

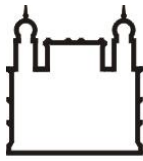
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O  
CONTROLE DE QUALIDADE DA ERITROPOETINA HUMANA  
RECOMBINANTE

INGRID PINHEIRO DE MEDEIROS

Rio de Janeiro  
2013



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos  
**Bio-Manguinhos**

## INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

**INGRID PINHEIRO DE MEDEIROS**

**Padronização e Otimização de Métodos Analíticos para o Controle de Qualidade  
da Eritropoetina Humana Recombinante**

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  
2013

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

M488 Medeiros, Ingrid Pinheiro de

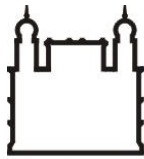
Padronização e otimização de métodos analíticos para o controle de qualidade da Eritropoetina Humana Recombinante / Ingrid Pinheiro de Medeiros. – Rio de Janeiro, 2013.  
xxv,138 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2013.  
Bibliografia: f. 125-138

1. Controle de qualidade. 2. Homogeneidade. 3. Eritropoetina Humana Recombinante. I. Título.

CDD 615.1901

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Departamento de Controle de Qualidade, sob a orientação do Dr. Akira Homma e Dr. Daniel da Silva Guedes Jr.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos

**Bio-Manguinhos**

## INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

**INGRID PINHEIRO DE MEDEIROS**

**Padronização e Otimização de Métodos Analíticos para o Controle de Qualidade  
da Eritropoetina Humana Recombinante**

**ORIENTADORES:** Dr. Akira Homma  
Dr. Daniel da Silva Guedes Jr.

Dissertação defendida em 3 de maio de 2013.

Examinadores:

Dr. Hilton Jorge Nascimento (Presidente)  
Fiocruz

Dr<sup>a</sup>. Alane Beatriz Vermelho  
UFRJ

Dr<sup>a</sup>. Shirley de Mello Pereira Abrantes  
Fiocruz

Rio de Janeiro  
2013

À minha mãe, Maria Aparecida de Medeiros, minha maior incentivadora. Quem, muitas vezes, renunciou aos seus sonhos, para que os meus fossem realizados.

## AGRADECIMENTOS

“Mas os que confiam no Senhor renovam suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam”. Isaías 40:31. Agradecimento primordial não poderia deixar de ser Àquele que sempre esteve ao meu lado, quem colocou em meu caminho pessoas que me ajudaram na realização de mais um sonho. Obrigada Senhor por tudo que vi, ouvi e aprendi. Obrigada pela vida!

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

À FIOTEC pelo apoio financeiro.

À coordenação e à secretaria do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, nas pessoas das Dr<sup>a</sup>. Sheila Farage e Zaíra Antunes, pela oportunidade de aprendizado e capacitação profissional. À Michele Clarina (*in memorian*) pelos momentos de descontração entre as aulas.

Ao Dr. Akira Homma pela orientação e incentivo.

Ao Dr. Daniel da Silva Guedes Jr. por todos os ensinamentos e dedicação prestados a realização desse trabalho. À quem acreditou em mim e esteve sempre presente em todas as conquistas e dificuldades, por se tornar mais do que um orientador, um profissional admirável e um amigo sem igual.

À minha mãe, minha melhor amiga, conselheira, quem partilha comigo todos os meus momentos felizes e de angústias, sempre me fazendo acreditar em mim mesma e a sonhar com os pés no chão. Amo-te mais que tudo.

À toda a minha família que sempre me apoiaram e torceram por minha felicidade.

Ao Hilton Jorge Nascimento, pela imensa contribuição, atenção e ensinamentos doados.

Aos amigos da Seção de Testes Biomoleculares e Imunocitoquímicos (SETBI), por me acolherem e me incentivarem. Especialmente às amigas Jaline Coutinho e Erica Louro pelos inúmeros momentos de descontração e conselhos, pelo carinho e amizade que quero cultivar para sempre.

Aos amigos do mestrado que tornaram mais leves o cumprimento dos intermináveis créditos. Em especial ao Cleyton Lage e Michel Gomes por mais dois anos de amizade e companheirismo.

Ao DEQUA, por todas as pessoas maravilhosas que conheci e que me receberam tão bem. Em especial à Darcy Akemi Hokama e Lilia Ribeiro Serodio pela atenção, confiança e incentivo.

Ao Paulo Cesar Dick pelo interesse sobre este estudo para poder nos auxiliar nas análises estatísticas.

À Katherine Antunes pelas sugestões das análises finais e escrita desta dissertação.

Ao *Centro de Inmunología Molecular* (CIM), em especial ao Alejandro Portillo, pelas amostras e documentos cedidos e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Laboratório Físico-Químico (LAFIQ) pela enorme contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. Especialmente à Melissa Chamon, Camila Faia, Lauro de Sena e Eduardo Castro pela ajuda e ensinamentos e ao Robert Angelino pela amizade e palavras de conforto e incentivo.

Ao Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) pelo espaço e aprendizado concedidos para o engrandecimento deste trabalho.

Ao Setor de Potência (SEPOT) pela oportunidade de ampliação de meus conhecimentos, por todos os ensinamentos e pela compreensão da minha ausência durante o decorrer do curso.

O início foi incerto, onde todos os estranhos fariam parte da minha vida. Porém, hoje posso dizer que esses, não mais estranhos e sim amigos, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional! Vocês me fizeram chegar até aqui, e espero que estejam ao meu lado em minha próxima jornada! Mesmo que o destino nos separe, levá-los-ei em meu coração.



## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DAS FIGURAS.....	xvi
RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxv
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biofármacos.....	1
1.1.1 Produção de biofármacos.....	4
1.2- Eritropoetina humana.....	5
1.2.1- Breve Histórico .....	8
1.3- Eritropoetina Humana Recombinante (EPOhr).....	9
1.4- Emprego terapêutico da EPOhr.....	11
1.5- Purificação da EPOhr.....	13
1.6- Transferência de Tecnologia.....	17
1.7- Produção da EPOhr no CIM.....	18
1.8- Controle de qualidade e de processos.....	20
1.8.1- Controle de qualidade e de processos para EPOhr.....	22
1.9- Análise da homogeneidade de proteínas recombinantes.....	23
1.10- Métodos Eletroforéticos utilizados para avaliação da homogeneidade.....	24
1.10.1- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida.....	25
1.11- Métodos Cromatográficos utilizados para avaliação da homogeneidade.....	27
2- OBJETIVOS.....	29

2.1- Geral.....	29
2.2- Específico.....	29
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1- Composição das amostras de EPOhr.....	30
3.2- Dessalinização e Quantificação proteica das amostras.....	31
3.3- Métodos Eletroforéticos.....	31
3.3.1- Focalização Isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF - PAGE).....	31
3.3.2- Eletroforese capilar de Zona (CZE).....	35
3.3.3- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
3.3.3.1- Especificidade.....	37
3.3.3.2- Linearidade.....	37
3.3.3.3- Intervalo.....	37
3.3.3.4- Precisão.....	38
3.3.3.5- Limite de quantificação.....	38
3.3.3.6- Exatidão.....	38
3.3.3.7- Robustez.....	38
3.4- Métodos Cromatográficos.....	40
3.4.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular (SEC-CLAE).....	39
3.4.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-CLAE).....	39
3.5- Análise estatística dos resultados.....	40
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1- Dessalinização e Quantificação proteica das amostras.....	43
4.2- Focalização Isoelétrica (IEF).....	45
4.2.1- Validação da técnica.....	45

4.2.2- Determinação do Ponto Isoelétrico da EPOhr.....	48
4.3- Eletroforese Capilar de Zona (CZE).....	59
4.4- Validação da metodologia SDS-PAGE.....	68
4.4.1.-Especificidade.....	68
4.4.2- Linearidade.....	69
4.4.3 – Intervalo.....	75
4.4.4- Repetibilidade.....	79
4.4.5- Precisão Intermediária.....	83
4.4.6- Limite de Quantificação.....	85
4.4.7- Exatidão.....	89
4.4.8- Robustez.....	93
4.5- Análise da homogeneidade da EPOhr.....	96
4.6- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular (SEC-CLAE).....	100
4.7- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-CLAE) .....	111
5-CONCLUSÕES.....	116
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABDI** – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
- AIDS** - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AZT** - Zidovudina
- BHK** – rim de hamster jovem
- BPF** – Boas Práticas de Fabricação
- BRP** – Biological Reference Preparation
- CATEBIO** – Câmara Técnica de Produtos Biológicos
- CECMED** – *Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos*
- CHO**- Ovário de hamster chinês
- CIM** – *Centro de Inmunología Molecular*
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- cMRt** – Candidato a Material de Referência de Trabalho
- CNMM** – Centro Nacional de Monitoramento de Medicamentos
- CPBIH**- Coordenação de registros e Produtos Biológicos
- CZE** – Eletroforese Capilar de Zona
- Da** – Dalton
- DEQUA** – Departamento de Controle de Qualidade
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- EMA** – *European Medicines Agency*
- EPO** – Eritropoetina
- EPOhr** – Eritropoetina Humana Recombinante
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- GECIS** – Grupo do Complexo Industrial da Saúde
- GESEF** – Gerência de Avaliação de eficácia e Segurança
- GGMED** – Gerência Geral de Medicamentos
- IEF** – Focalização Isoelétrica
- IFA** – Insumo Farmacêutico Ativo
- INCQS** – Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde
- KFDA** – *Korea Food and Drug Administration*
- LACOM**- Laboratório de Controle Microbiológico

**LAFIQ** – Laboratório Físico-químico  
**LAMAM** – Laboratório de Macromoléculas  
**LAMEV** – Laboratório de Metrologia e Validação  
**LEa** – Lote Experimental contendo arginina  
**mg** - miligrama  
**mL** – mililitro  
**mL/min** – mililitro por minuto  
**MR** – Material de Referência  
**MS** – Ministério da Saúde  
**NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*  
**NF** – Formulário Nacional  
**nm** – nanômetro  
**°C** – Graus Celsius  
**OMS** – Organização Mundial da Saúde  
**pI** – Ponto isoelétrico  
**PM** – Padrão de peso molecular  
**POP** – Procedimento Operacional Padrão  
**PPI** – Padrão de Ponto Isoelétrico  
**q.s.p** – Quantidade suficiente para  
**RDC** – Resolução da Diretoria Colegiada  
**Rf** - mobilidade eletroforética relativa  
**RP-CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa  
**SDS-PAGE** – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida  
**SEC-CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular  
**SETBI** - Setor de Testes Biomoleculares e Imunocitoquímicos  
**SNVS** – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária  
**SUS** – Sistema Único de Saúde  
**TFA** – Ácido Tricloroacético  
**UI** – Unidades Internacionais  
**USP** – *United states Pharmacopeia*  
**UV** – Ultra violeta  
**µg** – micrograma  
**V** – Volts  
**W** – Walts  
**WFI** – *Water for injection*  
**WHO** – *World Health Organization*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Solução para reidratação do PhastGel Dry IEF.....	31
Tabela 3.2: Parâmetros para a corrida de Focalização Isoelétrica.....	32
Tabela 3.3: Etapas para impregnação por prata do gel de IEF para EPOhr.....	32
Tabela 3.4: Critério de aceitação da análise das amostras de EPOhr segundo F.E. e CIM.....	33
Tabela 3.5: Classificação do método segundo RE 899 da ANVISA.....	33
Tabela 3.6: Classificação do método segundo RE 899 da ANVISA.....	36
Tabela 3.7: Gradiente de eluição para análise em RP-CLAE.....	39
Tabela 3.8: Gradiente de eluição linear para análise em RP-CLAE.....	39
Tabela 4.1: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV) da área das bandas das isoformas analisadas entre as réplicas do gel IEF realizado com LEa para avaliação do parâmetro repetibilidade.....	45
Tabela 4.2: Composição percentual das isoformas do LEa EPOhr por IEF-PAGE em comparação com o intervalo estabelecido pela Farmacopéia Européia (% F.E.) e pelo CIM (% CIM).....	46
Tabela 4.3: Percentual encontrado para cada isoforma do BRP (%BRP), IFA (%IFA) e LEa (%LEa) EPOhr.....	51
Tabela 4.4: Percentual encontrado para cada isoforma do IFA (%IFA), BRP (%BRP) e LEa (%LEa) EPOhr.....	55
Tabela 4.5: Área percentual das 8 isoformas (I) detectadas no LEa EPOhr, juntamente com a média (M), desvio padrão (S) e variância ( $S^2$ ) entre as 10 replicatas realizadas.....	60

Tabela 4.6: Área percentual das 8 isoformas (I) detectadas no IFA EPOhr, juntamente com a média (M), desvio padrão (S) e variância ( $S^2$ ) entre as 10 replicatas realizadas.....	61
Tabela 4.7: Área percentual das 8 isoformas (I) detectadas no BRP EPOhr, juntamente com a média (M), desvio padrão (S) e variância ( $S^2$ ) entre as 10 replicatas realizadas.....	63
Tabela 4.8: Média da área percentual (M%) e desvio padrão (S) das 8 isoformas (I) detectadas nas amostras LEa, BRP e IFA EPOhr em comparação com a faixa percentual de cada isoforma estabelecida pela F.E., juntamente com os resultados do p-valor.....	64
Tabela 4.9: Avaliação dos parâmetros eletroforéticos obtidos após análise do LEa EPOhr por SDS-PAGE.....	68
Tabela 4.10: Média (M) e desvio padrão (S) do volume de banda nas diferentes massas de proteína ( $\mu\text{g}$ ) do LEa EPOhr nas sete replicatas do gel (1 a 7) para avaliação do parâmetro linearidade.....	72
Tabela 4.11: Média (M) e desvio padrão (S) do volume de banda nas diferentes massas de proteína ( $\mu\text{g}$ ) do LEa EPOhr nas sete replicatas do gel (1 a 7) para avaliação do parâmetro intervalo.....	75
Tabela 4.12: Avaliação das bandas do LEa EPOhr apresentadas na Figura 4.33. Os valores de volume de banda, área e altura de banda foram estimados a partir da análise densitométrica das bandas de LEa aplicadas em um mesmo gel.....	79
Tabela 4.13: Avaliação das áreas das bandas relativas ao LEa EPOhr obtidas em sete corridas eletroforéticas diferentes. Em cada corrida foram aplicados seis amostras contendo $10\mu\text{g}$ do LEa EPOhr.....	80
Tabela 4.14: Avaliação da Repetibilidade (Repet.) e Precisão Intermediária (P. Intermed.) do SDS-PAGE. Nas colunas 2 e 3 são mostradas os valores de área da banda de EPOhr $\times 10^6$ . As demais colunas representam a Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).....	83
Tabela 4.15: Avaliação do limite de quantificação da EPOhr por SDS-PAGE 12,5%. Nas colunas de 1 a 7 estão representados os valores de volume de banda $\times 10^3$ estimados nas diferentes corridas. As demais colunas representam a Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).....	87

Tabela 4.16: Avaliação da exatidão do SDS-PAGE 12,5%. Nas colunas de 1 a 7 estão representados os valores de volume de banda x 10 <sup>3</sup> , estimados nas diferentes corridas. As demais colunas representam a Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).....	91
Tabela 4.17: Avaliação da robustez do SDS-PAGE 15%. Nas colunas de 1 a 3 estão representados os valores de volume de banda x 10 <sup>3</sup> , estimados nas diferentes corridas. As demais colunas representam a Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).....	92
Tabela 4.18: Avaliação da robustez do SDS-PAGE 12,5% para análise de LEa EPO, com variação da corrente utilizada na corrida. Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).....	93
Tabela 4.19: Valores médios de Rf encontrados na avaliação dos parâmetros de validação...	94
Tabela 4.20: Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do volume de banda (V), área de banda (A) e Rf das amostras BRP, LEa e IFA EP.....	97
Tabela 4.21: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção e área das triplicatas do BRP EPOhr 30µg.....	100
Tabela 4.22: Avaliação do pico principal do LEa EPOhr obtido por SEC-CLAE em coluna TSK Gel2500SWxl. Média (M), Desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área das triplicatas do LEa EPOhr 30µg.....	102
Tabela 4.23: Resultado da integração do pico principal do LEa EPOhr analisado por SEC-CLAE em diferentes massas aplicadas.....	103
Tabela 4.24: Resultado da integração do pico principal das triplicatas de LEa EPOhr 4,8µg analisado por cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Del 2500xl. Média (M), Desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área das triplicatas do LEa EPOhr 4,8µg.....	104
Tabela 4.25: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área das triplicata do IFA EPOhr 4,8 µg e 30µg.....	106



Tabela 4.26: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área do LEa e do IFA EPOhr 4,8 µg.....	107
Tabela 4.27: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área do LEa, IFA e BRP EPOhr 30µg.....	108
Tabela 4.28: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área da triplicata do LEa EPOhr 30µg.....	109
Tabela 4.29: Área percentual dos picos encontrados nos cromatogramas relativos ao LEa EPOhr 30µg nativa e desnaturada por aquecimento a 60°C durante 12 horas e 24 horas. A área percentual foi calculada seguindo a fórmula: $\text{Área \%} = \text{área do pico} \times 100 / \text{área total}$ .....	112
Tabela 4.30: Área total, área do pico principal, resultantes da integração dos cromatogramas das triplicatas e percentual de pureza das três amostras analisadas (LEa, IFA e BRP EPOhr).....	116
Tabela 4.31: Área total, área do pico principal, e percentual de pureza do LEa analisado em gradiente linear com 5 (5v) e 10 volumes de coluna (10v).....	117
Tabela 4.32: Tempo de retenção (TR) e área do pico principal resultantes da integração dos cromatogramas das replicatas do LEa EPOhr 30µg. Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) entre as réplicas.....	119
Tabela 4.33: Concentração do LEa EPOhr (µg/mL) relacionada a concentração do MR EPOhr (µg/mL).....	120

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Estrutura tridimensional da Eritropoetina Humana, demonstrando três sítios de N-glicosilação (Asn24, Asn38 e Asn83) e um de O-glicosilação (Ser126).....6
- Figura 1.2: Estrutura tridimensional da Eritropoetina Humana na sua forma ativa, circulante no plasma .....6
- Figura 1.3: Estrutura das cadeias glicídicas da Eritropoetina Humana.....7
- Figura 1.4: Cadeias glicídicas de N-glicosilação e O-glicosilação mais comumente presentes na molécula de EPOhr.....10
- Figura 1.5: Etapas do processo produtivo da EPOhr no CIM.....19
- Figura 4.1: Cromatograma do branco realizado com Tampão Tris-HCl 50mM com NaCl 1N. Coluna analítica Hitrap desalting sephadex G25, contra água Milli-Q, 4 mL de volume de aplicação por corrida, vazão de 3ml/min e coleta de 1ml/tubo.....41
- Figura 4.2: Cromatograma da dessalinização do LEa de EPOhr. Pico azul referente a leitura da amostra em 220 nm; pico vermelho referente a 280nm e pico marrom referente a condutividade. Coluna analítica Hitrap desalting sephadex G25, contra água Milli-Q, 4 mL de volume de aplicação por corrida, vazão de 3ml/min e coleta de 1ml/tubo.....42
- Figura 4.3: Cromatograma da dessalinização do IFA de EPOhr. Pico azul referente a leitura da amostra em 220 nm; pico vermelho referente a 280nm e pico marrom referente a condutividade. Coluna analítica Hitrap desalting sephadex G25, contra água Milli-Q, 4 mL de volume de aplicação por corrida, vazão de 3ml/min e coleta de 1ml/tubo.....42
- Figura 4.4: Gel de IEF com quatro replicatas LEa EPOhr corado por nitrato de prata (A) e após análise pelo programa ImageMaster<sup>®</sup> - GE Healthcare (B). Raia 1: Controle negativo (água WFI 4µL); Raias 2, 3, 4 e 5: LEa EPOhr 4 µg; Raia 6: Controle negativo (água WFI 4µL).....43
- Figura 4.5: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF do LEa EPOhr 4 µg (painéis B a E), obtida pelo programa ImageMaster<sup>®</sup>.....44

- Figura 4.6: Curva de calibração do PPI 3-10 (A) e 2,5-6,5 (B) da GE Healthcare obtida pelo programa ImageMaster® .....47
- Figura 4.7: Gel de IEF do LEa EPOhr corado por nitrato de prata (A) e após análise pelo programa ImageMaster® - GE Healthcare (B). Raia 1: Controle negativo (água WFI 4µL); Raia 2: PPI 3-10; Raias 3,4 e 5: LEa EPOhr 4 µg; Raia 6: Controle negativo (água WFI 4µL).....47
- Figura 4.8: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF do PPI (painel B) e do LEa EPOhr 4 µg (painéis C a E), obtida pelo programa ImageMaster® .....48
- Figura 4.9: Gel de IEF do BRP, LEa e IFA EPOhr corado por nitrato de prata (A) e após análise pelo programa ImageMaster® - GE Healthcare (B). Raia 1: Controle negativo (água WFI 4µL); Raia 2: PPI 2,5-6,5; Raia 3: BRP EPOhr 4 µg; Raia 4: IFA EPOhr 4 µg; Raia 5: LEa EPOhr 4 µg; Raia 6: Controle negativo (água WFI 4µL).....49
- Figura 4.10: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF: PPI (painel B); BRP EPOhr (painel C); IFA EPOhr (painel D) e do LEa EPOhr (painel E) 4 µg, obtida pelo programa ImageMaster® .....50
- Figura 4.11: Gel de IEF das diluições do PPI e IFA EPOhr analisado pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raia 1: Controle negativo (água WFI 4µL); Raia 2: PPI 2,5-6,5 1:2; Raia 3: PPI 2,5-6,5 1:3; Raia 4: PPI 2,5-6,5 1:4; Raia 5: IFA EPOhr 4 µg; Raia 6: Controle negativo (água WFI 4µL).....51
- Figura 4.12: Curva de calibração do PPI 2,5-6,5 obtida pelo programa ImageMaster® .....52
- Figura 4.13: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF obtida pelo programa ImageMaster®: Água WFI como controle negativo (painéis A e F); PPI 1:2 (painel B); PPI 1:3 (painel C); PPI 1:4 (painel D); IFA EPOhr 4 µg (painel E).....53
- Figura 4.14: Gel de IEF do LEa EPOhr corado por nitrato de prata (A) e o mesmo gel após análise pelo programa ImageMaster® - GE Healthcare (B). Raia 1,4 e 8: Controle negativo (água WFI 4µL); Raias 2, 3: PPI 2,5-6,5 4; Raia 5: IFA EPOhr 0,5 µg; Raia 6: BRP EPOhr 0,5 µg; Raia 7: LEa EPOhr 0,5 µg.....53
- Figura 4.15: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF obtida pelo programa ImageMaster®: Água WFI como controle negativo (painéis A, D e H); PPI 2,5-6,5 (painéis B e C); IFA EPOhr 0,5µg (painel E); BRP EPOhr 0,5µg (painel F); LEa EPOhr 0,5µg (painel G).....55
- Figura 4.16: Eletroferograma do LEa EPOhr. Parâmetros de corrida: 30kV, 300µA, 6W, Pressão de injeção 50mBar, Tempo de injeção 10 segundos, duração da corrida 100 minutos.....58
- Figura 4.17: Eletroferograma do LEa EPOhr. A: área e tempo de retenção da amostra; B: 5 das 10 replicatas realizadas. Parâmetros de corrida: 28kV, 300µA, 6W, Pressão de injeção

75mBar, Tempo de injeção 75 segundos, temperatura 28°C, duração da corrida 100minutos.....59

Figura 4.18: Eletroferograma do IFA EPOhr. A: área e tempo de retenção da amostra; B: 5 das 10 replicatas realizadas. Parâmetros de corrida: 28kV, 300μA, 6W, Pressão de injeção 75mBar, Tempo de injeção 75 segundos, temperatura 28°C, duração da corrida 100minutos.....61

Figura 4.19: Eletroferograma do BRP EPOhr. A: área e tempo de retenção da amostra; B: 5 das 10 replicatas realizadas. Parâmetros de corrida: 28kV, 300μA, 6W, Pressão de injeção 75mBar, Tempo de injeção 75 segundos, temperatura 28°C, duração da corrida 100minutos.....62

Figura 4.20: Eletroferograma representativo das três amostras analisadas. A: BRP EPOhr; B: IFA EPOhr; C: LEa EPOhr. Parâmetros de corrida: 28kV, 300μA, 6W, Pressão de injeção 75mBar, Tempo de injeção 75 segundos, temperatura 28°C, duração da corrida 100minutos.....63

Figura 4.21: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr. Raia 1: Padrões de peso molecular; Raia 2: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 3: LEa EPOhr 10 μg dessalinizado; Raia 4: LEa EPOhr 10 μg dessalinizado; Raia 6: LEa EPOhr 10 μg não dessalinizado; Raia 7: LEa EPOhr 10 μg não dessalinizado; Raia 9: solução de formulação EPOhr 10μL e Raia 10: solução de formulação EPOhr 10μL.....67

Figura 4.22: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes do LEa EPOhr. Raia 1: Padrões de peso molecular; Raia 2: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 3: LEa EPOhr 0,5 μg; Raia 4: LEa EPOhr 1 μg; Raia 5: LEa EPOhr 2 μg; Raia 6: LEa EPOhr 4 μg; Raia 7: LEa EPOhr 6 μg; Raia 8: LEa EPOhr 8 μg; Raia 9: LEa EPOhr 10μg e Raia 10: LEa EPOhr 15μg.....68

Figura 4.23: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr (0,5 μg a 15 μg), obtida pelo programa ImageMaster®.....69

Figura 4.24: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel A), do Tampão de amostra (painel B) e do LEa EPOhr 0,5μg, 1 μg, 2 μg, 4 μg, 6 μg, 8 μg, 10 μg e 15 μg (painéis C a J, respectivamente), obtida pelo programa ImageMaster®.....70

Figura 4.25: Relação entre a quantidade de massa do LEa EPOhr aplicada no gel com o volume de banda (A), altura do pico (B) e área de banda (C) obtida por cada banda eletroforética.....71

Figura 4.26: Gráfico comparativo do volume da banda entre as 7 replicatas do gel realizado para avaliação do parâmetro linearidade.....72

Figura 4.27: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr analisada pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raia 1: Padrões de peso molecular; Raia 2: Tampão de amostra (controle

negativo); Raia 3: LEa EPOhr 4,0 µg; Raia 4: LEa EPOhr 6,0 µg; Raia 5: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 6: LEa EPOhr 8,0 µg; Raia 7: LEa EPOhr 10,0 µg; Raia 8: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 9: LEa EPOhr 12µg e Raia 10: LEa EPOhr 14µg.....73

Figura 4.28: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr, obtida pelo programa ImageMaster® .....72

Figura 4.29: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel A), do Tampão de amostra (painel B, E e H) e do LEa EPOhr 4µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg, 12 µg, e 14 µg (painéis C, D, F, G, I e J), obtida pelo programa ImageMaster® .....75

Figura 4.30: Curva entre o volume de banda e massa de proteína para avaliação do parâmetro intervalo nas 7 replicatas do gel.....76

Figura 4.31: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr analisada pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raia 1: Padrões de peso molecular; Raia 2: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 3: LEa EPOhr 10 µg; Raia 4: LEa EPOhr 10 µg; Raia 5: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 6: LEa EPOhr 10 µg; Raia 7: LEa EPOhr 10 µg; Raia 8: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 9: LEa EPOhr 10µg e Raia 10: LEa EPOhr 10µg.....76

Figura 4.32: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster® .....77

Figura 4.33: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel A), do Tampão de amostra (painel B, E e H) e do LEa EPOhr 10 µg (painéis C, D, F, G, I e J) obtida pelo programa ImageMaster® .....78

Figura 4.34: Gráfico comparativo entre a área das bandas do LEa EPO analisadas em corridas eletroforéticas diferentes.....80

Figura 4.35: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr. Raia 1: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 3, 4, 5 e 6: LEa EPOhr 10 µg.....81

Figura 4.36: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster® .....81

Figura 4.37: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel B) e do LEa EPOhr 10 µg (painéis C, D, E e F) obtida pelo programa ImageMaster® .....82

Figura 4.38: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr. Raia 1: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raia 3: LEa EPOhr 0,5 µg; Raia 4: LEa EPOhr

1,0 µg; Raia 5: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 6: LEa EPOhr 2,0 µg; Raia 7: LEa EPOhr 3,0 µg; Raia 8: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 9: LEa EPOhr 4,0µg e Raia 10: LEa EPOhr 5,0µg.....83

Figura 4.39: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster® .....84

Figura 4.40: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel B), do Tampão de amostra (painel A, E e H) e do LEa EPOhr 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, e 5,0 µg (painéis C, D, F, G, I e J) respectivamente, obtida pelo programa ImageMaster® .....85

Figura 4.41: Curva de calibração volume de banda x massa de proteínas do LEa EPOhr aplicada no gel.....86

Figura 4.42: Curva de calibração de área de banda x massa de proteínas do LEa EPOhr aplicada no gel.....86

Figura 4.43: Avaliação da exatidão do SDS-PAGE 12,5% para análise do LEa EPOhr. Raia 1: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raia 3: LEa EPOhr 5,0 µg; Raia 4: LEa EPOhr 7,0 µg; Raia 5: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 6: LEa EPOhr 10 µg; Raia 7: LEa EPOhr 12 µg; Raia 8: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 9: LEa EPOhr 14µg e Raia 10: LEa EPOhr 16µg.....88

Figura 4.44: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster® .....88

Figura 4.45: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel B), do Tampão de amostra (painel A, E e H) e do LEa EPOhr 5,0, 7,0,10, 12, 14, e 16 µg (painéis C, D, F, G, I e J) respectivamente, obtida pelo programa ImageMaster® .....90

Figura 4.46: Curva de proporcionalidade entre o volume de banda e a massa de proteínas aplicada do LEa EPOhr.....90

Figura 4.47: SDS-PAGE 15% do LEa EPOhr analisada pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raias 1, 3, 6, 9 e 10: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 4, 5, 7 e 8: LEa EPOhr 10 µg.....92

Figura 4.48: Avaliação de robustez do SDS-PAGE 12,5% com variação de corrente elétrica de 30mA. Raias 1, 3, 6, 9 e 10: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 4, 5, 7 e 8: LEa EPOhr 10 µg.....92

Figura 4.49: SDS-PAGE 12,5% e tampão de corrida TBE do LEa EPOhr. Raias 1, 3, 6, 9 e 10: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 4, 5, 7 e 8: LEa EPOhr 10 µg.....93

- Figura 4.50: SDS-PAGE 12,5% analisado pelo programa ImageMaster<sup>®</sup> (GE Healthcare). Raias 1, 3, 5, 7, 9 e 10: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 4, 6 e 8: BRP, LEa e IFA EPOhr 10  $\mu$ g respectivamente.....95
- Figura 4.51: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster<sup>®</sup>.....95
- Figura 4.52: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel B), do Tampão de amostra (painéis A, C, E e G), BRP EPOhr 10 $\mu$ g (painel D), LEa EPOhr 10 $\mu$ g (painel F) e IFA EPOhr 10 $\mu$ g (painel H), obtida pelo programa ImageMaster<sup>®</sup>.....97
- Figura 4.53: Cromatografia de exclusão molecular da solução PBS em coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5 $\mu$ m equilibrada em solução tampão PBS pH6., vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....99
- Figura 4.54: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30 $\mu$ g de massa proteica do BRP EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6., vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.....100
- Figura 4.55: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30 $\mu$ g de massa proteica do LEa EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.....101
- Figura 4.56: Sobreposição dos perfis cromatográficos do LEa EPOhr avaliada por SEC-CLAE em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm), em diferentes concentrações da amostra: 0,6 $\mu$ g (azul escuro), 1,2 $\mu$ g (verde), 2,4 $\mu$ g (azul claro), 3,6 $\mu$ g (cinza) e 4,8 (marrom).....102
- Figura 4.57: Gráfico demonstrando proporcionalidade entre massa protéica do LEa EPOhr avaliada por SEC-CLAE e área do pico principal observado a 220nm.....103
- Figura 4.58: Sobreposição dos perfis cromatográficos do LEa EPOhr avaliada por SEC-CLAE em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) e detecção a 220nm. Em cada uma das três corridas cromatográficas foram aplicados 4,8 $\mu$ g de LEa EPOhr.....104
- Figura 4.59: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 4,8 $\mu$ g de massa proteica do IFA EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6., vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.....105

