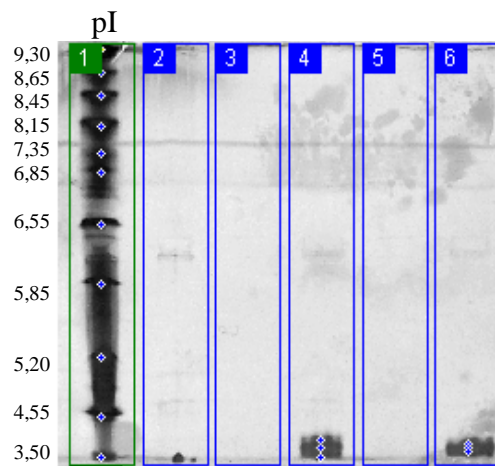


Figura 4.13: IEF-PAGE pH 3-9 para estimativa do pI da rHuEPO, analisado pelo programa ImageMaster[®]. Raia 1: Padrões de pI 3-10 Broad. Raias 2, 3 e 5: sem amostra. Raias 4 e 6: Solução de rHuEPO.

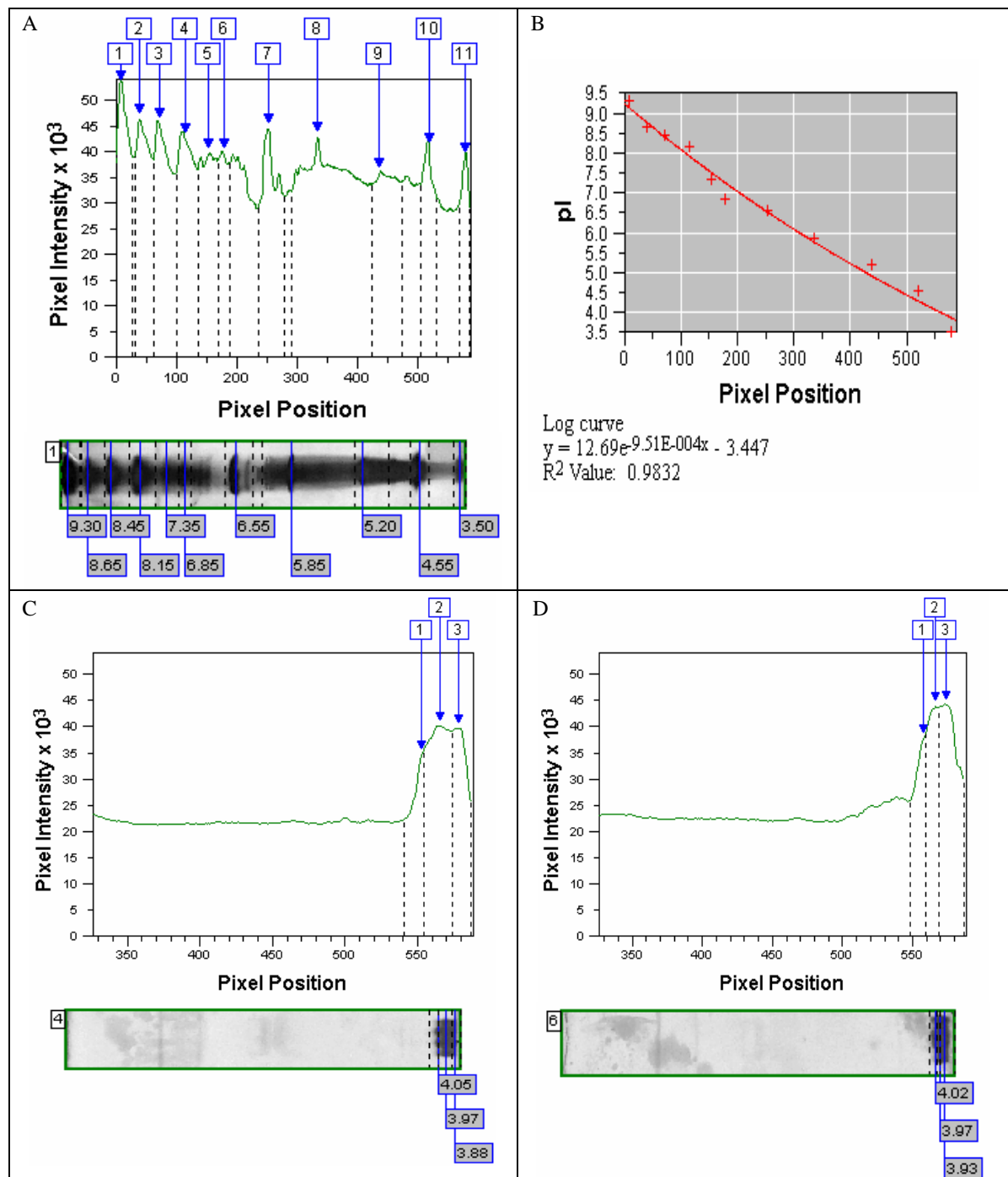


Figura 4.14: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF-PAGE pH 3-9 do padrão de pI (painel A), juntamente com sua curva de calibração (painel B), e da rHuEPO, em duplicata (painéis C e D), obtida pelo programa ImageMaster[®]. Os padrões de pI usados foram amiloglicosidase (3,50), inibidor de tripsina de soja (4,55), β -lactoglobulina A (5,20), anidrase carbônica B bovina (5,85), anidrase carbônica B humana (6,55), mioglobina ácida de cavalo (6,85), mioglobina básica de cavalo (7,35), lectina ácida de lentilha (8,15), lectina intermediária de lentilha (8,45), lectina básica de lentilha (8,65) e tripsinogênio (9,30).

Cromatofocalização

O pI da rHuEPO também foi estimado por cromatofocalização, utilizando o gradiente de pH de 7,0 a 3,0. No perfil cromatográfico dos padrões de pI 2,5 a 6,5 (GE Healthcare), foram observados seis picos cromatográficos numerados de 1 a 6 (Figura 4.15).

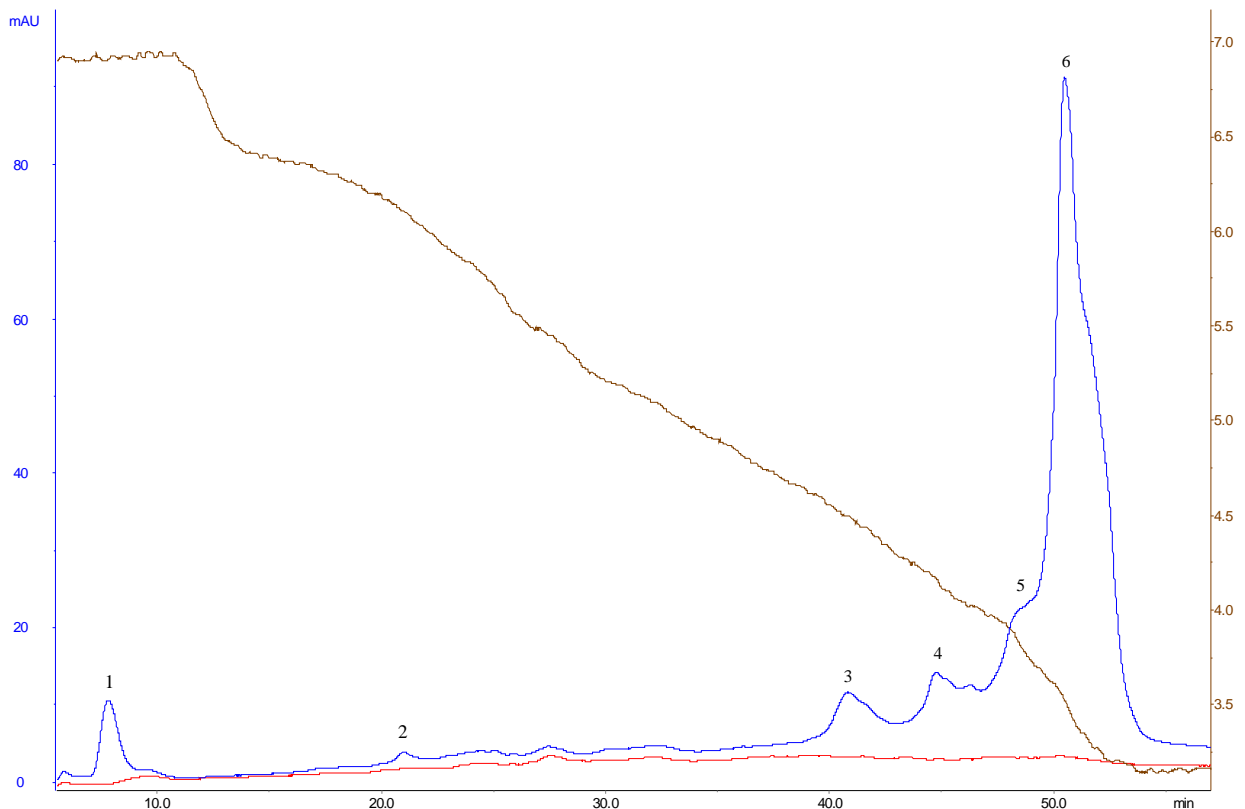


Figura 4.15: Cromatofocalização em coluna de cromatofocalização Mono-P da solução de padrões de pI 3-10 Broad. Eluentes: Imidazol 25mM pH 7,0 (A) e Polybuffer 74 1:20 em água Milli-Q pH 3,0 (B). Gradiente: 5 volumes de coluna (VC) com o eluente A e 20 VC com o eluente B. Os padrões de pI sugeridos foram: anidrase carbônica B humana (pico 1; pI 6,91), anidrase carbônica B bovina (pico 2; pI 6,11), inibidor trípico de soja (pico 3; pI 4,50), glicose oxidase (pico 4; pI 4,16), vermelho de metila (pico 5; pI 3,79) e amiloglicosidase (pico 6; pI 3,52). Solução de padrões de pI 3-10: azul. Branco da corrida cromatográfica: vermelho. Gradiente de pH: marrom.

As proteínas presentes, em quantidades iguais, no padrão são pepsinogênio (pI 2,80), amiloglicosidase (pI 3,50), vermelho de metila (pI 3,75), glicose oxidase (pI 4,15), inibidor de tripsina de soja (pI 4,55), β -lactoglobulina A (pI 5,20), anidrase carbônica B bovina (pI 5,85) e anidrase carbônica B humana (pI 6,55).

O pico 6 (pI 3,52) foi o que apresentou a maior absorvância a 280 nm, sugerindo ser referente a amiloglicosidase que possui um alto teor de tirosina. Os picos 5 (pI 3,79), 4 (pI 4,16) e

3 (pI 4,50), provavelmente, se referem aos padrões seguintes na ordem de pI vermelho de metila, glicose oxidase e inibidor trípico de soja, respectivamente. Enquanto os picos 2 (pI 6,11) e 1 (pI 6,91) podem ser referentes os padrões protéicos anidrase carbônica bovina e humana, respectivamente, devido à proximidade dos valores de pI.

O pepsinogênio (pI 2,80) e a β -lactoglobulina A (pI 5,20) não foram detectados. O primeiro deles tem seu pI fora da faixa de pH do gradiente e, provavelmente, ficou adsorvido na matriz cromatográfica. Já a β -lactoglobulina A possui coeficiente de extinção a 280 nm mais baixo que os demais padrões protéicos e, portanto, seu pico foi tão menor que não foi possível detectá-lo (Pace et al., 1995).

O erro obtido entre os valores de pI teórico e observado foi baixo (menor do que 6%), indicando que as condições cromatográficas foram adequadas (Tabela 4.3). Os padrões que possuem pI mais altos apresentaram uma diferença maior entre o valor de pI teórico e o observado, provavelmente, devido ao tamponamento menos eficaz do *polybuffer* no início do gradiente de pH. Para os padrões de pI mais baixos, essa diferença foi menor, indicando que o tamponamento funcionou melhor nessa faixa de pH.

Tabela 4.3: Valores de pI observados na cromatofocalização para os padrões protéicos e seus erros absoluto e percentual.

Padrão de pI	pI teórico	pI observado	Erro absoluto	Erro percentual
Anidrase carbônica humana	6,55	6,91	0,36	5,50
Anidrase carbônica bovina	5,85	6,11	0,26	4,44
Inibidor trípico de soja	4,55	4,50	0,05	1,10
Glicose oxidase	4,15	4,16	0,01	0,24
Vermelho de metila	3,75	3,79	0,04	1,07
Amiloglicosidase	3,50	3,52	0,02	0,57

A sobreposição da cromatofocalização da rHuEPO àquela do branco foi feita a fim de identificar o pico referente à rHuEPO, como mostra a Figura 4.16A. O perfil cromatográfico do branco foi subtraído do perfil da solução de rHuEPO, evidenciando o pico referente à rHuEPO (Figura 4.16B).

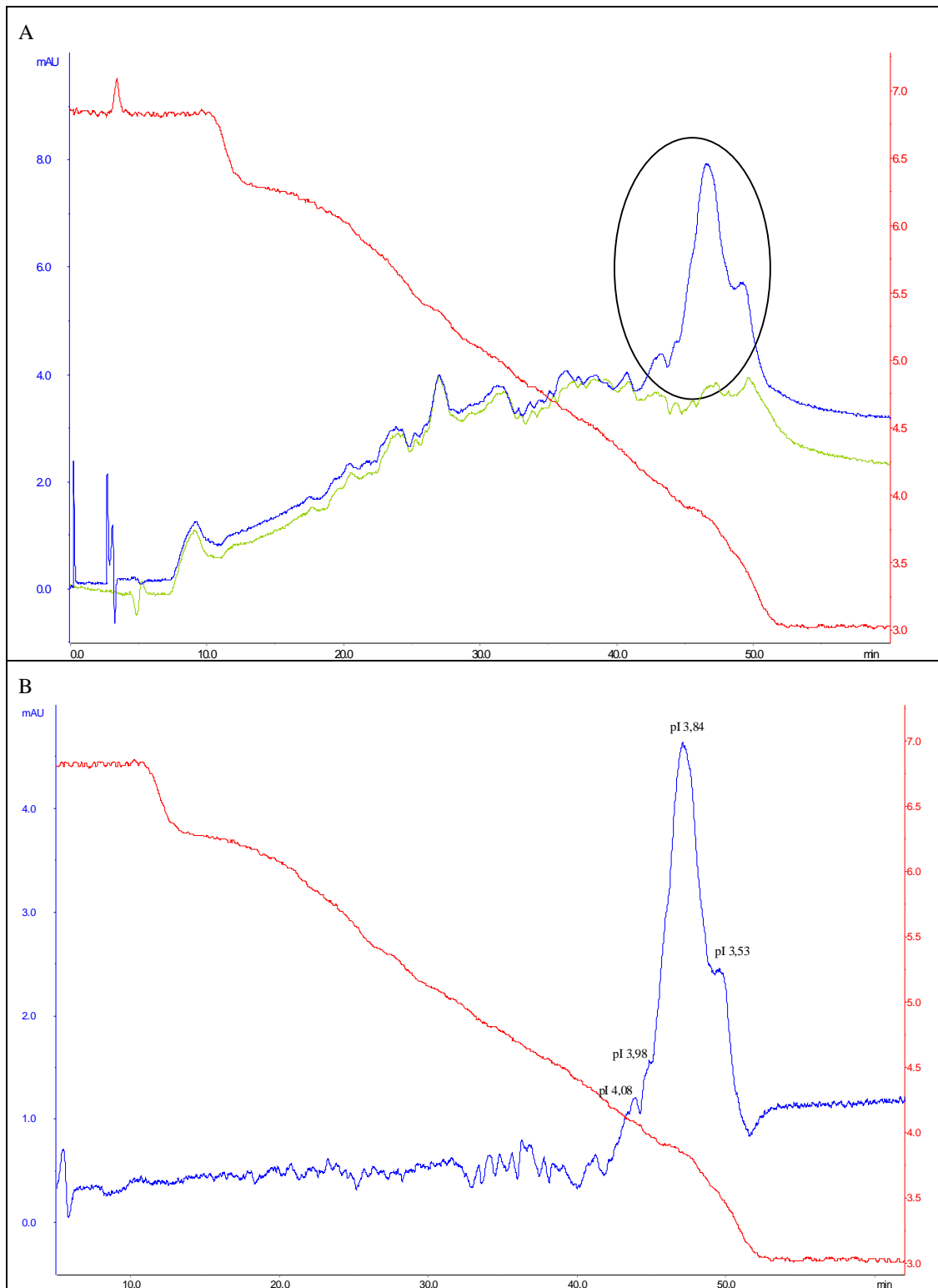


Figura 4.16: Cromatofocalização em coluna Mono-P da solução dessalinizada de rHuEPO. Eluentes: Imidazol 25mM pH 7,0 (A) e Polybuffer 74 1:20 em água Milli-Q pH 3,0 (B). Gradiente: 5 volumes de coluna (VC) com o eluente A e 20 VC com o eluente B. Painel A: Sem subtração do branco. Painel B: Com subtração do branco. Água Milli-Q (branco): verde. Solução de rHuEPO: azul escuro. Gradiente de pH: vermelho.

O pico cromatográfico referente a rHuEPO apresentou três ombros, o que indica a presença de, pelo menos, quatro isoformas desta glicoproteína, cujos pI foram estimados em 3,53 (ombro à direita), 3,84 (pico principal), 3,98 e 4,08 (ombros à esquerda), conforme mostrado na Figura 4.16.

4.2.4 - Determinação da mobilidade eletroforética da rHuEPO

A mobilidade eletroforética relativa (Rf) da rHuEPO foi estabelecida por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida (NATIVE-PAGE) 8-25% (Figura 4.17), obtendo-se os valores de 0,479, 0,477, 0,481 e 0,490 (raias 1 a 4, respectivamente), como mostra a Figura 4.18.

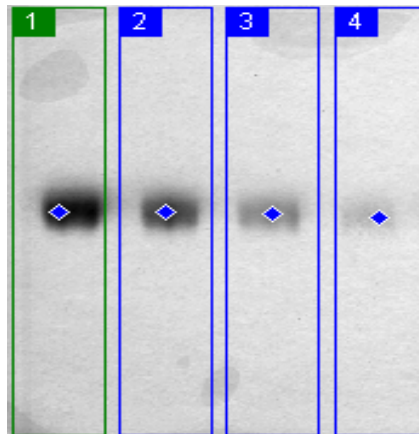


Figura 4.17: NATIVE-PAGE 8-25% da rHuEPO, analisada pelo programa ImageMaster[®]. Raia 1: 4 μ g de rHuEPO. Raia 2: 2 μ g de rHuEPO. Raia 3: 1 μ g de rHuEPO. Raia 4: 0,5 μ g de rHuEPO.

Os valores encontrados de Rf apresentaram desvio padrão de 0,006 e média igual a 0,482 (Tabela 4.4).