- Figura 4.60: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30µg de massa proteica do IFA EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6., vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.....105
- Figura 4.61: Integração dos cromatogramas do LEa EPOhr (em azul) e IFA EPOhr (em vermelho) com 4,8µg de massa. Coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5µm equilibrada em solução tampão PBS pH6., vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....106
- Figura 4.62: Integração dos cromatogramas do LEa EPOhr (em azul), IFA EPOhr (em marrom) e BRP EPOhr (em vermelho) com 30µg de massa. Coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5µm equilibrada em solução tampão PBS pH6., vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....107
- Figura 4.63: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30µg de massa proteica do LEa EPOhr dessalinizado em coluna Amicon® Ultra 10.000. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6., vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.....109
- Figura 4.64: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30µg (em vermelho) e 4,8µg (em azul) de massa proteica do LEa EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....110
- Figura 4.65: Integração dos cromatogramas do LEa EPOhr nativo (em vermelho), submetido a 60°C durante 12h (em azul) e submetido a 60°C durante 24h (em verde) obtidos da análise por SEC-CLAE em coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5µm equilibrada em solução tampão PBS pH6, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....111
- Figura 4.66: Cromatografia em Fase Reversa de 30µg de massa do LEa EPOhr realizada em triplicata. Em cinza: branco realizado com fase móvel A (TFA 0,1%); em verde: Gradiente de concentração; em azul e coral: LEa EPOhr 30 µg. Coluna analítica Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5µm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....114
- Figura 4.67: Cromatografia em Fase Reversa de 30µg de massa do IFA EPOhr realizada em triplicata. Em marrom: branco realizado com fase móvel A (TFA 0,1%); em verde: Gradiente de concentração; em azul claro, azul escuro e coral: IFA EPOhr 30 µg. Coluna analítica Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5µm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....114



- Figura 4.68: Comparação entre os perfis cromatográficos das amostras analisadas em fase reversa: LEa EPOhr (em azul escuro); IFA EPOhr (azul claro) e BRP EPOhr (em vermelho). Em linha verde pontilhada: branco realizado com fase móvel A (TFA 0,1%); em linha verde contínua: gradiente de concentração. Coluna analítica Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5 $\mu$ m, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....115
- Figura 4.69: Esquema representativo dos perfis cromatográficos de LEa EPOhr 30  $\mu$ g utilizando gradiente linear com 5 volumes de coluna (A) e 10 volumes de coluna (B). Linha pontilhada: Detecção a 280nm; linha contínua: detecção a 220nm; em marrom: condutividade. Coluna analítica Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5 $\mu$ m, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.....117
- Figura 4.70: Integração dos cromatogramas das réplicas do LEa EPOhr em fase reversa(A). Aumento do pico cromatográfico referente a EPOhr (B). Coluna analítica Bakerbond WP C18, 5  $\mu$ m, 4,6 x 100mm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, detecção a 214nm.....118
- Figura 4.71: Gráfico da área obtida por RP-CLAE *versus* concentração de proteínas do LEa.....119
- Figura 4.72: Integração dos cromatogramas das réplicas do MR EPOhr em fase reversa(A). Aumento do pico cromatográfico referente a EPOhr (B). Coluna analítica Bakerbond WP C18, 5  $\mu$ m, 4,6 x 100mm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, detecção a 214nm.....120
- Figura 4.73: Integração dos cromatogramas das réplicas do LEa EPOhr acrescido de albumina em fase reversa(A). Aumento do pico cromatográfico referente a EPOhr (B). Coluna analítica Bakerbond WP C18, 5  $\mu$ m, 4,6 x 100mm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, detecção a 214nm.....121
- Figura 4.74: Gráfico da área obtida por RP-CLAE *versus* concentração da EPOhr no LEa acrescido de albumina.....122

## RESUMO

A Eritropoetina é uma glicoproteína produzida pelo rim que atua como fator hormonal na formação de eritrócitos. A clonagem do gene da Eritropoetina Humana levou à produção da proteína recombinante (EPOhr) para o tratamento de anemias associadas à insuficiência renal crônica, uso terapêutico de Zidovudina, tratamentos oncológicos e redução de transfusões sanguíneas. O controle de qualidade de proteínas recombinantes requer a combinação de metodologias para a completa identificação, caracterização e avaliação da potência biológica. Dentre as metodologias preconizadas para análise da homogeneidade da EPOhr pela Farmacopéia Européia (F.E.) e pelo *Centro de Inmunología Molecular* (CIM), destaca-se a Focalização Isoelétrica (IEF), Eletroforese Capilar de Zona (CZE), Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular (SEC-CLAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-CLAE). O objetivo do presente estudo foi padronizar e otimizar tais metodologias conforme recomendações da F.E. e do CIM, visando ao controle de qualidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) da EPOhr em Bio-Manguinhos. Além disso, através dessas técnicas avaliou-se uma amostra referente a um Lote Experimental contendo arginina (LEa) em comparação com a Preparação de Referência Biológica (BRP) da F.E. Assim como as demais proteínas glicosiladas, a EPOhr compreende uma mistura de isoformas relacionada ao grau de glicosilação e à presença de ácido siálico, o que foi evidenciado através das técnicas de IEF e CZE. Foram detectadas de 7 a 9 isoformas em IEF e 8 isoformas em CZE com os percentuais de cada uma de acordo com as especificações vigentes. O valor médio de PM da três amostras da EPOhr (IFA, LEa e BRP) estimado foi de 31,53 kDa através da SDS-PAGE, onde detectou-se uma única banda eletroforética difusa de acordo com dados do CIM e da literatura. Além disso, os parâmetros para a validação das técnicas IEF e SDS-PAGE foram avaliados conforme a RE 899 da ANVISA e comprovam a sua reprodutibilidade. A SEC-CLAE e RP-CLAE demonstraram que a amostra analisada LEa não obteve percentual de pureza conforme as especificações da F.E. Entretanto, tais metodologias demonstraram-se eficazes e reprodutíveis para análise da pureza do produto intermediário da EPOhr, tendo em vista os perfis dos cromatogramas obtidos em concordância com as especificações e com baixa discrepância entre as réplicas. Conclui-se que após a completa validação das técnicas padronizadas no presente estudo, será possível a implantação na rotina do Controle de Qualidade em Bio-Manguinhos/Fiocruz uma adequada análise do IFA EPOhr quanto a sua homogeneidade.

## ABSTRACT

The Erythropoietin is a glycoprotein produced by the kidney that acts as a hormonal factor in the formation of erythrocytes. The cloning of the human erythropoietin gene led to the production of recombinant protein (EPOhr) for treatment of anemias associated with chronic renal therapeutic, use of zidovudine, cancer treatments and reduction of blood transfusion. The quality control of recombinant proteins requires the combination of methodologies for complete identification, characterization and evaluation of the biological potency. Among the methodologies advocated by the European Pharmacopoeia (E.P.) and the Center of Molecular Immunology (CIM) for the analysis of homogeneity of EPOhr stands the Isoelectric Focusing (IEF), Zone Capillary Electrophoresis (ZCE), Electrophoresis denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE), High Performance Liquid Chromatography by Size Exclusion (SEC-HPLC) and High Performance Liquid Chromatography by Reversed Phase (RP-HPLC). The aim of this study was to standardize and optimize methodologies such as recommendations from F.E. and CIM in order to quality control of Active Pharmaceutical Ingredient (IFA) of EPOhr in Bio-Manguinhos. Furthermore, using these techniques a sample is evaluated referring to an experimental plot containing arginine (LEa) compared with the Biological Reference Preparation (BRP) of E.F. Like other glycosylated proteins, the EPOhr comprises a mixture of isoforms related to the degree of glycosylation and the presence of sialic acid, which was evidenced through the techniques of CZE and IEF. Were detected 7-9 isoforms in IEF and 8 isoforms in CZE with the percentages of each in accordance with the specifications in force. The average value of PM of the three samples (IFA, LEa and BRP EPOhr) was 31.53 kDa estimated by SDS-PAGE, which detected a single electrophoretic band diffuse according to the CIM and literature. Moreover, the parameters for the validation techniques IEF and SDS-PAGE were evaluated according to RE 899 ANVISA and prove their reproducibility. The SEC-HPLC and RP-HPLC showed that the sample analyzed as LEa not obtained purity percentage as specified by E.F. However, these methods proved to be effective and reproducible for analysis the purity of intermediate product of EPOhr, because of the profiles of chromatograms obtained in accordance with the specifications and with low discrepancy between replicas. We conclude that after full validation of standardized techniques in this study, it will be possible to implement in routine Quality Control in Bio-Manguinhos/Fiocruz an adequate analysis of IFA EPOhr as homogeneity.

## **1- INTRODUÇÃO**

### **1.1- Biofármacos**

A biotecnologia moderna, baseada na tecnologia do DNA recombinante, emergiu no início dos anos 70 como uma oportunidade desafiadora para o desenvolvimento de novas proteínas terapêuticas, os biofármacos. Em 1982 iniciou-se a produção e comercialização da insulina recombinante e, em 1985, do hormônio de crescimento humano. Atualmente, muitas drogas recombinantes para o tratamento de diversas doenças já tiveram sua comercialização autorizada pelas agências regulatórias e outras se encontram em estágio de aprovação (Damm, 1998; Khafagy & Morishita, 2012).

Os biofármacos são medicamentos biológicos obtidos industrialmente de microrganismos ou células modificadas geneticamente, cultivadas em reatores, para a produção de determinadas proteínas que são idênticas ou muito parecidas com as proteínas humanas. Tais medicamentos são produtos gerados empregando tecnologia molecular e expressos em grandes quantidades, geralmente em células bacterianas ou células de mamíferos (Damm, 1998; Kaltashov et al. 2012). As principais aplicações da biotecnologia moderna na área de saúde são o uso da engenharia genética para a produção de biofármacos, vacinas e reativos para diagnóstico (Werner, 2004).

No Brasil, cabe à ANVISA/MS, dentre outras competências, a concessão do registro do produto biológico, após criteriosos estudos e análises técnico-científicas e regulatórias. Todo medicamento comercializado no mercado farmacêutico deve, obrigatoriamente, ser registrado conforme legislação vigente. Após o registro é iniciado em trabalho de monitoramento pós comercialização (Farmacovigilância), em que é monitorado a sua segurança, eficácia e qualidade terapêutica. Caso o produto seja comercializado sem o devido registro no órgão regulador, será prontamente recolhido e a empresa produtora sofrerá as penalidades cabíveis, conforme Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977 (Brasil, 2010).

Os produtos biológicos devem ser submetidos a estudos de estabilidade para a definição de prazos de validade. Tais estudos devem contemplar os resultados das análises, justificando o prazo de validade sob as condições de armazenamento estabelecidas. Além disso, os estabelecimentos fabricantes de biofármacos são submetidos à inspeção para fins de emissão do Certificado de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Caso os produtos biológicos apresentem reações adversas, especialmente devido ao uso inadequado, deve-se comunicar aos profissionais de saúde, que as notificarão ao Centro Nacional de Monitoramento de Medicamentos (CNMM), da Unidade de Farmacovigilância/ANVISA/MS (Brasil, 2010).

Na eventualidade de detecção de indícios de fraudes, falsificações, adulterações, estas são, imediatamente, notificadas pelo setor competente da ANVISA/MS aos órgãos do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), para providências cabíveis. A validade do registro de produto biológico são cinco anos, contados da data de sua publicação no Diário Oficial da União. Após este período, caso a empresa detentora não solicite a revalidação do registro, este será considerado caduco, sendo, por conseguinte, cancelado (Brasil, 2010).

A indústria de biofármacos vem crescendo substantivamente convertendo-se rapidamente em um setor estratégico de alto valor econômico em vários países e regiões do mundo e hoje representa cerca de 84 biomedicamentos de uso geral na medicina. Mais ou menos 500 biofármacos estão em ensaios clínicos, assegurando o crescimento deste setor. Os principais focos são para o tratamento do câncer, enfermidades infecciosas e cardiovasculares. (Werner, 2004; Khafagy & Morishita, 2012).

Os produtores nacionais têm interesse significativo no setor de biofármacos e vêm fazendo um alto investimento neste mercado. Os produtos biotecnológicos estão incluídos em diferentes programas de governo e uma vez que são produtos de alto valor agregado e alto custo, consomem uma parcela significativa do orçamento para saúde. Desta maneira, há um grande interesse do governo brasileiro que produtos biotecnológicos estejam cada vez mais disponíveis no mercado para que seu acesso seja ampliado, sendo sempre resguardadas as questões de eficácia e segurança (ANVISA, 2011).

Neste sentido, desde o ano de 2009, diversas questões relacionadas aos produtos biotecnológicos e o aumento da capacidade nacional de produção dos mesmos vem sendo discutidas no Grupo do Complexo Industrial da Saúde (GECIS). Entre as diversas necessidades observadas por este grupo, houve o apontamento da necessidade de revisão do marco regulatório para registro de produtos biológicos, categoria em que estão enquadrados os produtos biotecnológicos no Brasil (ANVISA, 2011).

A categoria de produto biológico era mencionada na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 315/05 da ANVISA, que versa sobre o Regulamento Técnico de Registro, Alterações Pós-Registro e Revalidação de Registro dos Produtos Biológicos Terminados, a qual considerava os seguintes medicamentos biológicos: vacinas, soros hiperimunes, hemoderivados, biomedicamentos (obtidos a partir de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal e obtidos por procedimentos biotecnológicos), anticorpos monoclonais, medicamentos contendo microrganismos vivos, atenuados ou mortos, probióticos e alérgenos. Em dezembro de 2010, foi publicada a RDC nº 55/2010, a qual revogou a RDC nº 315/05 e atualmente é o marco regulatório para registro de produtos biológicos. Para elaboração deste documento, foram considerados os marcos regulatórios e guias de diferentes agências no mundo, como Health Canadá (Canadá), European Medicines Agency - EMA (Europa), Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos - CECMED (Cuba), Korae Food and Drug Administration - KFDA (Coreia), e o guia publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), específico para registro de produtos bioterapêuticos similares (Brasil, 2005; Brasil, 2010; WHO, 2011).

No decorrer do ano de 2011, as Coordenações de Pesquisa Clínica e de Registro de Produtos biológicos da ANVISA realizaram diversas reuniões com diferentes indústrias nacionais para acompanhamento do desenvolvimento de produtos biológicos. Uma ação importante foi a disponibilização do marco regulatório completo para registro de produtos biológicos, incluindo as normas de registro RDC nº 55/2010 e pós-registro RDC nº 49/2011, entre outras resoluções necessárias para o registro e pós-registro de produtos biológicos. A publicação das bases legais para registro de produtos biológicos foi feita em parceria com a ABDI (Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial) e está disponível também em formato eletrônico no sítio eletrônico da ANVISA no link de produtos biológicos (Brasil 2010; Brasil, 2011).

Outra iniciativa importante foi a criação da Câmara Técnica de Produtos Biológicos (CATEBIO), de acordo com a RDC nº 53, aprovada na reunião da Diretoria Colegiada da ANVISA e publicada no Diário Oficial da União, no dia 20 de outubro de 2011. A CATEBIO é uma instância colegiada, de natureza consultiva, vinculada tecnicamente à Coordenação de Registro e Produtos Biológicos (CPBIH), da Gerência de Avaliação de Eficácia e Segurança (GESEF), e à Gerência-Geral de Medicamentos (GGMED), formada por especialistas de notório saber na área clínica e de biotecnologia, isentos de qualquer conflito de interesse. Na CATEBIO são discutidos tanto temas específicos, como o desenvolvimento e registro de

produtos biológicos, quanto questões mais amplas, como o estabelecimento de diretrizes e a elaboração de guias por categoria de produtos (Brasil, 2011).

### **1.1.1- Produção de biofármacos**

A primeira etapa para o desenvolvimento de um biofármaco consiste em modificar geneticamente uma célula ou microrganismo pela introdução de uma sequência de DNA que produza a proteína de interesse. A célula é conservada e suas réplicas são cultivadas durante o processo produtivo, no qual, sob certas condições de crescimento inicia-se a recuperação da proteína, juntamente à outros resíduos celulares remanescentes do cultivo. Posteriormente, esse extrato é submetido à purificação, que implica em várias etapas e utilizam uma diversidade de operações unitárias e processos, até obter o componente ativo purificado. Por último, o concentrado proteico é filtrado, estabilizado e formulado. Nesta fase, são iniciados os estudos pré-clínicos e, dependendo do produto, estudos de bioequivalência, bioestabilidade e, ensaios clínicos para o tratamento terapêutico ou profilaxia. Para obter a indicação terapêutica desejada, é importante garantir que o produto seja resultante de um processo validado e amplamente controlado ao longo de todas as etapas de manufatura (Mosaabadi, 2006; Khafagy & Morishita, 2012).

No processo produtivo, são detectadas impurezas oriundas, respectivamente, do processo fermentativo (componentes extracelulares e da lise celular) e do próprio produto (proteínas celulares do microrganismo), tornando a purificação um grande desafio. Dentre as impurezas inerentes ao extrato bruto dos microrganismos estão relacionados fragmentos da própria célula hospedeira, endotoxinas e ácidos nucleicos. Conseqüentemente, o desenho do processo para purificar o produto desejado, a fim de se obter uma proteína com altos padrões qualitativo e quantitativo, é uma tarefa fundamental. Antes da inicialização da escala de produção, o processo deve ser otimizado e caracterizado em cada etapa para que se obtenha um produto seguro e de alta qualidade (Mosaabadi, 2006).

Quando comparada às drogas sintéticas, as proteínas terapêuticas possuem alta especificidade e atividade em concentrações baixas, o que reduz o potencial de toxicidade. (Chuan & Robinson, 2001). Entretanto, devido à relevância do controle de processo associado com a produção de biofármacos e materiais derivados de biotecnologia, grande atenção e cuidados devem estar voltados para a necessidade de um monitoramento, incluindo conteúdo

genético do sistema de expressão, partículas virais, expressão de genes retrovirais endógenos e outros agentes adventícios microbianos (Brinks et al. 2010).

Para um produto obtido por síntese química, o qual é composto de uma molécula menor, alguns ensaios de bioequivalência com o produto original poderão ser suficientes. Entretanto, para demonstrar a compatibilidade de um biofármaco, precisa-se de muito mais rigor, devido às inúmeras etapas para a sua produção, utilizando procedimentos de manufatura e controle bem estabelecidos, com ensaios de toxicidade, farmacocinética *in vivo*, farmacodinâmica e, essencialmente, ensaios de imunogenicidade, além dos outros ensaios clínicos de segurança e eficácia necessários em cada caso (Roche, 2007; Brasil, 2010).

A maioria das proteínas de uso terapêutico consiste de moléculas complexas e glicosiladas. As cadeias de carboidratos em glicoproteínas são relativamente longas e se localizam na parte externa da molécula. Esta grande proporção de carboidratos, associada à sua localização periférica, influencia fortemente nas propriedades físico-químicas das glicoproteínas. Quando cadeias de carboidratos são removidas de uma glicoproteína, sua massa molar é reduzida em até 40% e a molécula torna-se menos hidrofílica, o que se reflete na queda de sua solubilidade e na formação de agregados insolúveis. Além disso, sua estabilidade bioquímica é afetada, já que fica mais sujeita a proteólise e desnaturação (Damm, 1998; Khafagy & Morishita, 2012).

## **1.2- Eritropoetina Humana**

A Eritropoetina (EPO) é uma glicoproteína produzida pelo rim, mais precisamente pelas células adjacentes aos túbulos proximais renais, sendo sua produção estimulada por hipóxia. Ela atua como fator hormonal de estimulação mitótica e de diferenciação, aumentando a formação de eritrócitos maduros a partir das células progenitoras eritróides (Eschbach & Adamson, 1985). A Eritropoetina circulante se liga aos receptores na superfície de células eritróides progenitoras resultando em replicação e maturação de eritrócitos funcionais (Lacombe & Mayeux, 1999; Chateauvieux et al. 2011).

Esta glicoproteína contém 166 aminoácidos e uma massa molar que varia entre 34 e 40 kDa, dos quais 40% são carboidratos. Os açúcares presentes em sua estrutura contribuem para sua solubilidade, metabolismo *in vivo* e processamento celular (Gokana et al. 1997). Apresenta 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, como demonstrado na figura 1.1 (Zhang et al. 2009).

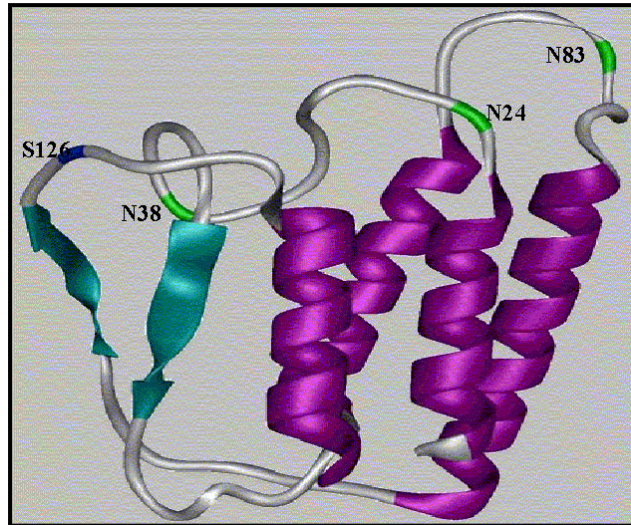


Figura 1.1: Estrutura tridimensional da Eritropoetina Humana, demonstrando três sítios de N-glicosilação (Asn24, Asn38 e Asn83) e um de O-glicosilação (Ser126). (*Protein Data Bank, 2003*).

A forma ativa do hormônio, que circula no plasma e interage com as células-alvo, sofre um processo proteolítico na extremidade C-terminal perdendo o último resíduo de arginina, portanto, a EPO ativa apresenta 165 aminoácidos. Sua estrutura terciária é globular, caracterizada por quatro hélices  $\alpha$  e duas folhas  $\beta$  anti-paralelas (Figura 1.2) (Wang et al. 1985; Lai et al. 1986; Recny et al. 1987; Choi et al. 1996).

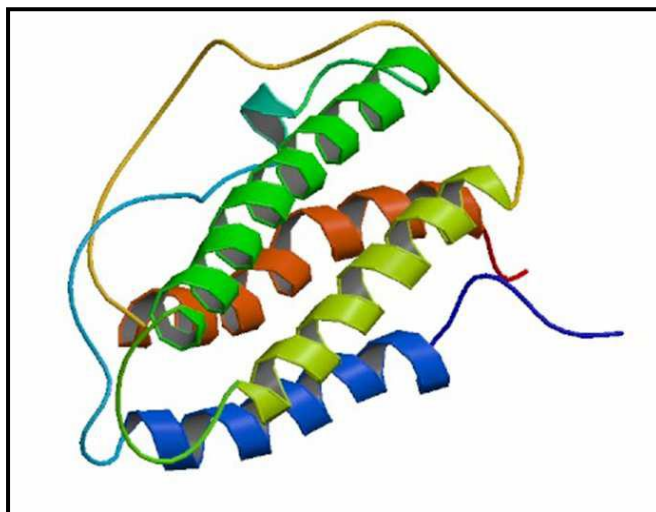


Figura 1.2: Estrutura tridimensional da Eritropoetina Humana na sua forma ativa, circulante no plasma (NCBI, 2011).

Assim como as demais proteínas glicosiladas, a EPO compreende uma mistura de isoformas heterogêneas, relacionada ao grau de glicosilação e à ausência ou presença de resíduos de ácido siálico com variado grau de acetilação. Portanto, o grau de sialiação das cadeias polissacarídicas influencia fortemente na mobilidade eletroforética e no ponto isoelétrico (pI) da molécula (Gokana et al. 1997). Estudos demonstram que o ponto isoelétrico da EPO varia entre 4,5 e 5,0, aproximadamente (Lai et al. 1986; Choi et al. 1996; Tanaka & Nangaku, 2012). Os resíduos glicídicos da EPO podem ser visualizados na figura 1.3, na qual se observa a presença de N-acetil glicosamina (GlcNAc), fucose (Fuc), ácido siálico (S), manose (Man), galactose (Gal) e N-acetil galactosamina (GalNAc).

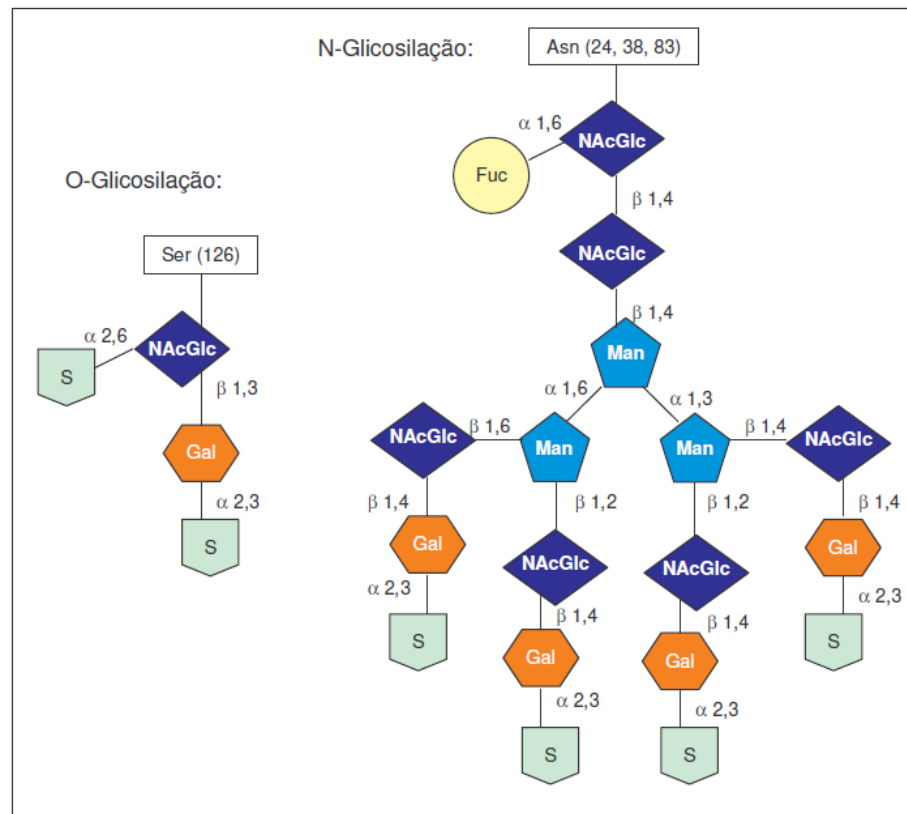


Figura 1.3: Estrutura das cadeias glicídicas da Eritropoetina Humana (Kratje et al., 2004).

### 1.2.1- Breve histórico

A hipótese referente ao controle da eritropoiese por um fator humoral foi primeiramente formulada por Carnot e De Flandre (1906) ao verificarem um aumento de 20 a 40% no número de glóbulos vermelhos em coelhos, dois dias após receberem uma única injeção de soro proveniente de coelhos tornados anêmicos por flebotomia, dando a esse provável fator o nome de hemopoietina. Posteriormente, os resultados de Hjort (1936), Krumdieck (1943) e Erslev (1953), demonstraram que a injeção de grandes volumes de plasma ou soro, provenientes de coelhos submetidos a sangramento determinava em coelhos normais um rápido aumento de reticulócitos no sangue periférico, provando a existência de um fator humoral no controle da eritropoiese. Somente quase meio século após, Bonsdorff & Jalavisto (1948), propuseram uma denominação mais apropriada de Fator Estimulante da Eritropoiese ou Eritropoetina (EPO), cujo papel humoral foi corroborado por Reissmann em 1950, que a evidenciou no sangue de animais submetidos à hipóxia.

O local de produção da EPO foi muito controverso até 1957, quando Jacobson e colaboradores apresentaram uma hipótese altamente sugestiva da sua produção pelos rins, pois a nefrectomia bilateral em ratos sob sangria eliminava a resposta eritropoética. Kuratowska e colaboradores (1961), bem como Fisher & Birdwell (1961), demonstraram que a EPO podia ser produzida por rins isolados e perfundidos, assim como a sua produção não era evidenciada em pacientes anêmicos e portadores de insuficiência renal crônica (Fisher, 1988).

Recentemente, muitas evidências através de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a Eritropoetina tem capacidade de proteger os tecidos contra trauma, toxinas e outros danos. Esta proteção é principalmente mediada pela inibição da apoptose, da inflamação e indução da angiogênese devido ao aumento da EPO no tecido lesionado. Estes efeitos protetores são principalmente conhecidos nos tecidos cardíaco e neural (Chateauvieux et al. 2011), mas são também relatados na degeneração da retina, lesão auditiva e pancreática (Frede et al. 2011). A Eritropoetina humana recombinante (EPOhr), que foi desenvolvida para tratar a anemia, não é adequada para a proteção dos tecidos, devido a baixa afinidade com o receptor não hematopoiético, necessitando administração de uma excessiva concentração de agentes estimuladores da eritropoiese (AES), o que implica em graves efeitos colaterais (Chateauvieux et al. 2011; Frede et al. 2011; Grigorakaki et al. 2011).

### 1.3- Eritropoetina Humana Recombinante (EPOhr)

A EPO foi primeiramente isolada do plasma de ovelha anêmica em 1971 (Derby et al. 1996). Posteriormente, Myake e colaboradores (1977) isolaram e purificaram o hormônio da urina de indivíduos portadores de Ancilostomose ou de anemia aplástica, sendo então utilizada, embora de forma limitada, para fins farmacêuticos. Com o advento da engenharia genética, o gene codificado para EPO humana foi clonado obtendo-se então a EPOhr, em cultura de células de mamíferos, como as de ovário de hamster chinês (CHO) e de rim de hamster jovem (BHK) (Lin et al. 1985). A partir desse evento, a obtenção da EPO passou a ser por tecnologia do DNA recombinante, em grande escala e altamente purificada, dando-se o início a produção industrial biotecnológica da EPOhr em 1988, fato que possibilitou o seu vasto emprego clínico no tratamento de anemias, evitando as transfusões sanguíneas (Cotes, 1988).

A glicosilação da EPO é um processo pós-tradução que é influenciado pelo tipo de célula na qual a EPO é expressa. Foi demonstrado que a EPOhr produzida em sistemas bacterianos não apresenta estrutura de carboidratos devido a incapacidade dos sistemas bacterianos fazer modificações pós-traducionais e, conseqüentemente, sua atividade biológica *in vivo* é mínima devido à reduzida meia-vida biológica na circulação sanguínea (Dordal et al. 1985; Griffiths, 1991; Grunwald, 1995). Por outro lado, as EPOhrs produzidas por 3 diferentes linhagens de células de mamíferos, demonstraram diferentes composições de isoformas e diferentes graus das propriedades biológicas *in vivo* (Storring et al. 1998; Lamon et al. 2010; Tanaka & Nangaku, 2012).

Quando comparada a EPO humana de origem urinária, a EPOhr produzida por cultura de células CHO tem estruturas similares de carboidratos, e é caracterizada pela presença de cadeias  $\alpha$  (31 a 39% de carboidratos) e  $\beta$  (24% de carboidratos) (Sasaki et al. 1987; Gild et al. 1996). A cadeia  $\alpha$  apresenta maior quantidade de isoformas ácidas devido à presença de variadas porções molares de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico), o qual é o único glicídio que confere a carga negativa ao hormônio. As três cadeias de carboidratos N-ligados podem conter duas ou até quatro ramificações com ácido siálico em suas terminações, e a cadeia de carboidrato "O" ligada pode apresentar até duas ramificações com moléculas de ácido siálico (Figura 1.4). Desta forma, a perda total de resíduos de ácido siálico resulta na ausência de atividade biológica *in vivo* da EPO, provavelmente decorrente da rápida depuração metabólica oferecida pelas proteínas de ligação das células hepáticas para a

galactose, a qual é o penúltimo sacarídeo de algumas cadeias de oligossacarídeos da EPO (Dubé et al. 1988; Fukuda et al. 1989, Llop et al. 2008).

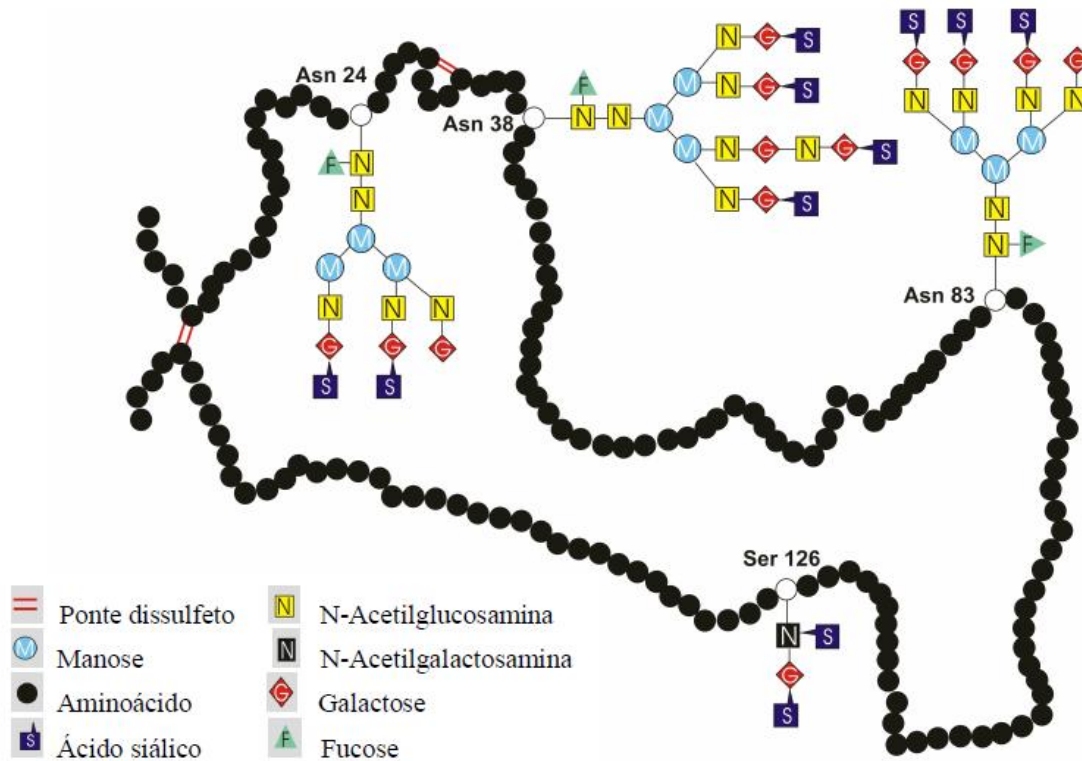


Figura 1.4: Cadeias glicídicas de N-glicosilação e O-glicosilação mais comumente presentes na molécula de EPOhr (Adaptado de NCBI, 2011).

A clonagem do gene da Eritropoetina Humana levou à produção da proteína recombinante, que recebeu aprovação do FDA para o tratamento da anemia associada à insuficiência renal crônica (Lin et al. 1985). A Eritropoetina Humana Recombinante contém 165 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 34 kDa. O produto gênico contém uma sequência de aminoácidos idêntica àquela da eritropoetina natural, porém, apresenta um padrão de glicosilação diferente, o que resulta em diferentes perfis isoelétricos (Lasne & Ceaurriz, 2000; Lasne et al. 2002). A complexa estrutura glicosilada da EPOhr torna imprescindível uma cuidadosa manutenção das condições operacionais preconizadas durante o processo produtivo, de modo a minimizar a heterogeneidade e, conseqüentemente, maximizar o rendimento das isoformas de maior atividade biológica (Moraes et al. 2008).

Alfaepoetina, betaepoetina e ômegaepoetina são as formas da EPOhr atualmente disponíveis no mercado para uso terapêutico. Tal classificação é dependente do método de fabricação, sendo as duas primeiras sintetizadas a partir de células CHO, enquanto que a última é produzida em células BHK. Apesar de as células CHO e BHK glicosilarem proteínas de modo bastante similar ao que ocorre na célula humana, algumas regiões de carboidratos não são sintetizadas por estas células devido à ausência de enzimas açúcar-transferases específicas. Enquanto a síntese da cadeia peptídica é geneticamente regulada, as cadeias polissacarídicas são processadas e ligadas por uma série de reações enzimáticas. Essas formas de EPOhr são compostas por diversos tipos de isoformas, devido à microheterogeneidade na estrutura do hormônio provocada pela variação na composição polissacarídica. As isoformas da EPOhr diferem parcialmente em sua composição quando analisadas pela técnica de focalização isoeletrica. Através dessa técnica, é possível visualizar não só maior número de bandas referentes às isoformas da betaepoetina, significando maior quantidade de isoformas, bem como uma região com bandas extras em valores de pH mais elevados, conferindo-lhes características mais básicas (Catlin & Hatton, 1991; Birchard, 2000; Skibeli et al. 2001).

Atualmente, outras formas de EPOhr estão disponíveis no mercado. Darbepoetina- $\alpha$  ou Nova Proteína Estimuladora da Eritropoiese (NESP) foi definida como a segunda geração da EPOhr, a qual é uma glicoproteína que difere da EPO na sua forma nativa por cinco aminoácidos permitindo a ligação de oligossacarídeos adicionais. Além desta forma, existe a Epoetina- $\delta$ , produzida por ativação do gene em células de fibrossarcoma humano. A terceira geração da EPOhr é denominada Epoetina- $\beta$  peguilada, na qual foi adicionado uma molécula grande de polietilenoglicol, conferindo a maior meia-vida a proteína quando comparada com as outras formas (Lamon et al. 2010; Nett et al. 2011).

#### **1.4- Emprego terapêutico da EPOhr**

A EPOhr é utilizada há pelo menos 10 anos, com eficácia e segurança, para o tratamento de anemias associadas à insuficiência renal crônica, uso terapêutico de Zidovudina (AZT) e tratamentos oncológicos em quimioterapia, assim como para reduzir as necessidades de transfusões sanguíneas durante procedimentos cirúrgicos (Ludwig et al. 1990; Miller et al. 1992, Casadevall, 2002).

Na insuficiência renal crônica ocorre uma diminuição progressiva e, geralmente, irreversível da função renal e a anemia se apresenta como sequela desta disfunção. Os

pacientes em estágio final de insuficiência renal requerem diálise ou transplante para a sua sobrevivência. Foi demonstrado que a eritropoetina estimula a eritropoiese tanto em pacientes submetidos a diálise quanto naqueles que não o fazem regularmente. A primeira evidência de resposta à eritropoetina é o incremento na contagem de reticulócitos nos primeiros 10 dias de tratamento, seguido de um aumento na contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, geralmente nas 2 - 6 semanas seguintes. Uma vez alcançada a meta proposta de hematócrito (33% - 36%), este nível deve ser mantido, se não existir deficiência de ferro ou outra doença concomitante (Bio-Manguinhos, 2005).

O desenvolvimento da anemia nos pacientes com AIDS pode ser potencializado pelo tratamento com AZT, requerendo-se, por este motivo, transfusões. Segundo monografia do produto alfaeritropoetina de Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ (2011), nestes pacientes, a resposta ao tratamento com Eritropoetina Humana Recombinante depende do nível endógeno da eritropoetina, ou seja, indivíduos com nível endógeno superior a 500 mUI/ml podem não apresentar resposta ao tratamento. Além disso, a anemia é frequentemente um sintoma concomitante ao tratamento de pacientes com câncer e a origem depende de uma combinação de fatores, onde os efeitos tóxicos diretos dos agentes quimioterápicos utilizados desempenham um papel importante. Nesses pacientes, a resposta ao tratamento com EPOhr também está relacionada ao nível endógeno do biofármaco. Pacientes com nível endógeno superior a 200 UI/ml não respondem ao tratamento.

Até meados da década de 2000, a EPOhr era considerada não imunogênica, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos anti-EPO era extremamente raro ser relatado na prática clínica. Entretanto, a partir de meados da década de 2000, houve um aumento significativo dos casos de desenvolvimento de anticorpos contra a EPOhr, o que chamou a atenção para a importância de se avaliar a imunogenicidade da Eritropoetina Recombinante, causada pela cadeia de carboidratos, utilizando ensaios sensíveis e específicos (Casadevall, 2002).

A administração de EPOhr resulta em um aumento da massa de células vermelhas, aumentando assim a concentração de hemoglobina e potência aeróbica e, conseqüentemente, induz uma melhoria do desempenho nas atividades físicas. Há evidências de que a EPOhr é utilizada por atletas para melhorar seus desempenhos em competições (Berglund & Ekblom, 1991), devido à vantagem adicional da difícil detecção de sua presença na matriz biológica através dos métodos analíticos convencionais por ser uma macromolécula complexa, presente em concentrações baixas nos fluidos biológicos, com estrutura bastante semelhante à da sua forma endógena (Bento et al. 2003). Por esse motivo, diferentes métodos para a detecção do uso indevido da EPOhr têm sido descritos, tais como separação das isoformas da EPO

urinária por Focalização Isoelétrica (Lasne & Ceaurriz, 2000) e por técnicas indiretas no sangue, utilizando-se marcadores que possam identificar eritropoiese alterada (Gore et al. 2003, Lamon et al. 2010).

De modo a evitar o uso de EPOhr com a finalidade de aumento de desempenho esportivo, foram lançados programas educativos sobre os riscos dos efeitos colaterais potenciais, mostrando que as doses administradas em pacientes para elevar o valor de hematócrito não poderiam ser extrapoladas para pessoas saudáveis, além do que, mesmo após a interrupção da sua administração, o efeito do hormônio sobre a medula óssea poderia continuar por mais alguns dias e o hematócrito tenderia a aumentar até atingir níveis perigosos (Bento et al. 2003). A desidratação, frequente durante e após o esforço físico intenso de uma competição, aliada à hemoconcentração, poderia acarretar risco iminente à saúde, por aumento da viscosidade sanguínea e redução do débito cardíaco, levando a quadros de hipertensão e possíveis eventos trombóticos (Catlin & Hatton, 1991; Birchard, 2000).

### **1.5- Purificação da EPOhr**

Antes de iniciar qualquer processo de purificação de proteínas, é necessário selecionar ensaios bioquímicos apropriados para detectar e quantificar a proteína de interesse. Primeiramente, deve-se analisar a função da proteína, ou seja, se for uma enzima, deve-se medir sua capacidade de converter um substrato em produto. Quando a proteína de interesse não possui atividade enzimática, pode ser quantificada imunologicamente, tipicamente por Western blot, ou por medição de densitometria (Ward & Cormier, 1979).

Embora seja esperado que a pureza irá aumentar a cada etapa de purificação, não existe um valor máximo definido. O número de etapas de purificação origina uma curva hiperbólica, que atinge o ponto máximo quando a proteína está pura. A confirmação do alcance da pureza máxima pode ser realizada de diferentes maneiras, cujos critérios aceitos para as proteínas de maneira geral incluem parâmetros, tais como: único pico cromatográfico de alta resolução em um cromatograma; uma única banda em SDS-PAGE; peso molecular único determinado por espectrometria de massa e uma única banda no gel de focalização isoelétrica (Ward & Swiatek, 2009). Este último parâmetro não se aplica a EPOhr, visto que esta glicoproteína compreende em uma mistura de isoformas, apresentando por isso mais de uma banda na análise por focalização isoelétrica (Gokana et al. 1997)



O trabalho de Broudy et al. (1988) representou um marco, já que pela primeira vez a EPO urinária foi substituída pela EPO recombinante. O sobrenadante de cultivo contendo células BHK foi aplicado em colunas com Cibacron Blue, Mono Q e fase reversa. Este procedimento, cuja recuperação global foi de 35%, resultou em um grau de purificação de até 160 vezes e com atividade específica de 84.000 U/mg. A fração pura da proteína apresentou uma única banda de 34 kDa em SDS-PAGE, o que prova a importância da expressão de glicoproteínas em células de mamíferos, capazes de realizar modificações pós-tradução. A diferença de glicosilação entre a EPO urinária e a recombinante pode alterar sua atividade biológica *in vivo* ou sua meia-vida no plasma. Quelle et al. (1989), por sua vez, purificaram EPOhr expressa em células do inseto *Spodoptera frugiperda* e o sobrenadante de cultivo foi concentrado e aplicado em coluna DEAE-Sepharcel. Após concentração das alíquotas eluídas, estas foram submetidas diretamente à cromatografia (CLAE) de fase reversa e, em seguida, em agarose-conA. O fator de purificação global após esta última etapa foi de 890, com atividade específica de 200 U/mg. A caracterização da EPOhr pura revelou a existência de três isoformas (22 kDa, 24 kDa e 26 kDa), quando as células foram cultivadas em presença de menos de 4% de soro fetal bovino, e uma única forma (26 kDa) em meio contendo mais de 4% de soro. Ensaios biológicos mostraram, todavia, atividades equivalentes para as isoformas de 24 kDa e 26 kDa. Portanto, os resultados provaram que o nível de glicosilação limitado das células de inseto é suficiente para se obter EPOhr com atividade *in vitro*. No entanto, a ausência de ácido siálico nos sacarídeos derivados nos insetos explica a falta de atividade *in vivo*.

Benghanem et al. (1994) desenvolveram um AcM anti-EPO e purificaram a EPOhr obtida de meio de cultura contendo células linfoblastóides em duas etapas: cromatografia de imunoafinidade (usando o anticorpo imobilizado em Sepharose\_4B) seguida de cromatografia de troca iônica com DEAE-Sepharose. A combinação destas duas etapas resultou em uma EPOhr altamente purificada, com rendimento global de 50% (Kishino & Miyazaki, 1997).

Bill et al. (1997) desenvolveram um método rápido para purificar EPOhr com objetivo de estudar sua relação estrutura-função. Isto foi possível através da construção de um sistema de expressão, no qual o gene do peptídeo *myc* foi inserido na fração C-terminal da EPOhr. Após transfecção deste vetor, a proteína hEPO-*myc* foi purificada em coluna cromatográfica com anticorpo anti-*myc* imobilizado. A fim de separar as isoformas, Gokana et al. (1997) aplicaram meio de cultura de células linfoblastóides contendo EPOhr em coluna Sepharose anti-EPO. Além do rendimento satisfatório de 86% desta primeira etapa, foi possível aumentar a atividade biológica da EPO em 647 vezes. Em seguida, aplicou-se a fração eluída

da primeira coluna em DEAE Sphacel, com a qual separaram-se 7 isoformas da proteína dentre frações de pI básico, intermediário e ácido. Devido ao elevado número de isoformas presentes no meio, a resolução do método não foi suficiente para isolar uma única isoforma de EPO. Entretanto, foi obtida uma quantidade suficiente de frações para estimativa de pureza. O recuperação deste fracionamento foi de 65% da EPO aplicada na troca iônica.

A fim de desenvolver um meio livre de soro (LS) para produção de EPOhr por uma cultura de células CHO em suspensão, Lee et al. (1999) utilizaram uma abordagem de otimização estatística para determinar as condições ótimas. Uma das variáveis analisadas foi atividade biológica da EPO e, por esta razão, se fez necessária a obtenção da proteína pura. Sua purificação foi realizada com aplicação do sobrenadante em coluna de fase reversa. A concentração de EPO no meio LS foi de 17,9 mg/mL, aproximadamente 79% da concentração no meio com 5% de soro. Apesar da concentração mais baixa em meio LS, a facilidade de purificação e testes de qualidade assegurada superam esta desvantagem. Além disso, as atividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo* de ambas as EPOs foram muito próximas.

Chung et al. (2001) estudaram o efeito do butirato de sódio na estrutura dos N-oligossacarídeos da EPOhr produzida em células CHO. Após purificação do sobrenadante da cultura em coluna de afinidade (heparina-Sepharose) e imunoafinidade, obteve-se EPOhr homogênea, da qual a fração de N-oligossacarídeos foi isolada para análise por cromatografia líquida. O trabalho mostrou que o butirato de sódio tem efeito negativo sobre a estrutura da EPO, já que se observou aumento da proporção de asialoglicanos, ou seja, oligossacarídeos com ausência de ácido siálico na estrutura.

Na pesquisa realizada por Wang et al. (2002), comparou-se a produtividade e qualidade da EPOhr secretada por célula CHO em diferentes modos de cultura: biorreator em leite fluidizado (Cytopilot), frascos T, frascos *spinner* e biorreator em tanque agitado. Em todos os casos, a EPO foi purificada em coluna de imunoafinidade, dialisada e concentrada com membrana de ultrafiltração com limite de retenção de 10 kDa. A maior densidade celular foi alcançada com o Cytopilot quando comparada com as demais culturas. Entretanto, o maior valor para produtividade específica de EPO, medida através de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), foi na fase estacionária das células cultivadas.

Burns et al. (2002) criaram uma EPO mutante destinada especificamente para inibir a eritropoiese através da substituição de uma alanina por uma arginina na posição 103 (EPO R103A), impedindo assim seu reconhecimento pelo receptor da EPO. O vetor contendo a mutação assim como uma cauda de histidina na posição C-terminal foi clonado na levedura

*Pichia pastoris*. O sobrenadante resultante do cultivo das células de levedura foi aplicado em coluna de 4 mL empacotada com NTA-Ni<sup>2+</sup>. Após lavagem da coluna com tampão de equilíbrio, a EPO mutante foi desorvida com tampão de eluição (imidazol 0,25 M, 0,5 M NaCl, Tris-HCl 20 mM pH 8,0). A EPO recuperada, cuja concentração medida foi de 2 mg/L, apresentou elevado grau de pureza constatado por gel de eletroforese.

Além de Inoue et al. (1994) e Lasne et al. (2002), Amadeo et al. (2003) também exploraram a capacidade de lectinas vegetais interagirem com açúcares, utilizando-as como ligantes em cromatografia de afinidade para purificação da EPOhr a partir de caldo de cultura de células CHO. Após ensaio de hemaglutinação, escolheram-se as lectinas de tomate, batata, germen de trigo e jiquiriti que, depois de purificadas por afinidade, foram imobilizadas em Sepharose. O resultado da purificação revelou a eficiência da WGA, que reteve até 97% da EPOhr presente. A cromatografia com WGA-Sepharose resultou em preparações de EPOhr com até 70% de pureza em uma única etapa.

Apesar da disponibilidade de técnicas cromatográficas para purificação da EPOhr, nem todas foram testadas em escala industrial. A fim de preencher esta lacuna, Zanette et al. (2003) descreveram um processo para purificação da EPOhr em larga escala, o qual envolve uma etapa inicial de captura da EPO por uma resina de enilborato e agarose. Os ligantes do fenilborato formam complexos com moléculas contendo duas hidroxilas vicinais em configuração *cis*. Apesar da formação de duas ligações covalentes, a esterificação é facilmente revertida pelo deslocamento destas moléculas por compostos diol, como sorbitol ou tampões altamente hidroxilados como Tris (tris-hidroximetil-aminometano). Esta primeira etapa de purificação da EPOhr a partir de 3,2 litros de sobrenadante de cultura de célula animal apresentou um rendimento de 76% e fator de purificação de 18 vezes. Em seguida, a EPO passou por uma etapa de cromatografia de troca aniônica em coluna SepharoseQ e, por fim, por uma de cromatografia de fase reversa preparativa. No final desta última etapa a EPO foi recuperada com rendimento de 30% e fator de purificação de 97 vezes.

## **1.6- Transferência de Tecnologia**

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, a qual prevê três etapas. A primeira é a obtenção do registro do produto EPOhr junto à Anvisa e o fornecimento do produto ao Ministério da Saúde. Nesta etapa, o produto é fornecido pelo CIM, envasado em frascos-ampola (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).

A assinatura do contrato de transferência de tecnologia entre o CIM e Bio-Manguinhos foi realizado em agosto de 2004 e, a partir de dezembro de 2004, os Comitês Técnicos 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 precisa da conclusão das obras da área de formulação e do CIPBR (Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnóstico) 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).

### **1.7- Produção da EPOhr no *Centro de Imunología Molecular* (CIM)**

O processo produtivo da EPOhr realizado no CIM, o qual será implementado em Bio-Manguinhos ao final das etapas de transferência de tecnologia do produto, foi detalhado neste capítulo para melhor compreensão segundo relatório técnico de Bio-Manguinhos (2005). A produção inicia-se pelo processo de fermentação para crescimento das células CHO e, conseqüentemente, a produção da EPOhr é realizada em biorreatores do tipo tanque agitado, tendo a velocidade de agitação, temperatura, pH e 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.

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

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 metal imobilizado. Na terceira etapa, então, é utilizada a matriz Chelating Sepharose Fast flow e a coluna BPG 300/500, visando à 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  $\text{Cu}^{++}$  e os grupos imidazol da matriz cromatográfica, o qual adsorve reversivelmente os grupos histidina expostos das proteínas.

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 EPOhr ácidas (biologicamente ativas) das básicas, reter os ácidos nucleicos e concentrar o produto.

A sexta etapa de purificação 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 EPOhr na solução de formulação. E, por fim, o produto é submetido à filtração esterilizante através de membranas inertes de 0,2  $\mu\text{m}$  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.

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 EPOhr por lote. Os lotes de IFA são submetidos aos controles de qualidade e, de acordo com o resultado do teste de potência da EPOhr, 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. 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. O resumo do processo produtivo de EPOhr encontra-se exemplificado na figura 1.5.

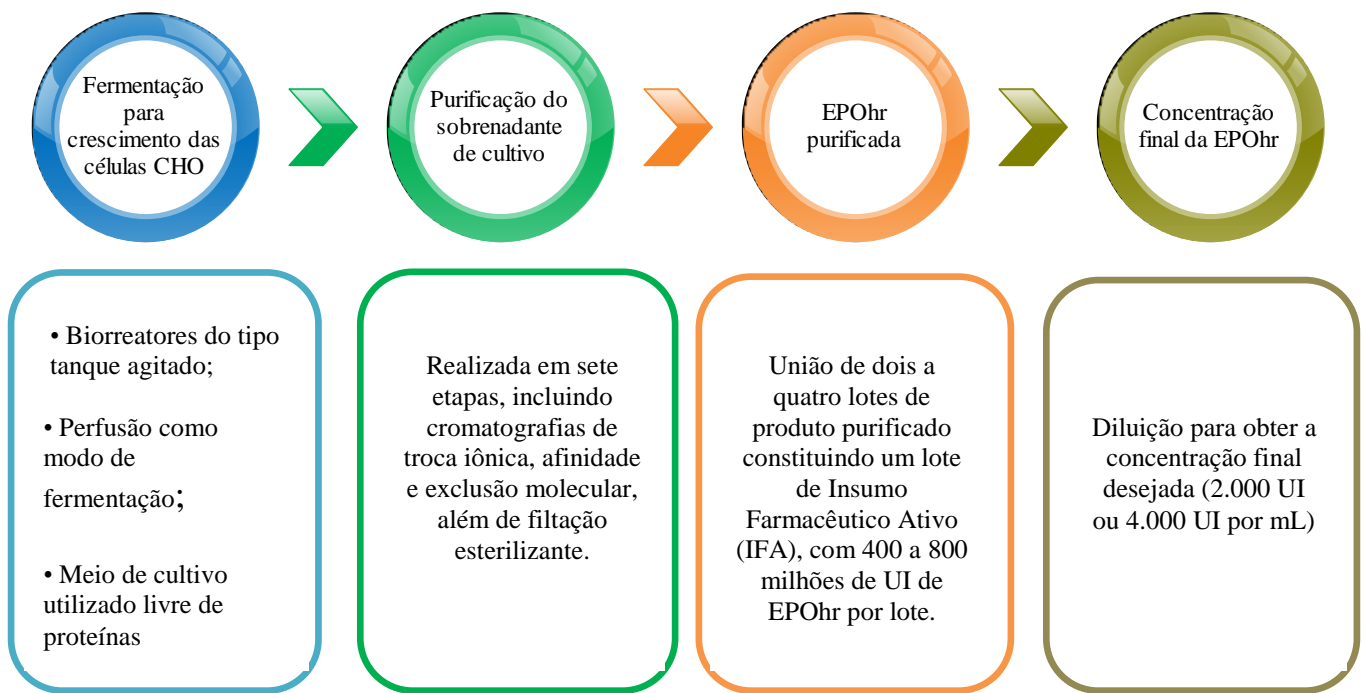


Figura 1.5: Etapas do processo produtivo da EPOhr no CIM.

## 1.8- Controle de Qualidade e Controle de Processos

A qualidade do produto biológico no mercado farmacêutico brasileiro é regularmente avaliada mediante a realização de ensaios laboratoriais executados na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas) e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

O Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica consiste de um conjunto de operações a fim de assegurar a obtenção de medicamentos cada vez melhores, mais eficazes e seguros, menos tóxicos e mais estáveis. Outro objetivo do controle de qualidade é verificar se o produto está em conformidade com as especificações farmacopeicas. Tal procedimento é importante, visto que a não conformidade representa um somatório de atribuições para a empresa que podem resultar, além dos prejuízos decorrentes do retrabalho, a perda de

credibilidade e até a cassação da licença de funcionamento e do registro do produto. Além disso, para o paciente, a falta de qualidade do medicamento ocasiona sérios transtornos com o comprometimento da sua saúde (Cooper, 1979; Gowen, 2008).

O Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que Regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros, são adotadas os seguintes conceitos técnicos: Conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos abrangidos por este Regulamento, para que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade.

O capítulo XVII da Resolução RDC 17/2010 da ANVISA, define o Controle de Qualidade como responsável pelas atividades referentes à amostragem, às especificações e aos ensaios, bem como à organização, à documentação e aos procedimentos de liberação que garantam que os ensaios sejam executados e que os materiais e os produtos terminados não sejam aprovados até que a sua qualidade tenha sido julgada satisfatória.

O Controle de Qualidade não deve resumir-se às operações laboratoriais, deve participar e ser envolvido em todas as decisões que possam estar relacionadas à qualidade do produto. O Departamento de Controle de Qualidade deve estar sob a responsabilidade de uma pessoa com qualificação e experiência apropriadas, que tenha um ou vários laboratórios de controle à sua disposição com recursos adequados para garantir que todas as atividades de controle de qualidade sejam realizadas com eficácia e confiabilidade (Brasil, 2010).

Outras atribuições do Departamento de Controle de Qualidade é estabelecer, validar e implementar todos os procedimentos de controle de qualidade, avaliar, manter e armazenar os padrões de referência, garantir a rotulagem correta dos reagentes, padrões e outros materiais de sua utilização, garantir que a estabilidade dos ingredientes ativos e medicamentos seja monitorada, participar da investigação de reclamações relativas à qualidade do produto e participar do monitoramento ambiental. Todas essas operações devem ser realizadas em conformidade com procedimentos escritos e, quando necessário, registradas (Brasil, 2010).

A qualidade dos produtos e dos processos é o desafio da atualidade para manter a competitividade e a sobrevivência das empresas, portanto, é preciso garantir que os produtos gerados estão enquadrados nos parâmetros de qualidade especificados (Cooper, 1979, Brinks et al. 2010).

O controle em processo é a essência do gerenciamento da qualidade em todos os níveis hierárquicos da empresa, desde o diretor aos operadores. As responsabilidades do controle em

processo vão além de prever os recursos necessários para realização dos ensaios físico-químicos ou microbiológicos. Trata-se de estabelecer uma sistemática de trabalho em que seja possível avaliar os resultados obtidos e monitorar ações tomadas para o ajuste dos processos, com o objetivo de garantir que o produto cumpra as especificações necessárias para sua aprovação (Peixoto Jr. et al. 2005).

As atividades do controle em processo relacionadas às análises de amostras dos produtos são recolhidas durante as diferentes etapas do processo produtivo. Os resultados, que vem a ser o produto gerado das análises quantitativas ou qualitativas, norteiam a tomada de decisões para que se dê continuidade ao processo de produção. O controle em processo, neste contexto, visa atender a demanda analítica em amostras recolhidas durante a produção. Portanto, é de extrema importância para garantir a qualidade de produtos intermediários e finais dentro das especificações requeridas (Brinks et al. 2010).

O controle em processos está atrelado à produção, diferentemente das ações relativas ao Controle da Qualidade, que aceitam ou rejeitam lotes a partir de resultados de ensaios e seus limites de especificação. As normas técnicas nacionais e internacionais para boas práticas de fabricação orientam quanto ao controle em processo e os pontos críticos de controle (Peixoto Jr. et al. 2005; Hermeling et al. 2006).

### **1.8.1- Controle de Processos e de Qualidade para a EPOhr**

Diferentemente da maioria dos medicamentos, o controle de qualidade das proteínas recombinantes, se afigura mais complexo, pois requer a combinação de metodologias de natureza físico-química, imunológica e biológica, para a completa identificação, caracterização química e avaliação da potência biológica (Gild et al. 1996). 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).

A identidade da EPOhr é obtida através da eletroforese em gel de poliacrilamida não-redutora, seguida da imunodeteção com anticorpos específicos, bem como por focalização isoeletrica, que revelará a composição das diferentes isoformas (Gild et al. 1996).

As variações da atividade biológica da EPOhr, poderão resultar em alterações da sua estrutura molecular, reconhecidamente complexa e onde se destacam número variável de



isoformas, que se diferenciam pela composição heterogênea de cadeias de carboidratos N-ligados à fração peptídica da molécula, contendo 2, 3 ou 4 ramificações que, nas suas extremidades, apresentam uma molécula de ácido siálico. Diferenças significativas entre a composição dessas isoformas e propriedades biológicas do hormônio, foram observadas entre as EPOhr de diferentes procedências, refletindo, muito provavelmente, variações relacionadas com: linhagem das células recombinantes usadas para a expressão do hormônio e/ou as condições de cultivo destas células e/ou os processos empregados para a identificação do hormônio (Kinoshita et al. 2000).

O Controle de Processo para EPOhr produzida no CIM, realiza os seguintes ensaios após as etapas de purificação: 1) determinação da concentração de proteínas pela técnica de espectrofotometria; 2) pureza pelo método de cromatografia em fase reversa e pela análise do conteúdo de dímeros e componentes de alto peso molecular; 3) mapeamento de peptídeos; 4) determinação do conteúdo de ácido siálico; 5) identidade mediante eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida e Western blot e pela análise de distribuição de isoformas mediante focalização isoeletrica; 6) determinação de DNA e de proteínas contaminantes; 7) determinação da concentração de EPO em sobrenadante por ELISA (Bio-Manguinhos, 2005).

A Farmacopéia Européia versão 7.0 recomenda que a análise da homogeneidade da EPOhr pode ser determinada por técnicas eletroforéticas e cromatográficas, tais como: 1) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-CLAE); 2) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Gel Filtração (GF-CLAE); 3) Western blot; 4) Eletroforese capilar; 5) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e 6) Focalização Isoeletrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE). Além disso, também se recomenda a identificação de ácido siálico, mapeamento peptídico, conteúdo de DNA e análise da potência.

A caracterização da EPOhr provou que a proteína produzida por tecnologia recombinante é quase idêntica a EPO humana urinária e, pode, portanto, ser utilizada terapeuticamente. Desta maneira, o uso de técnicas biológicas e imunoquímicas faz-se necessário para evidenciar a reprodutibilidade do processo de produção, de modo que o fabricante seja capaz de provar a qualidade do produto e garantir a sua segurança (Gild et al., 1996). Uma combinação de vários métodos analíticos é necessária para uma caracterização completa da proteína e para controle de qualidade adequado relacionado à homogeneidade, identidade e potência (Gild et al. 1996; Muller et al. 1996; Brinks et al. 2010).

Para o estabelecimento de métodos de controle confiáveis e no intuito de garantir a qualidade dos produtos, exatidão e veracidade das técnicas empregadas, faz-se necessário o uso de Materiais de Referência (MR). No contexto atual de Bio-Manguinhos, com a

transferência de tecnologia de EPOhr advinda do CIM, o estabelecimento de um MR físico-químico e bioquímico comum às instituições, torna possível a equivalência e melhor desempenho na implementação de técnicas bem como o controle eficiente de testes bioquímicos e físico-químicos nessa instituição.

### **1.9- Análise da homogeneidade de proteínas recombinantes**

A homogeneidade de proteínas recombinantes é determinada pela análise estatística da variação entre as unidades do produto de um mesmo ou de diferentes lotes. Uma proteína recombinante pode ser caracterizada quanto ao grau de homogeneidade para cada característica de interesse, porém, esta avaliação é trabalhosa, tanto física como economicamente e, em alguns casos, não é viável. Desta forma, na prática, a determinação da homogeneidade de proteínas é efetuada a partir da seleção de características determinadas (CIM, 2006).

A avaliação da identidade, pureza, potência e caracterização de biomoléculas se faz necessária para garantir maior disponibilidade dos medicamentos com qualidade e menor custo. As metodologias analíticas pesquisadas nas etapas de desenvolvimento e processo de produção dos fármacos e de suas formulações são fundamentais para a avaliação de identidade, pureza e potência lote-a-lote dos produtos farmacêuticos acabados (Guo-Hua, 1998). Entretanto, a expressão e produção de biomoléculas envolvem processos complexos, nos quais qualquer modificação nos sistemas celulares ou organismos, fermentação, purificação e formulação, pode originar diferenças significativas nos efeitos clínicos. Desse modo, é de suma importância a realização de testes e ensaios específicos e consistentes para assegurar a qualidade dos produtos conforme guias existentes, inclusive a nível internacional (Gild et al. 1996; Barth et al. 2008).

A USP 34-NF (Unites States Pharmacopeia) contempla apenas insulina e somatropina como monografias específicas. Apesar de não estar disponível uma monografia oficial para outros biomedicamentos, a USP sugere uma série de requisitos que deverão ser avaliados e sugere métodos para essa avaliação. Adotando essa postura, a USP permite que cada produtor utilize a metodologia que julgar mais apropriada.

A Farmacopéia Européia versão 7.0 prevê requisitos gerais para produtos de tecnologia recombinante, determinando que o produto deve ser caracterizado quanto a sua identidade, pureza, potência e estabilidade, utilizando métodos químicos, físicos,

imunoquímicos e biológicos. Algumas metodologias são sugeridas para a determinação de consistência de produção, como: Composição de aminoácidos, sequenciamento N-terminal, mapa peptídico, proteína total, proteínas do sistema de expressão. Além dos produtos mais tradicionais, é contemplada monografia para Eritropoetina, onde recomenda-se a aplicação de determinados ensaios.