A aplicação no gel de diferentes quantidades de rHuEPO possibilitou estabelecer uma relação entre o volume da banda eletroforética e a massa aplicada de rHuEPO, gerando um equação polinomial (Figura 4.19). Através da equação estabelecida, pode-se determinar a massa de rHuEPO em uma amostra desconhecida da glicoproteína em questão a partir do volume da banda eletroforética obtida no gel de NATIVE-PAGE 8-25%, sob as condições especificadas no item 3.3.4.

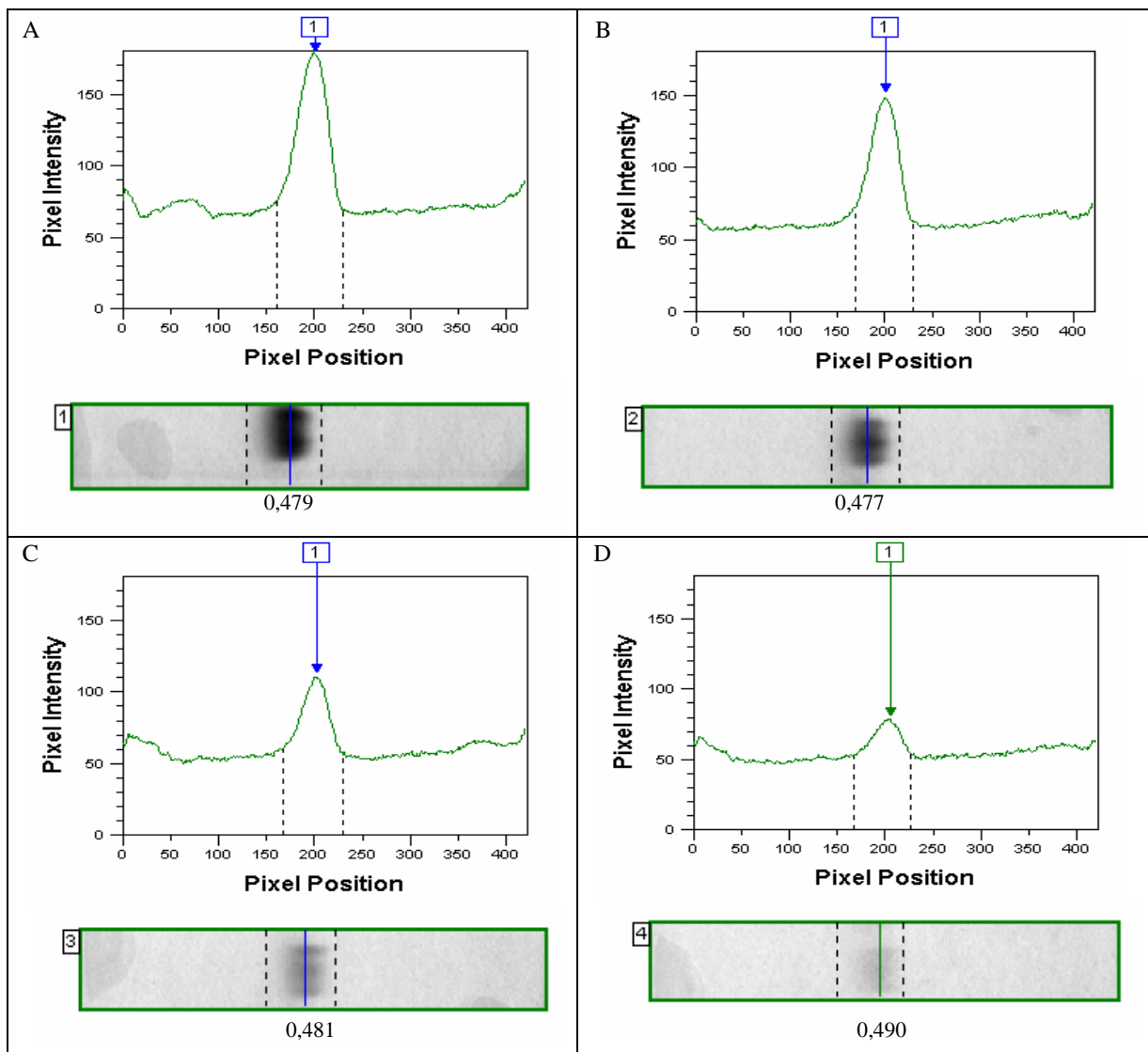


Figura 4.18: Densitometria das bandas eletroforéticas da NATIVE-PAGE 8-25% da rHuEPO 4 μg , 2 μg , 1 μg e 0,5 μg (painéis A, B, C e D, respectivamente), obtida pelo programa ImageMaster[®].

Tabela 4.4: Valores de Rf e volume de banda, obtidos pelo programa ImageMaster[®], para a banda eletroforética da rHuEPO em gel de NATIVE-PAGE 8-25%.

Raia	Massa aplicada de rHuEPO	Rf	Volume da banda (Pixel Intensity x mm ²)
1	4 μg	0,479	313194
2	2 μg	0,477	245339
3	1 μg	0,481	159823
4	0,5 μg	0,490	87365
	<i>Média</i>	0,482	
	<i>Desvio padrão</i>	0,006	

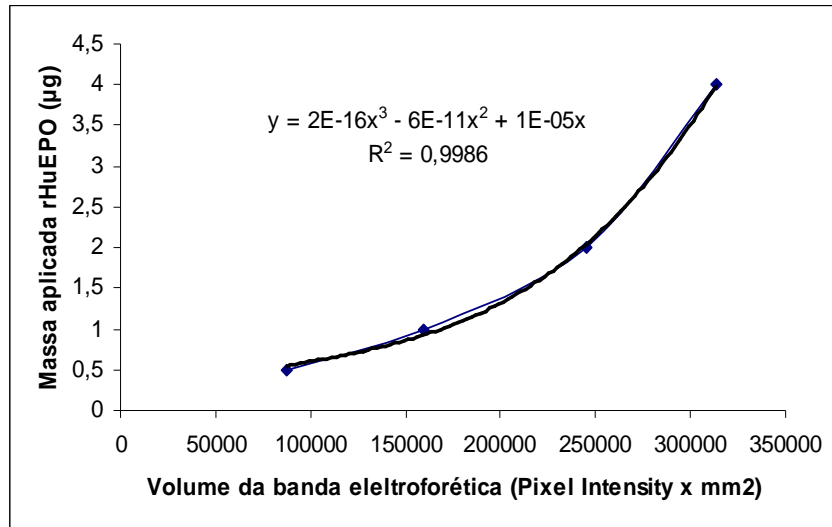


Figura 4.19: Relação entre o volume da banda eletroforética obtida no gel de NATIVE-PAGE 8-25% com a respectiva massa de rHuEPO aplicada no gel.

4.3 - Padronização da hidrólise enzimática da rHuEPO

4.3.1 - Obtenção dos peptídeos tripticos teóricos da rHuEPO

Dezenove peptídeos e dois aminoácidos foram obtidos na hidrólise virtual do substrato rHuEPO utilizando-se a enzima tripsina, feita pelo programa PeptideCutter[®]. A sequência de aminoácidos, o tamanho e a massa molecular desses peptídeos são descritos na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Peptídeos obtidos pelo programa PeptideCutter[®] na hidrólise teórica da rHuEPO com a enzima tripsina.

Posição do sítio de clivagem	Sequência de aminoácidos do peptídeo gerado	Tamanho do peptídeo (nº de aminoácidos)	Massa molecular (Da)
4	APPR	4	439.515
10	LICDSR	6	705.827
14	VLER	4	515.610
20	YLLEAK	6	735.878
45	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK	25	2689.906
52	VNFYAWK	7	927.070
53	R	1	174.203
76	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	23	2526.934

97	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK	21	2359.667
103	AVSGLR	6	601.704
110	SLTTLLR	7	802.969
116	ALGAQK	6	586.689
131	EAISPPDAASAAPLR	15	1465.626
139	TITADTFR	8	924.021
140	K	1	146.189
143	LFR	3	434.539
150	VYSNFLR	7	898.029
152	GK	2	203.241
154	LK	2	259.349
162	LYTGEACR	8	912.028
166	TGD	4	447.448

4.3.2 - Avaliação da atividade enzimática da tripsina

Os perfis cromatográficos observados para os hidrolisados de BSA (solução t_{1h}), feitos com as soluções de tripsina recém-preparada (Figura 4.20A) e após 30 dias armazenadas a -20°C (Figura 4.20B), foram sobrepostos aos perfis da solução de BSA com tripsina sem incubação (t_0) para fins comparativos.

Através das áreas dos picos cromatográficos referentes à BSA, foi determinada a porcentagem desta proteína que foi hidrolisada pela tripsina nos dois casos (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Parâmetros referentes aos picos de BSA obtidos na cromatografia de fase reversa das soluções de BSA com tripsina t_0 e t_{1h} .

Solução BSA + tripsina	Solução de tripsina	Tempo de retenção do pico (min)	Área do pico (mAU.mL)	Grau de hidrólise
Tempo zero (t_0)	Recém preparada	29,28	334,4875	0
Incubação de 1h (t_{1h})	Recém preparada	29,74	30,6649	90,83%
Tempo zero (t_0)	30 dias a -20°C	29,36	283,8535	0
Incubação de 1h (t_{1h})	30 dias a -20°C	29,60	115,9406	59,15%

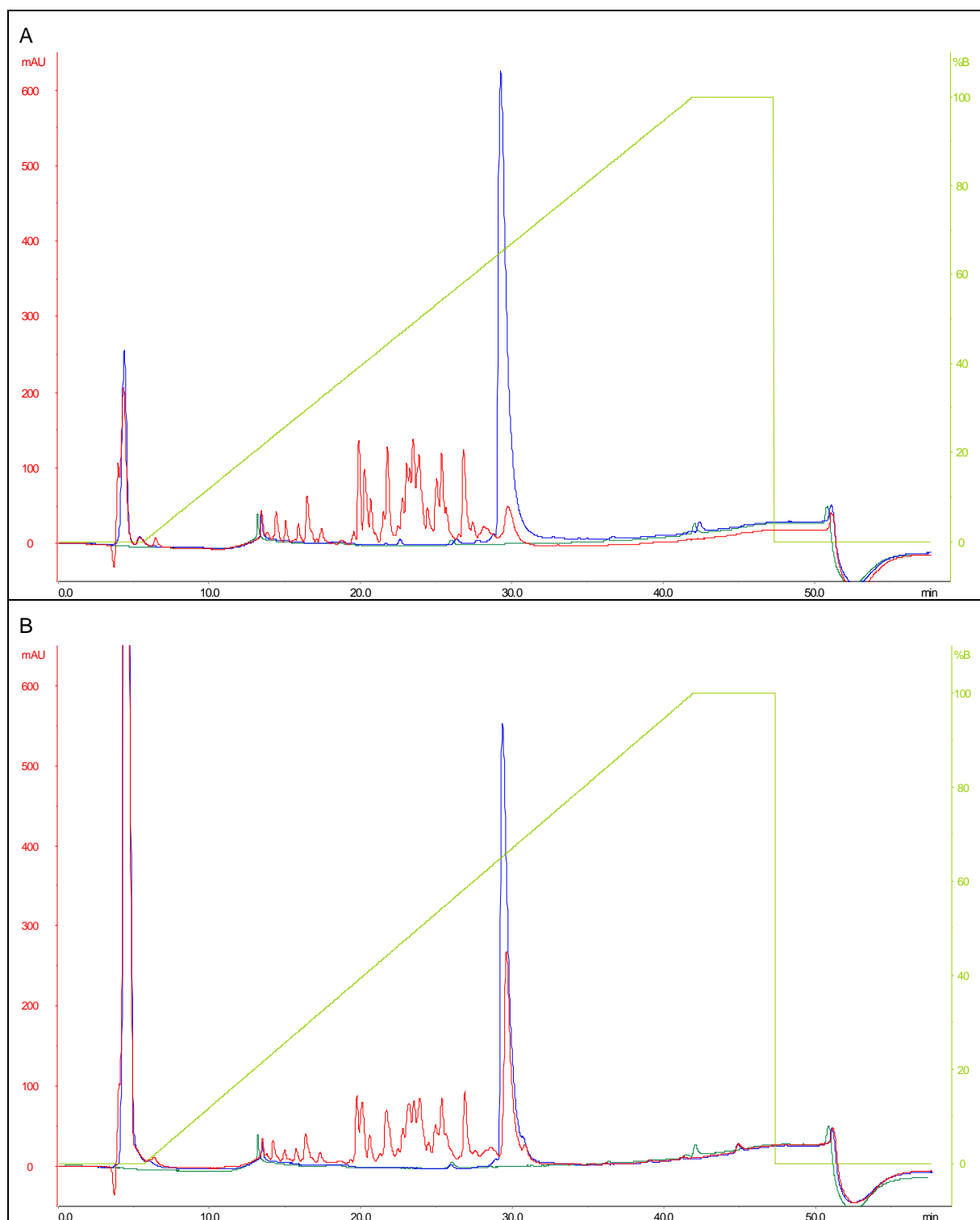


Figura 4.20: Cromatografia de fase reversa em coluna Hi-Pore[®] RP-318 das soluções de BSA com tripsina t_0 e t_{1h} . Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08%(B). Gradiente: 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B. Painel A: Referente à solução de tripsina recém-preparada. Painel B: Referente à solução de tripsina preparada há 30 dias e armazenada a 20°C. Solução t_{1h} : em vermelho. Solução t_0 : em azul. Branco da corrida cromatográfica: verde escuro.

O pico da BSA apresentou área de 334,4875 mAU.mL, no tempo zero de incubação enzimática, e 30,6649 mAU.mL, após 1 hora de incubação com a solução de tripsina recém-preparada, o que significa 9,17% da quantidade inicial de BSA. Ou seja, houve hidrólise de 90,83% da BSA.

Já para a tripsina em solução há 30 dias, o pico da BSA apresentou área de 283,8535 mAU.mL, no tempo zero, e 115,9406 mAU.mL após 1 hora de incubação, o que significa 40,85% da quantidade inicial de BSA. Portanto, neste caso, houve hidrólise de 59,15% da BSA.

4.3.3 - Preparação das amostras de rHuEPO para a hidrólise triptica

A dessalinização da solução original de rHuEPO feita por cromatografia de exclusão e peneiração molecular é mostrada na Figura 4.21. Os tubos 2 a 7, contendo a glicoproteína livre de sais, foram reunidos. A solução resultante teve sua absorvância lida a 280 nm para estimativa de sua concentração protéica, apresentando o valor de 0,511. Utilizando o coeficiente de extinção de $0,7435 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$, a concentração encontrada de rHuEPO na solução foi 0,687 mg/mL.

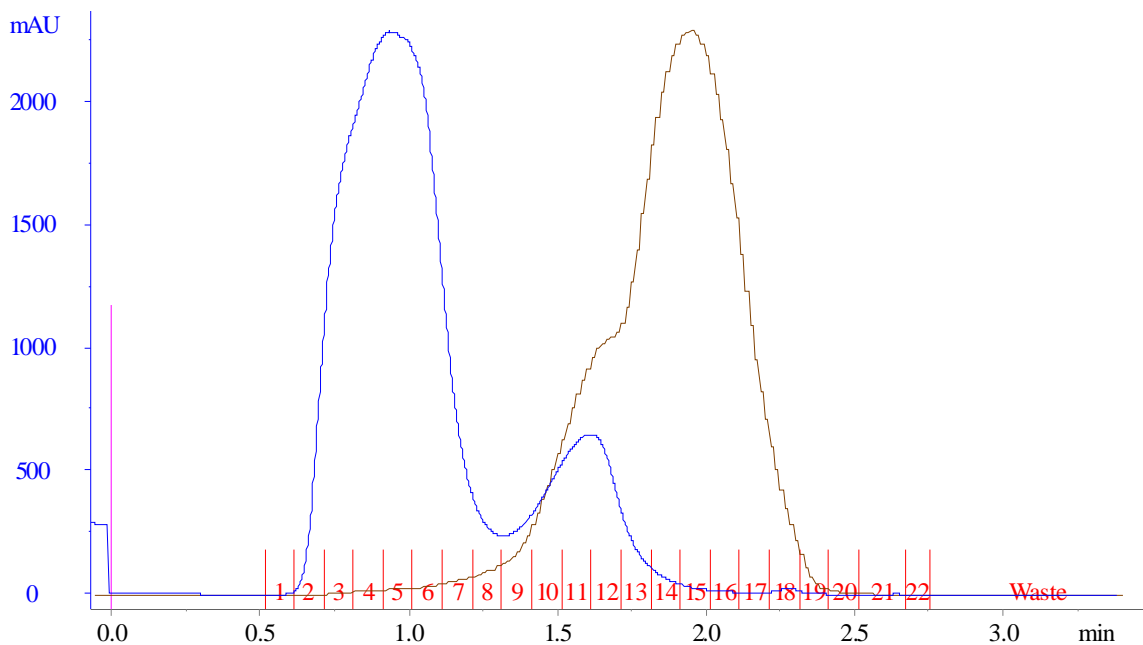


Figura 4.21: Cromatografia de exclusão e peneiração molecular em coluna HiTrap Desalting da solução original da rHuEPO. Eluente: Água milli-Q. Gradiente: 3 volumes de coluna. Absorção a 280 nm: azul. Condutividade: marrom.

Tendo obtido essa concentração, alíquotas equivalentes a 50 µg de rHuEPO foram preparadas adicionando-se 72,8 µL da solução dessalinizada por tubo *ependorf*. Posteriormente, as alíquotas foram secas à vácuo e armazenadas em geladeira até serem utilizadas para as reações de hidrólise enzimática.

4.3.4 - Determinação do tempo de hidrólise

Os perfis cromatográficos dos hidrolisados trípticos de rHuEPO, após incubações de 15 minutos, 1 hora, 3 horas e 24 horas, e da solução de rHuEPO com tripsina no tempo zero (sem incubação) estão apresentados na Figura 4.22. Os hidrolisados com incubações de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora e 30 minutos e 2 horas não são mostrados, pois apresentaram um perfil cromatográfico similar aos hidrolisados de 15 minutos, 1 hora e 3 horas.

Os picos referentes à rHuEPO tiveram suas áreas calculadas, as quais foram utilizadas na determinação da porcentagem de proteína hidrolisada pela tripsina nos diferentes tempos de incubação (Tabela 4.7). Com esses valores, um gráfico foi feito para mostrar a cinética de hidrólise da rHuEPO pela tripsina (Figura 4.23).

Tabela 4.7: Valores obtidos para tempo de retenção e área dos picos referentes à rHuEPO e sua porcentagem hidrolisada nos diferentes tempos de hidrólise.