A Farmacopéia Brasileira 5ª edição contém as monografias de insulina e somatropina, onde os parâmetros e metodologias a serem observados são idênticos aos citados na USP 30-NF. Não existem recomendações gerais para produtos de tecnologia recombinante nem monografias para outros biomedicamentos.

### **1.10- Métodos Eletroforéticos utilizados para avaliação da homogeneidade**

A técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas carregadas em um determinado meio ou suporte durante a aplicação de uma diferença de potencial é chamada de eletroforese. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, sua forma e a sua carga. Assumindo-se moléculas com formas semelhantes, aquelas de menor massa molecular e maior carga irão migrar mais rapidamente do que as de maior massa e menor carga. A eletroforese normalmente é utilizada para separar peptídeos, proteínas, nucleotídeos, polinucleotídeos e outras moléculas de relevância biológica que possuam ou desenvolvam um líquido de carga em função do pH do meio onde estão dissolvidas ou suspensas (Deutscher, 1990; Silva Junior, 2001; Ahmed, 2005).

Para a separação de proteínas, utiliza-se como meio físico o gel de poliacrilamida (PAGE), enquanto que para separar moléculas de DNA e RNA, utiliza-se gel de agar ou agarose. Estes géis também se prestam para separar imunoglobulinas ou outras proteínas com dificuldade de migração nos géis de poliacrilamida (Lehninger et al. 2004; Ahmed, 2005).

O gel de poliacrilamida é uma mistura de dois componentes, acrilamida e bisacrilamida, que formam uma malha com tamanhos de poros diferentes, dependendo da concentração desses componentes. A eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser considerada nativa ou desnaturante, relacionando-se estes termos ao fato de as proteínas estarem no seu estado nativo ou desnaturado (perda significativa de sua conformação original). Como em qualquer eletroforese, a migração das moléculas carregadas depende do

trinômio peso molecular – carga – forma (Lehninger et al. 2004; Silva Junior, 2004; Ahmed, 2005).

Para a avaliação da EPOhr determinadas técnicas eletroforéticas são amplamente utilizadas, tais como o SDS-PAGE (Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida). Para realização da técnica, as amostras devem ser tratadas com tampão desnaturante que normaliza a carga e a forma das proteínas, permitindo que sejam separadas em gel de poliacrilamida pelo seu peso molecular. Este tampão possui em sua composição beta-mercaptoetanol que tem a função de reduzir as pontes dissulfeto das proteínas o que facilita a separação por tamanho. Outro ingrediente do tampão é o SDS que é um detergente aniônico que se liga às proteínas desnaturando-as e conferindo a mesma carga negativa evitando que estas sejam separadas pela sua carga. O azul de bromofenol é utilizado como um indicador que marca a linha de migração das proteínas no gel (Laemmli, 1970; Ahmed, 2005; Crespo et al. 2010).

A técnica Western Blot associa a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida à revelação com anticorpos mono ou policlonais dirigidos contra uma ou algumas ou ainda todas as bandas referentes às cadeias polipeptídicas separadas após a migração eletroforética. Para tanto, é preciso que após a eletroforese as bandas dos polipeptídeos resolvidas sejam transferidas através da corrente elétrica para uma membrana de nitrocelulose, onde se fixam. Após a fixação dessas bandas à membrana estas se ligam a seu anticorpo primário, sendo lavada para retirada do excesso de anticorpo. Formado o complexo anticorpo-proteína, é adicionado o anticorpo secundário que é conjugado a uma enzima como, por exemplo, a peroxidase e fosfatase. Por fim a banda eletroforética é revelada através da ação da enzima sobre o seu substrato peróxido de Hidrogênio fornecendo como produto o oxigênio, cuja reação sobre um cromógeno determina a formação de um produto colorido (Silva Junior, 2004; MacPhee, 2010).

O Ponto isoelétrico (pI) é um importante parâmetro físico-químico das proteínas. A técnica amplamente utilizada para tal análise é a Focalização Isoelétrica (IEF), a qual baseia-se na separação eletroforética dos pontos isoelétricos de proteínas. Neste tipo de eletroforese as proteínas migram até encontrar um pH do meio eletroforético que seja igual a seu ponto isoelétrico. Para que isto ocorra é necessário, inicialmente, que seja estabelecido um gradiente de pH entre os eletrodos, o que pode ser conseguido através da migração rápida de certas substâncias poliméricas, denominados anfólitos, que contém em sua estrutura vários grupos ionizáveis (Silva Junior, 2004; Ahmed, 2005).

Outra técnica preconizada para o controle de qualidade da EPOhr é a Eletroforese Capilar, a qual foi introduzida em 1981 por Jorgenson & Lukacs e tem sido aceita cada vez mais, como um importante método analítico. Em sua forma mais simples a eletroforese capilar é uma aproximação da técnica original, descrita por Tiselius (1930) para o estudo de proteínas em soro, porém emprega-se um tubo capilar, preenchido com um eletrólito, tendo como principal vantagem o uso de capilares com diâmetros internos extremamente pequenos (na faixa de 15-100  $\mu\text{m}$ ) que permite uma melhor dissipação do calor e, assim, é possível obter uma alta eficiência de separação com tempo reduzido de análise (Kuhn & Hoffstetter-Kuhn, 1993; Kannamkumarath et al. 2002).

O tipo de eletroforese capilar que a Farmacoéia Européia 7.0 preconiza para análise de homogeneidade da EPOhr é a eletroforese capilar de zona, na qual a migração das espécies ocorre pela combinação dos efeitos dos fluxos eletrosmótico e eletroforético que são gerados quando o campo elétrico é aplicado. Muitos compostos podem ser separados rapidamente e facilmente por esta técnica, pois a separação é baseada nas diferenças das mobilidades eletroforéticas resultantes das diferentes velocidades de migrações de espécies iônicas no tampão, contido dentro do capilar. O fluxo eletrosmótico proporciona duas grandes vantagens, sendo que a primeira delas é que cátions e ânions podem ser separados numa única análise, e a outra vantagem é que mesmo os íons com razões carga/raio muito diferentes podem ser analisados em um tempo relativamente curto devido à magnitude deste fluxo (Tavares, 1996; Dabek-Zlotorzynska & Timerbaev, 1998).

### **1.11- Métodos Cromatográficos utilizados para avaliação da homogeneidade**

A cromatografia é um método de separação de misturas variadas de componentes orgânicos, ou não, e de identificação dos componentes destas misturas. Qualquer tipo de cromatografia apresenta uma fase móvel e uma fase fixa ou estacionária. A separação ou fracionamento das espécies químicas, ou analitos, depende da diferença de interação destes com a fase móvel e a fase estacionária. A interação dos componentes da mistura com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares, incluindo iônica, polar, apolar, e específicos efeitos de afinidade e solubilidade. A grande variabilidade de combinações entre a fase móvel e estacionária faz com que a cromatografia tenha uma série de técnicas diferenciadas (Deutscher, 1990; Silva Junior, 2004; Lehninger et al. 2004; Ahmed, 2005).

Na cromatografia líquida, a fase móvel é o líquido que percorre a coluna cromatográfica, chamado de eluente, e a fase estacionária é a resina ou o gel que preenche a coluna, ficando suspenso no meio líquido. A capacidade de distinguir as várias frações de uma amostra (Resolução Cromatográfica) de uma coluna cromatográfica depende de algumas variáveis, como o tipo de eluente, o tipo de gel ou resina da coluna, a fluxo do eluente pela coluna, a altura da coluna e a temperatura. No processo cromatográfico, as frações separadas de uma mistura são observadas, após a detecção adequada, como picos nos sistemas de registro. (Silva Junior, 2004; Lehninger et al. 2004; Ahmed, 2005)

Dois métodos cromatográficos utilizados para análise da EPOhr são a Cromatografia de Fase Reversa (RPC) e Cromatografia de Exclusão e Peneiração Molecular (SEC), denominada também filtração em gel. A RPC é uma técnica muito utilizada para análise da polaridade de proteínas. Neste tipo de cromatografia líquida o suporte ou fase estacionária é formado por partículas de sílica ou resinas orgânicas a qual se prendem um significativo número de grupamentos apolares. Tal técnica é indicada para a análise da estrutura primária da proteína, como método final de isolamento de uma preparação protéica mais homogênea e para analisar homogeneidade de certas preparações protéicas que tenham sido purificadas por associação de outros métodos de fracionamento. Uma limitação da técnica é a impossibilidade de recuperar a proteína com sua função biológica (Silva Junior, 2004; Ahmed, 2005).

A SEC é um tipo de cromatografia líquida onde os solutos são separados em função do binômio forma-peso molecular. Quando as espécies químicas são da mesma classe, o que lhes dá a chance de serem mais parecidas do ponto de vista da forma, como por exemplo, as proteínas globulares, a eluição que ocorre em uma coluna de filtração molecular é função de seus pesos moleculares desde que o soluto não interaja com a matriz cromatográfica por interações físico-químicas e químicas acarretando adsorções (Silva Junior, 2004; Ahmed, 2005).

Neste tipo de cromatografia não há interação entre matriz e analito. A coluna é constituída por uma matriz de pequenas esferas porosas empacotadas. Ao passar uma solução de proteínas pela matriz da coluna, as moléculas pequenas entram nos poros das esferas demorando a atravessá-los, enquanto que as grandes passam entre as esferas sendo separadas e detectadas primeiro. (Deutscher, 1990; Silva Junior, 2004; Lehninger et al. 2004; Ahmed, 2005).

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Geral**

Padronizar técnicas eletroforéticas e cromatográficas, de acordo com especificações da Farmacopéia Européia e do CIM, visando ao controle de qualidade quanto a homogeneidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) EPOhr na produção deste em Bio-Manguinhos.

### **2.2- Específicos**

- Padronizar e validar a técnica Focalização Isoelétrica para a análise das isoformas e ponto-isoelétrico da EPOhr;
- Padronizar a técnica de Eletroforese Capilar a fim de obter um eletroferograma que represente as diferentes isoformas da EPOhr;
- Padronizar e validar a técnica SDS-PAGE para a análise da homogeneidade da EPOhr;
- Padronizar a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular a fim de determinar a presença de agregados e produtos de degradação da EPOhr;
- Padronizar a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa a fim de confirmar a pureza da EPOhr;
- Analisar estatisticamente os resultados.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

A avaliação da homogeneidade da EPOhr será baseada nas recomendações descritas na Farmacopéia Européia (F.E.) versão 7.0. A padronização das técnicas utilizadas neste trabalho foi ajustada conforme as necessidades de Bio-Manguinhos e os procedimentos operacionais padronizados (POP) do CIM.

Dentre as metodologias descritas na literatura e na F.E., selecionou-se um conjunto destas que permitem a melhor avaliação da homogeneidade da EPOhr. Para esta avaliação, padronizou-se métodos eletroforéticos (Focalização Isoelétrica, Eletroforese Capilar e SDS-PAGE) e cromatográficos (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa), como descrito nos itens 3.3.1 a 3.4.2.

Todos os equipamentos utilizados são validados e qualificados pelo Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV) e os insumos utilizados, além do certificado de análise do fabricante, foram anteriormente analisados no Laboratório Físico-Químico (LAFIQ).

#### **3.1- Composição das amostras de EPOhr**

O Lote Experimental, o qual contém arginina em sua composição (LEa), utilizado para a realização deste estudo, juntamente com o seu certificado de qualidade, foi cedido pelo CIM, situado em Havana, Cuba e envasado por Bio-Manguinhos. Cada um dos frascos é composto por um precipitado liofilizado contendo 250 µg de Alfapoetina uma solução composta por: 60 mg/mL de trealose, 9 mg/mL de arginina, 0,3 mg/mL de Tween 20, 13,5 mg/mL de NaCl e 10,6 mg/mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 1H<sub>2</sub>O.

O BRP (Preparação de Referência Biológica) de EPOhr da Farmacopéia Européia é composto por um precipitado liofilizado contendo 250 µg de Alfapoetina e Betapoetina e uma solução de formulação composta por: 60,6 mg/mL de trealose, 6 mg/mL de arginina, 0,2 mg/mL de Tween 20, 9 mg/mL de NaCl e 2,42 mg/mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 1H<sub>2</sub>O.



A solução do IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) de EPOhr, cedida pelo CIM, apresenta a seguinte composição nominal: Alfapoetina 0,3 mg/mL, cloreto de Sódio 5,8 mg/mL, citrato de sódio 5,8 mg/mL, ácido cítrico 0,069 mg/mL e Tween 20 a 0,022 mg/mL, com pH entre 2,5 e 5.

O LEa e o IFA foram armazenados antes, durante e após a sua caracterização a 2-8°C e o BRP a -20°C.

### **3.2- Dessalinização e Quantificação proteica das amostras**

A dessalinização das amostras foi realizada em colaboração com o LAMAM (Laboratório de Macromoléculas) e o LAFIQ (Laboratório Físico-Químico). Para isso, foram utilizados quatro colunas Hitrap desalting sephadex G25 e o cromatógrafo da ÄKTA purifier GE. As colunas foram previamente equilibradas utilizando água Milli-Q com fluxo de 0,5 min/mL. A dessalinização foi realizada contra água Milli-Q, utilizando 4 mL de volume de aplicação por corrida, fluxo de 3 ml/min e coleta de 1 ml/ tubo. O branco foi feito com Tampão Tris-HCl 50 mM com NaCl 1N e volume de aplicação de 5ml. Entre as corridas, as colunas foram lavadas com água Milli-Q e ao final foram armazenadas em etanol 20%.

Após a dessalinização, a concentração de proteínas foi determinada através do sistema nanodrop (Thermo<sup>®</sup>). A absorbância obtida foi multiplicada pelo coeficiente de extinção da EPOhr, cujo valor de 1,345 foi determinado pelo CIM e, concentradas através do concentrador eppendorf<sup>®</sup> para ajustar a concentração de proteínas satisfatória para cada metodologia de análise.

### **3.3- Métodos Eletroforéticos**

#### **3.3.1- Focalização Isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE)**

Para determinar o padrão e distribuição de isoformas da EPOhr em função do ponto isoelétrico (pI) foi utilizado a técnica de focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida de acordo com o POP do CIM (PNO-5059).

Nesta metodologia foi utilizada uma combinação de 2 anfólitos (2,5–5,0 e 3,0-10,0), dificultando o uso de um padrão de ponto isoelétrico (PPI) específico. Portanto, para que amostras de EPOhr sejam avaliadas faz-se necessário o uso de um material de referência que sirva como parâmetro de comparação com os lotes de EPOhr. Além disso, avaliou-se dois PPIs da GE Healthcare, com intervalos de pH 3-10 e 2,5-6,5.

A escolha da faixa de pH do gel foi realizada de acordo com as características da EPOhr para que houvesse uma melhor distribuição das 8 isoformas esperadas ao longo do gel. Como a EPOhr possui características de ponto isoelétrico ácidas é necessário estabelecer um gradiente de pH que possibilite a separação das isoformas dentro da faixa ácida do gel. O gel utilizado para realização da técnica foi PhastGel Dry IEF (GE Healthcare), o qual foi reidratado com a solução descrita na tabela 3.1:

Tabela 3.1: Solução para reidratação do PhastGel Dry IEF

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Uréia	2,4 g
Anfólito 2,5-5,0	535,6 µL
Anfólito 3,0-10	89,4 µL
Água milli-Q	q.s.p 10 mL

O gel foi incubado em placa de petri contendo a combinação de anfólitos, sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a reidratação do gel, o mesmo foi posicionado no módulo de controle e separação com o auxílio de uma pinça tendo-se o cuidado para que não houvesse a formação de bolhas.

As amostras foram aplicadas diretamente no pente (6/ 4µL), e este foi alocado no aparelho Phastsystem. Foram utilizados os seguintes parâmetros de corrida conforme descrito na tabela 3.2.

Após o término da corrida, o gel foi transferido para a unidade de revelação para a impregnação do mesmo pela prata, seguindo as etapas descritas no protocolo para PhastGel IEF (GE Healthcare), conforme a tabela 3.3.

Tabela 3.2: Parâmetros para a corrida de Focalização Isoelétrica

Etapa	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Temperatura (°C)	Voltagem acumulada (Vh)
1 <sup>a</sup>	750	2,5	3,5	15	90
2 <sup>a</sup>	150				15
3 <sup>a</sup>	750				417

Tabela 3.3: Etapas para impregnação por prata do gel de IEF para EPOhr.

Solução para coloração de IEF por prata	Tempo
1 – Ácido Tricloroacético 20% + H <sub>2</sub> O WFI q.s.p 250 mL	5 minutos
2 – Fixação 1 – Etanol 10% + Ácido Acético 5% + H <sub>2</sub> O WFI q.s.p 500mL	4 minutos
3 – Fixação 2 – Etanol 10% + Ácido Acético 5% + H <sub>2</sub> O WFI q.s.p 500mL	4 minutos
4 – Sensibilização – Etanol 30% + Tiosulfato de sódio 4% + Acetato de sódio 6,8% + Glutaraldeído 0,5% + H <sub>2</sub> O WFI qsp 250mL	6 minutos
5 – Fixação 3 – Etanol 10% + Ácido Acético 5% + H <sub>2</sub> O WFI q.s.p 500mL	3 minutos
6 – Fixação 4 – Etanol 10% + Ácido Acético 5% + H <sub>2</sub> O WFI q.s.p 500mL	5 minutos
7 – Lavagem 1 - H <sub>2</sub> O WFI	2 minutos
8 – Lavagem 2 - H <sub>2</sub> O WFI	2 minutos
10 – Nitrato de Prata 2,5% + H <sub>2</sub> O WFI q.s.p 250 mL	10 minutos
11 – Lavagem 3 - H <sub>2</sub> O WFI	0,5 minutos
12 – Lavagem 4 - H <sub>2</sub> O WFI	0,5 minutos
13 – Solução reveladora – Carbonato de sódio 2,5% + Formaldeído 0,062% + H <sub>2</sub> O WFI q.s.p 250mL	3 minutos
15 – Solução de parada - ácido acético 5% + H <sub>2</sub> O WFI q.s.p 250 mL	10 minutos

Os géis revelados foram digitalizados, a imagem obtida analisada por densitometria e o percentual de cada isoforma foi comparado ao critério de aceitação estabelecido pela Farmacopéia Européia (F.E.) versão 7.0 e pelo CIM, como descrito na tabela 3.4.

Tabela 3.4: Critério de aceitação da análise das amostras de EPOhr segundo F.E. e CIM.

Nº da isoforma	Intervalo % estabelecido/F.E.	Intervalo % estabelecido/CIM
1	0 – 15	-
2	0 – 15	0 – 15
3	1 – 20	0 – 20
4	10 – 35	10 – 35
5	15 – 40	15 – 40
6	10 – 35	10 – 35
7	5 – 25	0 – 20
8	0 - 15	-

A validação desta metodologia foi realizada através da categoria III de acordo com a classificação da RE 899 da ANVISA (Tabela 3.5), a qual é indicada para determinação de características físico-químicas em substâncias ativas ou em produtos acabados. Nesta categoria a repetibilidade é o parâmetro que deve ser analisado.

Tabela 3.5: Classificação do método segundo RE 899 da ANVISA

<b>Categoria: III</b>						
<b>Teste: Repetibilidade.</b>						
Parâmetro		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

A repetibilidade foi avaliada a partir do LEa da EPOhr com 100% da massa teórica do teste (4µg) realizando 7 corridas eletroforéticas com 4 réplicas da amostra em cada um dos géis.

### 3.3.2- Eletroforese capilar de Zona (CZE)

A padronização desta técnica foi realizada em colaboração com o LAFIQ, utilizando as amostras de LEa, IFA e BRP de EPOhr dessalinizadas. A análise foi realizada a partir dos parâmetros descritos na metodologia proposta pela Farmacopéia Européia versão 7.0: Eletroforese Capilar de Zona (CZE) em capilar de Sílica Fundida, com 107 cm de comprimento efetivo e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A amostra LEa EPOhr foi aplicada com injeção hidrodinâmica de 50mBar por 10 segundos e uma voltagem de 15.4 kV por 80 minutos a 35°C, utilizando tampão CZE 1X como eletrólito em ambos os reservatórios. Os parâmetros acima descritos foram ajustados até a obtenção de um eletroferograma similar ao fornecido para o material de referência da Farmacopéia Européia (BRP), com oito isoformas bem definidas.

O tampão utilizado nos ensaios foi o CZE 1X composto por 0,01M de tricina, 0,01M de cloreto de sódio, 0,01M de acetato de sódio, 7 M de uréia e 2,5 mM de putrescina, com pH 5,55 a 30°C, filtrado em membrana 0,22  $\mu\text{m}$ . Para melhorar a separação das isoformas no eletroferograma alterou-se a concentração de putrescina para 3,9 mM no tampão CZE.

O pré-condicionamento do capilar foi realizado por 30 minutos com 1,0 M de hidróxido de sódio; 60 minutos com 0,1 M de hidróxido de sódio; e 60 minutos com o tampão CZE 1X, e aplicou-se a voltagem de 20kV por 3horas ou até completa estabilização do sistema. Todas as soluções utilizadas na metodologia, inclusive as amostras, foram filtradas através de membrana 0,22  $\mu\text{m}$  antes do seu uso. Acondicionou-se o capilar por 5 minutos com hidróxido de sódio 0,1 M; 5 minutos água MilliQ, e 10 minutos com tampão CZE 1X.

Os resultados relativos ao LEa EPOhr obtidos através da técnica de Eletroforese Capilar foram avaliados de acordo com mudanças nos parâmetros da metodologia a ser padronizada. Inicialmente foi modificada a tensão na faixa de 20 a 30 kV. Após o ajuste na tensão, outros parâmetros importantes foram avaliados como: temperatura, pressão, tempo de injeção e concentração da amostra.

### 3.3.3- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A técnica de SDS-PAGE foi utilizada para identificar a EPOhr e confirmar sua homogeneidade através de seu peso molecular (PM), o que foi estimado a partir da mobilidade eletroforética da glicoproteína em gel de poliacrilamida, conforme especificações da F.E. versão 7.0 e o PNO-5070 proveniente do CIM.

A montagem do sistema Miniprotean- BioRad<sup>®</sup> III foi feita utilizando-se placas de vidro de 0,75 mm e gel de poliacrilamida na concentração 12,5%. Após polimerização do gel, o sistema foi montado e preenchido com tampão de corrida (Tris Base 0,25 M, Glicina 1,92 M, SDS 1%).

Foi aplicado 10 µL do Padrão de Peso Molecular (PPM) e 10µL das amostras na concentração 2 µg/µL diluídas em Tampão de amostra 2x redutor (Tampão Tris-HCl 2,0M pH6,8; SDS 20%; Glicerol 20%; β-mercaptoetanol 10%; Azul de bromofenol 1%). A corrida foi iniciada com 100V/ 20 mA/ 300W, quando as amostras ultrapassaram o gel concentrador modificou-se os parâmetros para: 100V/ 25 mA/ 300W. Após o término da corrida os géis foram retirados do cassete sendo o gel concentrador descartado e o gel separador transferido para uma cuba de coloração contendo solução de fixação (Metanol 50%, Ácido acético 10%) a qual foi aquecida a 100°C e resfriada, sob agitação, três vezes consecutivas. Posteriormente, a solução anterior foi substituída pela solução de coloração (Etanol 5%, Ácido acético 7,5%, coomassie blue 0,25%), a qual foi aquecida e depois, o gel foi mantido sob agitação até que fosse possível a visualização das bandas. Por último, descartou-se a solução de coloração e adicionou-se a solução descorante (Metanol 5%, Ácido acético 7%) até diminuir completamente o *background* do gel.

O critério de aceitação descrito pelo CIM e pela F.E. estabelece que a amostra deve apresentar única banda difusa entre 30 e 37 kDa.

As amostras do LEa dessalinizadas foram utilizadas para a validação da técnica de SDS-PAGE. Para isso, foi usado a categoria II quantitativo de acordo com a classificação da RE 899 da ANVISA, na qual os parâmetros que devem ser analisados são: Especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, limite de quantificação, exatidão e robustez (Tabela 3.6).

Tabela 3.6: Classificação do método segundo RE 899 da ANVISA

<b>Categoria: II</b>						
<b>Testes: Especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, limite de quantificação, exatidão e robustez.</b>						
Parâmetro		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

### 3.3.3.1- Especificidade

A especificidade foi avaliada utilizando as amostras dessalinizadas e não dessalinizadas contendo 10 µg de EPOhr e a solução que compõe a formulação na ausência da EPOhr, composta por: 60mg/mL de trealose, 9 mg/mL de arginina, 0,3 mg/mL de Tween 20, 13,5 mg/mL de NaCl e 10,6mg/mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 1H<sub>2</sub>O .

Foram feitos 7 replicatas do gel para a análise deste parâmetro, as quais foram analisadas pelo programa ImageMaster®.

### 3.3.3.2- Linearidade

Para esta análise utilizou-se 8 diferentes concentrações do Lea EPOhr tais como: 0,5 µg, 1µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg e 15 µg. Além disso, aplicou-se 10µL do Padrão de peso molecular (*Kaleidoscope Polypeptide Standards*), a fim de inferir o peso molecular da amostra, e 10 µL do Tampão de amostra concentrado 5x como controle negativo. Foram feitos sete replicatas e analisadas no programa ImageMaster® (GE Healthcare).

### 3.3.3.3- Intervalo

Tendo em vista a faixa pretendida de linearidade, as quantidades utilizadas para comprovar o intervalo do método foram: 4,0µg, 6,0µg 8,0µg, 10,0µg, 12,0µg e 14,0 µg. Estes valores estão de acordo com a RE n° 899 que recomenda uma faixa de 80 a 120% da massa

teórica do teste (10,0µg). Foram realizadas sete replicatas deste gel e utilizado PPM *Prestained SDS-PAGE Standards – Broad Range*

#### **3.3.3.4- Precisão**

A precisão intralaboratorial foi analisada através dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada a partir do LEa EPOhr com 100% da massa teórica (10 µg) do teste em 6 replicatas em um mesmo gel, do qual foi feito 7 corridas eletroforéticas. Neste gel, foi utilizado outro PPM (*Prestained SDS-PAGE Standards – Broad Range*) com faixa de peso molecular que se adéqua melhor a análise da EPOhr. A avaliação do parâmetro precisão intermediária foi efetuada com outro analista utilizando suas próprias soluções. Entretanto, o gel foi idêntico ao descrito para a avaliação da repetibilidade, com quatro réplicas utilizando o PPM *BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder*.

#### **3.3.3.5- Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes da EPOhr até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. As massas utilizadas do LEa para esta análise foram: 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg, 3 µg, 4 µg e 5 µg, em sete replicatas do gel. O PPM utilizado foi *BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder*.

#### **3.3.3.6- Exatidão**

Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperação dentro da faixa 70% a 120% são aceitas. Levando em consideração que 10µg é a concentração de trabalho, foram utilizadas as concentrações: 5 µg, 7 µg, 10 µg, 12 µg, 14 µg e 16 µg do LEa EPOhr, em sete replicatas do gel. Para a análise do peso molecular utilizou-se o PPM *BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder*.

#### **3.3.3.7- Robustez**

Para avaliar a robustez do método, foi selecionado alguns parâmetros que podem interferir nos resultados. Foi alterado o tampão de corrida, % do gel de poliacrilamida e a miliamperagem (mA) durante a corrida. Para cada parâmetro alterado foram feitas três replicatas do gel.



### **3.4- Métodos Cromatográficos**

#### **3.4.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular (SEC-CLAE)**

Para a análise da EPOhr foi utilizada a coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5µm equilibrada em solução tampão PBS pH6. As condições cromatográficas utilizadas foram: fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220 nm e 280 nm. O branco foi realizado com aplicação do eluente PBS pH 6 sob as mesmas condições da corrida. As cromatografias foram realizadas no sistema ÄKTA purifier (GE Healthcare).

A padronização da metodologia foi realizada seguindo a orientação da Farmacopéia Européia 7.0 e também do CIM (PNO-5067) em colaboração com o LAMAM. Foram aplicados 30 µg de cada uma das amostras analisadas (LEa, IFA e BRP) e para avaliar a recuperação de cada corrida foi utilizado amostras diluídas representando 16% da amostra concentrada. Em função das possíveis variações no sistema de detecção, foram testadas diferentes concentrações do LEa (0,6 µg, 1,2 µg, 2,4 µg, 3,6 µg e 4,8 µg). A análise dos cromatogramas foi realizada através do programa UNICORN 5.11<sup>®</sup> (GE Healthcare).

De acordo com o CIM, este ensaio é aceito se o pico do monômero correspondente a EPOhr for superior a 98% e se todos os picos detectados tiverem área inferior ao pico de 16%.

#### **3.4.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-CLAE)**

A padronização desta metodologia foi realizada em colaboração com o LAMAM utilizando a coluna Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5µm equilibrada com a fase móvel A (Ácido Trifluoracético 0,1%) e fase móvel B (Acetonitrila 90% e Ácido trifluoracético 0,09%). As condições cromatográficas utilizadas foram: fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm e 280nm.

Foi definido o volume de injeção contendo 30 µg de EPOhr, conforme orientação do CIM (PNO- 5068) para as amostras de LEa, IFA e BRP EPOhr, sendo a análise realizada em triplicata para cada amostra. O gradiente de eluição foi realizado conforme tabela abaixo, seguindo orientação do CIM (Tabela 3.7).

Tabela 3.7: Gradiente de eluição para análise em RP-CLAE

Tempo (min)	% Fase móvel B
0 – 5	40%
5 – 20	65%
20 – 23	100%
23 – 25	100%
25 – 27	40%

Além disso, foi utilizado o gradiente de eluição linear conforme tabela 3.8, com a finalidade de determinar a melhor condição de corrida, levando-se em conta a resolução cromatográfica e o tempo de corrida.

Tabela 3.8: Gradiente de eluição linear para análise em RP-CLAE

Tempo (min)	% Fase móvel B
0 – 2	10%
2 – 20	10 – 100%
20 – 22	100%
22 – 26	10%

A análise dos cromatogramas foi realizada através do programa UNICORN 5.11<sup>®</sup> (GE Healthcare). Segundo o PNO-5068, o critério de aceitação é que o pico principal seja correspondente a EPOhr seja superior a 98%.

### 3.5- Análise estatística dos resultados

Os resultados das amostras analisadas através das técnicas eletroforéticas e cromatográficas padronizadas neste trabalho foram descritos através da média, desvio-padrão e coeficiente de variação.

Quando se trabalha com um conjunto de dados, frequentemente é interessante que se use algumas medidas de resumo deste conjunto. É comum utilizar medidas de posição e de dispersão para tal fim. Duas medidas que são bastante usadas são a média (posição) e o desvio-padrão (dispersão). O desvio-padrão tem uma vantagem em relação à variância, outra medida de dispersão usada com frequência, por manter a unidade original dos dados. Apesar disto, não é possível comparar desvios-padrão de duas grandezas diferentes. Desta forma, é útil o uso de uma medida de dispersão que seja adimensional, permitindo comparações diretas entre dados de grandezas diferentes. Uma medida usada com frequência que atende a esta necessidade é o coeficiente de variação (CV), o qual é calculado como a razão entre o desvio-padrão e a média, frequentemente multiplicado por 100 para ser expresso em termos percentuais (Triola, 2005).

Para a Eletroforese Capilar, além do uso destas medidas, utilizou-se o teste Levene modificado, o qual se trata de um procedimento robusto a desvios da normalidade (Montgomery, 2009). Um dos objetivos da avaliação realizada é verificar se os resultados obtidos para cada isoforma nas diferentes amostras da EPOhr (LEa, BRP e IFA) são homogêneos entre si. Desta forma, é interessante avaliar se os resultados de área das isoformas possuem variação similar entre as amostras. Para isso, o teste usa para cada grupo de resultados de uma isoforma, o desvio absoluto de cada observação com relação à mediana deste grupo. Se as médias destes grupos de desvios absolutos forem iguais, as variações entre os grupos serão as mesmas (Montgomery, 2009). Para esta última verificação, basta usar a estatística F da ANOVA para testar igualdade entre as médias dos desvios absolutos.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Dessalinização e Quantificação proteica das amostras

A solução Tampão Tris-HCl 50mM com NaCl 1N foi utilizada como branco na coluna Hitrap<sup>®</sup> e não demonstrou pico cromatográfico a 220 e 280 nm. (Figura 4.1). As frações coletadas referentes ao LEa foram dos tubos 2 a 7 e do IFA foram dos tubos de 3 a 8, como pode-se observar nas figuras 4.2 e 4.3, respectivamente.

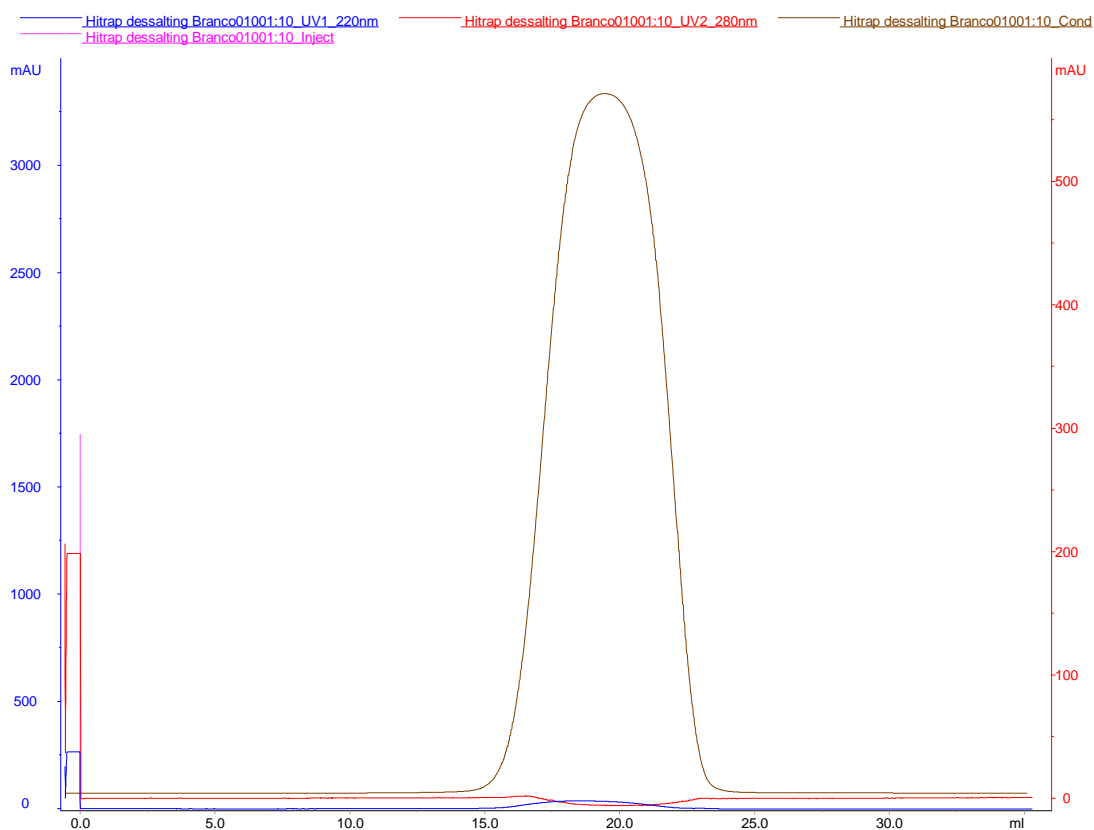


Figura 4.1: Cromatograma do branco realizado com Tampão Tris-HCl 50mM com NaCl 1N. Coluna analítica Hitrap desalting sephadex G25, contra água Milli-Q, 4 mL de volume de aplicação por corrida, fluxo de 3ml/min e coleta de 1ml/ tubo.

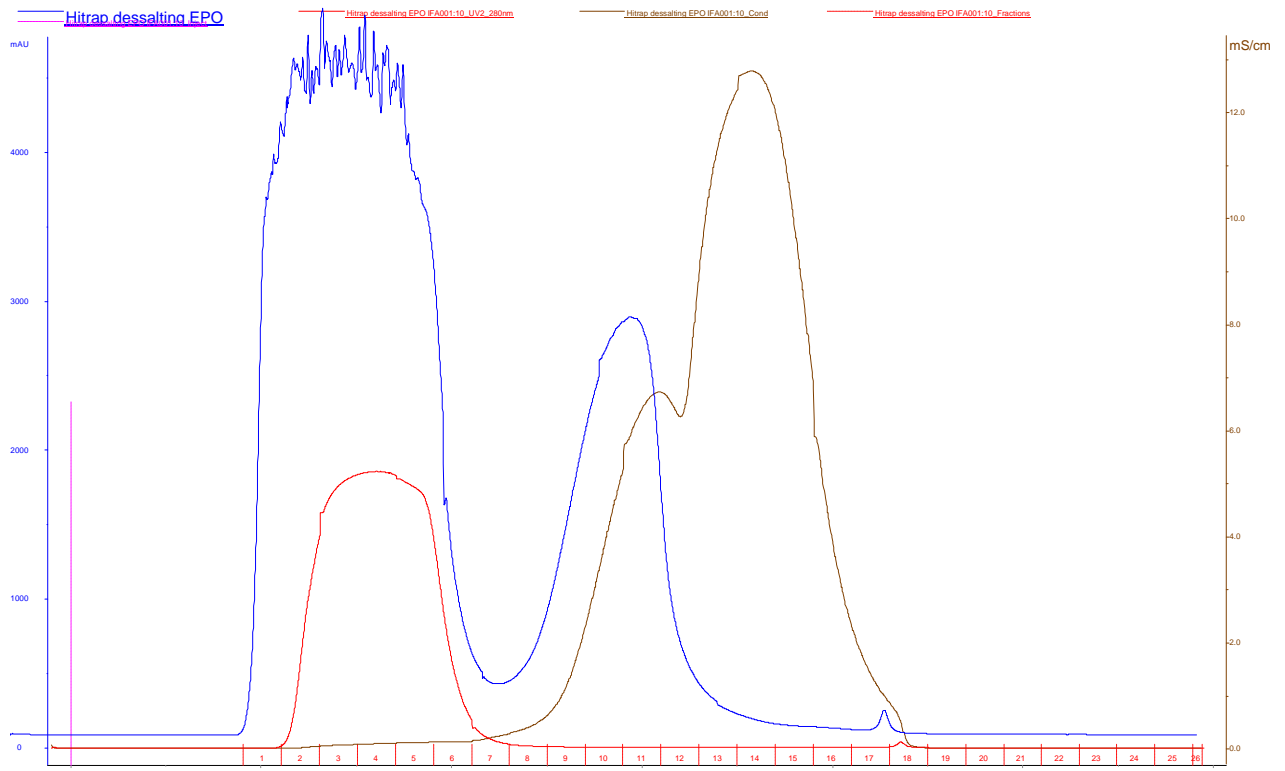


Figura 4.2: Cromatograma da dessalinização do LEa de EPOhr. Pico azul referente a leitura da amostra em 220 nm; pico vermelho referente a 280nm e pico marrom referente a condutividade. Coluna analítica Hitrap desalting sephadex G25, contra água Milli-Q, 4 mL de volume de aplicação por corrida, fluxo de 3ml/min e coleta de 1ml/ tubo.

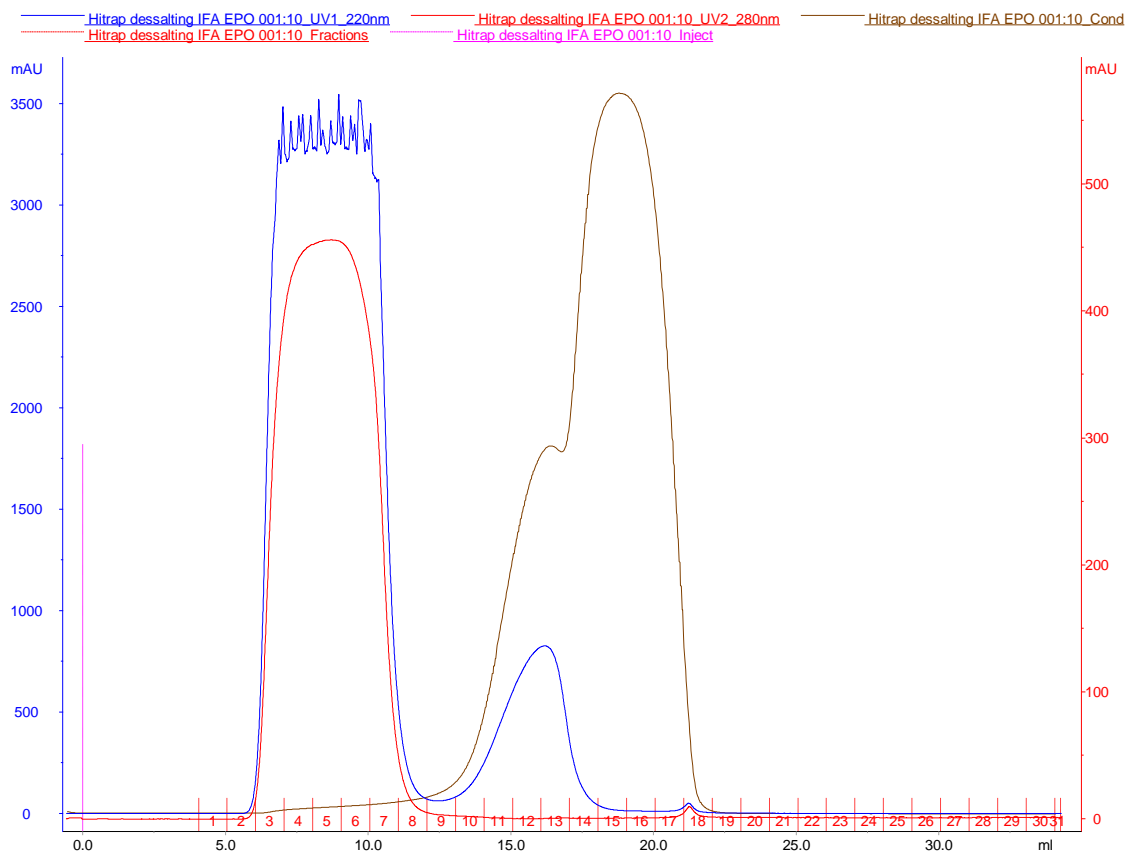


Figura 4.3: Cromatograma da dessalinização do IFA de EPOhr. Pico azul referente a leitura da amostra em 220 nm; pico vermelho referente a 280nm e pico marrom referente a condutividade. Coluna analítica Hitrap desalting sephadex G25, contra água Milli-Q, 4 mL de volume de aplicação por corrida, fluxo de 3ml/min e coleta de 1ml/ tubo.

A concentração de proteínas foi determinada utilizando o sistema nanodrop, fazendo-se a leitura das frações separadamente, para assegurar que apresentava quantidade de proteína satisfatória e, posteriormente, fez-se a leitura de todas as frações unidas. A absorbância obtida foi multiplicada pelo coeficiente de extinção da EPOhr, cujo valor é 1,345. Desta maneira, obteve-se aproximadamente 0,5 mg/mL para o LEa e 1,6 mg/mL do IFA. O volume total do LEa e do IFA foi aliquoteado em 500  $\mu$ L por criotubo, concentrado a 2 mg/mL e armazenado a temperatura de 2-8  $^{\circ}$ C até o momento da análise.

## 4.2- Focalização Isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE)

### 4.2.1- Validação da técnica

Uma vez que o IEF-PAGE foi enquadrado na categoria III da RE 899 da ANVISA, o parâmetro avaliado foi a repetibilidade. Nesse contexto, foram realizadas sete corridas eletroforéticas utilizando a amostra LEa EPOhr, em quadruplicata por gel, como pode ser observado nas figuras 4.4 e 4.5, foram detectadas nove isoformas da EPOhr.

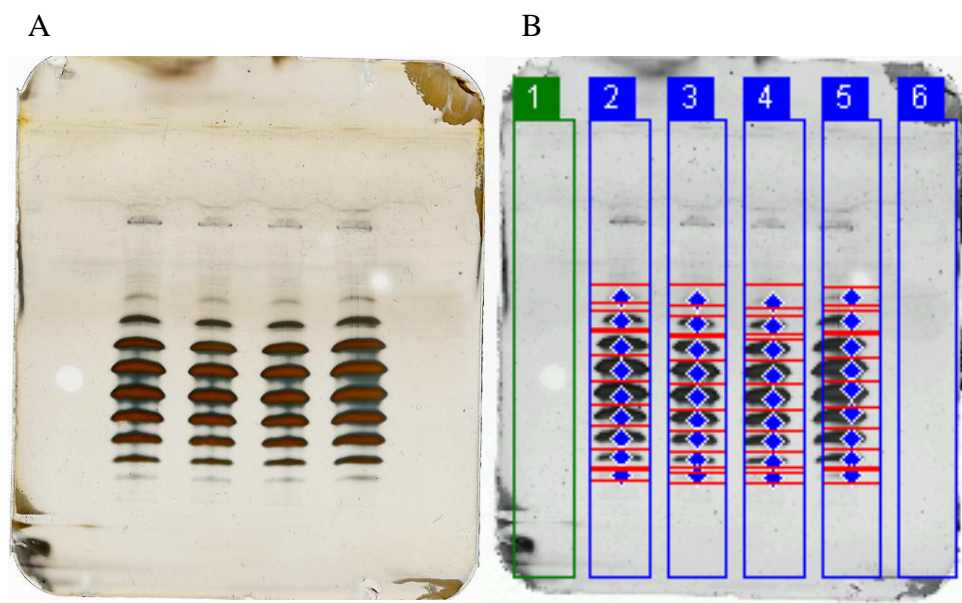


Figura 4.4: Gel de IEF com quatro replicatas LEa EPOhr corado por nitrato de prata (A) e após análise pelo programa ImageMaster<sup>®</sup> - GE Healthcare (B). Raia 1: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L); Raias 2, 3, 4 e 5: LEa EPOhr 4  $\mu$ g; Raia 6: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L).

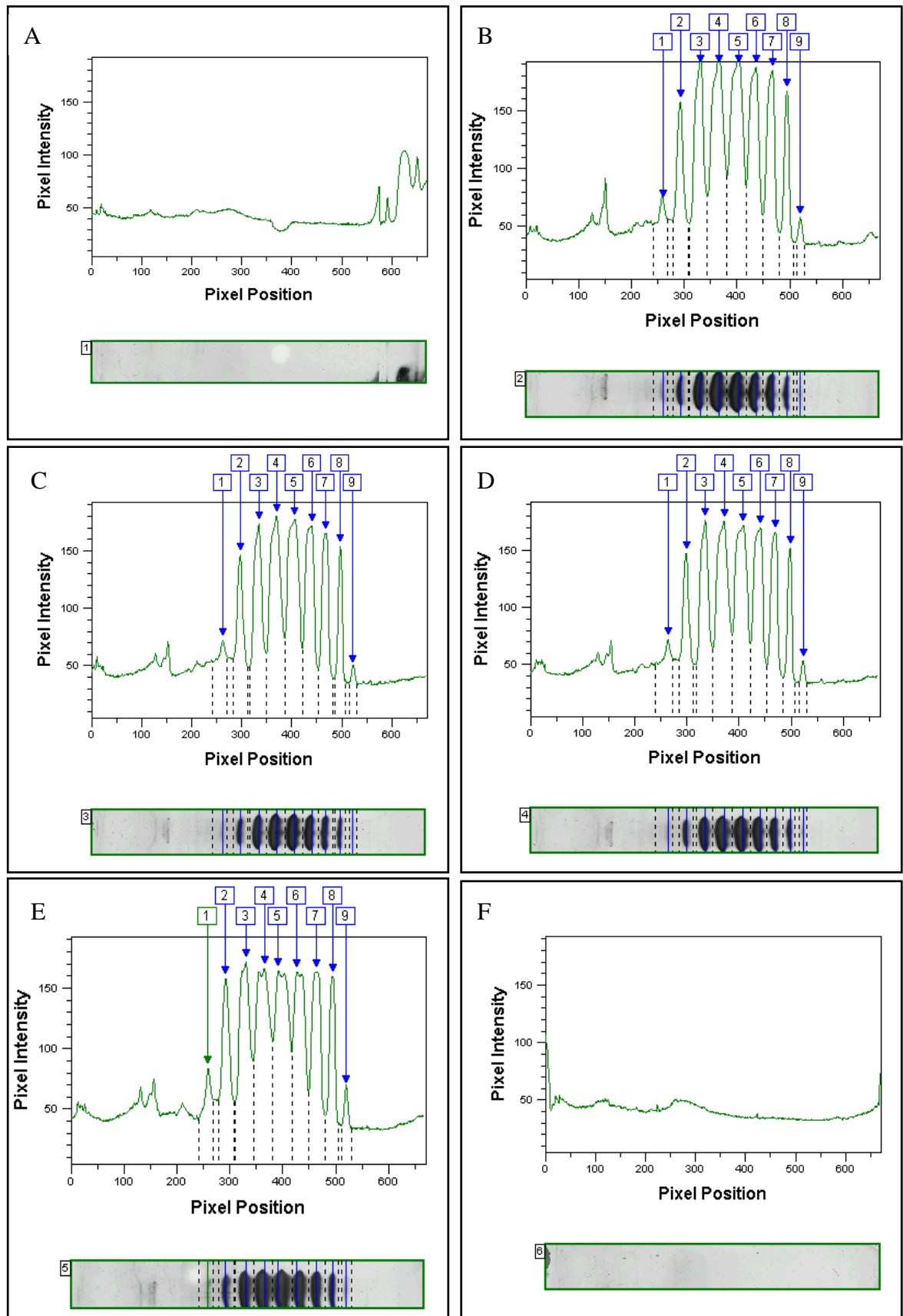


Figura 4.5: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF do LEa EPOhr 4 µg (painéis B a E) obtida pelo programa ImageMaster®. A água WFI foi utilizada como controle negativo (A e F).

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Sendo assim, a partir dos resultados encontrados (Tabela 4.1), pode-se dizer que a repetibilidade do método foi comprovada.

O volume de banda foi determinado por densitometria (ImageMaster<sup>®</sup>) e calculada a média das quadruplicatas em cada um dos sete géis (Tabela 4.1), de onde se obteve a média total. Com a análise de tais dados observa-se que há pequena dispersão de resultados entre a mesma isoforma nas diferentes réplicas do gel, o que é evidenciado pelo baixo desvio-padrão e coeficiente de variação. Sendo assim, a repetibilidade do teste é comprovada.

Tabela 4.1: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV) da área das bandas das isoformas analisadas entre as réplicas do gel IEF realizado com LEa para avaliação do parâmetro repetibilidade.

Isoforma	1	2	3	4	5	6	7	M	S	CV%
1	147,08	164,98	154,75	144,56	163,34	138,27	141,08	150,58	10,63	7,06
2	242,84	237,31	250,55	220,69	216,38	230,84	229,51	232,59	12,02	5,17
3	373,42	366,74	337,00	332,42	343,99	337,07	352,56	349,03	15,86	4,55
4	478,51	449,27	470,72	443,10	479,19	495,15	451,19	466,73	19,25	4,12
5	493,37	483,31	427,99	423,45	427,69	477,01	451,13	454,85	29,56	6,50
6	369,22	328,81	378,38	353,43	357,53	343,78	381,33	358,92	18,95	5,28
7	319,78	313,87	318,79	333,29	325,87	321,30	350,10	326,14	12,21	3,74
8	198,19	197,19	193,19	198,19	197,15	167,15	187,15	191,17	11,31	5,92
9	127,08	119,08	139,08	126,08	126,08	128,08	118,08	126,22	6,91	5,48

A percentagem de cada isoforma foi calculada a partir da média do volume de cada banda, entre as réplicas em um gel, e comparado ao limite estabelecido pela F.E. e pelo CIM (Tabela 4.2). Tal análise mostra que o LEa EPOhr está dentro da faixa estabelecida pela F.E. e pelo CIM apesar de ter sido encontrado mais isoformas do que é considerado nas referidas especificações. Em função do alto grau de heterogeneidade glicídica esperado para a EPOhr (Lasne et al. 2002), a quantidade de isoformas e sua distribuição varia muito. Este fato explica os intervalos percentuais descritos pela F.E. e pelo CIM, dispostos na tabela 4.2.

Conforme dito anteriormente, foi detectado maior número de isoformas do que no CIM para a mesma amostra e isto provavelmente está relacionado com o método de revelação do gel. Nesta dissertação optamos por utilizar a revelação pelo método da prata associado ao sistema de revelação automático do phastsystem e o Kit de revelação da GE Healthcare, o que garantiu maior sensibilidade do que a metodologia empregada no CIM e boa reprodutibilidade, conforme observado pelo baixo coeficiente de variação do volume das bandas eletroforéticas em géis diferentes (Tabela 4.1).



Tabela 4.2: Composição percentual das isoformas do LEa EPOhr por IEF-PAGE em comparação com o intervalo estabelecido pela Farmacopéia Européia (% F.E.) e pelo CIM (% CIM).

Nº da isoforma	% F.E.	% CIM	Percentual LEa
1	0 – 15	-	5,67
2	0 – 15	0 – 15	8,76
3	5 – 20	0 – 20	13,14
4	10 – 35	10 – 35	17,57
5	15 – 40	15 – 40	17,12
6	10 – 35	10 – 35	13,51
7	0 – 20	0 – 20	12,27
8	0 - 15	-	7,19
9	-	-	4,75

#### 4.2.2- Determinação do Ponto Isoelétrico da EPOhr

Uma vez que as isoformas da EPOhr que possuem atividade biológica são as formas ácidas (Righetti, 2004), avaliamos a possibilidade de utilização de padrões de ponto isoelétricos como padrões internos (PPI) para garantir que as isoformas de EPOhr reveladas no IEF-PAGE são as esperadas. A utilização de uma combinação de 2 anfólitos (2,5-5,0 e 3,0-10,0), dificulta o uso de um padrão de ponto isoelétrico (PPI), pois o gradiente de pH formado não é linear. Portanto, avaliou-se dois PPIs da GE Healthcare, com intervalos de pH 3-10 e 2,5-6,5. A curva de calibração para o PPI 3-10 apresentou coeficiente de determinação de 0,9941 (Figura 4.6 A), o que é satisfatório considerando o que é descrito na RE 899 da ANVISA que recomenda e aceita valores de  $R^2$  a partir de 0,99. Os padrões de pI 2,5-5,0 forneceram uma curva de calibração com coeficiente de determinação ligeiramente maior, de 0,9950 (Figura 4.6 B)

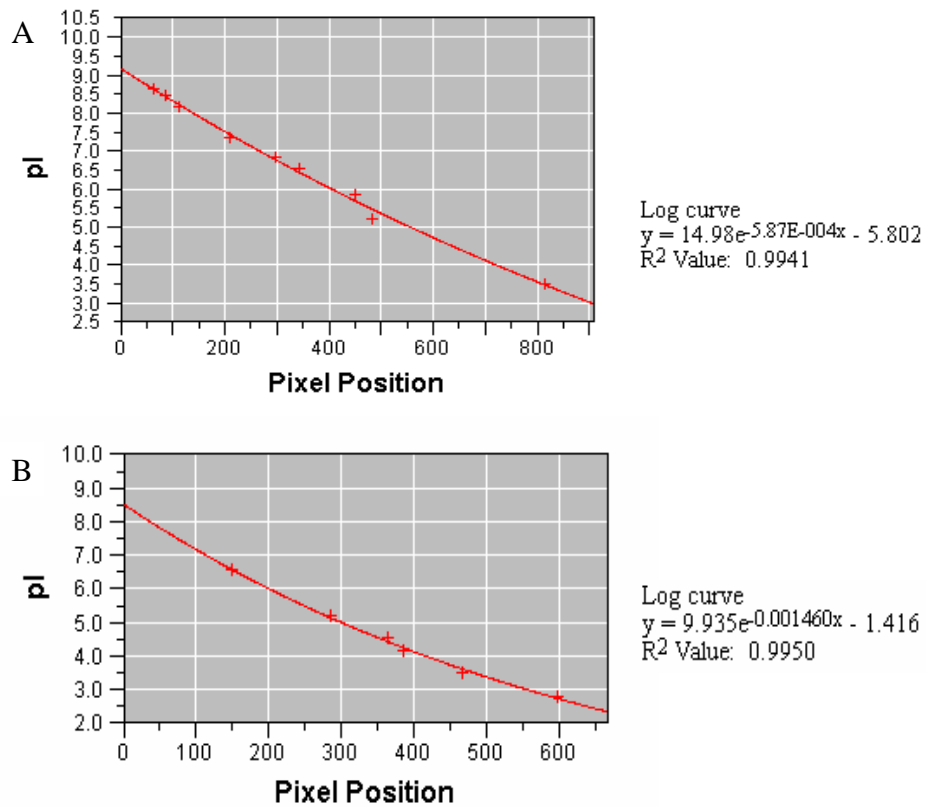


Figura 4.6: Curva de calibração do PPI 3-10 (A) e 2,5-6,5 (B) da GE Healthcare obtida pelo programa ImageMaster®.

A estimativa do pI das oito isoformas principais do LEa EPOhr indicou os valores médios de: 6,43; 6,09; 5,74; 5,39; 5,02; 4,70; 4,38 e 4,12 de acordo com a análise realizada pelo programa ImageMaster® (Figuras 4.7 e 4.8).

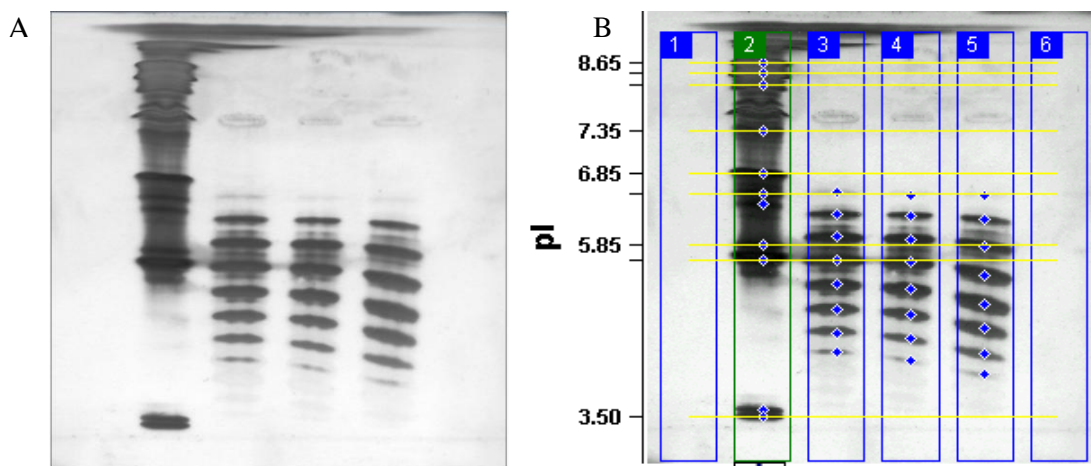


Figura 4.7: Gel de IEF do LEa EPOhr corado por nitrato de prata (A) e após análise pelo programa ImageMaster® - GE Healthcare (B). Raia 1: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L); Raia 2: PPI 3-10; Raias 3,4 e 5: LEa EPOhr 4  $\mu$ g; Raia 6: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L).

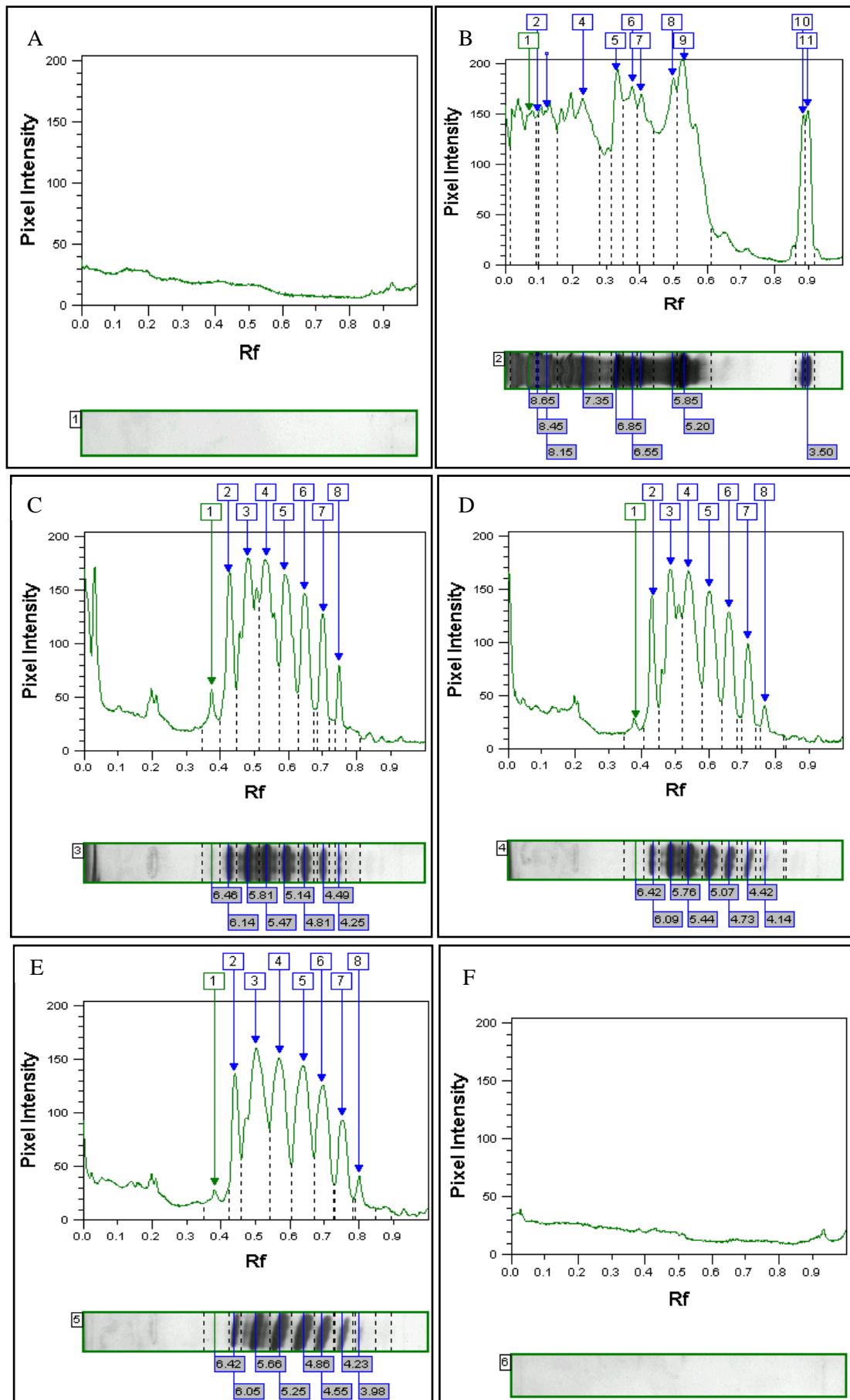


Figura 4.8: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF do PPI (painel B) e do LEa EPOhr 4 µg (painéis C a E), obtida pelo programa ImageMaster®.

A análise das amostras de BRP, LEa e IFA EPOhr por IEF-PAGE pode ser observada na figura 4.9. O padrão de pI ácido (2,5-6,5) foi utilizado para garantir que o gradiente de pH atendesse a faixa ácida, em função da faixa esperada para a EPOhr.