Tempo de hidrólise	Tempo de retenção (min)	Área do pico da rHuEPO (mAU.min)	% rHuEPO hidrolisada
0 minuto	32,10	270,94	0
15 minutos	32,51	5,83	97,85
30 minutos	32,58	3,22	98,81
45 minutos	32,60	2,83	98,96
1 hora	32,48	2,50	99,08
1 hora e 30 minutos	32,39	1,66	99,39
2 horas	32,51	1,12	99,59
3 horas	32,50	1,29	99,52
24 horas	-	0,00	100,00

Média: 32,46
Desvio padrão: 0,16
Desvio padrão relativo: 0,49%

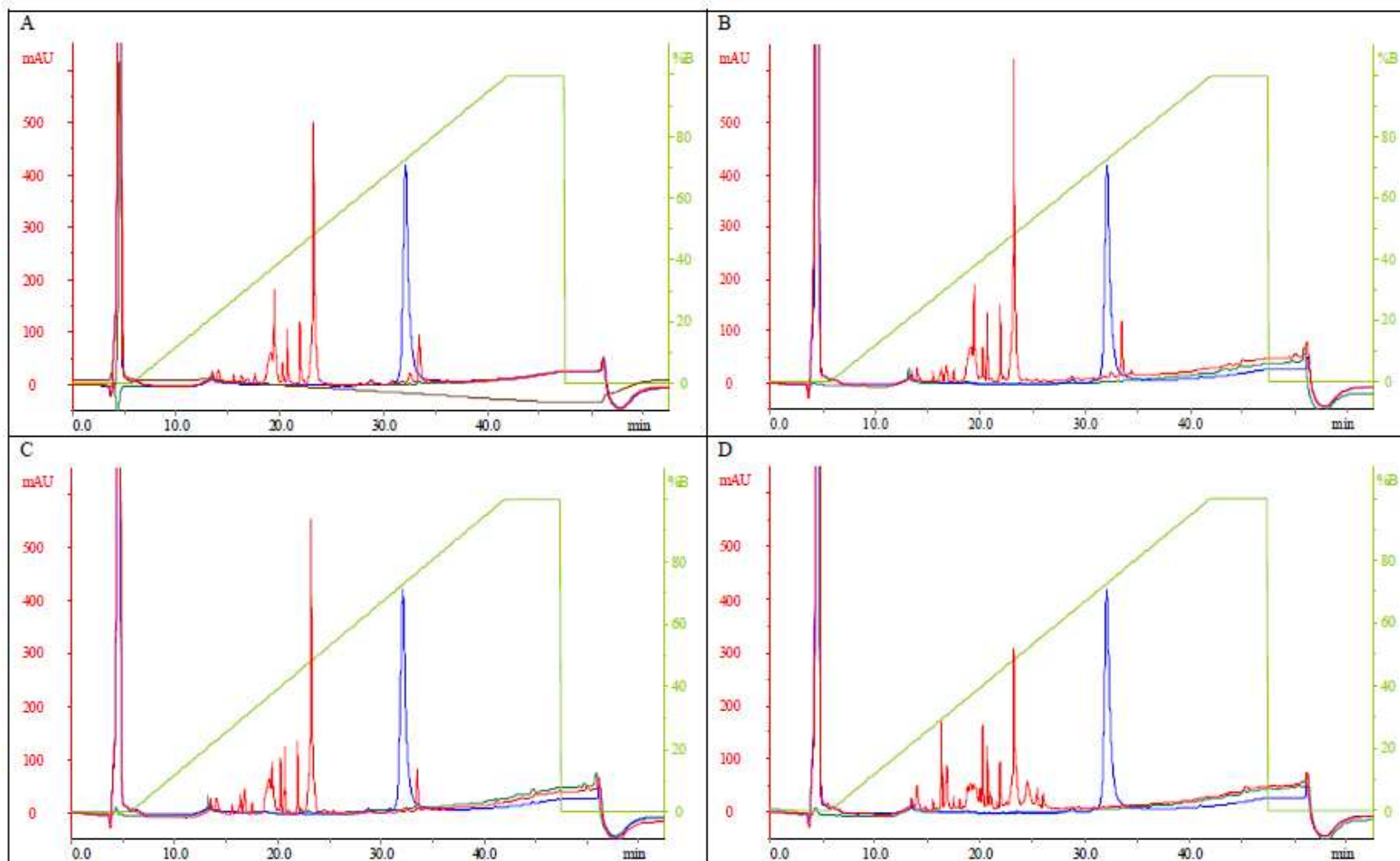


Figura 4.22: Cromatografia de fase reversa em coluna Hi-Pore RP-318 do hidrolisado tríptico da rHuEPO em diferentes tempos de hidrólise tríptica. Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradiente: 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B. Painel A: Hidrólise de 15 minutos. Painel B: Hidrólise de 1 hora. Painel C: Hidrólise de 3 horas. Painel D: Hidrólise de 24 horas. Hidrolisado tríptico da rHuEPO: vermelho. Amostra tempo zero: azul. Branco da corrida cromatográfica (ausência de amostra): verde escuro. Condutividade: marrom.

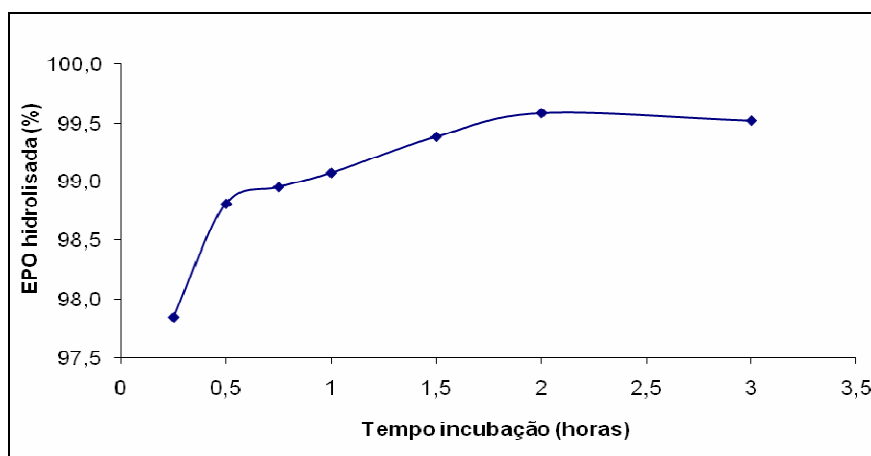


Figura 4.23: Cinética da hidrólise trípica da rHuEPO.

O pico da rHuEPO não foi detectado no hidrolisado trípico de 24 horas, ou seja, praticamente, 100% da rHuEPO foi consumida pela digestão enzimática nessa incubação. Nos outros hidrolisados, este pico foi detectado no tempo de retenção médio de 32,46 minutos, apresentando desvio padrão relativo de 0,49% (Tabela 4.7). Uma hora de incubação foi suficiente para o consumo de mais de 99% da rHuEPO.

Na incubação de 24 horas, foram detectados 18 picos cromatográficos. Em todos os outros tempos de incubação, foram obtidos 12 picos principais (numerados na Figura 4.26A), excluindo-se aquele que também é observado no branco da corrida cromatográfica (sem aplicação de amostra) e o pico que aparece no volume morto (*void*) da coluna. Este último pico refere-se aos sais do tampão de hidrólise, como indica o aumento da condutividade nessa fração cromatográfica. Salienta-se que o pico cromatográfico do branco apresentou tempo de retenção diferente dos picos referentes aos peptídeos trípticos da rHuEPO.

4.3.5 - Determinação da relação enzima/substrato

Os perfis cromatográficos dos hidrolisados trípticos de rHuEPO com 1 hora de incubação, na relação E/S de 1/50 (p/p), 1/75 (p/p), 1/100 (p/p) e 1/125 (p/p), foram sobrepostos ao perfil das amostras no tempo zero correspondentes (Figura 4.24).

As áreas dos picos referentes à rHuEPO foram utilizadas no cálculo da porcentagem da glicoproteína que foi hidrolisada por ação da tripsina adicionada em diferentes quantidades (Tabela 4.8).

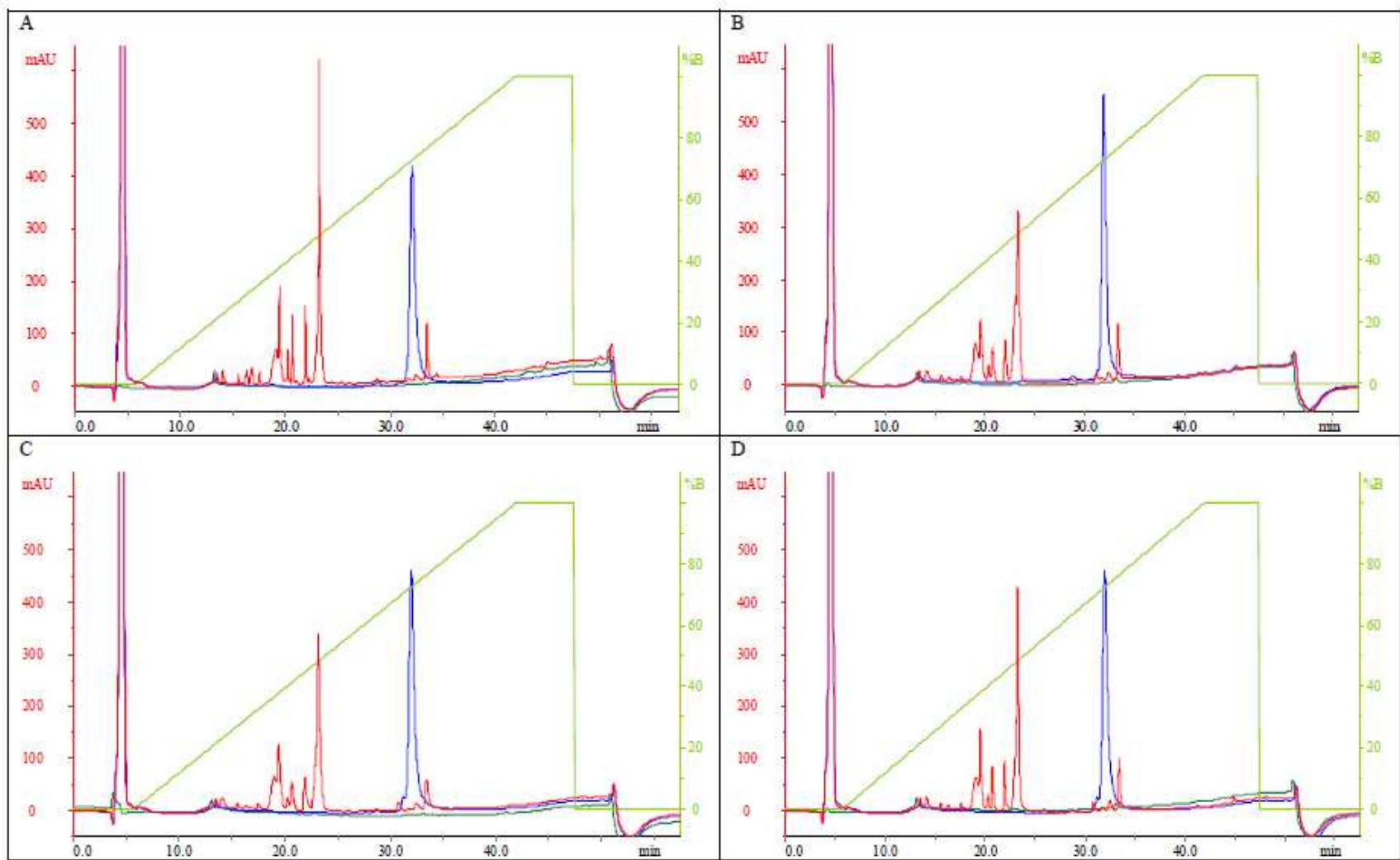


Figura 4.24: Cromatografia de fase reversa em coluna Hi-Pore RP-318 do hidrolisado tríptico da rHuEPO com diferentes relações E/S. Eluentes: TFA 0,1% (A) acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradiente: 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B. Painel A: Relação E/S de 1/50 (p/p). Painel B: Relação E/S de 1/75 (p/p). Painel C: Relação E/S de 1/100 (p/p). Painel D: Relação E/S de 1/125 (p/p). Hidrolisado tríptico da rHuEPO: vermelho. Amostra tempo zero: azul. Branco da corrida cromatográfica: verde escuro.

Tabela 4.8: Relação dos valores obtidos para tempo de retenção e área dos picos referentes à rHuEPO e sua porcentagem hidrolisada nas diferentes relações tripsina/rHuEPO.

Relação tripsina/rHuEPO (p/p)	Tempo de retenção (min)	Área do pico da rHuEPO (mAU.min)	% rHuEPO hidrolisada
Tempo zero	32,10	270,94	0
1/50	32,48	2,50	99,08
1/75	32,45	4,99	98,16
1/100	32,46	5,06	98,13
1/125	32,52	6,73	97,52

Média: 32,40

Desvio padrão: 0,171

Desvio padrão relativo: 0,53%

A relação tripsina/rHuEPO de 1/50 (p/p) foi a única que hidrolisou mais de 99% da glicoproteína. Utilizando as relações E/S de 1/75 (p/p), 1/100 (p/p) e 1/125 (p/p), o consumo foi menor que 98,2% da rHuEPO.

O perfil peptídico do hidrolisado trípico da rHuEPO com a relação E/S de 1/50 (p/p) apresentou 12 picos cromatográficos mais significativos, enquanto os hidrolisados com as outras relações E/S apresentaram 11 picos cada um, excluindo-se o pico do *void* e o pico que também aparece no branco da corrida cromatográfica.

4.3.6 - Avaliação do uso das endoproteinases Arg-C e Lys-C

Treze peptídeos foram obtidos na hidrólise virtual do substrato rHuEPO, feita pelo programa PeptideCutter[®], utilizando-se a endoproteinase Arg-C, e nove peptídeos utilizando-se a endoproteinase Lys-C. A sequência de aminoácidos, o tamanho e a massa molecular desses peptídeos são descritos nas Tabela 4.9 e 4.10.

Os perfis cromatográficos dos hidrolisados de rHuEPO empregando-se as endoproteinases Arg-C e Lys-C, sobrepostos ao perfil cromatográfico das amostras no tempo zero e do branco da corrida cromatográfica (ausência de amostra), estão apresentados na Figura 4.25. Os picos referentes à rHuEPO tiveram suas áreas calculadas para a determinação da porcentagem de proteína hidrolisada por ação das diferentes enzimas (Tabela 4.11).

Tabela 4.9: Peptídeos obtidos pelo programa PeptideCutter[®] na hidrólise teórica da rHuEPO com a endoproteínase Arg-C.

Posição do sítio de clivagem	Sequência de aminoácidos do peptídeo gerado	Tamanho do peptídeo (nº de aminoácidos)	Massa molecular (Da)
4	APPR	4	439.515
10	LICDSR	6	705.827
14	VLER	4	515.610
53	YLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP DTKVNIFYAWKR	39	4473.011
76	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	23	2526.934
103	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLR	27	2943.355
110	SLTLLR	7	802.969
131	ALGAQKEAISPPDAASAAPLR	21	2034.300
139	TITADTFR	8	924.021
143	KLFR	4	562.713
150	VYSNFLR	7	898.029
162	GKLKLYTGEACR	12	1338.588
166	TGDR	4	447.448

Tabela 4.10: Peptídeos obtidos pelo programa PeptideCutter[®] na hidrólise teórica da rHuEPO com a endoproteínase Lys-C.

Posição do sítio de clivagem	Sequência de aminoácidos do peptídeo gerado	Tamanho do peptídeo (nº de aminoácidos)	Massa molecular (Da)
20	APPRLICDSRVLERYLLEAK	20	2342.785
45	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK	25	2689.906
52	VNFYAWK	7	927.070
97	RMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQ ALLVNSSQPWEPLQLHVDK	45	5024.773
116	AVSGLRSLTLLRALGAQK	19	1955.331
140	EASPPDAASAAPLRTITADTFRK	24	2499.806
152	LFRVYSNFLRGK	12	1499.779
154	LK	2	259.349
166	LYTGEACRTGDR	12	1341.461

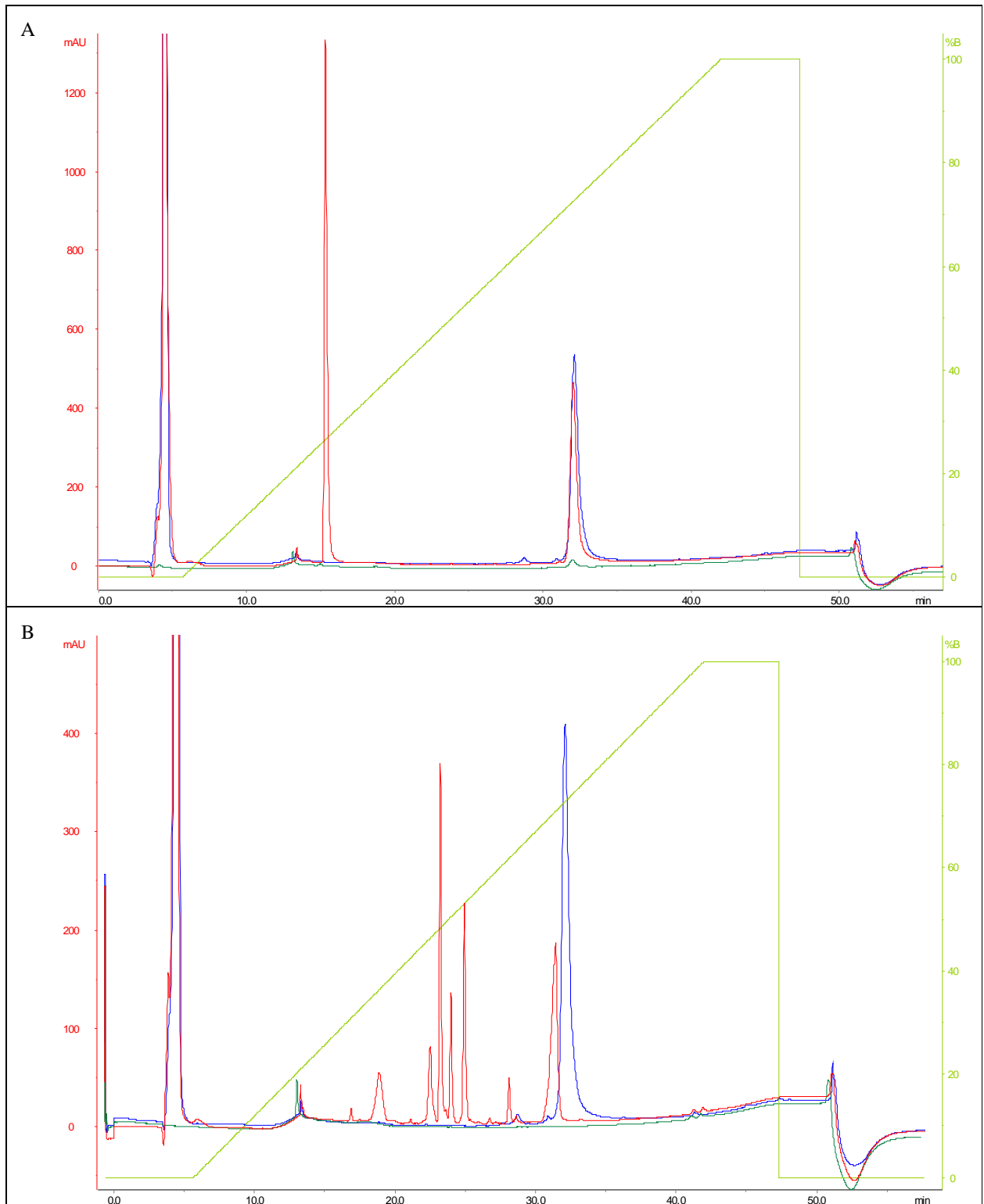


Figura 4.25: Cromatografia de fase reversa em coluna Hi-Pore[®] RP-318 do hidrolisado da rHuEPO com a endoproteínase Arg-C (Painel A) e com a endoproteínase Lys-C (Painel B). Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradiente: 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B. Hidrolisado enzimático da rHuEPO: vermelho. Amostra tempo zero: azul. Branco da corrida cromatográfica: verde escuro.