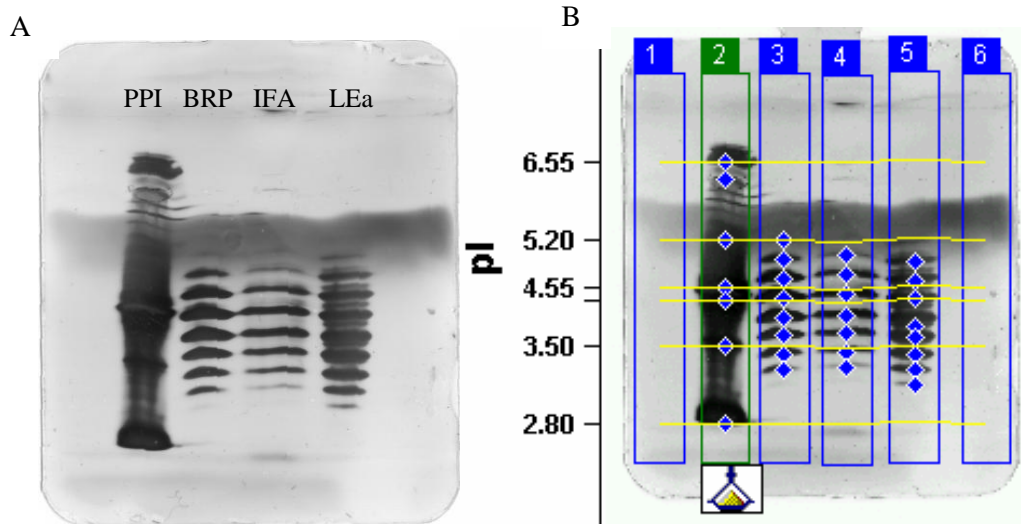
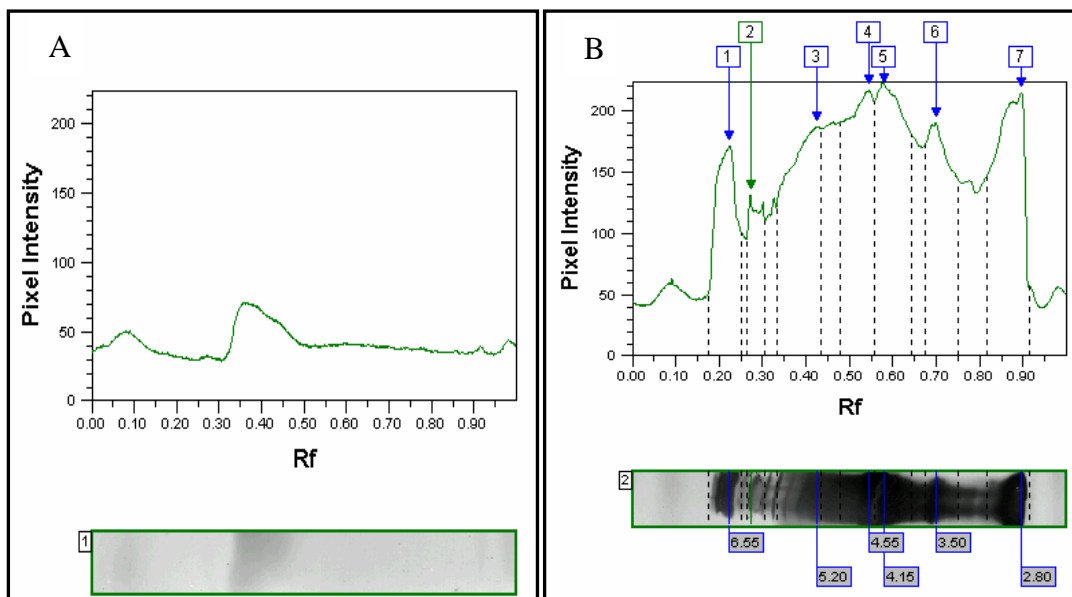


Figura 4.9: Gel de IEF do BRP, LEa e IFA EPOhr corado por nitrato de prata (A) e após análise pelo programa ImageMaster® - GE Healthcare (B). Raia 1: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L); Raia 2: PPI 2,5-6,5; Raia 3: BRP EPOhr 4  $\mu$ g; Raia 4: IFA EPOhr 4  $\mu$ g; Raia 5: LEa EPOhr 4  $\mu$ g; Raia 6: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L).

A amostras avaliadas diferem quanto a quantidade de isoformas, sendo detectado pelo menos 8 isoformas para o BRP e LEa EPOhr e 7 isoformas para o IFA EPOhr, as quais possuem pI variando de 5,15 a 3,13 (Figura 4.10). Provavelmente, a detecção de mais isoformas foi prejudicada devido ao *background* formado no gel.



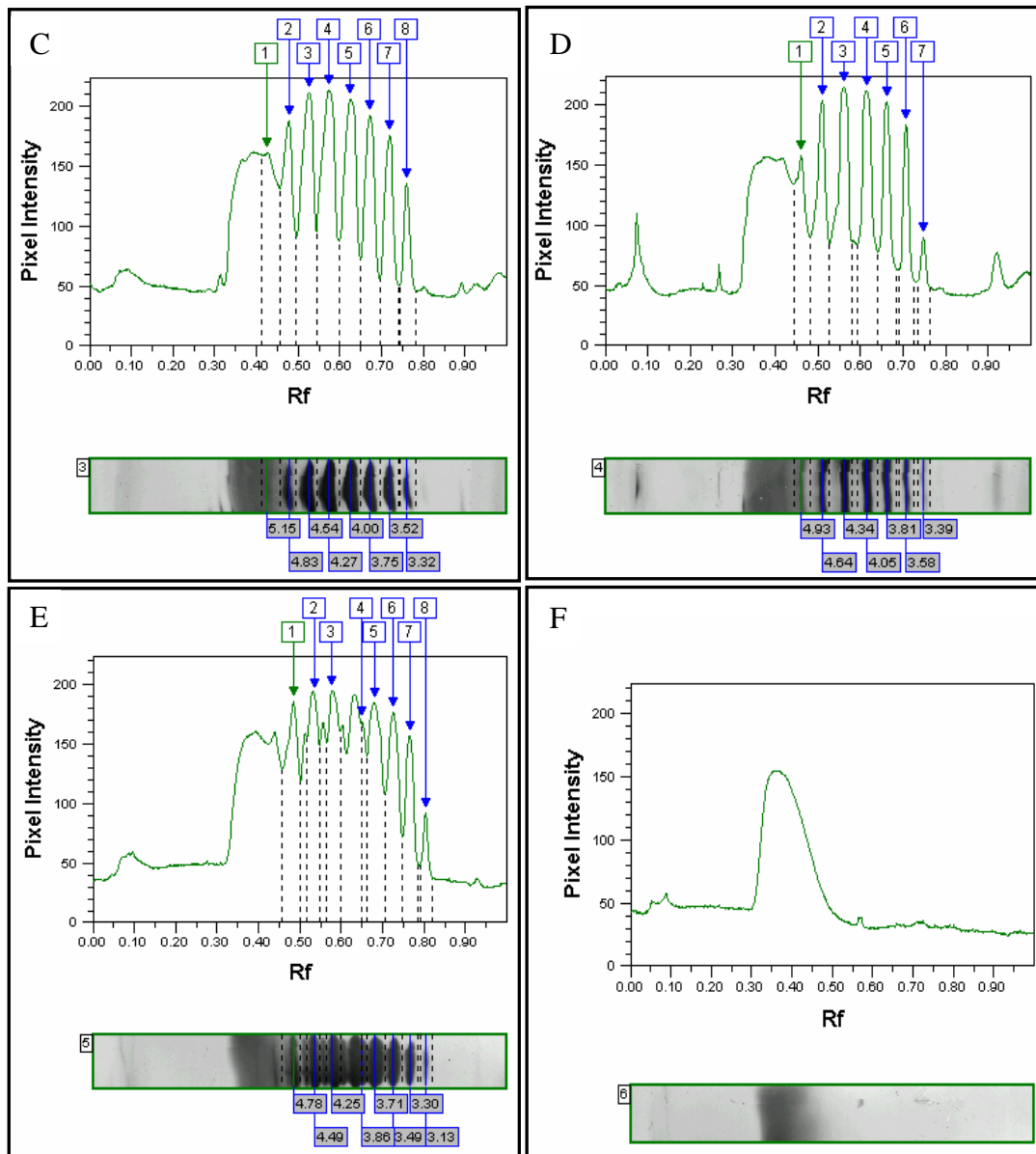


Figura 4.10: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF: PPI (painel B); BRP EPOhr (painel C); IFA EPOhr (painel D) e do LEa EPOhr (painel E) 4 µg, obtida pelo programa ImageMaster®.

O perfil eletroforético do IFA e do BRP foram similares. O LEa apresentou perfil compatível com o esperado para a EPOhr, entretanto, a coloração de fundo prejudicou a visualização adequada das bandas do LEa (Figura 4.10). Mesmo com diferença entre as amostras, o percentual da maioria das isoformas detectadas está de acordo com as especificações da F.E. e do CIM (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Percentual encontrado para cada isoforma do BRP (%BRP), IFA (%IFA) e LEa (%LEa) EPOhr

Isoforma	% F.E.	% CIM	% BRP (pI)	% IFA (pI)	% LEa (pI)
1	0 – 15	-	13,3 (5,15)	-	-
2	0 – 15	0 – 15	11,4 (4,83)	12,8 (4,93)	17,3 (4,78)
3	5 – 20	0 – 20	14,8 (4,54)	17,2 (4,64)	13,6 (4,49)
4	10 – 35	10 – 35	17,1 (4,27)	19,5 (4,34)	15,1 (4,25)
5	15 – 40	15 – 40	15,4 (4,00)	18,5 (4,05)	5,5 (3,86)
6	10 – 35	10 – 35	11,7 (3,75)	15,1 (3,81)	17,9 (3,71)
7	0 – 20	0 – 20	9,96 (3,52)	10,6 (3,58)	15,1 (3,49)
8	0 - 15	-	6,2 (3,32)	5,23 (3,39)	10,8 (3,30)
9	-	-	-	-	4,73 (3,13)

Para melhor visualização das bandas do padrão de pI ácido, diferentes quantidades do mesmo foram avaliadas nas condições de análise estabelecidas para a EPOhr (Figura 4.11).

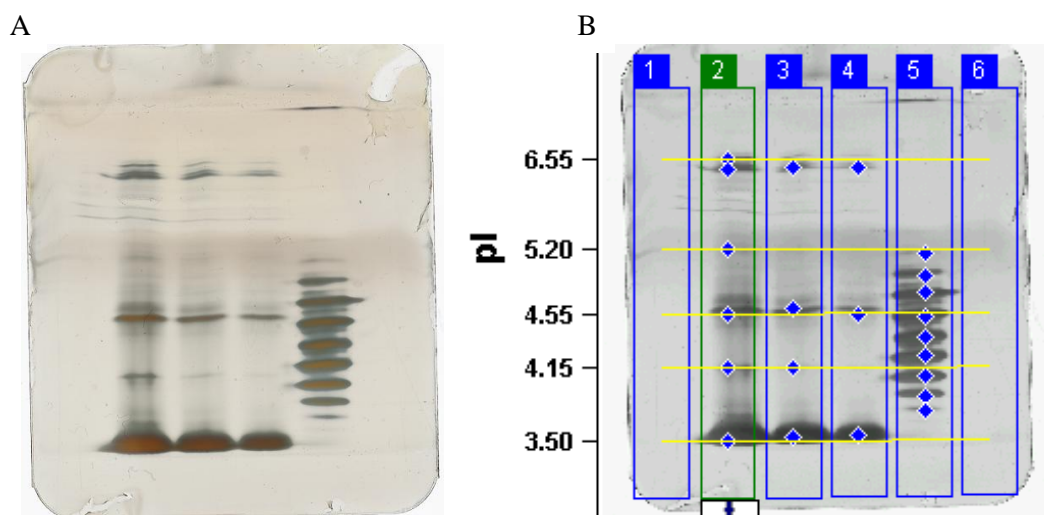


Figura 4.11: Gel de IEF das diluições do PPI e IFA EPOhr analisado pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raia 1: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L); Raia 2: PPI 2,5-6,5 1:2; Raia 3: PPI 2,5-6,5 1:3; Raia 4: PPI 2,5-6,5 1:4; Raia 5: IFA EPOhr 4  $\mu$ g; Raia 6: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L).

Os padrões de pI detectados foram: Amiloglicosidase (3,50), glicose oxidase (4,15), inibidor de tripsina de soja (4,55),  $\beta$ -lactoglobulina A (5,20) e anidrase carbônica B humana (6,55), cuja curva de calibração apresentou  $R^2$  igual 0,9978 (Figura 4.12).

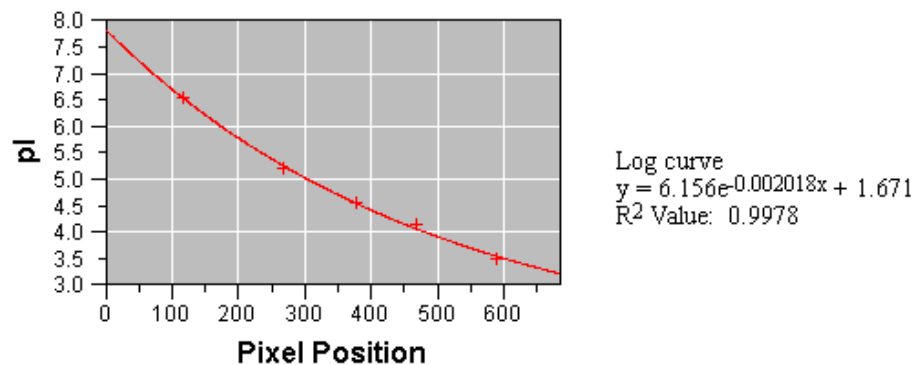
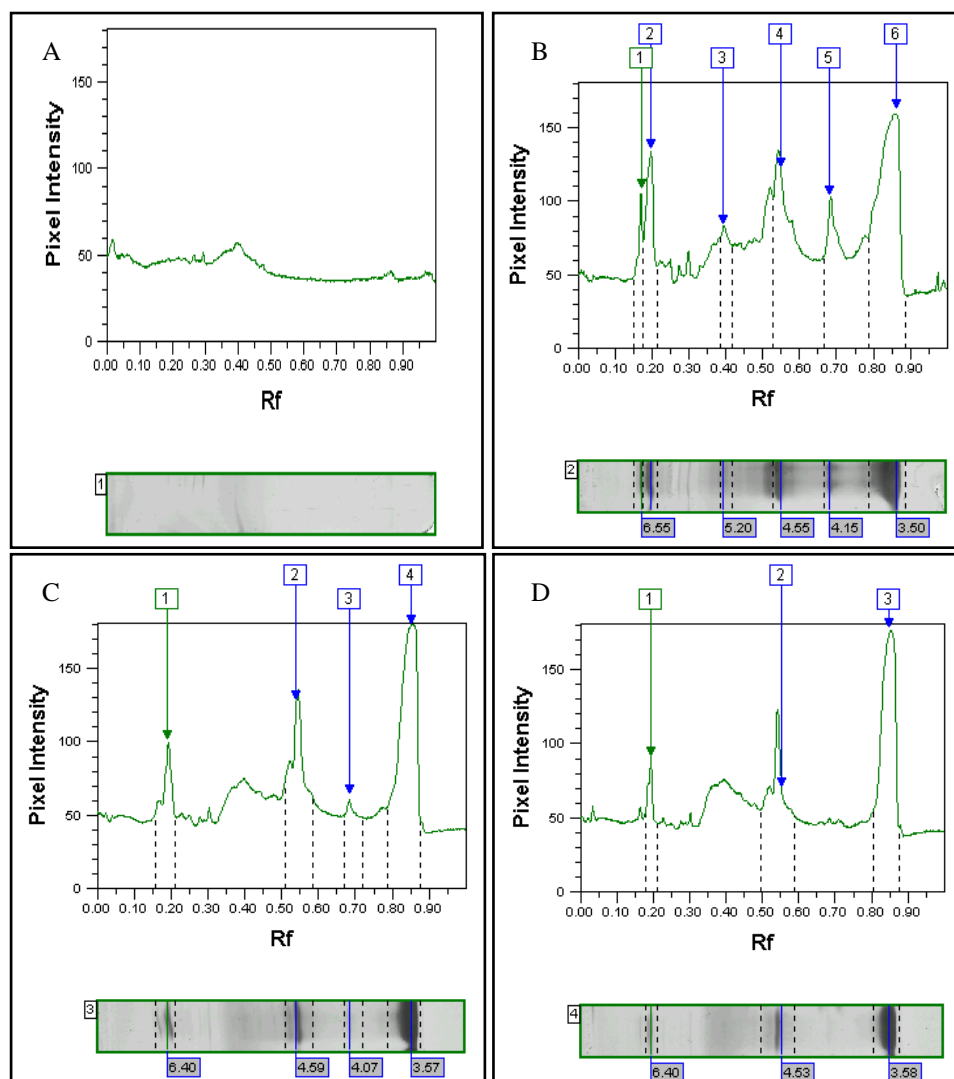


Figura 4.12: Curva de calibração do PPI 2,5-6,5 obtida pelo programa ImageMaster®.

Pode-se observar através da figura 4.13 que o PPI diluído 1:2 apresentou melhor definição das bandas. Os valores de pI das isoformas da amostra IFA EPOhr variou de 5,19 a 3,74, como demonstrado na figura 4.13.



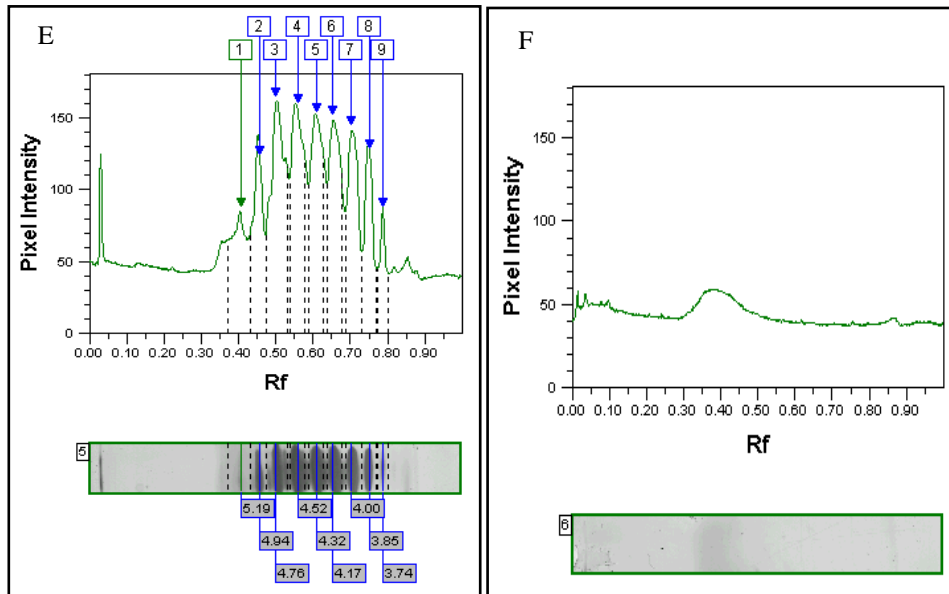


Figura 4.13: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF obtida pelo programa ImageMaster®: Água WFI como controle negativo (painéis A e F); PPI 1:2 (painel B); PPI 1:3 (painel C); PPI 1:4 (painel D); IFA EPOhr 4  $\mu$ g (painel E).

Para avaliar o efeito da quantidade de amostra de EPOhr a ser aplicada nos géis de IEF-PAGE, foram realizadas triplicatas do gel utilizando o pente 8/0,5 $\mu$ L (Figura 4.14), no qual aplicou-se 1 $\mu$ L de cada amostra para minimizar o erro de pipetagem. Pode-se verificar que mesmo com quantidades muito menores das amostras, foi possível a detecção de pelo menos 7 isoformas para o IFA, e 8 isoformas para o BRP e LEa EPOhr (Figura 4.15), estando de acordo com dados obtidos com o pente 6/4 $\mu$ L.

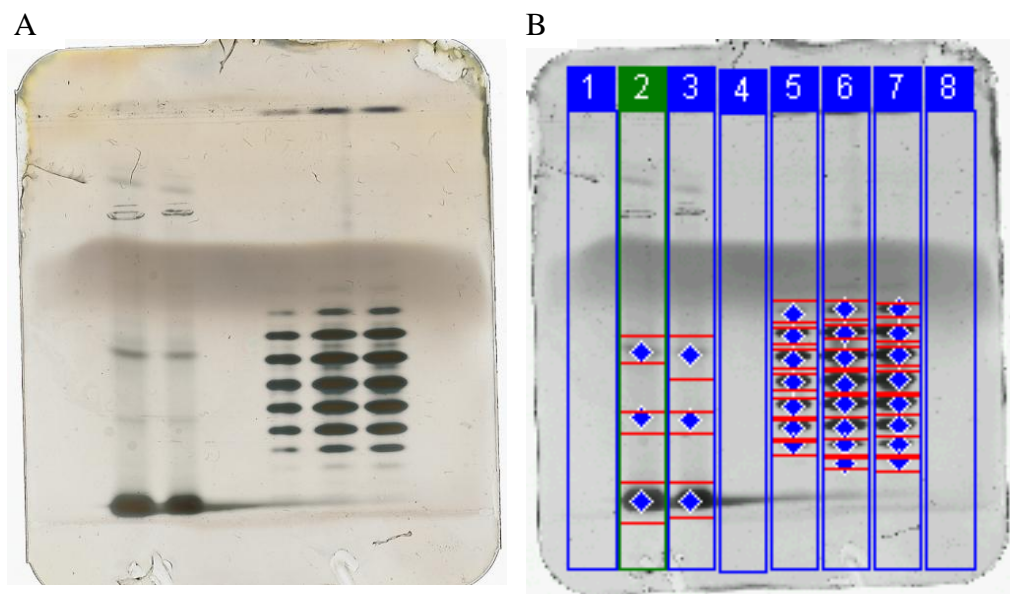
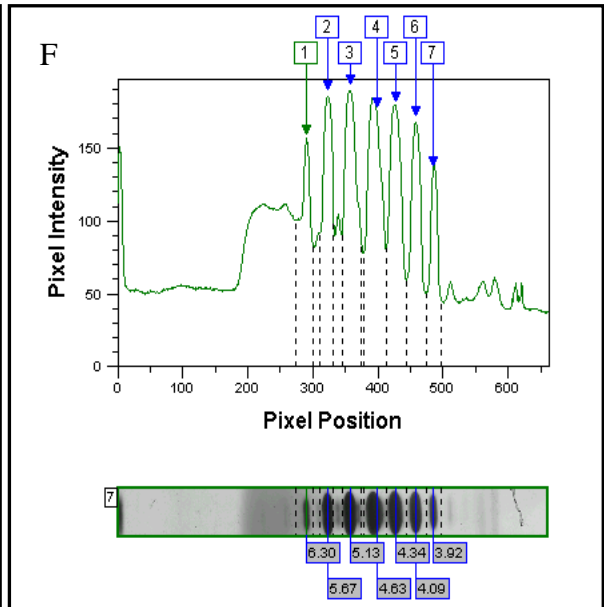
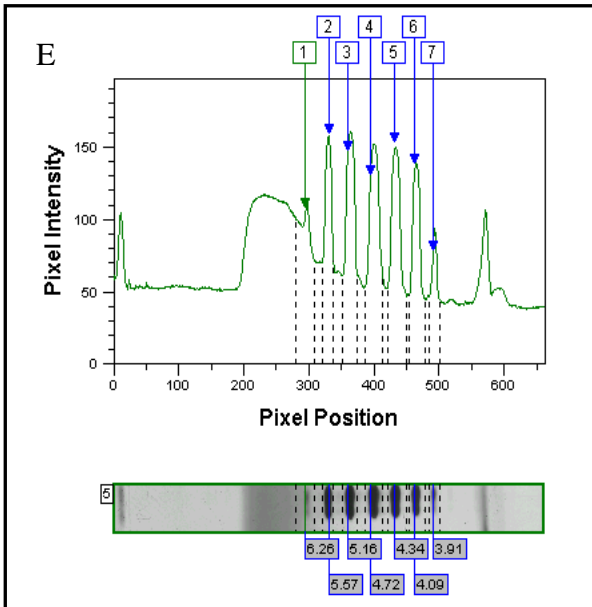
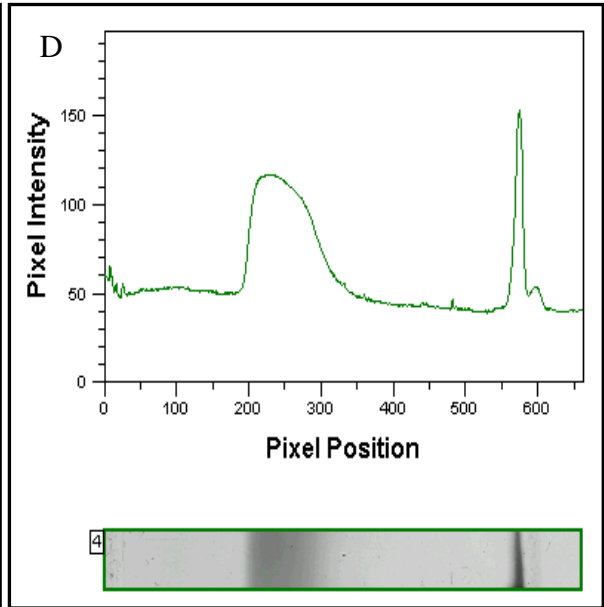
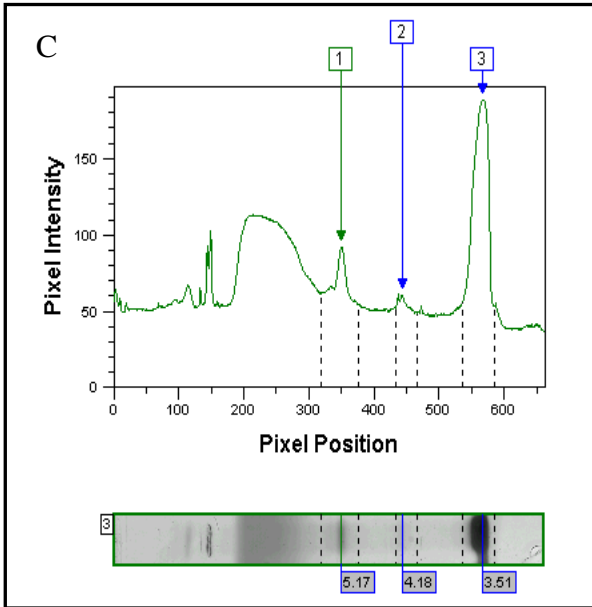
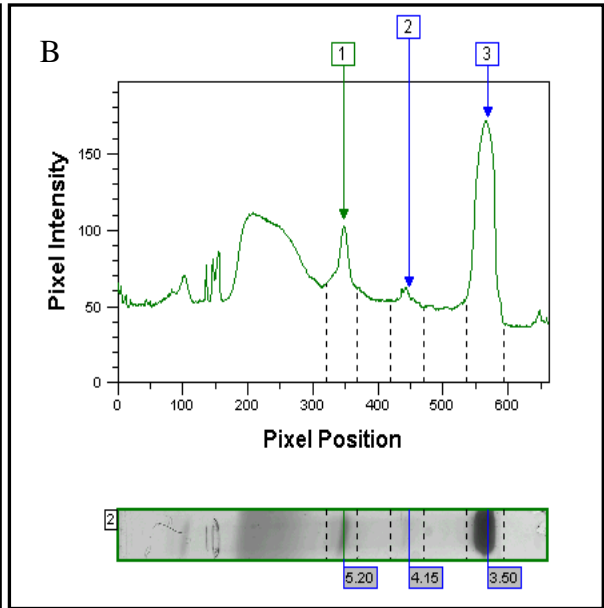
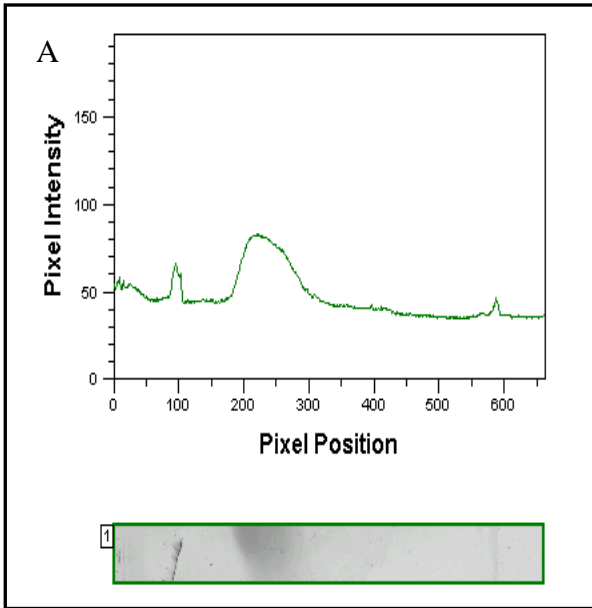


Figura 4.14: Gel de IEF do LEa EPOhr corado por nitrato de prata (A) e o mesmo gel após análise pelo programa ImageMaster® - GE Healthcare (B). Raia 1,4 e 8: Controle negativo (água WFI 4 $\mu$ L); Raias 2, 3: PPI 2,5-6,5 4; Raia 5: IFA EPOhr 0,5  $\mu$ g; Raia 6: BRP EPOhr 0,5  $\mu$ g; Raia 7: LEa EPOhr 0,5  $\mu$ g





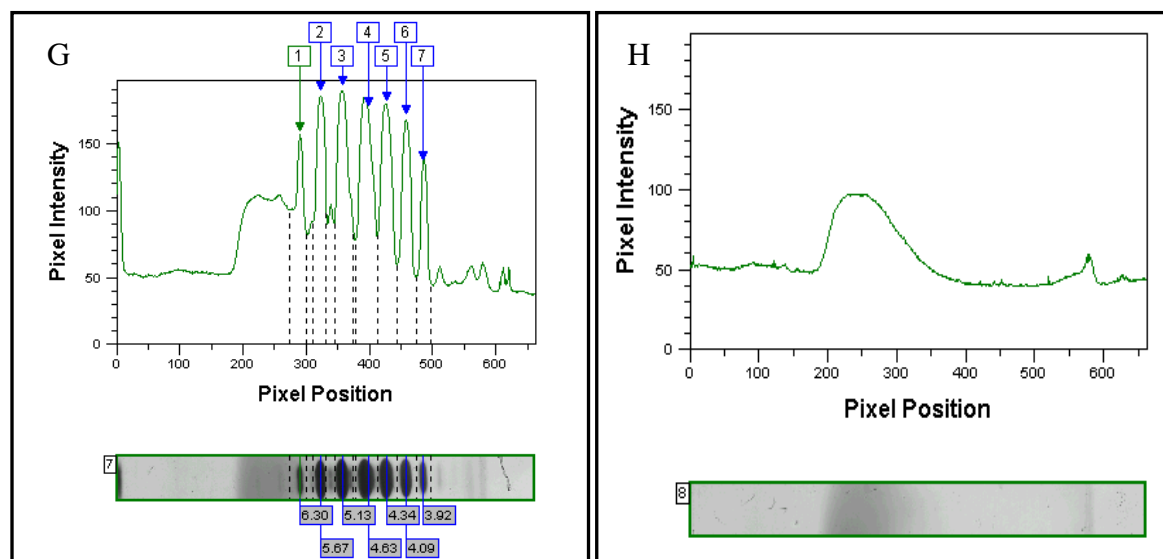


Figura 4.15: Densitometria das bandas eletroforéticas da IEF obtida pelo programa ImageMaster<sup>®</sup>: Água WFI como controle negativo (painéis A, D e H); PPI 2,5-6,5 (painéis B e C); IFA EPOhr 0,5 $\mu$ g (painel E); BRP EPOhr 0,5 $\mu$ g (painel F); LEa EPOhr 0,5 $\mu$ g (painel G).

As marcações nas extremidades do gel e a banda extensa observada na figura 4.15 H estão relacionadas ao anfólito utilizado na incubação do gel. Variações mínimas no tempo de incubação podem causar variação no teor de certos anfólitos incorporados ao gel, que consequentemente, aparecem na revelação por prata como bandas, manchas ou aumento da coloração de fundo. Desse modo, para garantir que tais interferências não atrapalhem as análises, foi introduzido na metodologia de IEF-PAGE, as raias do branco, que correspondem a água WFI. O percentual de cada isoforma calculado a partir do volume de banda está de acordo com a faixa estabelecida pela F.E. e pelo CIM conforme listado na tabela 4.4. Dessa maneira, mesmo sabendo-se que o CIM utiliza 4  $\mu$ g da EPOhr, esta análise demonstra que quantidades de EPOhr na ordem de 0,5 $\mu$ g são suficientes para avaliação por IEF-PAGE. Isso implica em uma menor quantidade de amostra para analisar e, com isso, menor custo do processo. Neste caso, seria necessário ajustar apenas a diluição do PPI.

Tabela 4.4: Percentual encontrado para cada isoforma do IFA (%IFA), BRP (%BRP) e LEa (%LEa) EPOhr.

Isoforma	% F.E.	% CIM	% IFA	% BRP	% LEa
1	0 – 15	-	4,0	5,7	5,3
2	0 – 15	0 – 15	13,8	11,9	13,4
3	5 – 20	0 – 20	19,8	19,0	18,2
4	10 – 35	10 – 35	21,3	20,9	20,9
5	15 – 40	15 – 40	20,1	18,1	18,1
6	10 – 35	10 – 35	15,5	14,9	14,7
7	0 – 20	0 – 20	5,6	8,2	7,8
8	0 - 15	-	-	1,2	1,5

Levando-se em consideração que a técnica de Focalização Isoelétrica está sujeita a muitos interferentes, deve-se atentar para determinadas etapas como o preparo da amostra, o qual envolve muitos procedimentos como a dosagem de proteínas, dessalinização e secagem que são pontos críticos no desenvolvimento do ensaio (Bento et al. 2003, Joyner, 2004, Marie et al. 2004). Além disso, a formação do gradiente de pH do gel é um parâmetro que pode inviabilizar o desempenho do método pela má distribuição das isoformas através do gel (Bento et al. 2003). Como a EPOhr possui características de ponto isoelétrico ácidas (Lasne & Ceaurriz, 2000) foi necessário estabelecer um gradiente de pH que possibilitasse a separação das isoformas dentro da faixa ácida do gel. Desta forma, foi possível a separação de 7 a 9 isoformas bem definidas das amostras de EPOhr (BRP, IFA e LEa), estando de acordo com dados disponíveis na literatura (Gokana et al. 1997; Lai et al. 1986; Choi et al. 1996; Tanaka & Nangaku, 2012).

A diferença da quantidade e percentagem de cada isoforma entre as três amostras analisadas provavelmente está relacionada ao teor de açúcares e ácido siálico presente na EPOhr, o que poderia ser confirmado através de outras metodologias, por exemplo, mapeamento peptídico ou quantificação de açúcares. Llop et al. (2008) demonstraram a diferença da quantidade de isoformas e pI entre as amostras da Eritropoetina Humana endógena, BRP e Eritropoetina delta. Portanto, a diferença de resultados entre as amostras analisadas neste trabalho era algo descrito e esperado. Além disso, enquanto o IFA e o LEa apresentam em sua composição apenas alfapoetina, o BRP apesar de ter a mesma quantidade de proteína (250 µg), a metade desta corresponde a eritropoetina alfa e a outra metade eritropoetina beta (Behr-Gross, 2007). É descrito que a Eritropoetina beta possui maior quantidade de isoformas básicas se comparada a EPOhr alfa, estando tal diferença relacionada ao padrão de glicosilação (Storring et al. 1998).

Apesar de a metodologia padronizada seguir as recomendações do CIM, houve pequena diferença entre os resultados, sendo relatada a presença de apenas 6 isoformas no referido Instituto, o que pode ser devido a coloração dos géis. Apesar do CIM também realizar a coloração por nitrato de prata, isto não é feito com o kit de coloração *Silver Staining Kit, Protein* - GE Healthcare, conforme utilizado nesse trabalho. A utilização do kit de coloração comercial, bem como a coloração automatizada, diminui os interferentes relacionados ao preparo das soluções e ao operador, o que poderia comprometer a detecção das bandas devido ao background formado no gel.

A utilização do PhastGel Dry IEF também pode acarretar diferenças na distribuição de cada isoforma, pois uma pequena diferença no preparo da solução de hidratação e/ou no tempo de hidratação do gel, pode gerar gradiente de pH diferente. Por esse motivo, seria mais adequado o uso de um gel com um gradiente de pH ácido pré-estabelecido, como por exemplo o PhastGel com a faixa de pH 4-6,5, o que provavelmente tornaria mais uniforme os resultados obtidos em diferentes dias e/ou diferentes operadores.

Com relação à estimativa dos valores de pI para a EPOhr, observou-se a presença de isoformas na faixa entre 3,13 e 5,19 nas amostras analisadas, em concordância com dados disponíveis na literatura (Lasne & Ceaurriz, 2000, River & Saugy, 2003). Segundo Choi et al. (1996), as isoformas de EPOhr possuem pI na faixa de 4,5 a 5,0 com variação entre diferentes amostras, o que está relacionado, 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 EPOhr mais baixo. Portanto, os dados obtidos para as amostras avaliadas podem ser um indicativo da presença de isoformas com altos níveis de ácido siálico, as quais são desejáveis para uso terapêutico, uma vez que a presença de moléculas de ácido siálico aumenta a permanência do biofármaco no organismo, potencializando seu efeito farmacológico (Halstenson et al., 1991, Allon et al., 2002).

Além da concordância dos resultados de pI e quantidades de isoformas com dados disponíveis na literatura, a padronização desta técnica permitiu a análise do percentual de cada isoforma. Foi demonstrado que apesar de ter sido detectado número maior de isoformas do que é considerado pela F. E. e pelo CIM, as mesmas se encontram dentro da faixa estabelecida, como pode ser observado nas tabelas 4.3 e 4.4. Sendo assim, a metodologia padronizada e validada é reprodutível e adequada para a análise da EPOhr pelo Controle de Qualidade.

Entretanto, a F.E. preconiza para determinação das isoformas a técnica de eletroforese capilar, que é mais sensível e mais automatizada que a focalização isoeletrica, minimizando os interferentes relacionados ao operador (Girard et al. 2012) além das alterações relativas a uniformidade do gradiente de pH.

### 4.3- Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

A padronização da técnica CZE foi realizada utilizando-se a amostra LEa EPOhr e, os resultados obtidos foram avaliados de acordo com mudanças nos parâmetros da metodologia. Inicialmente foi modificada a tensão na faixa de 20 a 30 kV. Após o ajuste da tensão, outros parâmetros importantes foram avaliados como: temperatura, pressão e tempo de injeção. Desta forma, pode-se observar a separação de seis picos majoritários bem evidentes apresentando amplitude máxima de aproximadamente 2.3 mAU (Figura 4.16) e uma tendência a separação da primeira e oitava glicoforma de EPOhr que corresponde a isoforma mais básica e mais ácida, respectivamente, as quais geralmente apresentam-se no eletroferograma por um pico relativamente menor que os demais. A linha de base apresentou-se levemente inclinada, mas sem ruído, indicando que a mesma encontra-se instável.

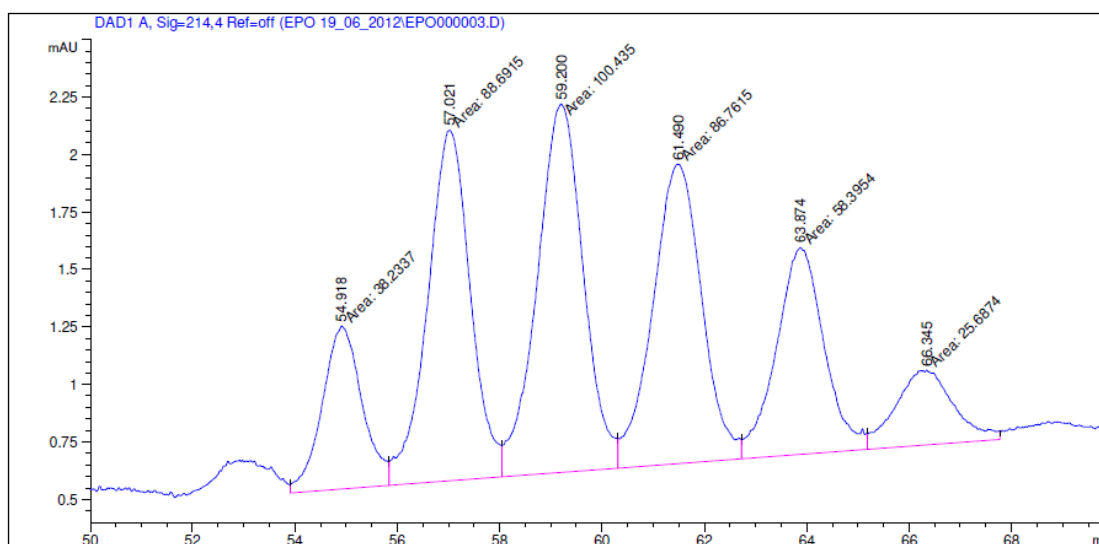


Figura 4.16: Eletroferograma do LEa EPOhr. Parâmetros de corrida: 30kV, 300 $\mu$ A, 6W, Pressão de injeção 50mBar, Tempo de injeção 10 segundos, duração da corrida 100 minutos.

Com o objetivo de aumentar a área relativa a primeira e a última glicoformas, a pressão de injeção foi ajustada para 100mBar e o tempo de injeção elevado para 75 segundos. Desta forma, houve o aumento da concentração da EPOhr no capilar, o que acarretou maior fluxo eletrosmótico e maior absorbância (40 mAU), levando ao aumento das áreas relativas a cada isoforma. Porém, este aumento implicou em desestabilização da linha de base relativa à conformação da área dos picos.

Para a escolha dos parâmetros ideais e reprodutíveis das corridas, foram realizadas 10 corridas fixando-se a concentração de proteínas (2  $\mu$ g/ $\mu$ L), pressão (75 mBar), tempo de injeção (75s) e a temperatura do sistema (28°C), variando-se apenas a voltagem a qual o capilar foi submetido (30 e 28 kV). Comparando-se os perfis dos eletroferogramas obtidos, o

resultado cuja área dos picos das 8 isoformas encontram-se mais precisos e com menor sobreposição entre as áreas adjacentes são os obtidos com 28 kV. A figura 4.17 A demonstra a área e o tempo de retenção obtido para o LEa com os picos relacionados as isoformas bem resolvidos. A figura 4.17 B é o eletroferograma representativo de cinco das dez replicatas realizadas, demonstrando perfil idêntico entre elas.

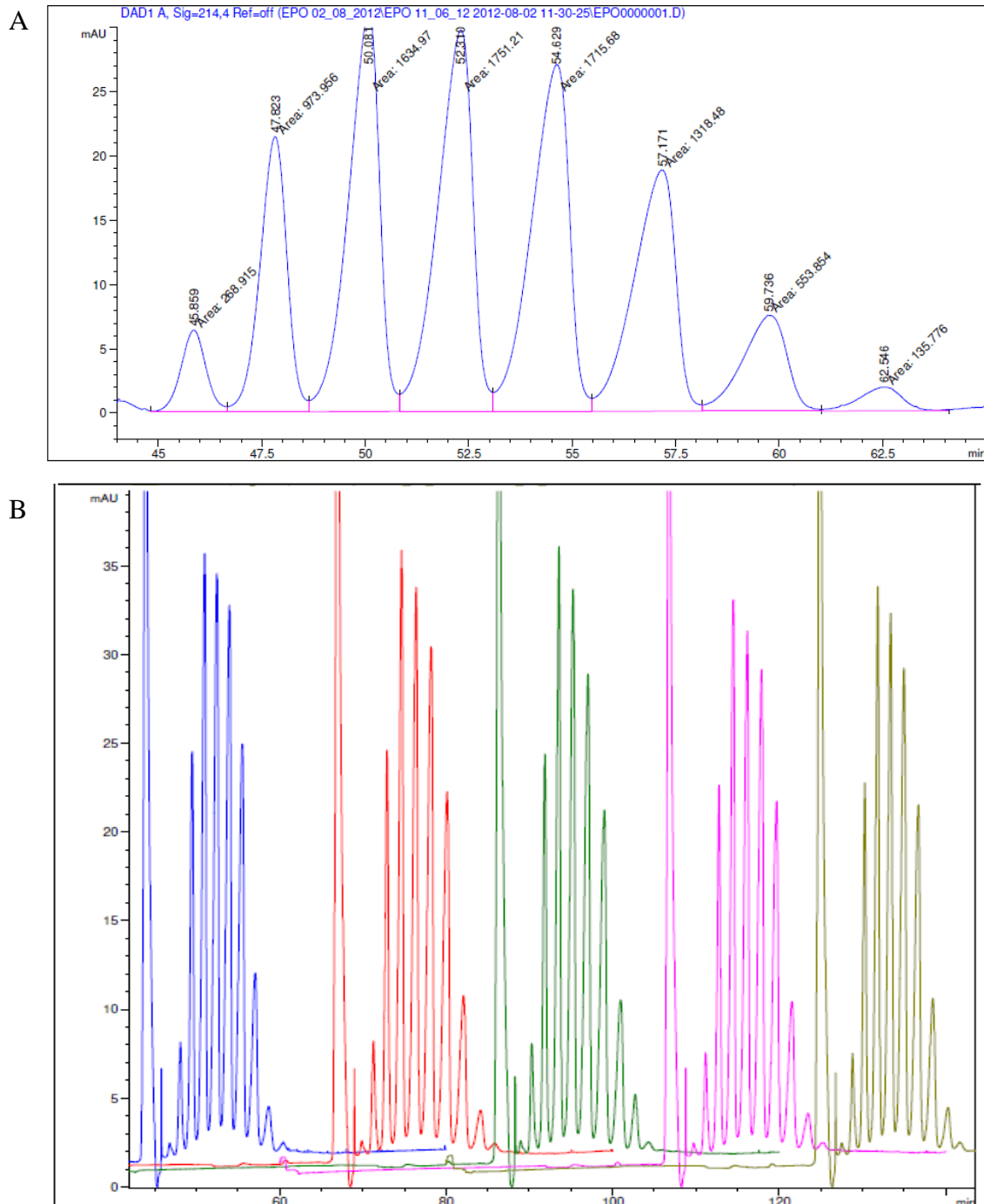


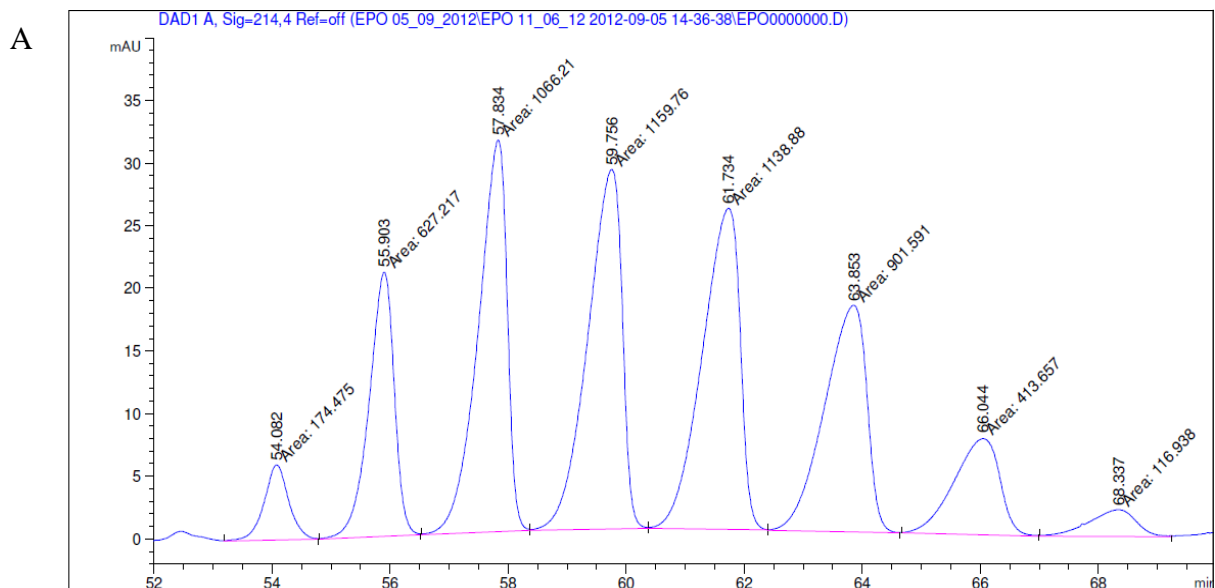
Figura 4.17: Eletroferograma do LEa EPOhr. A: área e tempo de retenção da amostra; B: 5 das 10 replicatas realizadas. Parâmetros de corrida: 28kV, 300 $\mu$ A, 6W, Pressão de injeção 75mBar, Tempo de injeção 75 segundos, temperatura 28°C, duração da corrida 100 minutos.

A área percentual dos picos do eletroferograma foi utilizada para calcular a percentagem de cada isoforma do LEa EPOhr e comparar com as especificações da F.E. A tabela 4.5 a seguir apresenta a área percentual das 8 isoformas detectadas nas 10 corridas realizadas, juntamente com a média (M), desvio padrão (S) e variância (S<sup>2</sup>).

Tabela 4.5: Área percentual das 8 isoformas (I) detectadas no LEa EPOhr, juntamente com a média (M), desvio padrão (S) e variância (S<sup>2</sup>) entre as 10 replicatas realizadas.

I	Corridas eletroforéticas										Avaliação estatística		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	M	S	S <sup>2</sup>
1	3,29	3,22	3,14	3,14	3,21	3,17	3,24	2,96	3,17	3,04	3,16	0,10	0,010
2	11,67	11,66	11,44	11,58	11,72	11,74	11,84	11,79	11,83	11,83	11,71	0,13	0,016
3	19,34	19,57	19,20	19,39	19,58	19,68	19,64	19,78	19,69	19,61	19,55	0,18	0,033
4	20,76	20,97	20,54	20,87	20,96	21,06	20,95	21,14	21,04	21,04	20,93	0,17	0,030
5	20,38	20,54	20,24	20,42	20,38	20,52	20,32	20,61	20,43	20,47	20,43	0,11	0,012
6	15,78	15,78	16,07	15,92	15,75	15,74	15,60	15,62	15,58	15,71	15,75	0,15	0,022
7	6,85	6,63	7,22	6,90	6,73	6,59	6,70	6,55	6,68	6,68	6,75	0,19	0,038
8	1,93	1,63	2,16	1,77	1,67	1,50	1,71	1,55	1,57	1,63	1,71	0,20	0,040

Os mesmos parâmetros estabelecidos para o LEa EPOhr foram testados para o IFA e BRP EPOhr. O perfil dos eletroferogramas foi bastante similar entre as amostras. Entretanto, o IFA apresentou amplitude diferente do que foi observado para LEa e para o BRP (Figuras 4.18 e 4.19). A área percentual das isoformas do IFA e BRP EPOhr pode ser observada nas tabelas 4.6 e 4.7 respectivamente. A análise entre as replicatas foi realizada a partir do cálculo da média (M), desvio padrão (S) e variância (S<sup>2</sup>), os quais são apresentados nas referidas tabelas.



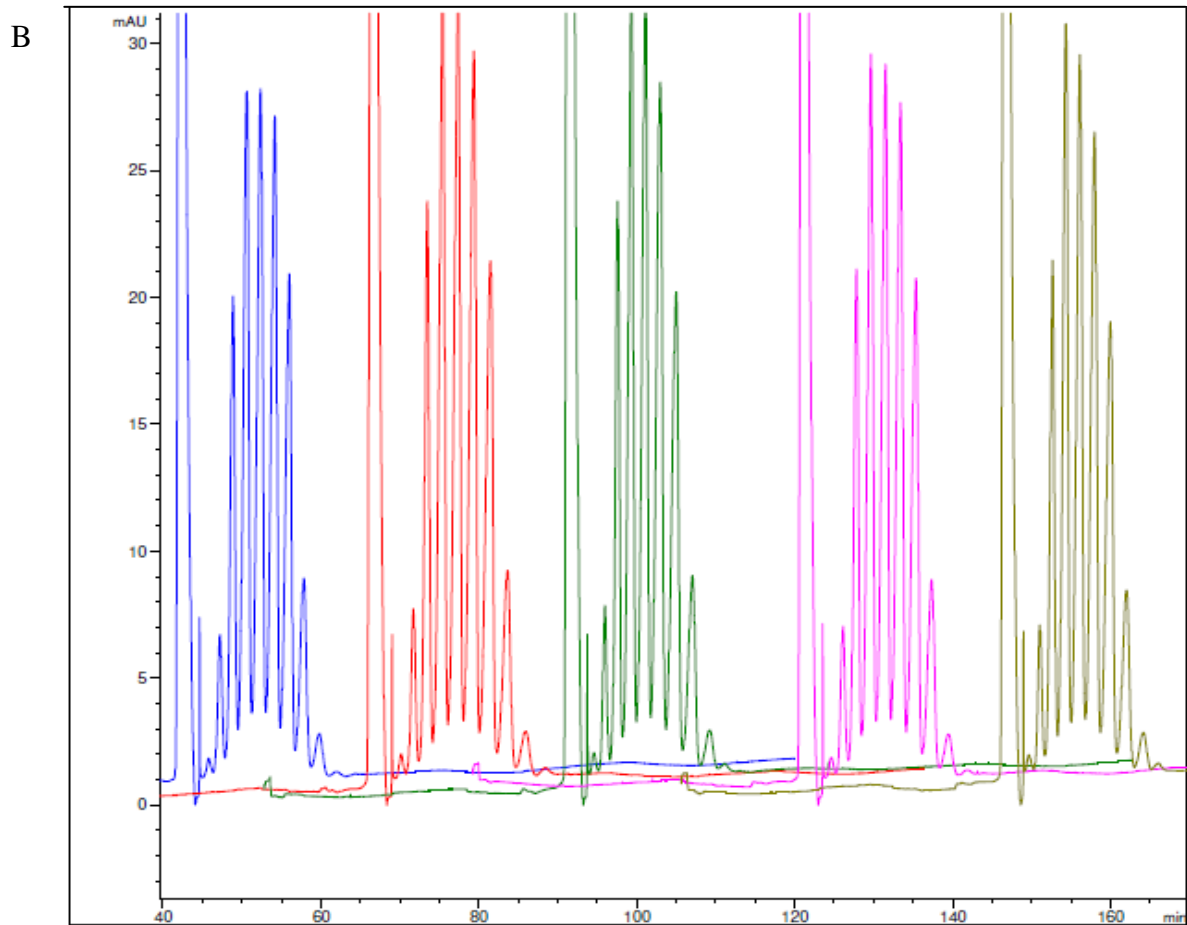


Figura 4.18: Eletroferograma do IFA EPOhr. A: área e tempo de retenção da amostra; B: 5 das 10 replicatas realizadas. Parâmetros de corrida: 28kV, 300 $\mu$ A, 6W, Pressão de injeção 75mBar, Tempo de injeção 75 segundos, temperatura 28°C, duração da corrida 100 minutos.

Tabela 4.6: Área percentual das 8 isoformas (I) detectadas no IFA EPOhr, juntamente com a média (M), desvio padrão (S) e variância ( $S^2$ ) entre as 10 replicatas realizadas.

I	Corridas eletroforéticas										Tratamento de dados		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	M	S	$S^2$
1	3,12	3,05	3,20	3,01	3,17	3,12	2,96	3,02	2,83	3,02	3,05	0,108	0,012
2	11,20	11,19	10,98	11,12	10,96	11,10	10,98	11,11	10,99	10,76	11,04	0,134	0,018
3	19,04	19,01	18,80	18,89	18,66	18,89	19,09	18,97	18,91	18,49	18,88	0,184	0,034
4	20,71	20,75	20,58	20,62	20,41	20,78	20,64	20,77	20,68	20,64	20,66	0,111	0,012
5	20,34	20,41	20,13	20,34	20,16	20,37	20,31	20,40	20,41	20,36	20,32	0,100	0,009
6	16,10	16,12	15,94	16,14	16,27	16,20	16,16	16,21	16,30	16,22	16,17	0,101	0,010
7	7,39	7,43	7,73	7,61	7,71	7,48	7,49	7,47	7,71	8,00	7,60	0,189	0,035
8	2,09	2,03	2,63	2,27	2,66	2,05	2,38	2,05	2,17	2,52	2,29	0,249	0,062



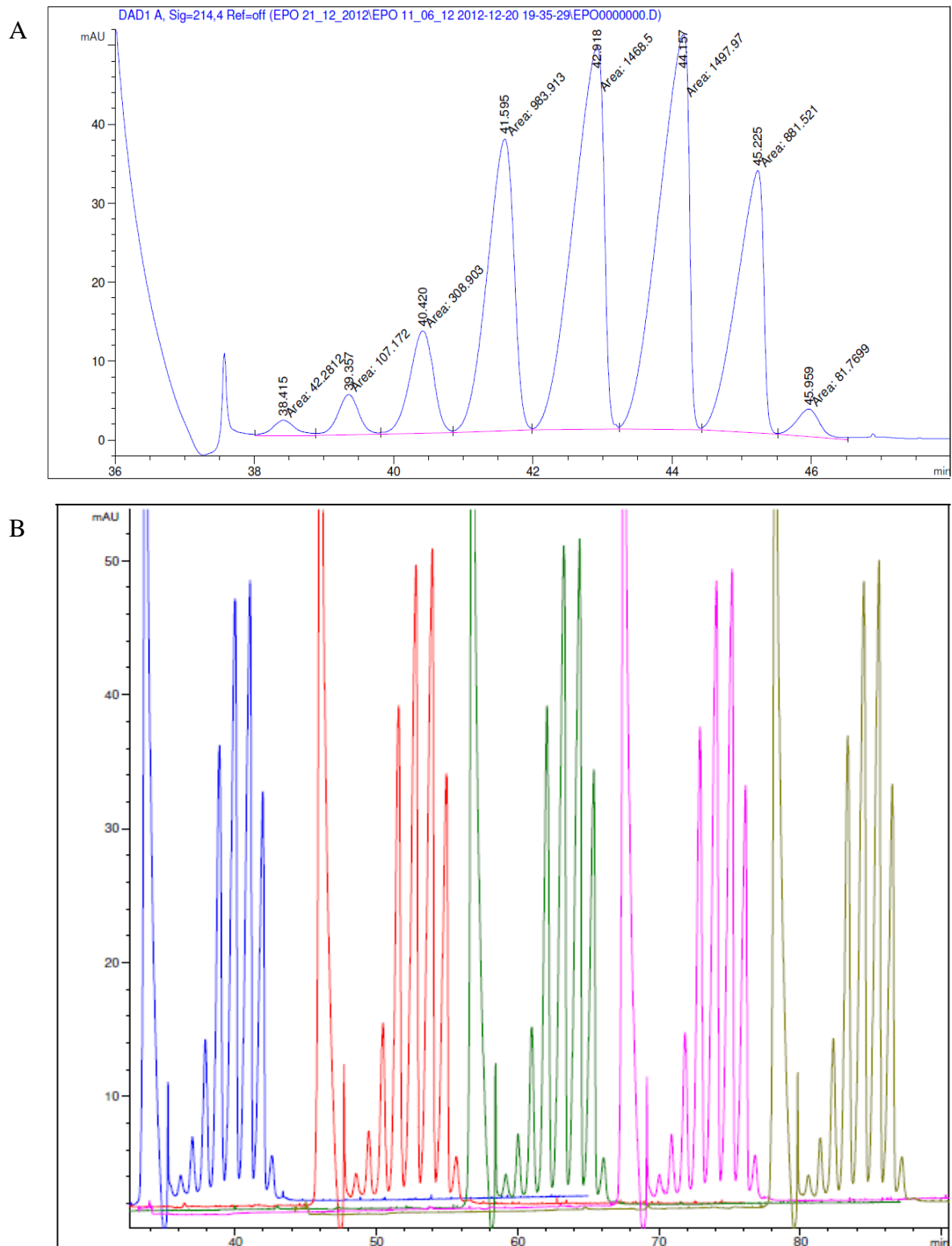


Figura 4.19: Eletroferograma do BRP EPOhr. A: área e tempo de retenção da amostra; B: 5 das 10 replicatas realizadas. Parâmetros de corrida: 28kV, 300 $\mu$ A, 6W, Pressão de injeção 75mBar, Tempo de injeção 75 segundos, temperatura 28°C, duração da corrida 100minutos.

Tabela 4.7: Área percentual das 8 isoformas (I) detectadas no BRP EPOhr, juntamente com a média (M), desvio padrão (S) e variância (S<sup>2</sup>) entre as 10 replicatas realizadas.

I	Corridas eletroforéticas										Tratamento de dados		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	M	S	S <sup>2</sup>
1	0,79	0,83	0,81	0,79	0,78	0,81	0,77	0,90	0,75	0,94	0,82	0,06	0,003
2	2,00	2,08	1,94	1,88	1,93	1,93	1,90	1,89	1,88	1,90	1,93	0,06	0,004
3	5,75	5,88	5,78	5,69	5,73	5,62	5,80	5,58	5,53	5,50	5,68	0,13	0,015
4	18,32	18,46	18,53	18,49	18,44	18,43	18,53	18,25	18,14	17,88	18,35	0,21	0,043
5	27,34	27,24	27,48	27,47	27,47	27,39	27,44	27,35	27,44	27,18	27,38	0,10	0,010
6	27,88	27,60	27,80	27,84	27,81	27,85	27,70	27,98	28,10	28,14	27,87	0,17	0,028
7	16,41	16,35	16,30	16,41	16,39	16,50	16,39	16,55	16,65	16,80	16,48	0,15	0,023
8	1,52	1,56	1,37	1,43	1,45	1,46	1,47	1,50	1,51	1,66	1,49	0,08	0,006

O esquema representativo dos eletroferogramas das amostras BRP, IFA e LEa EPOhr analisadas (Figura 4.20), evidencia o mesmo perfil de separação e mesma quantidade de isoformas entre elas.

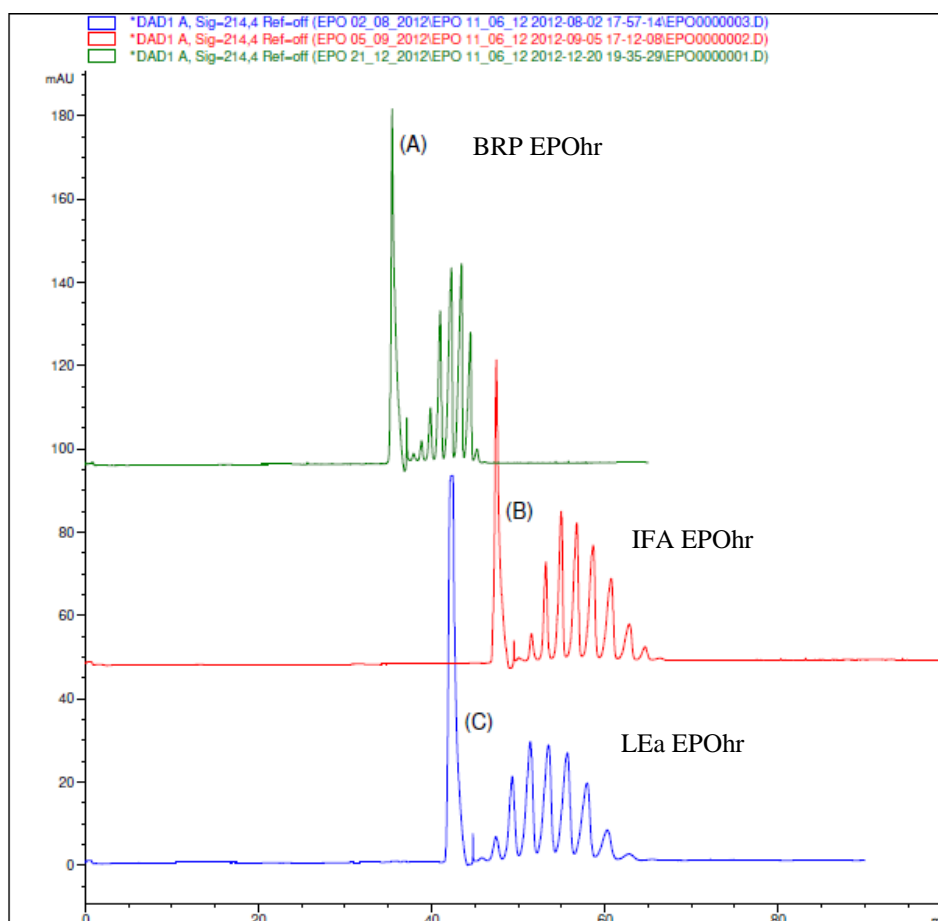


Figura 4.20: Eletroferograma representativo das três amostras analisadas. A: BRP EPOhr; B: IFA EPOhr; C: LEa EPOhr. Parâmetros de corrida: 28kV, 300 $\mu$ A, 6W, Pressão de injeção 75mBar, Tempo de injeção 75 segundos, temperatura 28°C, duração da corrida 100minutos.

O percentual de cada isoforma foi calculado a partir da área dos picos nas amostras de LEa, IFA e BRP. Para avaliar se os resultados obtidos para cada isoforma nas diferentes amostras são homogêneos entre si, foi utilizado o teste de Levene modificado, que se trata de um procedimento interessante por ser robusto a desvios da normalidade (Montgomery, 2008). Resumidamente, o teste usa para cada grupo de resultados de uma isoforma, o desvio absoluto de cada observação com relação à mediana deste grupo. Se as médias destes grupos de desvios absolutos forem iguais, as variações entre os grupos serão as mesmas. Para esta última verificação, foi utilizada a ferramenta estatística F da ANOVA para testar igualdade entre as médias dos desvios absolutos (Montgomery, 2008).

Utilizando um nível de significância de 5%, considera-se que a diferença entre as dispersões é estatisticamente significativa quando o p-valor do teste for inferior a 0,05. Na tabela 4.8 estão listados os resultados da média percentual de cada isoforma (M), o desvio-padrão (S) e o p-valor obtido entre as diferentes amostras juntamente com a faixa percentual de cada isoforma especificado pela F.E.

Tabela 4.8: Média da área percentual (M%) e desvio padrão (S) das 8 isoformas (I) detectadas nas amostras LEa, BRP e IFA EPOhr em comparação com a faixa percentual de cada isoforma estabelecida pela F.E., juntamente com os resultados do p-valor.