Tabela 4.11: Valores obtidos para tempo de retenção e área dos picos referentes à rHuEPO e sua porcentagem hidrolisada com as endoproteinasas Lys-C e Arg-C.

Amostra	Tempo de retenção (min)	Área do pico da rHuEPO (mAU.min)	% rHuEPO hidrolisada
Tempo zero Arg-C	32,10	270,94	0
Hidrolisado Arg-C	32,05	202,47	25,27
Tempo zero Lys-C	32,11	267,09	0
Hidrolisado Lys-C	-	-	100

A endoproteinase Arg-C hidrolisou apenas 25,27% da rHuEPO e apresentou somente dois picos na cromatografia de fase reversa. Na digestão enzimática com a endoproteinase Lys-C, houve hidrólise de 100% da rHuEPO e foram observados oito picos cromatográficos.

4.4 – Otimização da cromatografia de fase reversa dos peptídeos trípticos da rHuEPO

4.4.1 - Avaliação do gradiente cromatográfico de eluição

Os gradientes de eluição foram avaliados quanto à resolução dos picos cromatográficos e ao tempo de corrida. O perfil cromatográfico do hidrolisado da rHuEPO, com 1 hora de incubação e relação E/S de 1/50 (p/p), nos diferentes gradientes de eluição testados estão apresentados na Figura 4.26. Os 12 picos mais significativos presentes nos perfis cromatográficos foram numerados na Figura 4.26A. Os tempos de duração das corridas cromatográficas em cada gradiente estão na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Tempo de duração das corridas cromatográficas em cada gradiente testado.

Gradiente de eluição	Duração da corrida cromatográfica (min)
1	58,1
2	68,7
3	76,5
4	165,4

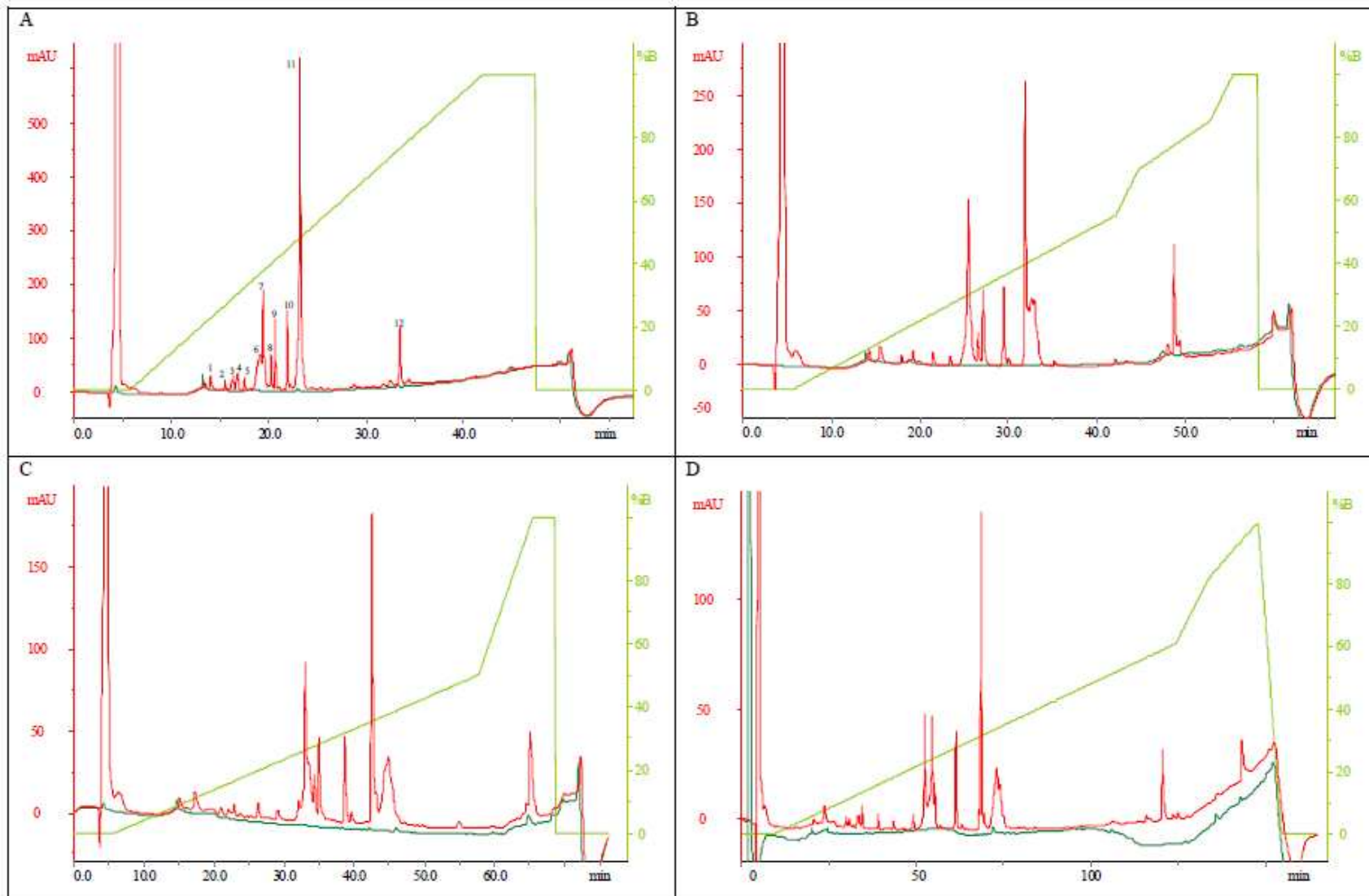


Figura 4.26: Cromatografia de fase reversa em coluna Hi-Pore® RP-318 do hidrolisado trípico da rHuEPO. Paineil A: Gradiente 1. Paineil B: Gradiente 2. Paineil C: Gradiente 3. Paineil D: Gradiente 4. Gradientes: verde claro. Hidrolisado trípico da rHuEPO: vermelho. Branco da corrida cromatográfica: verde escuro.

A região central do perfil cromatográfico, que vai do pico 6 ao 11 do gradiente 1, foi a que mais variou com as modificações no gradiente de eluição. A diminuição do ângulo de inclinação do gradiente melhorou a resolução do pico 11, o qual se separou em dois picos, entretanto, os picos 6 e 7 do gradiente 1 eluíram juntos nos outros gradientes. Portanto, não houve aumento significativo na resolução geral dos picos do perfil cromatográfico do hidrolisado tríptico da rHuEPO com o aumento do gradiente de eluição.

Os tempos de retenção médios dos 12 picos mais significativos do gradiente 1 são mostrados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Tempos de retenção médios dos picos principais observados nas triplicatas feitas com o gradiente 1 da cromatografia de fase reversa com a coluna Hi-Pore RP-318 do hidrolisado de rHuEPO.

Pico Cromatográfico	Tempo de retenção médio (min)	Desvio-padrão
1	14,02	0,08
2	15,53	0,07
3	16,25	0,07
4	16,85	0,09
5	17,55	0,06
6	18,81	0,07
7	19,47	0,06
8	20,28	0,05
9	20,72	0,05
10	21,94	0,05
11	23,25	0,06
12	33,50	0,04

4.4.2 - Avaliação da coluna cromatográfica de fase reversa C18

Os perfis cromatográficos referentes ao hidrolisado tríptico da rHuEPO (relação E/S de 1/50 p/p e hidrólise de 1 hora a 37°C) nas colunas cromatográficas de fase reversa PepMap C18 (Figura 4.27), Vydac 218TP C18 (Figura 4.28) e Delta Pak C18 (Figura 4.29) estão apresentados a seguir, sendo o perfil peptídico obtido na coluna Hi-Pore RP 318 mostrado na Figura 4.26A.

Os parâmetros de avaliação, tempo de corrida e números de picos cromatográficos, para cada coluna testada são mostrados na Tabela 4.14.

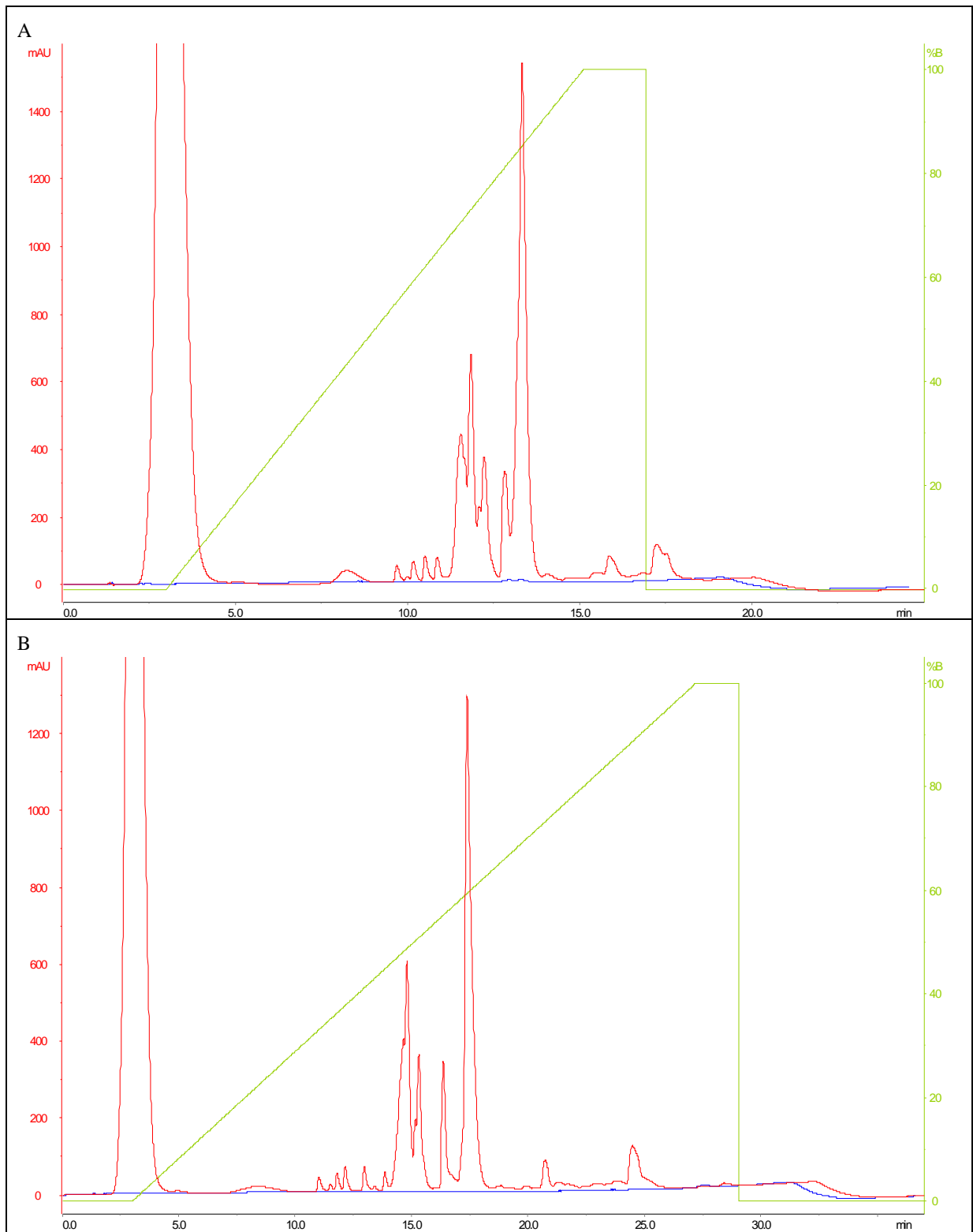


Figura 4.27: Cromatografia de fase reversa em coluna PepMap C18 do hidrolisado tríptico da rHuEPO. Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradientes: 1 volume de coluna (VC) em 0% de B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 5 VC em 0% de B (Painel A); 1 VC em 0% de B, 14 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 5 VC em 0% de B (Painel B). Hidrolisado tríptico da rHuEPO: vermelho. Branco da corrida cromatográfica: azul.

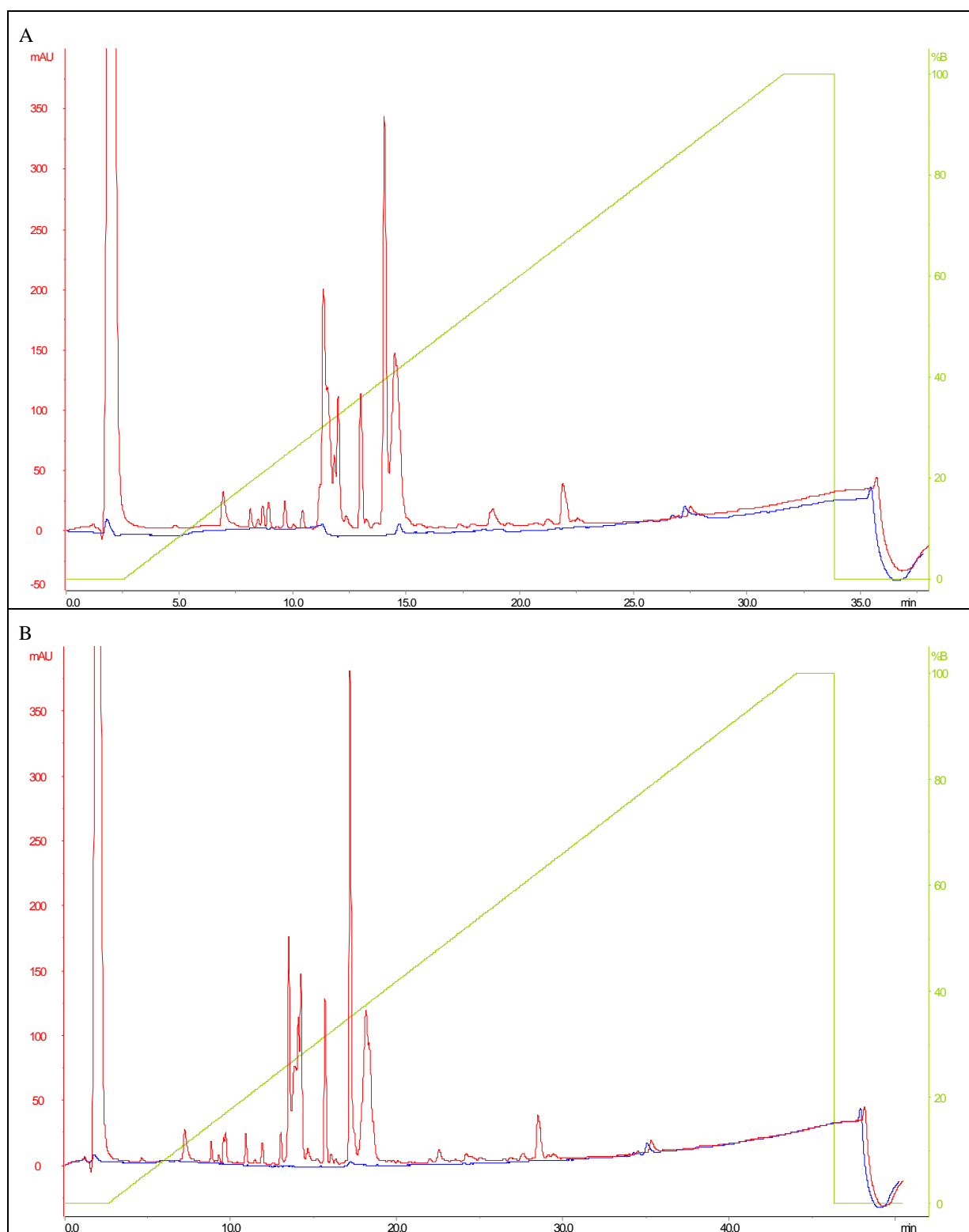


Figura 4.28: Cromatografia de fase reversa em coluna Vydac 218TP C18 do hidrolisado tríptico da rHuEPO. Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradientes: 1 volume de coluna (VC) em 0% de B, 14 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B (Painel A); 1 VC em 0% de B, 20 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B (Painel B). Hidrolisado tríptico da rHuEPO: vermelho. Branco da corrida cromatográfica: azul.

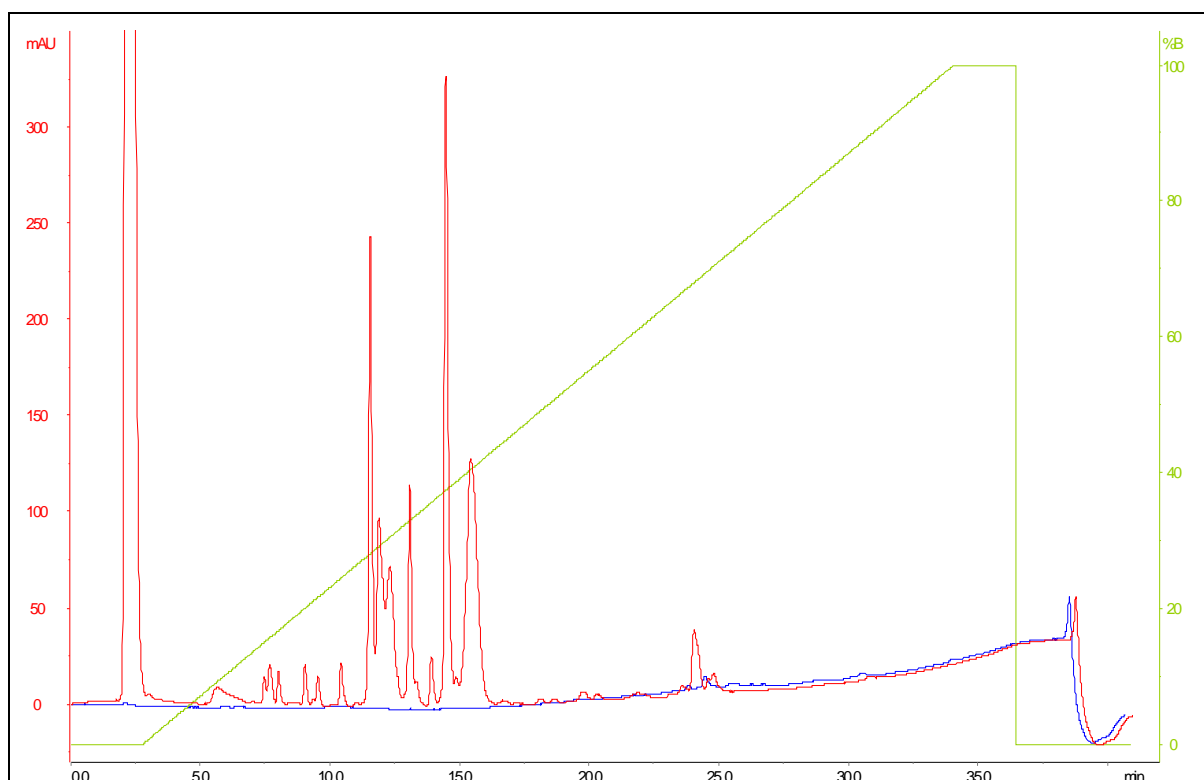


Figura 4.29: Cromatografia de fase reversa em coluna Delta Pak C18 do hidrolisado trípico da rHuEPO. Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradiente: 1 VC em 0% de B, 14 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B. Hidrolisado trípico da rHuEPO: vermelho. Branco da corrida cromatográfica: azul.

Tabela 4.14: Principais parâmetros de avaliação das colunas cromatográficas testadas no fracionamento dos peptídeos trípicos da rHuEPO por HPLC-RP-C18.

Coluna cromatográfica	Dimensões	Gradiente linear 0 a 100% B	Fluxo	Duração corrida (min)	Nº picos
Hi-Pore RP 318	4,6x250mm	7VC	0,8mL/min	58,1	12
PepMap C18	2,1x100mm	7VC	0,2mL/min	25,7	10
PepMap C18	2,1x100mm	14VC	0,2mL/min	37,8	11
Delta Pak C18	3,9x150mm	14VC	0,8mL/min	41,0	14
Vydac 218TP C18	4,6x100mm	14VC	0,8mL/min	38,1	13
Vydac 218TP C18	4,6x100mm	20VC	0,8mL/min	51,0	14

A coluna PepMap C18 apresentou baixa resolução dos picos cromatográficos. Foram observados 10 picos no primeiro gradiente e 11 no segundo, cujos tempos de retenção médios são mostrados nas Tabelas 4.15 e 4.16.

Tabela 4.15: Tempos de retenção médios dos picos principais observados nas triplicatas feitas com o gradiente 1 da cromatografia de fase reversa com a coluna PepMap C18 do hidrolisado de rHuEPO.

Pico Cromatográfico	Tempo de retenção médio (min)	Desvio-padrão
1	10,56	0,06
2	10,90	0,04
3	11,58	0,03
4	11,88	0,04
5	12,11	0,04
6	12,26	0,04
7	12,86	0,04
8	13,35	0,03
9	15,91	0,06
10	17,25	0,01

Tabela 4.16: Tempos de retenção médios dos picos principais observados nas triplicatas feitas com o gradiente 2 da cromatografia de fase reversa com a coluna PepMap C18 do hidrolisado de rHuEPO.

Pico Cromatográfico	Tempo de retenção médio (min)	Desvio-padrão
1	12,18	0,04
2	12,99	0,02
3	14,69	0,04
4	14,85	0,05
5	15,2	0,05
6	15,35	0,05
7	16,41	0,05
8	16,76	0,05
9	17,43	0,05
10	20,78	0,07
11	24,52	0,04

A coluna Delta Pak C18 gerou um perfil cromatográfico com 14 picos, cujos tempos de retenção médios são mostrados na Tabela 4.17. Com esta coluna, o pico 6 presente no gradiente 1 com a Hi-Pore RP 318 ficou suprimido e os picos 7, 8 e 9 estão pouco resolvidos, no entanto, dois novos picos apareceram, um entre os picos 10 e 11 e o outro após o pico 11.

Já a Vydac 218TP C18 apresentou perfil peptídico com 13 picos cromatográficos no primeiro gradiente e 14 no segundo, cujos tempos de retenção médios são mostrados nas Tabelas 4.18 e 4.19. O perfil dos picos da região central foi semelhante ao da coluna Delta Pak C18, com exceção daquele entre os picos 10 e 11, que não foi observado.

Tabela 4.17: Tempos de retenção médios dos picos principais observados na cromatografia de fase reversa das triplicatas feitas com a coluna Delta Pak C18 do hidrolisado de rHuEPO.

Pico Cromatográfico	Tempo de retenção médio (min)	Desvio-padrão
1	7,78	0,13
2	8,08	0,08
3	9,09	0,06
4	9,6	0,08
5	10,49	0,08
6	11,6	0,05
7	11,94	0,05
8	12,35	0,04
9	13,13	0,06
10	13,96	0,05
11	14,52	0,06
12	15,02	0,21
13	15,47	0,04
14	24,09	0,04

Tabela 4.18: Tempos de retenção médios dos picos principais observados nas triplicatas feitas com o gradiente 1 da cromatografia de fase reversa com a coluna Vydac 218TP C18 do hidrolisado de rHuEPO.

Pico Cromatográfico	Tempo de retenção médio (min)	Desvio-padrão
1	6,93	0,05
2	9,65	0,07
3	11,25	0,05
4	11,35	0,04
5	11,52	0,06
6	11,83	0,05
7	12,00	0,05
8	12,35	0,04
9	12,99	0,05
10	14,03	0,07
11	14,49	0,06
12	18,82	0,06
13	21,89	0,05

Tabela 4.19: Tempos de retenção médios dos picos principais observados nas triplicatas feitas com o gradiente 2 da cromatografia de fase reversa com a coluna Vydac 218TP C18 do hidrolisado de rHuEPO.

Pico Cromatográfico	Tempo de retenção médio (min)	Desvio-padrão
1	7,23	0,06
2	9,70	0,05
3	10,92	0,06
4	13,03	0,07
5	13,49	0,05
6	13,87	0,05
7	14,08	0,04
8	14,23	0,06
9	15,69	0,06
10	17,19	0,05
11	18,14	0,07
12	18,33	0,05
13	22,55	0,04
14	28,49	0,05

4.5 - Análise dos peptídeos trípticos da rHuEPO por espectrometria de massa

Os espectros de massa foram obtidos em modo refletido para as frações cromatográficas da cromatografia de fase reversa do hidrolisado tríptico da rHuEPO, referentes aos picos 6+7+8 (Figura 4.30), pico 9 (Figura 4.31), picos 10+11 (Figuras 4.32 a 4.34) e pico 12 (Figura 4.35). Os peptídeos identificados, por sua massa molecular, em cada fração são descritos na Tabela 4.20.

Através do programa *Mascot Search Results (Matrix Science)*, três fragmentos peptídicos foram relacionados à EPO humana (Anexo I). Foram identificados os peptídeos TITADTFR, VNFYAWK e EAISPPDAASAAPLR, cujas massas moleculares teóricas são, respectivamente, de 924.021 Da, 927.070 Da e 1.465,626 Da, segundo o programa PeptideCutter[®]. Este resultado foi obtido com uma tolerância de 0,6 Da na massa dos peptídeos. Quando foi considerada uma margem maior de tolerância, 1,2 Da, o programa identificou um peptídeo a mais, MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR (massa molecular teórica de 2.526,934 Da).

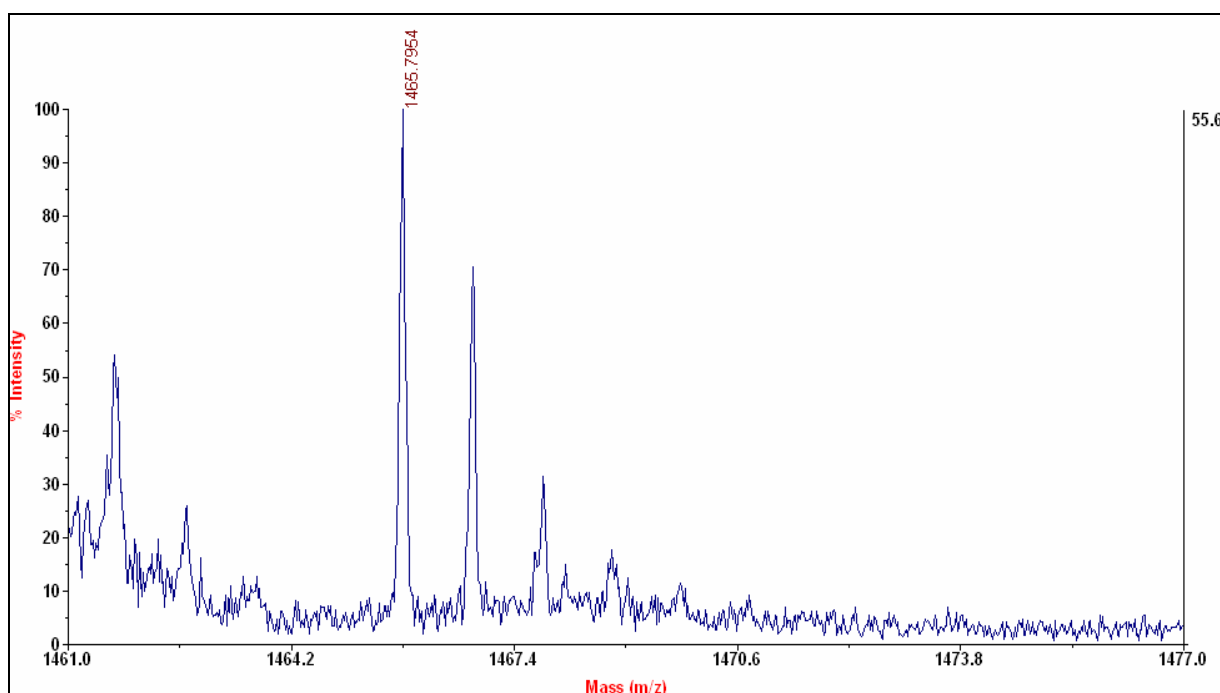


Figura 4.30: Espectrometria de massas em modo refletido da fração cromatográfica referente aos picos 6+7+8, realizada no espectrômetro de massas AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems), usando o sistema MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight*). Peptídeo identificado: EAI SPDAASAAPLR (1.465,626 Da).

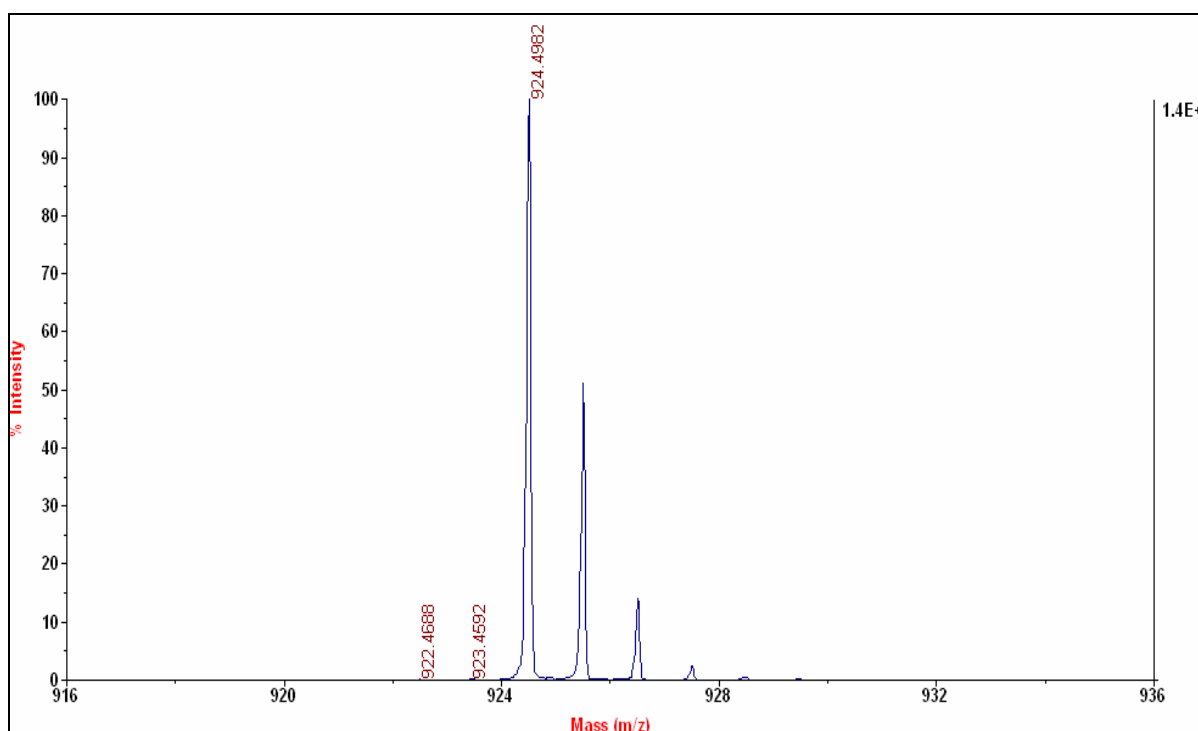


Figura 4.31: Espectrometria de massas em modo refletido da fração cromatográfica referente ao pico 9, realizada no espectrômetro de massas AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems), usando o sistema MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight*). Peptídeo identificado: TITADTFR (924,021 Da).

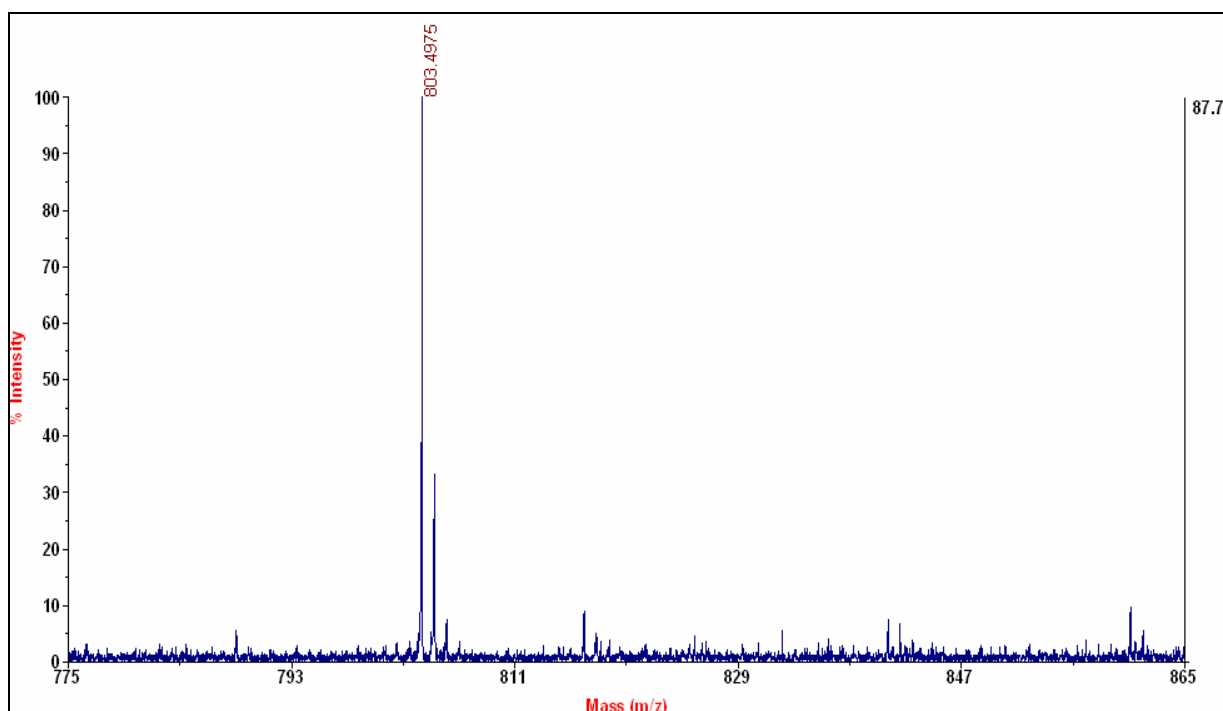


Figura 4.32: Espectrometria de massas em modo refletido da fração cromatográfica referente aos picos 10+11, realizada no espectrômetro de massas AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems), usando o sistema MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight*). Peptídeo identificado: SLTLLR (802.969 Da).

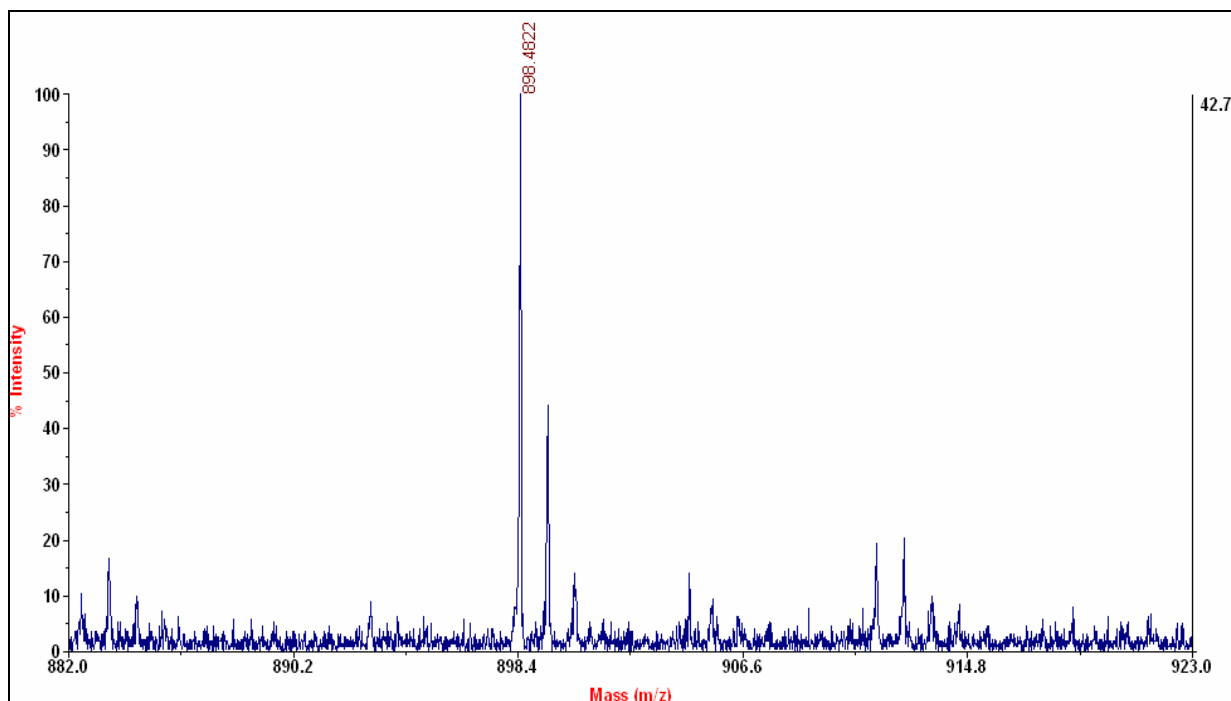


Figura 4.33: Espectrometria de massas em modo refletido da fração cromatográfica referente aos picos 10+11, realizada no espectrômetro de massas AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems), usando o sistema MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight*). Peptídeo identificado: VYSNFLR (898,029 Da).

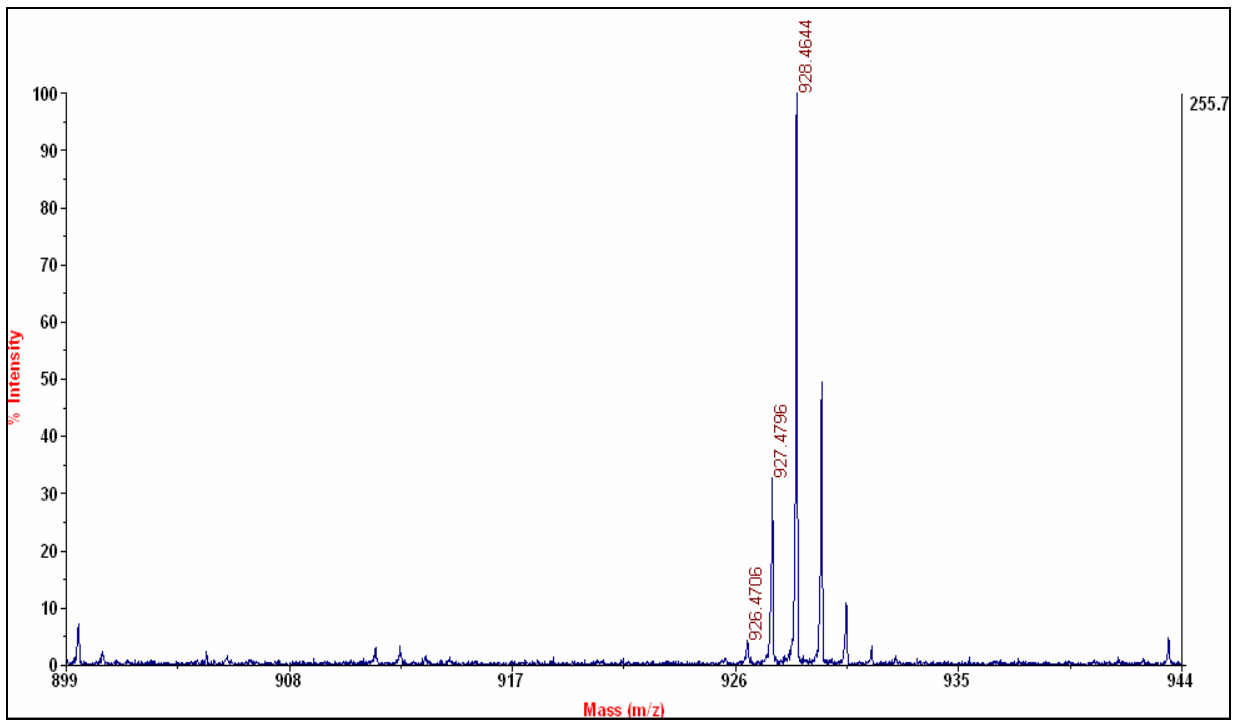


Figura 4.34: Espectrometria de massas em modo refletido da fração cromatográfica referente aos picos 10+11, realizada no espectrômetro de massas AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems), usando o sistema MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight*). Peptídeo identificado: VNFYAWK (927,070 Da).

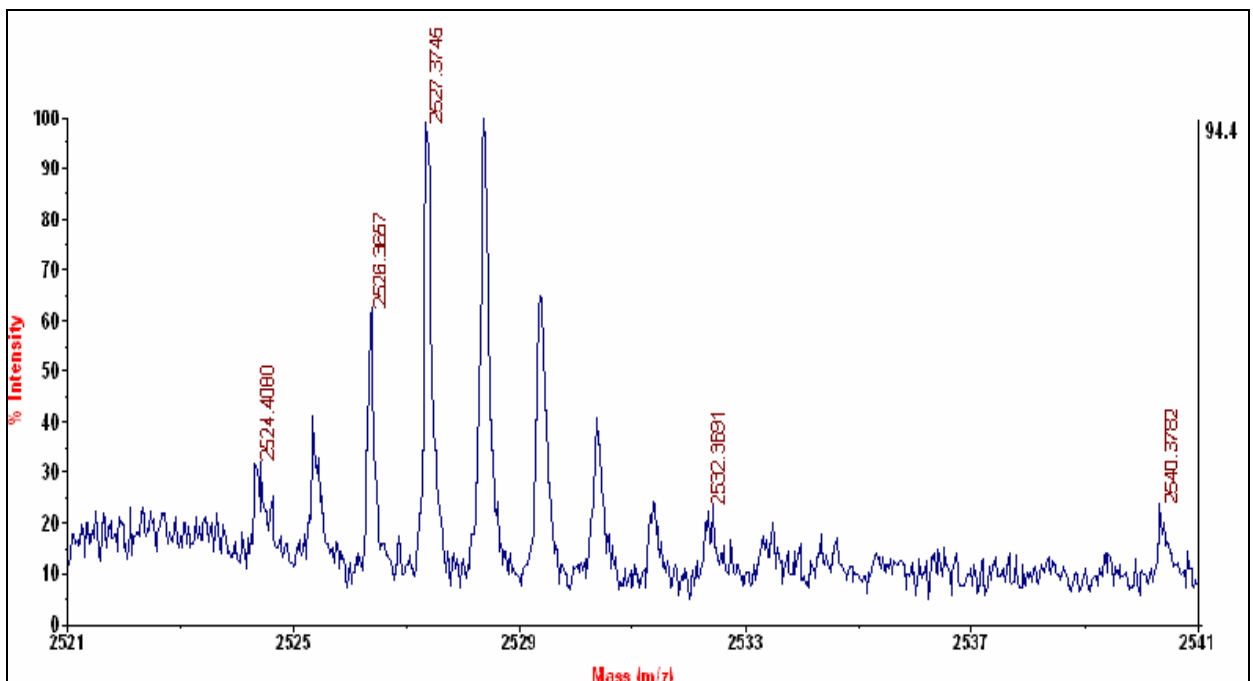


Figura 4.35: Espectrometria de massas em modo refletido da fração cromatográfica referente ao pico 12, realizada no espectrômetro de massas AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystems), usando o sistema MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight*). Peptídeo identificado: MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR (2.526,934 Da).

Tabela 4.20: Peptídeos trípticos da rHuEPO identificados na espectrometria de massas das frações cromatográficas de fase reversa do hidrolisado tríptico da rHuEPO.

Seqüência de aminoácidos do peptídeo	Massa molecular teórica (Da)	Massa molecular experimental (Da)	Fração cromatográfica
EAISPPDAASAAPLR	1.465,626	1.465,7954	Picos 6+7+8
TITADTFR	924,021	924,4982	Pico 9
SLTTLLR	802,969	803,4975	Picos 10+11
VYSNFLR	898,029	898,4822	Picos 10+11
VNFYAWK	927,070	928,4644	Picos 10+11
MEVGQQAQVEVWQGLAL LSEAVLR	2.526,934	2527,3745	Pico 12

4.6 - Especificidade da metodologia desenvolvida

O perfil cromatográfico do branco do hidrolisado tríptico de rHuEPO apresentou apenas um pico no volume morto (*void*) da coluna cromatográfica, excluindo-se o pico que também está presente na corrida feita sem amostra, como mostra a Figura 4.36.

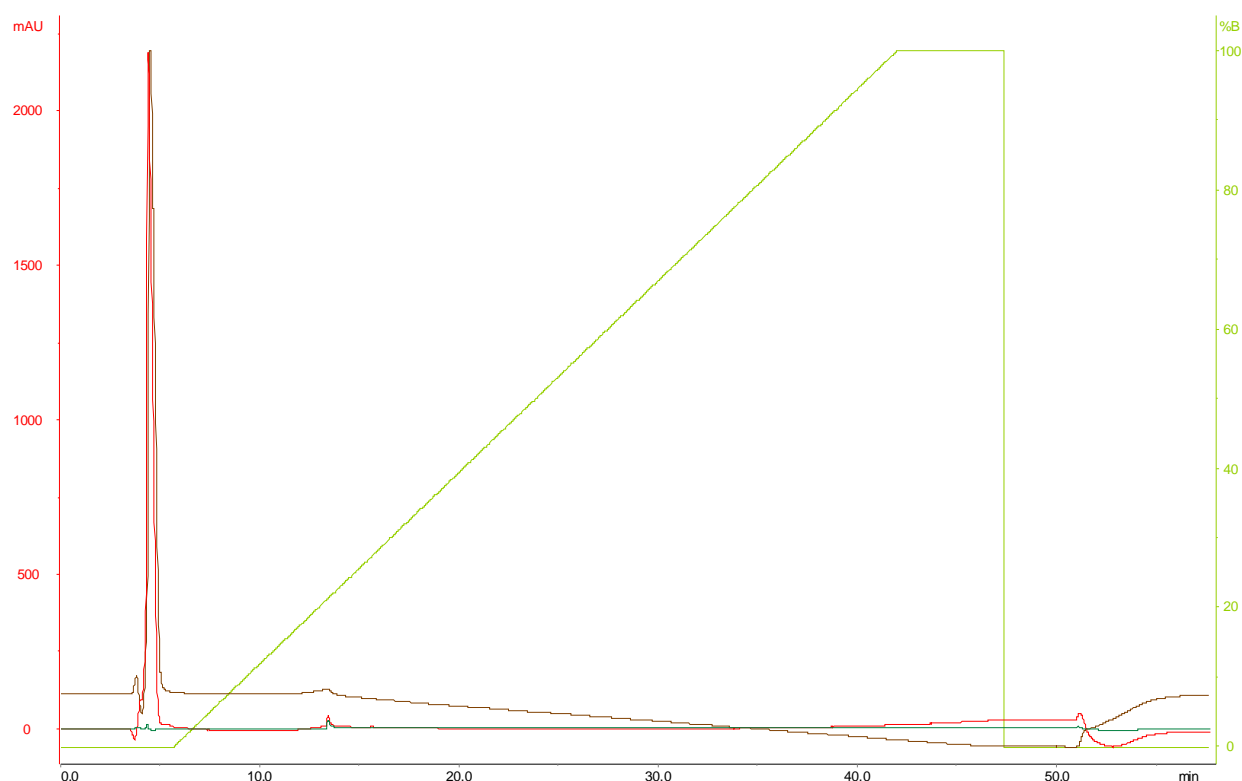


Figura 4.36: Cromatografia de fase reversa em coluna Hi-Pore® RP-318 do branco do hidrolisado tríptico da rHuEPO. Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradiente: 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B. Branco do hidrolisado: vermelho. Ausência de amostra: verde escuro. Condutividade: marrom.

Com exceção do pico do *void*, que se refere aos sais do tampão de hidrólise, os outros picos cromatográficos presentes no perfil peptídico do hidrolisado trípico da rHuEPO não foram observados para o branco do hidrolisado.

O perfil peptídico do hidrolisado trípico do quimotripsinogênio A, feito da mesma forma que o hidrolisado trípico da rHuEPO (relação E/S de 1/50 e hidrólise de 1 hora a 37°C) e analisado sob as mesmas condições de HPLC-RP-C18, é mostrado na Figura 4.37. Sem levar em conta o pico do *void*, todos os outros picos do hidrolisado trípico do quimotripsinogênio A diferiram daqueles observados no perfil peptídico do hidrolisado da rHuEPO.

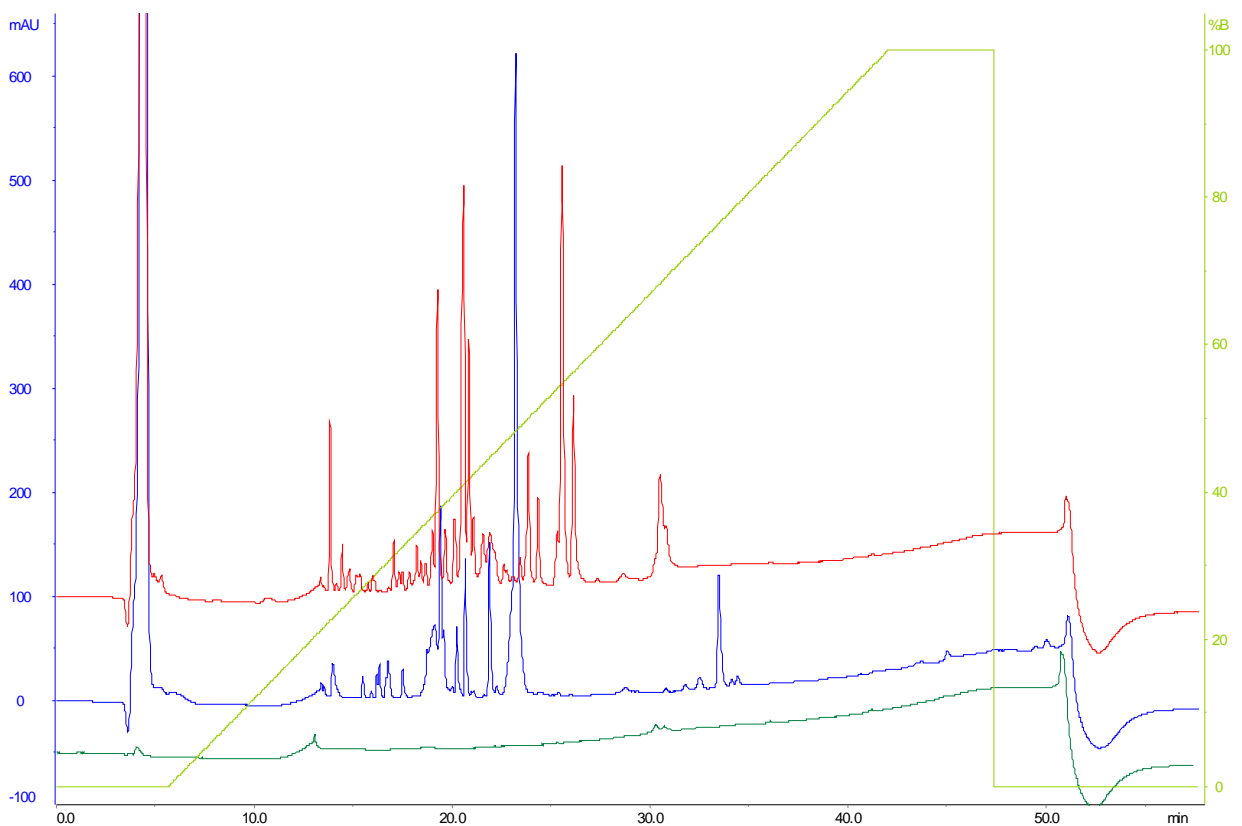


Figura 4.37: Cromatografia de fase reversa em coluna Hi-Pore® RP-318 do hidrolisado trípico do quimotripsinogênio A. Eluentes: TFA 0,1% (A) e acetonitrila 80% com TFA 0,08% (B). Gradiente: 1 volume de coluna (VC) em 0% do eluente B, 7 VC em gradiente linear de 0 a 100% de B, 1 VC em 100% de B e 2 VC em 0% de B. Hidrolisado de quimotripsinogênio A: vermelho. Hidrolisado de rHuEPO: azul. Branco da corrida cromatográfica: verde escuro.

A hidrólise enzimática virtual usando-se o substrato quimotripsinogênio A e a enzima tripsina, feita no programa PeptideCutter® para fins comparativos, mostrou 19 peptídeos. A sequência de aminoácidos, o tamanho e a massa molecular desses peptídeos são descritos na Tabela 4.21.

Tabela 4.21: Peptídeos obtidos pelo programa PeptideCutter® na hidrólise teórica do quimotripsinogênio A com a enzima tripsina.

Posição do sítio de clivagem	Sequência do peptídeo gerado	Tamanho do peptídeo (nº de aminoácidos)	Peso do peptídeo (Da)
15	CGVPAIQPVLSGLSR	15	1496.788
36	IVNGEEAVPGSWPWQVSLQDK	21	2339.590
79	TGFHFCCGSLINENWVVTAAHCGVTTS DVVVAGEFDQGSSEK	43	4444.828
82	IQK	3	387.479
84	LK	2	259.349
87	IAK	3	330.428
90	VFK	3	392.499
93	NSK	3	347.371
107	YNSLTINNDITLLK	14	1621.851
145	LSTAASFSQTVSAVCLPSASDDFAAGTT CVTTGWGLTR	38	3781.181
154	YTNANTPDR	9	1051.081
169	LQQASLPLLSNTNCK	15	1629.892
170	K	1	146.189
175	YWGTK	5	653.736
177	IK	2	259.349
202	DAMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCK	25	2316.678
203	K	1	146.189
230	NGAWTLVGIVSWGSSCSTSTPGVYAR	27	2758.058
245	VTALVNWVQQTLAN	15	1627.861

5- DISCUSSÃO

5.1 - Homogeneidade protéica e caracterização físico-química da rHuEPO

As concentrações de rHuEPO na solução original estimadas pelos métodos de Folin-Lowry modificado e espectrofotométrico de absorção a 280 nm foram semelhantes (Item 4.2.1). O método de quantificação protéica utilizado como referência foi o de absorção a 280 nm, por se tratar de um método mais simples e utilizar o coeficiente de extinção obtido a partir do padrão de EPO, enquanto que para o método de Folin-Lowry modificado utilizou-se uma proteína diferente (BSA) como padrão protéico para a curva de calibração.

A amostra de IFA da rHuEPO apresentou pureza estimada maior que 94% por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% (Item 4.1.1, último parágrafo). Em cada raia, a banda eletroforética relativa à rHuEPO mostrou-se difusa (Figura 4.1), sendo esta uma característica dessa glicoproteína, que apresenta isoformas com mobilidades eletroforéticas muito próximas devido à microheterogeneidade de suas cadeias glicídicas (Schmidt, 2003). Os dados da curva área da banda eletroforética *versus* massa de rHuEPO aplicada (Figura 4.4) apresentaram uma boa correlação (R^2 de 0,991), sugerindo que preparações, homogêneas ou não, de rHuEPO com concentrações desconhecidas, podem ser quantificadas por meio da avaliação da área da banda eletroforética obtida por SDS-PAGE 12% sob as condições estabelecidas, contra uma curva de calibração usando-se amostras de rHuEPO com concentrações conhecidas.

Na cromatografia de fase reversa em coluna C4, apesar da visualização de dois picos cromatográficos (Figura 4.5), não foram detectadas proteínas contaminantes na amostra, pois nenhuma banda protéica foi identificada por SDS-PAGE 8-25% para a fração cromatográfica correspondente ao pico do volume morto (*void*) da coluna de fase reversa (Figura 4.6). A fração cromatográfica eluída no gradiente de acetonitrila apresentou uma banda eletroforética na SDS-PAGE 8-25% com peso molecular (PM) estimado de 33.516 (Figura 4.7), indicando ser a

rHuEPO, cujo PM citado na literatura varia entre 30.000 e 34.000 (Choi et al., 1996; Schmidt et al., 2003).

O valor médio de PM da rHuEPO estimado em outro gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) 8-25%, feito com triplicatas, foi 30.988 (Figura 4.10). Este resultado apresentou coerência com os dados da literatura. Essa variação ocorre devido à heterogeneidade das cadeias glicídicas da rHuEPO. Vale ressaltar que o PM obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida é uma estimativa e não uma medida exata, podendo apresentar uma incerteza de cerca de 5%, de acordo com Hames & Rickwood (1990). Além disso, segundo Segrest & Jackson (1972), no caso das glicoproteínas, o valor de peso molecular observado por SDS-PAGE pode ser cerca de 1.000 Da maior que o seu peso molecular real para cada 10% da glicoproteína representado por glicídeos. Esse efeito ocorre porque as glicoproteínas, em função do impedimento estérico das cadeias glicídicas, apresentam um menor número de ligações com o dodecil sulfato de sódio (SDS) em comparação as proteínas padrões, o que provoca uma menor mobilidade na SDS-PAGE e, conseqüentemente, um peso molecular aparente maior do que o real (Segrest & Jackson, 1972). Como a rHuEPO apresenta aproximadamente 40% da sua massa composta por glicídeos, o peso molecular obtido por SDS-PAGE pode ser cerca de 4.000 Da acima do valor verdadeiro. De acordo com Segrest & Jackson (1972), para uma estimativa mais acurada do peso molecular mínimo assintótico de uma glicoproteína, as corridas eletroforéticas devem ser feitas em gel de poliacrilamida mais concentrado (de 15% ou mais). O peso molecular aparente diminui com o aumento da concentração do gel, uma vez que a baixa ligação ao SDS é compensada com a diminuição da porosidade do gel (Segrest & Jackson, 1972). Por este motivo, foi utilizado o gel de gradiente de concentração 8-25% na estimativa do peso molecular da rHuEPO.

Por espectrometria de massa, a rHuEPO apresentou massa molecular de 26.878 Da (Figura 4.12). Segundo Guo-Hua et al. (1999), o pico largo observado é característica das glicoproteínas heterogêneas. De acordo com o mesmo autor, quanto maior a largura do pico, maior a heterogeneidade glicídica da glicoproteína. O valor de peso molecular (PM) encontrado está abaixo do PM citado na literatura, que é de 30.000 a 34.000, etimado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Choi et al., 1996; Schmidt et al., 2003). Na análise de glicoproteínas intactas por MALDI-TOF, grupos lábeis como ácidos siálicos e N-acetilglicosamina tendem a se fragmentar no sistema de ionização ou durante a aceleração (Gimenez et al., 2007; Gimenez et al., 2010). Portanto, parte das cadeias glicídicas presentes na molécula da rHuEPO pode ter sido retirada. Essa perda de porção glicídica provocaria, então, a obtenção de uma massa molecular

menor, como foi observado nesta dissertação. De acordo com Gimenez et al. (2007), a matriz mais adequada para obter valores confiáveis de massa molecular de glicoproteínas intactas por MALDI-MS seria a matriz sólida DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzóico), que reduz a fragmentação dos glicídeos. No entanto, a matriz DHB apresenta dificuldade na reprodutibilidade dos resultados, aumentando o tempo necessário para realizar as medições (Gimenez et al., 2010). Recentemente, alguns trabalhos têm sugerido que líquidos iônicos são matrizes melhores para a análise de glicopeptídeos por MS, pois aumentam a homogeneidade local e impedem a fragmentação que ocorre utilizando matrizes sólidas (Fukuyama et al., 2008; Ullmer & Rizzi, 2009; Gimenez et al., 2010). As matrizes de líquido iônico são sais orgânicos formados por misturas equimolares de matrizes ácidas cristalinas e bases orgânicas. Portanto, o mais correto teria sido usar uma matriz de líquido iônico, ou ainda DHB, em vez da matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), já que se trata de uma análise de glicoproteína.

Com relação à estimativa dos valores de ponto isoelétrico (pI) para a rHuEPO, tanto por focalização isoelétrica quanto por cromatofocalização, observou-se a presença de isoformas com valores de pI na faixa entre 3,5 e 4,1 (Figuras 4.14 e 4.16). As metodologias utilizadas para determinação de pI foram congruentes em relação à faixa de pI das isoformas encontradas, tendo sido observadas, pelo menos, quatro isoformas na cromatofocalização e três bandas distintas no IEF-PAGE. A identificação do menor número de isoformas da rHuEPO no IEF-PAGE pode ser consequência da falta de resolução da eletroforese, devido à ampla faixa de pH do gel utilizado (3 a 9). Uma estimativa mais acurada por IEF-PAGE poderia ser feita utilizando-se géis semi-secos com gradiente de pH entre 2,5 e 5,0. Observou-se, também, que os valores de pI obtidos foram menores do que aqueles descritos na literatura para a EPO nativa. Segundo Choi et al. (1996), as isoformas de EPO possuem pI na faixa de 4,5 a 5,0. Essa variação está relacionada, principalmente, com o nível de ácido siálico presente nas extremidades das cadeias glicídicas da molécula. A presença de maior quantidade de ácido siálico torna o pI da rHuEPO mais baixo. Gokana et al. (1997) encontrou mais de dez isoformas em amostras de rHuEPO purificadas com pI entre 3 e 7. Portanto, os dados obtidos para a amostra avaliada podem ser um indicativo da presença de isoformas com altos níveis de ácido siálico. Moléculas de rHuEPO com alto teor de ácido siálico são desejáveis para seu uso como agente terapêutico, uma vez que a presença de moléculas de ácido siálico aumenta a permanência do biofármaco no organismo, potencializando seu efeito farmacológico.

Com relação à mobilidade relativa por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (Figura 4.17 e 4.18), o desvio padrão entre os valores de Rf da rHuEPO foi baixo, 0,006 (Tabela 4.4). A boa correlação ($R^2 = 0,9986$) entre os valores do volume da banda eletroforética e da massa de amostra aplicada indicaram que esta metodologia também pode ser empregada para a quantificação de amostras de rHuEPO, através da equação polinomial estabelecida (Figura 4.19). Cabe ressaltar, ainda, que a amostra em questão, aplicada em quantidades crescentes na eletroforese, apresentou-se homogênea por mais esse critério de pureza.

5.2 - Padronização da hidrólise enzimática da rHuEPO

Para a definição de uma metodologia de mapeamento peptídico, todos os insumos envolvidos devem ser qualificados. Neste contexto, a enzima tripsina, utilizada na hidrólise enzimática da rHuEPO, foi avaliada quanto a sua atividade enzimática. Essa avaliação pode ser feita utilizando diversos substratos, sendo os principais a azocaseína (Charney & Tomarelli, 1947) e o N- α -benzoil-L-arginina-etil éster (Oliveira et al., 1993). No entanto, estas metodologias convencionais são limitadas em relação à disponibilidade ou ao custo dos substratos utilizados, além da baixa solubilidade no caso da azocaseína. No sentido de facilitar a avaliação da tripsina, um ensaio simples para quantificar a atividade proteolítica desta enzima foi desenvolvido, nesta dissertação, usando-se o padrão de BSA como substrato e a cromatografia de fase reversa como metodologia para fracionamento do hidrolisado de BSA. Os resultados foram expressos em termos de percentual de BSA hidrolisada, entretanto, a relação de massa de BSA hidrolisada por unidade de tempo pode ser definida como uma Unidade de Atividade (UA), desde que as condições de hidrólise e análise cromatográfica sejam bem definidas. Essa metodologia foi bastante simples, rápida e de menor custo em relação às outras sugeridas. Como resultado desta abordagem, foi obtida uma hidrólise de mais de 90% da quantidade total de BSA por ação da tripsina, após 1 hora de incubação a 37°C, com relação E/S de 1/50 (p/p) e concentração de BSA igual a 1 mg/mL (Tabela 4.6). O ensaio de hidrólise de BSA também foi utilizado para avaliar a atividade enzimática da tripsina após 30 dias de armazenamento a - 20°C, observando-se uma queda no grau de hidrólise para valores menores que 60% da quantidade total de BSA. Essa perda de atividade proteolítica pode ser resultante de reações de autólise da enzima ou de inativação pelas condições de armazenamento. Devido a esse resultado, neste trabalho, as hidrólises da

rHuEPO foram realizadas com soluções de tripsina recém-preparadas. No entanto, se um estudo mais aprofundado sobre a estabilidade da tripsina em solução for realizado, será possível estabelecer até quantos dias, após sua reconstituição, a enzima poderá ser utilizada sem prejuízos significativos a sua atividade proteolítica.

Antes de hidrolisar as amostras de IFA da rHuEPO, esta precisa ser dessalinizada para retirar todos os componentes dessa preparação. A cromatografia de exclusão e peneiração molecular em coluna HiTrap Desalting (Sephadex G25) foi a metodologia selecionada para realizar a dessalinização da amostra, uma vez que mostrou-se uma técnica simples, rápida e eficiente (Item 4.3.3).

A hidrólise de proteínas para mapeamento peptídico deve ser realizada em condições otimizadas para cada enzima selecionada. Em função da natureza do substrato, ajustes nos parâmetros reacionais, como pH, temperatura, relação enzima/substrato (E/S), concentração de substrato e tempo de incubação, podem ser necessários. No estudo da hidrólise trípica da rHuEPO realizadas nesta dissertação, os parâmetros de tempo de incubação e relação E/S (p/p) foram alterados separadamente, e utilizou-se o pH ótimo da tripsina (pH 8,5) e a temperatura máxima suportada pela enzima, 37°C (Promega Corporation, 2009). A concentração da rHuEPO foi mantida constante em 1 mg/mL para todos os ensaios devido à limitação de quantidade de amostra fornecida.

Com exceção do hidrolisado de 24 horas de incubação, que é um tempo muito longo para ser aplicado para ensaios de controle em processo, o número de peptídeos gerados (picos cromatográficos observados na fase reversa) foi igual para todos os hidrolisados. Sendo assim, o tempo de incubação para a reação hidrolítica da rHuEPO ficou estabelecido em 1 hora, já que, com esse tempo, a hidrólise de 99% da glicoproteína é conseguida e o perfil peptídico é semelhante em relação aos hidrolisados de 2 e 3 horas (Tabela 4.7 e Figura 4.22). O hidrolisado de 15 minutos de incubação apresentou perfil peptídico similar ao do hidrolisado de 1 hora de incubação e hidrolisou 97% da rHuEPO. Tratando-se de um ensaio de controle em processo, os tempos de incubação de 15 e 30 minutos poderiam ser empregados para diminuir o tempo de análise.

A relação tripsina/rHuEPO de 1/50 (p/p) foi a única que hidrolisou mais de 99% da glicoproteína (Tabela 4.8). Utilizando as relações E/S de 1/75 (p/p), 1/100 (p/p) e 1/125 (p/p), o consumo foi menor que 98,2% da rHuEPO. O perfil peptídico do hidrolisado com E/S de 1/50 (p/p) apresentou 12 picos mais significativos, enquanto os outros hidrolisados apresentaram 11

picos cada uma (Figura 4.24). Diante destes resultados, a relação tripsina/rHuEPO ficou estabelecida em 1/50 (p/p), uma vez que apresentou o maior grau de hidrólise da rHuEPO e um perfil cromatográfico com mais peptídeos observados.

De acordo com o PeptideCutter[®], a hidrólise trípica da rHuEPO produz dezenove peptídeos e dois aminoácidos (Tabela 4.5), uma vez que esta glicoproteína possui doze resíduos de arginina e oito resíduos de lisina. Na prática, no entanto, foi observada uma quantidade menor de fragmentos peptídicos. Isto se deve à formação de pequenos peptídeos e aminoácidos isolados, que podem sair no volume morto (*void*) da coluna cromatográfica de fase reversa ou não são passíveis de detecção em função do tamanho. Outra causa provável para a redução de números de fragmentos encontrados seria a presença de sítios de clivagem não acessíveis ou com cinética de hidrólise mais lenta, causadas por impedimento estérico ou repulsão de cargas, respectivamente (Oliveira et al., 1993).

O uso de outras enzimas, como as endoproteinases Arg-C e Lys-C, foi avaliado como uma alternativa ao uso da tripsina. Teoricamente, a hidrólise enzimática da rHuEPO com a endoproteinase Arg-C produz treze peptídeos (Tabela 4.9) e, com a endoproteinase Lys-C, nove peptídeos (Tabela 4.10), segundo o programa PeptideCutter[®]. No entanto, como já discutido anteriormente, nem todos os peptídeos obtidos na teoria são observados na prática. Em função do número reduzido de peptídeos, as endoproteinases Arg-C e Lys-C foram consideradas boas opções de enzimas para serem utilizadas no estudo para mapeamento peptídico da rHuEPO, pois um número menor de peptídeos gerados pode significar uma maior resolução dos picos cromatográficos no mapa peptídico por cromatografia de fase reversa. A hidrólise enzimática com a endoproteinase Arg-C não foi bem-sucedida nas condições estabelecidas, apresentando hidrólise de somente 25,27% da rHuEPO e perfil cromatográfico do hidrolisado de rHuEPO com apenas dois picos (Tabela 4.11 e Figura 4.25A). Melhores resultados poderiam ser obtidos com a otimização das condições de hidrólise, como o aumento do tempo de incubação e/ou maior relação E/S, no entanto, essas mudanças tornariam a endoproteinase Arg-C uma opção desfavorável, economicamente, em relação à hidrólise enzimática com a tripsina. A hidrólise da rHuEPO realizada com a endoproteinase Lys-C, por outro lado, foi de 100% e apresentou um perfil peptídico com oito picos cromatográficos principais (Tabela 4.11 e Figura 4.25B). A resolução cromatográfica do mapa peptídico do hidrolisado da rHuEPO com a endoproteinase Lys-C foi altamente satisfatório, embora as condições da cromatografia de fase reversa não tenham sido otimizadas para este hidrolisado. Os picos cromatográficos foram bem definidos, em

sua maioria. Do ponto de vista metodológico, a endoproteinase Lys-C representou uma alternativa melhor em relação à tripsina, no entanto, se for levado em consideração o custo das duas enzimas, a tripsina se torna mais vantajosa. Apenas para ilustrar a disparidade do valor de cada uma destas enzimas, a tripsina *Sequencing Grade* pode ser comprada em frascos contendo 100 µg por R\$216,00 (Promega Corporation, 2011a) e a endoproteinase Lys-C *Sequencing Grade* é comercializada em frascos contendo 5 µg por R\$420,00 (Promega Corporation, 2011b), ou seja, peso por peso, o custo da endoproteinase Lys-C é cerca de trinta e nove vezes maior do que o custo da tripsina (R\$2,16/µg de tripsina contra R\$84,00/µg de endoproteinase Lys-C).

5.3 – Otimização da cromatografia de fase reversa dos peptídeos trípticos da rHuEPO

Inicialmente, os experimentos foram realizados com a coluna Hi-Pore RP 318 por uma questão de disponibilidade. Tal coluna mostrou-se apta para utilização na metodologia de mapeamento peptídico, com baixa dispersão dos tempos de retenção de um mesmo pico cromatográfico em diferentes corridas, sendo os desvios padrões menores que 0,1 (Tabela 4.13). As alterações no gradiente de eluição da coluna Hi-Pore RP 318 não mostraram ganhos significativos. Apesar da diminuição do ângulo de inclinação do gradiente, não foi observada uma maior resolução dos picos cromatográficos do hidrolisado tríptico da rHuEPO, de uma forma geral (Figura 4.26). Em suma, considerando os parâmetros resolução cromatográfica e tempo de corrida, o gradiente de eluição mais vantajoso para a coluna Hi-Pore RP 318 seria o gradiente 1, que obteve resoluções satisfatórias dos picos e apresentou o menor tempo de duração para a corrida cromatográfica (Tabela 4.12). De qualquer forma, independente do gradiente utilizado, o tempo de corrida com a Hi-Pore RP 318 foi menor do que o utilizado no CIM, representando uma redução significativa no tempo de análise.

A utilização de outras colunas cromatográficas de fase reversa foi avaliada, tendo como principal objetivo estabelecer alternativas à coluna Hi-Pore RP 318 que tenham melhor resolução cromatográfica dos peptídeos e menor tempo de corrida. Estes são parâmetros importantes a serem considerados em um ensaio de mapeamento peptídico. Com exceção da PepMap C18, que apresentou uma resolução ruim dos picos, as outras colunas sugeridas, Delta Pak C18 e Vydac 218TP C18, poderiam ser usadas em substituição a Hi-Pore RP C18 para o fracionamento dos peptídeos trípticos da rHuEPO, uma vez que mostraram resoluções cromatográficas mais satisfatórias dos picos e tempos de corrida menores (Figuras 4.27 a 4.29 e Tabela 4.14).

Ademais, estas colunas também apresentaram baixa dispersão entre os tempos de retenção de um mesmo pico em corridas distintas (Tabelas 4.15 a 4.19). Estudos adicionais de otimização de gradiente para essas colunas de fase reversa podem ser feitos com a finalidade de diminuir ainda mais o tempo de análise dos peptídeos trípticos da rHuEPO. No entanto, mesmo considerando a corrida cromatográfica mais demorada, 58 minutos com a coluna Hi-Pore RP C18, o tempo de duração foi reduzido em 1 hora e 42 minutos em relação à que é empregada no CIM.

5.4 - Análise dos peptídeos trípticos da rHuEPO por espectrometria de massa

A análise por espectrometria de massa das quatro principais frações cromatográficas, oriundas da cromatografia de fase reversa do hidrolisado de rHuEPO, identificou seis fragmentos peptídicos cujas massas moleculares estão relacionadas com peptídeos trípticos teóricos desta glicoproteína (Figuras 4.30 a 4.35 e Tabela 4.20). O peptídeo E AISPPDAASAAPLR, identificado no espectro de massa da fração referente aos picos 6+7+8, é o menos hidrofóbico dos seis peptídeos observados, pois se trata de um glicopeptídeo com um sítio de O-glicosilação no segundo resíduo de serina (S) (Lai et al., 1986; Choi et al., 1996). Devido a isto, este peptídeo eluiu antes dos demais na cromatografia de fase reversa. Ademais, a baixa resolução entre os picos 6 e 7 e a presença de ombros são mais um indício da presença de glicopeptídeo que apresenta microheterogeneidade glicídica. A observação da massa exclusiva da cadeia polipeptídica do referido peptídeo no espectro de massa sugere que houve a retirada total da porção glicídica durante o processo de ionização (Gimenez et al., 2010). Os outros fragmentos peptídicos encontrados não possuem cadeia glicídica e a ordem de eluição na cromatografia de fase reversa foi condizente com o teor de resíduos hidrofóbicos (Tabela 4.20). O peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR é o maior peptídeo tríptico da rHuEPO, em número de aminoácidos, que não possui cadeia glicídica (Lai et al., 1986; Choi et al., 1996), portanto é o mais hidrofóbico, confirmado pela sua observação na fração cromatográfica referente ao pico mais adsorvido na fase reversa (pico 12). Os três fragmentos peptídicos identificados na fração dos picos 10+11 (SLTTLLR, VYSNFLR e VNFYAWK) são similares em tamanho e em composição de aminoácidos, e por isso, eluíram juntos ou próximos.

Através do programa *Mascot Search Results*, a identidade dos fragmentos peptídicos analisados foi confirmada como EPO humana (Anexo I), legitimando a metodologia de mapeamento peptídico desenvolvida nesta dissertação.

5.5 - Especificidade da metodologia desenvolvida

A especificidade é o único parâmetro de validação exigido, pela resolução RE n° 899/2003, para o tipo de método analítico a que pertence a técnica desenvolvida de mapeamento peptídico: Teste de Identificação (Categoria IV). Esta resolução descreve que, para a análise qualitativa (teste de identificação), especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes com estruturas relacionadas que podem estar presentes na amostra (Brasil, 2003). Segundo a RE n° 899/2003, essa capacidade deve ser confirmada pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o composto alvo e de resultados negativos obtidos com amostras que não contém o composto alvo, mas sim compostos estruturalmente semelhantes.

Para atender esse requisito, avaliamos a metodologia com um branco do hidrolisado da rHuEPO e com um hidrolisado de quimotripsinogênio A. O padrão de quimotripsinogênio A foi selecionado como um composto estruturalmente semelhante ao biofármaco analisado, devido ao fato de ser o padrão protéico, dentre os disponíveis, que apresentou o número de resíduos de arginina e lisina mais próximo ao da rHuEPO. Dessa forma, o número de peptídeos a serem gerados na hidrólise trípica é semelhante, de acordo com o programa PeptideCutter® (quimotripsinogênio A -19 peptídeos; rHuEPO - 21 peptídeos).

O perfil cromatográfico em HPLC-RP-C18 do branco da hidrólise (Figura 4.36) e do hidrolisado do quimotripsinogênio A (Figura 4.37, em vermelho) foram distintos em relação ao perfil peptídico do hidrolisado da rHuEPO (Figura 4.37, em azul), corroborando que a metodologia de mapeamento peptídico desenvolvida é específica para a rHuEPO.

Tendo sido demonstrada sua especificidade, a metodologia para obtenção do mapa peptídico da rHuEPO, conforme o procedimento mostrado no fluxograma do Anexo II, foi considerada apta para ser empregada como ensaio do controle em processos da produção deste biofármaco em Bio-Manguinhos.

6- CONCLUSÕES

- A amostra de rHuEPO fornecida pelo CIM mostrou uma homogeneidade protéica adequada por critérios eletroforéticos e cromatográficos, possibilitando a realização do estudo de mapeamento peptídico para essa glicoproteína.
- Considerando-se a ação hidrolítica observada, a eficiência do processo e o custo das enzimas envolvidas (tripsina, endoproteinase Arg-C e endoproteinase Lys-C), a tripsina mostrou-se mais vantajosa.
- As condições de hidrólise triptica da rHuEPO, por fim, estabelecidas nesta dissertação (1 hora de hidrólise com relação tripsina/rHuEPO de 1/50 p/p) apresentou uma vantagem significativa em relação àquelas usadas no CIM, com redução de tempo em, pelo menos, 2 horas.
- As colunas cromatográficas de fase reversa Hi-Pore RP 318, Vydac 218TP C18 e Delta Pak C18 mostraram-se apropriadas para o fracionamento peptídico desejado, e apresentaram uma diminuição no tempo de corrida cromatográfica de, pelo menos, 1 hora e 42 minutos em comparação àquela realizada no CIM.
- Objetivando sua aplicação no controle em processo da produção da rHuEPO, a especificidade da metodologia desenvolvida foi comprovada, através do confronto do perfil peptídico da glicoproteína (resultados positivos) em relação ao perfil do branco e do hidrolisado do quimotripsinogênio A (resultados negativos), como preconiza a RE n° 899/2003 da Anvisa (Brasil, 2003).

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed H. **Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization.** 1st ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2005.

Amersham Pharmacia Biotech. **Gel filtration – Principles and Methods.** 8th ed. Uppsala (Suécia): Amersham Pharmacia Biotech AB; 1998.

Andersen DC, Krummen L. **Recombinant protein expression for therapeutic applications.** *Biochemical engineering* 2002; 13: 117–23.

Bio-Manguinhos. Fiocruz. **Alfaepoetina. Monografia do produto.** 2005, p. 23-48.

Bio-Manguinhos. Fiocruz. **Biofármacos: quem é quem?** *BioNotícias*, agosto/setembro 2008, n° 37, p. 2.

Bio-Manguinhos. Fiocruz. **Juntos pelo desenvolvimento do Brasil. Bio-Manguinhos, BNDES e Ministério da Saúde investem em inovação para construir a mais moderna planta de protótipos do país.** *BioNotícias*, maio/junho 2009, n° 40, p. 4-5.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003.** *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, 02 de junho de 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n° 17, de 16 de abril de 2010.** *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, 19 de abril de 2010.

Charney J and Tomarelli RM. **Colorimetric method for determination of the proteolytic activity of duodenal juice.** *J Biol Chem* 1947; 171: 501-5.

Cheetham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, Egrie J, Harvey TS. **NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation.** *Nat Struct Biol* 1998; 5(10): 861-6.

Choi D, Kim M, Park J. **Erythropoietin: physico and biochemical analysis.** *Journal of Chromatography B* 1996; 687: 189-99.

CIM. Centro de Inmunología Molecular. Procedimiento Normalizado de Operación. **Técnicas de espectrofotometria para epocim.** PNO-5072. Versión 05. Havana: Dpto de Aseguramiento de la Calidad/CIM; 2007.

CIM. Centro de Inmunología Molecular. Procedimiento Normalizado de Operación. **Análisis de eritropoyetina humana recombinante mediante mapeo de peptidos**. PNO-5017. Versión 03. Havana: Dpto de Aseguramiento de la Calidad/CIM; 2008.

Conceição CM. **Isolamento e caracterização físico-química e química da eritropoetina humana recombinante de formulações terapêuticas**. Rio de Janeiro; 2003. Mestrado [Dissertação em Bioquímica] - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Deutscher MP. **Guide to protein purification. Methods in Enzymology**. Vol. 182. 1st ed. San Diego: Academic Press; 1990.

Dionex Corporation. **Peptide mapping by reversed-phase high-performance liquid chromatography**. Application Note 99. Salt Lake City: Dionex corporation; 1994.

Egelhofer V, Gobom J, Seitz H, Giavalisco P, Lehrach H, Nordhoff E. **Protein identification by MALDI-TOF-MS peptide mapping: a new strategy**. *Anal Chem* 2002; 74: 1760-71.

European Pharmacopoeia 6.0. **Erythropoietin concentrated solution**. França: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2007; 1813-7.

ExpASY Proteomics Server. **PeptideCutter**. Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) [on line]. Lausanne, Suíça; 2010 [capturado em 05 fev. 2010]. Disponível em: <http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>

Fiocruz. **Fundação Oswaldo Cruz** [on line]. Rio de Janeiro, Brasil; 2010a [capturado em 09 jan. 2010]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>

Fiocruz. **Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos** [on line]. Rio de Janeiro, Brasil; 2010b [capturado em 09 jan. 2010]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>

Fukuda MN, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M. **Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates**. *Blood* 1989; 73(1): 84-89.

Fukuyama Y, Nakaya S, Yamazaki Y, Tanaka K. **Ionic liquid matrixes optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides**. *Anal Chem* 2008; 80: 2171-9.

Garnick RL, Solli NJ, Papa PA. **The role of quality control in biotechnology: an analytical perspective**. *Anal Chem* 1988; 60: 2546-57.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server**. In: Walker JM. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press 2005.

Giménez E, Benavente F, Barbosa J, Sanz-Nebot V. **Ionic liquid matrices for MALDI-TOF-MS analysis of intact glycoproteins**. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 357-65.

Giménez E, Benavente F, Barbosa J, Sanz-Nebot V. **Towards a reliable molecular mass determination of intact glycoproteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21: 2555-63.

Gokana A, Winchenne JJ, Ben-Ghanem A, Ahaded A, Cartron JP, Lambin P. **Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms.** *Journal of Chromatography A* 1997; 791: 109-18.

Guo-Hua Z, Guo-An L, Guo-Qing S, Ya-Cheng C, Ming-Sheng Z. **Study on the quality of recombinant proteins using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry.** *World Journal of Gastroenterology* 1999; 5 (3): 235-240.

Hames BD, Rickwood D. **Gel electrophoresis of protein: A practical approach.** 2nd ed. Oxford: IRL Press; 1990.

Judd RC. **Peptide Mapping by High-Performance Liquid Chromatography.** In: Walker JM. *The Protein Protocols Handbook.* 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc. 2002; 81: 559-61.

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970; 227: 680-5.

Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E. **Structural characterization of human erythropoietin.** *J Biol Chem* 1986; 261: 3116-21.

Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. **Cloning and expression of the human erythropoietin gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7580-4.

Lindsay S. **High Performance Liquid Chromatography.** 2nd ed. New York: Analytical Chemistry by open learning; 1997.

Ministério da Saúde. **Medicamentos Excepcionais** [on line]. Brasília, Brasil; 2010 [capturado em 26 jan. 2010]. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=32332&janela=1

Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. **Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos a terapia gênica.** 1^a ed. São Paulo: Roca; 2008.

NCBI. National center for biotechnology information. **Bookshelf: Essentials of Glycobiology** [on line]. Bethesda, EUA; 2010 [capturado em 10 fev. 2010] Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch8&rendertype=figure&id=ch8.f8>

Oliveira MGA, Rogana E, Rosa JC, Reinhold BB, Andrade MH; Greene JL, Mares-Guia M. **Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidino and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)azo--trypsin.** *J Biol Chem* 1993; (268): 26893-903.

Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.** Protein Science 1995, 4: 2411-23.

Peterson, GL. **Determination of total protein.** Methods Enzymol 1983; 91: 95-121.

Pharmacia Biotech. **PhastSystem™ – User Manual.** Uppsala (Suécia): Pharmacia LKB Biotechnology AB; 1990.

Promega Corporation. **Endoproteinase Lys-C, Sequencing Grade.** Catálogo [on line]. São Paulo, Brasil; 2011b [capturado em 15 maio 2011]. Disponível em: http://www.promega.com/products/protein-expression-purification-and-analysis/mass-spectrometry-analysis/endoproteinase-lys_c_-sequencing-grade/

Promega Corporation. **Sequencing Grade Modified Trypsin.** Catálogo [on line]. São Paulo, Brasil; 2011a [capturado em 15 abril 2011]. Disponível em: <http://www.promega.com/products/protein-expression-purification-and-analysis/mass-spectrometry-analysis/sequencing-grade-modified-trypsin/>

Promega Corporation. **Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade.** Bula do produto. Madison (EUA): Promega Corporation; 2009.

Recny MA, Scoble HA, Kim Y. **Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin.** J Biol Chem 1987; 262 (35): 17156-63.

Roche Applied Science. **Endoproteinase Arg-C Sequencing Grade from *Clostridium histolyticum*.** Instructions for Use [on line]. Mannheim, Alemanha; 2011a [capturado em 10 de jan. 2011]. Disponível em: https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/index.jsp?id=iforu&iforu_page=search&catalogNumber=11370529001

Roche Applied Science. **Endoproteinase Lys-C Sequencing Grade from *Lysobacter enzymogenes*.** Instructions for Use [on line]. Mannheim, Alemanha; 2011b [capturado em 10 de jan. 2011]. Disponível em: https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/index.jsp?id=iforu&iforu_page=search&catalogNumber=11420429001&instruction_version=Version+17

Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M. **Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA.** J Biol Chem 1987; 262 (25): 12059-76.

Schmidt CA, Codevilla CF, Fronza M, Casali RG, Dalmora SL. **Physico-chemical characterization and biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products.** Lat Am J Pharm 2003; 22 (4): 343-50.

Segrest JP, Jackson RL. **Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrilamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate.** Methods Enzymol 1972; 28: 54-63.

Silva Junior JG. **Cromatografia de proteínas – guia teórico e prático.** 1ª ed. Rio de Janeiro: InterCiência; 2004.

Silva Junior JG. **Eletroforese de proteínas – guia teórico-prático.** 1ª ed. Rio de Janeiro: InterCiência; 2001.

Stone KL, Williams KR. **Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gels.** In: Walker JM. The Protein Protocols Handbook. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc. 2002a; 76: 511-21.

Stone KL, Williams KR. **Reverse-phase HPLC separation of enzymatic digests of proteins.** In: Walker JM. The Protein Protocols Handbook. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc. 2002b; 78: 533-40.

Ulmer R, Rizzi A. **Use of a novel ionic liquid matrix for MALDI-MS analysis of glycopeptides and glycans out of total tryptic digests.** J Mass Spectrom 2009; 44: 1596-603.

Vesterberg O. **Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels.** Biochimica et Biophysica Acta 1972; 257 (1): 11-19.

Wang FF, Kung CKH, Goldwasser E. **Some Chemical Properties of Human Erythropoietin.** Endocrinology 1985; 116: 2286-92.

Waterborg JH. **The Lowry Method for Protein Quantitation.** In: Walker JM. The Protein Protocols Handbook. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc. 2002; 2: 7-9.

WHO. World Health Organization. **Technical report series no 823. Specifications for pharmaceutical preparations.** Geneva, 1992.

Wyckoff M, Rodbard D, Chrambach A. **Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate containing buffers using multiphasic buffer systems: properties of the stack, valid R(f) measurement, and optimized procedure.** Analytical Biochemistry 1977; 78 (2): 459-82.

ANEXOS

ANEXO I: Resultado do Mascot MS/MS Ion Search.


Mascot Search Results

Database : SwissProt 2011_08 (531473 sequences; 188463640 residues)
 Protein hits : EPO_HUMAN Erythropoietin OS=Homo sapiens GN=EPO PE=1 SV=1

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
8	924.4991	923.4918	923.4713	0.0206	0	45	0.0049	1	U	R.TITADTFR.K
10	927.4797	926.4724	926.4650	0.0074	0	23	0.66	1	U	K.VNIFYAWK.R
47	1465.7645	1464.7572	1464.7572	0.0000	0	51	0.0021	1	U	K.EAISPDAASA APLR.T

Top scoring peptide matches to query 8
 Label: Pico 9, Spot_Id: 22329, Peak_List_Id: 24802, MSMS Job_Run_Id: 10471,
 Comment:

Score greater than 33 indicates homology

Score greater than 34 indicates identity

Score	Expect	Delta	Hit	Protein	Peptide
45.0	0.0049	0.0206	1	EPO_HUMAN	R.TITADTFR.K
18.0	2.5	0.0713			K.CMSTDVIR.K
12.1	9.7	0.0383			K.LTEGVCFR.N
11.6	11	-0.0158			K.TIVTSFTR.L
11.1	12	0.0318			R.DVTDVTFK.R
10.8	13	0.1176			R.ACCHSTFR.G
10.6	14	-0.0059			K.WVHDLVR.S
10.0	16	0.0569			K.EDGTVTFR.G
10.0	16	0.0417			K.LWDSTFR.S
10.0	16	0.0206			R.STALETFR.N

Top scoring peptide matches to query 10

Label: Picos 10+11, Spot_Id: 22325, Peak_List_Id: 24798, MSMS Job_Run_Id:
 10471, Comment:

Score greater than 27 indicates homology

Score greater than 34 indicates identity

Score	Expect	Delta	Hit	Protein	Peptide
23.3	0.66	0.0074	1	EPO_HUMAN	K.VNIFYAWK.R
13.4	6.4	0.0518			K.EHGAEASR.L
12.6	7.7	0.0114			K.FFGVGSASR.I
12.6	7.7	0.0808			R.YGAMGGTR.R
11.8	9.3	-0.0825			R.SPLLLLAASR.S
11.5	9.8	0.0193			-.MAASAVSYK.E
11.3	10	0.0444			R.TMQYQTR.D
10.8	12	-0.1076			K.ILLALAEKG.I
10.8	12	0.0478			R.HGVDDAWK.D
10.5	13	0.1276			K.NCDMMWK.Q

Top scoring peptide matches to query 47
 Label: Picos 6+7+8, Spot_Id: 22325, Peak_List_Id: 24720, MSMS Job_Run_Id:
 10471, Comment:

Score greater than 32 indicates homology

Score greater than 37 indicates identity

Score	Expect	Delta	Hit	Protein	Peptide
50.7	0.0021	0.0000	1	EPO_HUMAN	K.EAISPPDAASAAPLR.T
15.9	6.4	-0.0516			M.EHFLLEVAAAAPLR.L
10.3	24	-0.1204			M.ASPVAIAAQAGKLLR.E
10.1	25	0.0364			K.ELTGFDIGNGSISR.E
7.2	48	-0.0153			K.EDVRFVFTSPIR.S
7.2	48	-0.0728			K.EPKEQIISVGPIR.R
6.9	52	0.1334			R.SGQQVLGWGDCCR.E
6.7	54	0.1368			K.SDSGHYHCSGIFR.S
6.2	61	-0.0339			K.EKKPAVGVFQGMFR.Y
5.8	66	0.1123			R.AMSGPRLASCSDDR.T

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : Trypsin
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.6 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.3 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF

ANEXO II: Fluxograma para obtenção do mapa peptídico da rHuEPO.