I	F.E %	M% LEa	S LEa	M% BRP	S BRP	M % IFA	S IFA	p-valor
1	0-15	3,16	0,098	0,82	0,060	3,02	0,147	0,211
2	0-15	11,71	0,127	1,93	0,063	11,01	0,161	0,070
3	5-20	19,55	0,181	5,68	0,126	18,86	0,183	0,995
4	10-35	20,93	0,174	18,35	0,207	20,68	0,135	0,183
5	15-40	20,43	0,109	27,38	0,103	20,35	0,139	0,811
6	10-35	15,75	0,149	27,87	0,168	16,19	0,118	0,193
7	0-20	6,75	0,195	16,48	0,153	7,62	0,186	0,737
8	0-15	1,71	0,200	1,49	0,080	2,27	0,241	0,080

Podemos observar que todas as amostras analisadas se encontram em concordância com a faixa percentual especificada. Além disso, pode-se observar que os resultados obtidos entre as diferentes amostras são homogêneos entre si, tendo em vista que o p-valor foi maior que 0,05 para todas as isoformas detectadas. Dessa forma, a técnica de Eletroforese Capilar de Zona (CZE), demonstrou ser eficaz e reprodutível para a análise das isoformas de EPOhr. Em comparação com a Focalização Isoelétrica (IEF), a metodologia CZE tem se tornado mais utilizada e preconizada para a análise das isoformas de glicoproteínas recombinantes (Barbosa, J. et al. 2006), devido principalmente a facilidade em reproduzir réplicas da análise com menor variação entre elas (Lamb et al. 2005). Além disso, a técnica é bastante promissora por necessitar de pequenas quantidades tanto de amostra como do eletrólito de

análise, apresentar um alto poder de resolução e, ainda poder ser executada em um curto intervalo de tempo (Tavares, 1996; Poitevin, M. et al. 2007; Agilent Technologies 2009).

A modificação do protocolo estabelecido pela F.E. para análise das isoformas de EPOhr através da CZE demonstrou resultados semelhantes e diminuiu o tempo de análise em média 20 minutos. Além disso, a variação entre as replicatas e entre as três amostras analisadas não demonstrou diferença significativa, sendo, portanto, a técnica bastante reprodutível. Os resultados obtidos utilizando-se as amostra de LEa, IFA e BRP EPOhr, submetidas a dessalinização, apresentou eletroferograma compatível com 6 isoformas majoritárias e 2 minoritárias corroborando com os resultados obtidos através da IEF neste estudo e, correspondendo ao perfil esperado quando comparado aos dados disponíveis na F.E. e na literatura (Gokana A. et al. 1997, Bietlot H. & Girard M., 1997; Behr-Gross M.E., Daas A. & Bristow A.F., 2004; Zhang J. et al. 2009).

A maioria dos recentes trabalhos para a determinação das isoformas de EPOhr é baseada no método descrito pela F.E., o qual determina a utilização do tampão de separação contendo 2,5 mM de putrescina para evitar a adsorção da proteína na superfície do capilar (Girard *et al.*, 2012). Porém, foi conseguido melhor separação das isoformas modificando-se para 3,9 mM de putrescina segundo Frutos et al. (2003). Além disso, outros parâmetros modificados durante o desenvolvimento e padronização da metodologia como a pressão, tempo de injeção, temperatura do sistema e a voltagem a qual o capilar foi submetido demonstram eletroferogramas com melhor resolução em comparação com dados da literatura.

Um ponto crítico da utilização deste método é o condicionamento do capilar após as corridas e entre as mesmas. Tomando-se as devidas precauções recomendadas na F.E, houve separação de 8 isoformas em aproximadamente 60 minutos com boa repetibilidade para as três amostras analisadas. No entanto Zhang et al. (2009) relataram falta de reprodutibilidade do método, o que pode estar relacionado ao condicionamento inadequado do capilar, pois esta etapa é extremamente necessária para remover completamente a putrescina e restabelecer o pH na superfície da sílica. Por este motivo, os autores propuseram um procedimento de lavagem utilizando uma combinação de ácido, base e água em um longo período, sendo sua eficácia demonstrada. Durante o presente estudo, a reprodutibilidade quanto a resolução dos eletroferogramas foi mantida por até doze corridas consecutivas, quando o capilar necessitava ser removido para a limpeza das partes móveis do equipamento onde havia depósito de sais provenientes do tampão com solução saturada de uréia. O tempo de retenção das amostras em cada corrida foi sempre decrescente ao longo das replicatas realizadas. Este fato relaciona-se

possivelmente ao tipo de equipamento, aos parâmetros estabelecidos para a análise, bem como ao acondicionamento do capilar. Entretanto, o que se leva em consideração é o perfil eletroforético similar entre as análises.

Park et al. (2009) propuseram a utilização de revestimentos poliméricos comerciais para evitar a falta de reprodutibilidade que tinha sido previamente observada nos capilares não revestidos. Neste estudo, o capilar utilizado foi do tipo não revestido de sílica fundida, conforme especificações da F.E. Outros autores relataram que a causa da falta de reprodutibilidade pode também estar relacionada ao pré-tratamento da amostra, da qual deve ser previamente retirado os sais e outros componentes presentes na formulação (Alahmad et al., 2011). Os dados obtidos neste estudo, não relacionam a dessalinização a falta de reprodutibilidade e sim com o perfil eletroforético de separação, já que todas as amostras foram dessalinizadas em coluna Hitrap<sup>®</sup> antes da análise. Entretanto, para a amostra BRP a concentração de proteínas após a dessalinização foi muito baixa, sendo utilizada, por isso, a coluna Amicon<sup>®</sup>Ultra 10.000, com a qual a recuperação da concentração de proteínas foi melhor, possibilitando a lavagem da solução concentrada para retirada de sais, minimizando a quantidade de interferentes.

As formulações geralmente contêm uma mistura variada de excipientes que incluem pequenas moléculas, tais como sais, açúcares, aminoácidos, além de moléculas maiores, como a albumina bovina e polissorbato. Neste contexto, torna-se desejável desenvolver métodos largamente aplicáveis para a avaliação de produtos de várias fontes. Boucher et al. (2012) desenvolveram um método, previamente publicado, para análise de produto final e IFA (alfa, beta e darbepoetina) sem necessidade de pré-tratamento da amostra. Neste estudo, o método mostrou ser aplicável a todas as formulações encontradas, isto é, na presença de polissorbato, albumina e sais como excipientes principais, alargando assim o leque de produtos que podem ser analisados sem pré-tratamento. Além disso, sabe-se que as diferentes formas de apresentação da EPOhr diferem-se quanto ao padrão de glicosilação, ocasionando diferenças no padrão das isoformas bem como em suas propriedades biológicas. A Eritropoetina beta tem menos porção de ácido siálico se comparado a EPOhr alfa, fazendo com que as isoformas básicas estejam em maiores quantidades, o que reduz a afinidade pelo receptor e conseqüentemente a atividade biológica (Storring et al. 1998). Como dito anteriormente, o BRP difere-se das outras amostras analisadas por ser composto por Eritropoetina alfa e beta, enquanto que o IFA e Lea apresentam em sua composição apenas Eritropoetina alfa. Entretanto, a análise por EC demonstrou similaridade qualitativa entre os perfis eletroforéticos das diferentes amostras.

Desta forma, a padronização da metodologia CZE realizada neste trabalho, permitirá a implantação da análise das isoformas para o produto intermediário da EPOhr, como preconizado pela F.E., no Controle de Qualidade em Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. Para isso, será desenvolvido um protocolo de validação, conforme a resolução 899 (ANVISA), para demonstrar que o método analítico é adequado para identificação e avaliação das glicofomas da EPOhr.

#### 4.4- Validação da metodologia SDS-PAGE

##### 4.4.1.-Especificidade

É a capacidade que um método possui de medir inequivocamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz (Brasil, 2003), por tanto é uma medida do quanto o método é indiferente à presença, na amostra, de espécies que poderiam interferir na determinação do analito (Leite, 2002). Segundo a RDC 899 (Brasil, 2003), um método é considerado específico quando o contaminante não interfere no resultado da amostra em análise.

Para avaliar a especificidade, foram realizadas sete corridas eletroforéticas, nas quais foram aplicadas o LEa EPOhr dessalinizado e não dessalinizado (Figura 4.21). Em todas as análises apenas uma banda eletroforética com mobilidade eletroforética de  $0,515 \pm 0,016$  (desvio-padrão de 0,008) foi encontrada. Entretanto, pode-se observar que a amostra dessalinizada (raias 3 e 4) apresenta banda mais compacta e coloração mais escura se comparada a amostra não dessalinizada (raias 6 e 7). O controle negativo realizado com a solução de formulação na ausência da proteína, não apresentou bandas (raias 9 e 10), conforme figura 4.22.

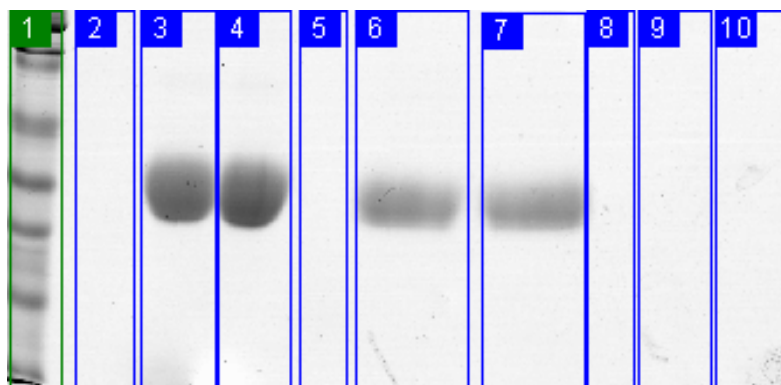


Figura 4.21: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr. Raia 1: Padrões de peso molecular; Raia 2: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 3: LEa EPOhr 10 µg dessalinizado; Raia 4: LEa EPOhr 10 µg dessalinizado; Raia 6: LEa EPOhr 10 µg não dessalinizado; Raia 7: LEa EPOhr 10 µg não dessalinizado; Raia 9: solução de formulação EPOhr 10µL e Raia 10: solução de formulação EPOhr 10µL.

Tabela 4.9: Avaliação dos parâmetros eletroforéticos obtidos após análise do LEa EPOhr por SDS-PAGE

	Volume da banda $\times 10^6$	Altura do pico $\times 10^3$	Área da banda $\times 10^3$
<b>LEa dessal.</b>	62,54	13,14	7,80
<b>LEa não dessal.</b>	50,86	9,03	9,24
<b>Média</b>	56,70	11,09	8,52
<b>Desvio Padrão</b>	8,26	2,90	1,02
<b>CV %</b>	14,56%	26,14%	11,97%

Foi evidenciado que o parâmetro de análise “área da banda” apresentou menor desvio-padrão e coeficiente de variação (CV%) entre o LEa dessalinizado e não dessalinizado, se comparado aos outros parâmetros (volume da banda e altura do pico), como pode ser observado na tabela 4.9. Os parâmetros listados abaixo representam a média obtida entre as replicatas.

#### 4.4.2- Linearidade

Para a definição da linearidade do SDS-PAGE foram realizadas sete corridas eletroforéticas, nas quais foram aplicadas concentrações crescentes do LEa EPOhr variando de 0,5  $\mu\text{g}$  a 15  $\mu\text{g}$  de massa de EPOhr, como pode ser observado na figura 4.22

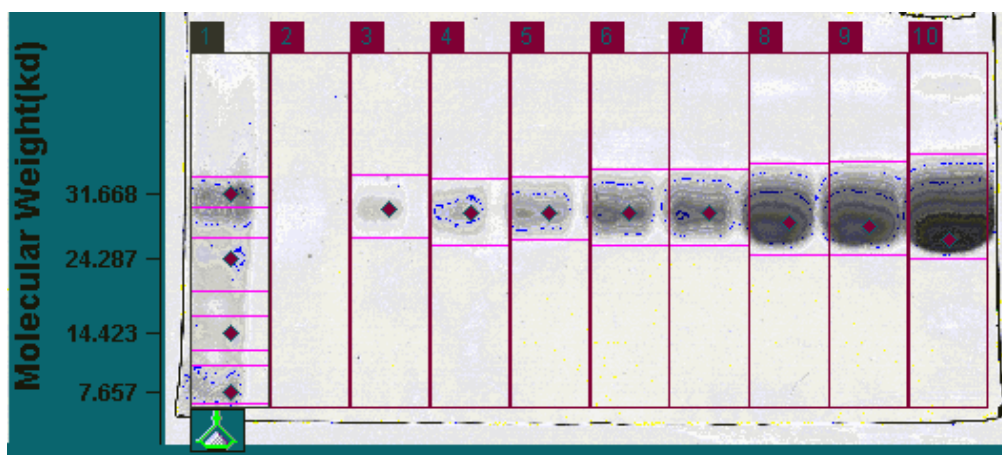


Figura 4.22: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes do LEa EPOhr. Raia 1: Padrões de peso molecular; Raia 2: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 3: LEa EPOhr 0,5  $\mu\text{g}$ ; Raia 4: LEa EPOhr 1  $\mu\text{g}$ ; Raia 5: LEa EPOhr 2  $\mu\text{g}$ ; Raia 6: LEa EPOhr 4  $\mu\text{g}$ ; Raia 7: LEa EPOhr 6  $\mu\text{g}$ ; Raia 8: LEa EPOhr 8  $\mu\text{g}$ ; Raia 9: LEa EPOhr 10 $\mu\text{g}$  e Raia 10: LEa EPOhr 15 $\mu\text{g}$ .

Em todos os géis analisados foram observados apenas uma banda difusa, com peso molecular variando entre 26 kDa a 30 kDa (Figura 4.22 e 4.24). O peso molecular médio destas bandas foram estimados contra curva de calibração de peso molecular feita a partir de padrões de PM *Kaleidoscope Polypeptide Standards* (Bio-Rad) apresentada na figura 4.23. Embora o coeficiente de determinação da curva de PM seja perfeitamente aceitável, igual a

0,9968, os valores de PM estimados para a EPOhr foram menores do que é descrito na literatura, de aproximadamente 34 kDa (Gokana et al. 1997; Zhang et al. 2009). Tal discrepância é irrelevante para o estudo de linearidade, uma vez que as bandas de EPOhr são difusas, o que dificulta a marcação do centro das bandas e o padrão selecionado não é o mais adequado para a EPOhr, como será observado na figura 4.33.

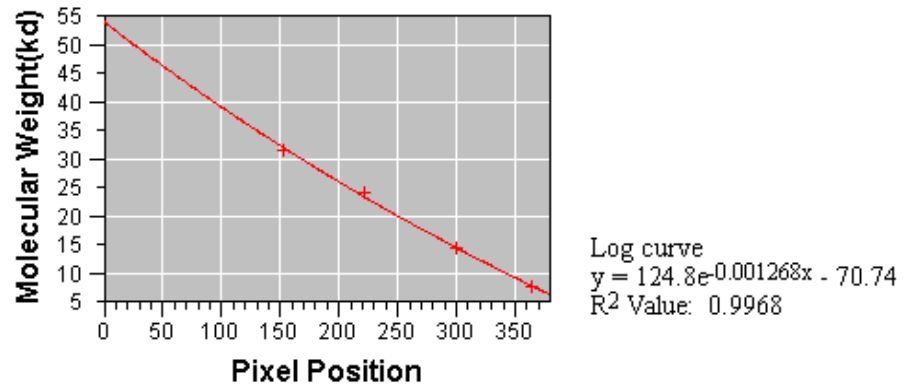
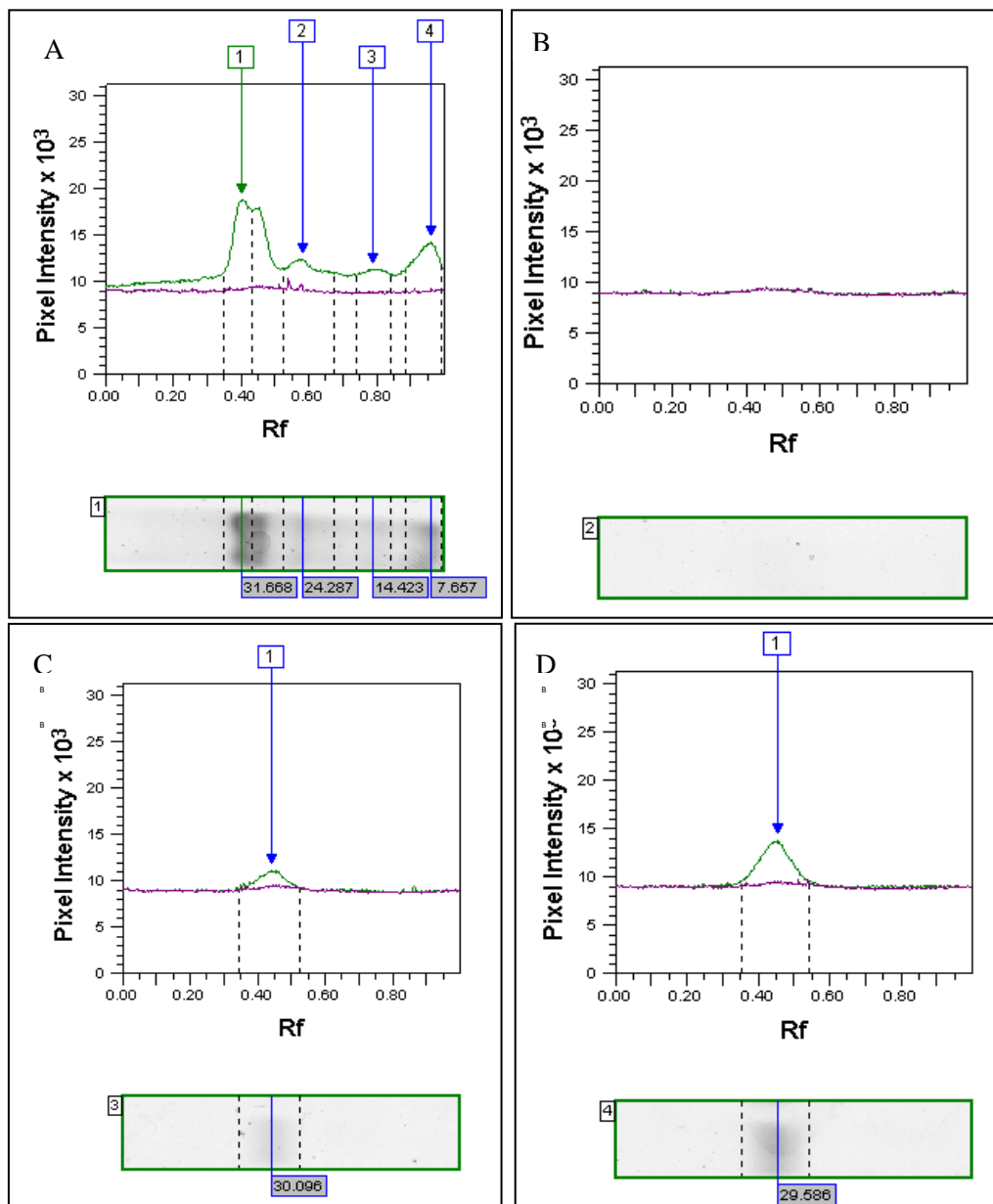


Figura 4.23: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr (0,5  $\mu$ g a 15  $\mu$ g), obtida pelo programa ImageMaster®.





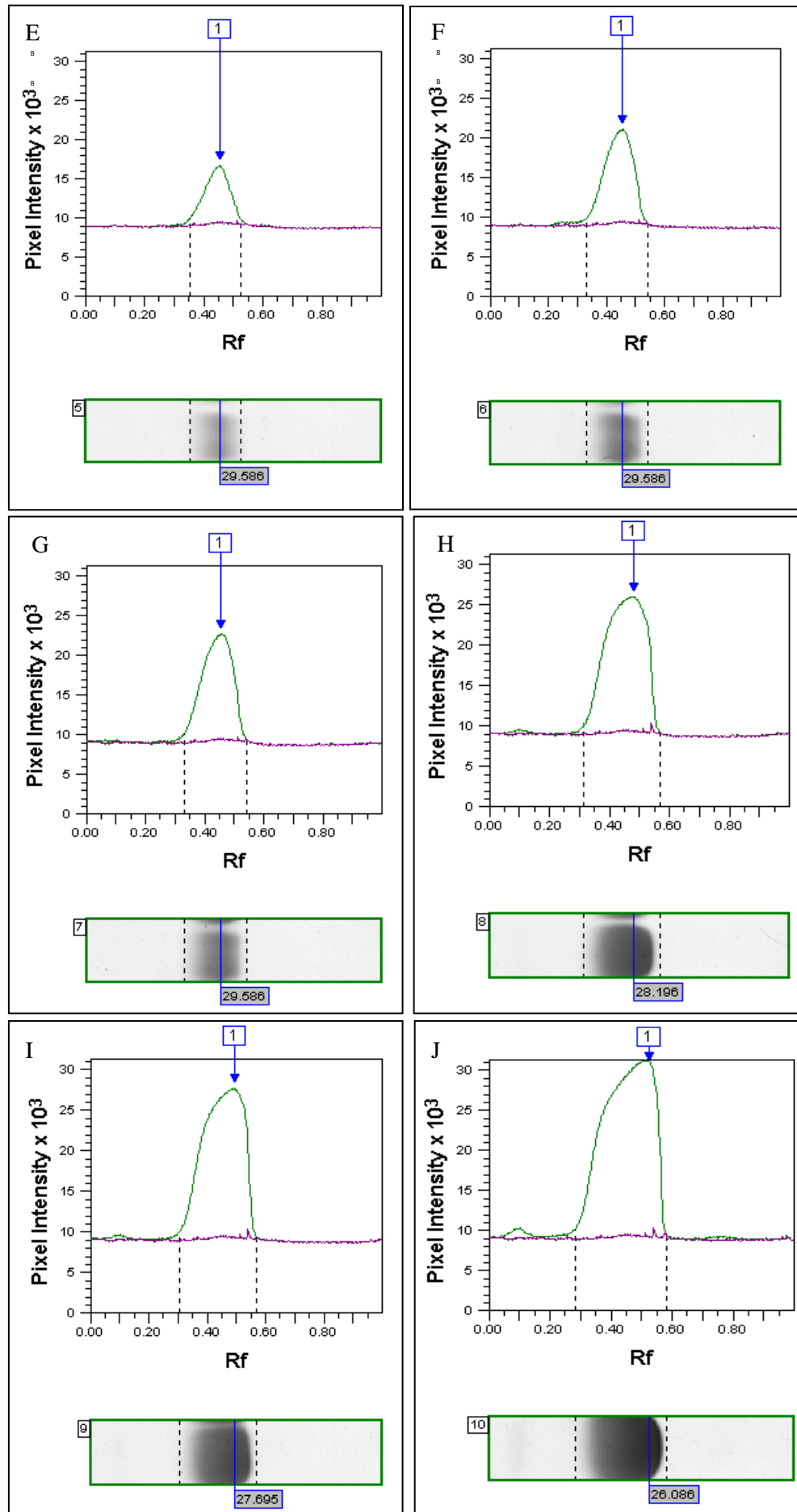


Figura 4.24: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel A), do Tampão de amostra (painel B) e do LEa EPOhr 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 6  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  e 15  $\mu\text{g}$  (painéis C a J, respectivamente), obtida pelo programa ImageMaster<sup>®</sup>.

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (Brasil, 2003). O ICH e a ANVISA recomendam que para estabelecer a linearidade, um mínimo de cinco concentrações deve ser utilizado, realizando leituras em triplicata (ICH, 2005, Brasil, 2003). As curvas mostradas na figura 4.25, demonstram que independentemente do parâmetro selecionado, seja área, altura ou volume de banda, há uma relação linear entre esses parâmetros e a massa do LEa aplicada, conforme evidenciado pelos coeficientes de correlação maiores que 0,95.

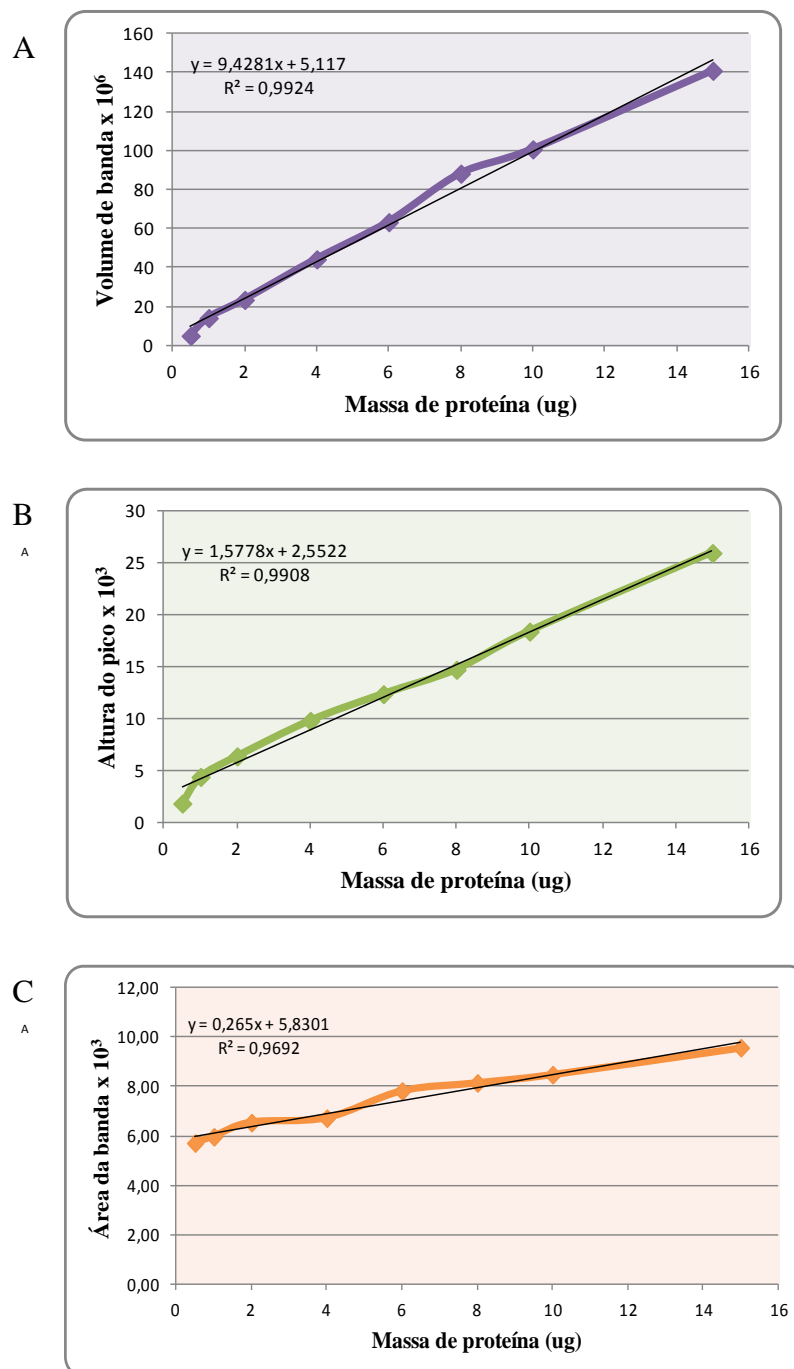


Figura 4.25: Relação entre a quantidade de massa do LEa EPOhr aplicada no gel com o volume de banda (A), altura do pico (B) e área de banda (C) obtida por cada banda eletroforética.

O parâmetro de análise volume da banda obteve o maior  $R^2$  e, por esse motivo, foi selecionado para a comparação entre as replicatas do gel. Na tabela 4.10 com os valores da média (M) e desvio padrão (S) entre as mesmas massas da amostra, os desvios-padrões das estimativas de volume de banda são baixos, exceto para as bandas de 8  $\mu\text{g}$  e 10  $\mu\text{g}$ . A maior dispersão de valores nas condições de maior quantidade de amostra é explicado pela dificuldade de delimitar a banda para a sua análise. Através da figura 4.26 pode-se evidenciar que a replicata 6 teve comportamento mais linear com  $R^2$  igual a 0,9918.

Tabela 4.10: Média (M) e desvio padrão (S) do volume de banda nas diferentes massas de proteína ( $\mu\text{g}$ ) do LEa EPOhr nas sete replicatas do gel (1 a 7) para avaliação do parâmetro linearidade

Volume da Banda x 10 <sup>6</sup>									
$\mu\text{g}$	1	2	3	4	5	6	7	M	S
0,50	4,88	7,52	4,86	6,75	6,77	5,01	2,42	5,46	1,72
1,00	14,00	16,24	11,56	14,53	12,17	8,85	4,62	11,71	3,92
2,00	23,32	31,11	25,97	23,80	26,12	15,80	12,74	22,69	6,34
4,00	44,15	43,49	48,41	45,94	41,07	28,60	43,14	42,11	6,39
6,00	53,25	58,45	56,73	49,97	49,87	38,97	51,34	51,23	6,32
8,00	88,14	94,99	74,70	60,67	64,38	46,62	55,08	69,23	17,60
10,00	100,64	123,50	93,60	71,13	81,54	57,23	82,63	87,18	21,40

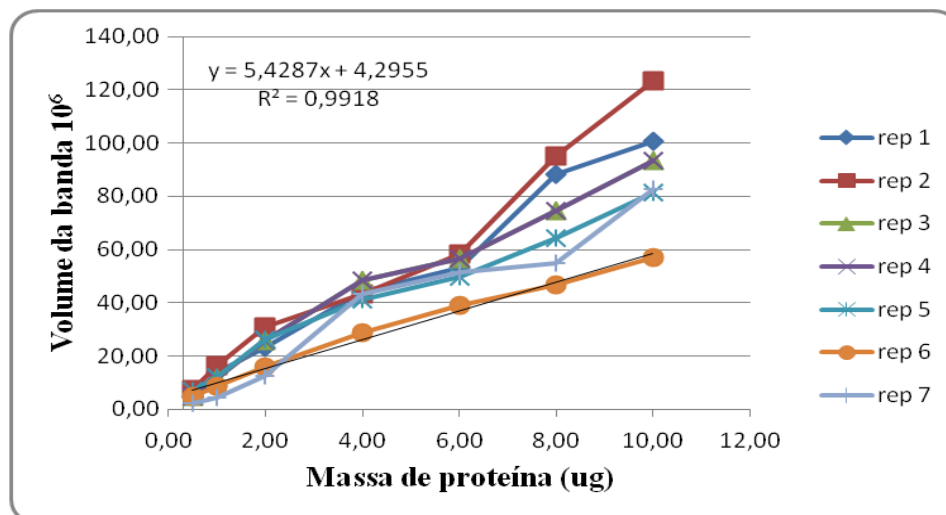


Figura 4.26: Gráfico comparativo do volume da banda entre as 7 replicatas do gel realizado para avaliação do parâmetro linearidade.

#### 4.4.3 - Intervalo

As quantidades utilizadas para comprovar o intervalo do método (4,0µg, 6,0µg, 8,0µg, 10,0µg, 12,0µg e 14,0 µg), estão de acordo com a RE n° 899 que recomenda uma faixa de 80 a 120% da massa teórica do teste (10,0µg). Nas sete análises deste parâmetro apenas uma banda difusa com peso molecular médio de 31,39 kDa foi observada (Figura 4.27 e 4.29).

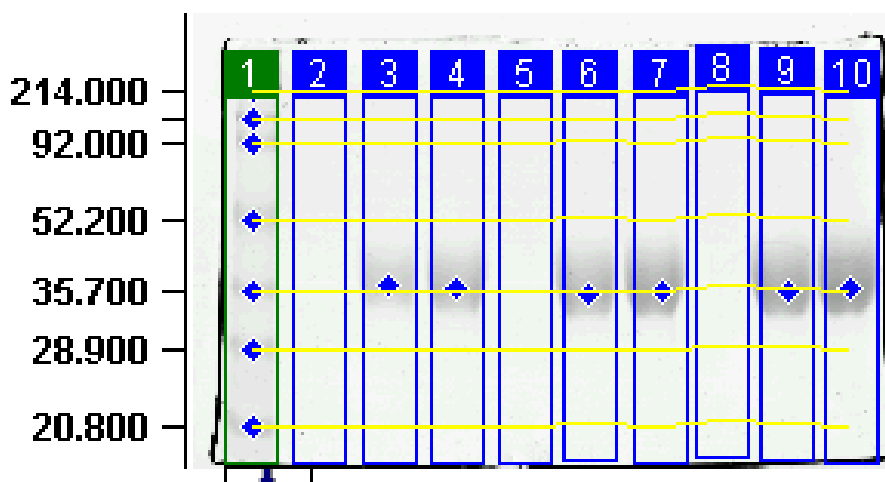


Figura 4.27: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr analisada pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raia 1: Padrões de peso molecular; Raia 2: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 3: LEa EPOhr 4,0 µg; Raia 4: LEa EPOhr 6,0 µg; Raia 5: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 6: LEa EPOhr 8,0 µg; Raia 7: LEa EPOhr 10,0 µg; Raia 8: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 9: LEa EPOhr 12µg e Raia 10: LEa EPOhr 14µg.

O valor de PM da EPOhr foi maior do que o estimado no item anterior em consequência do padrão utilizado nestas análises (*Prestained SDS-PAGE Standards – Broad Range*). O valor do coeficiente de determinação da curva de calibração com este padrão (Figura 4.28) foi menor do que o observado na figura 4.23. Tal diferença não é significativa (<0,0026) e o intervalo de peso molecular deste padrão é mais adequado para a estimativa do PM da EPOhr por abranger uma faixa maior de peso molecular (20,8 kDa a 214 kDa).

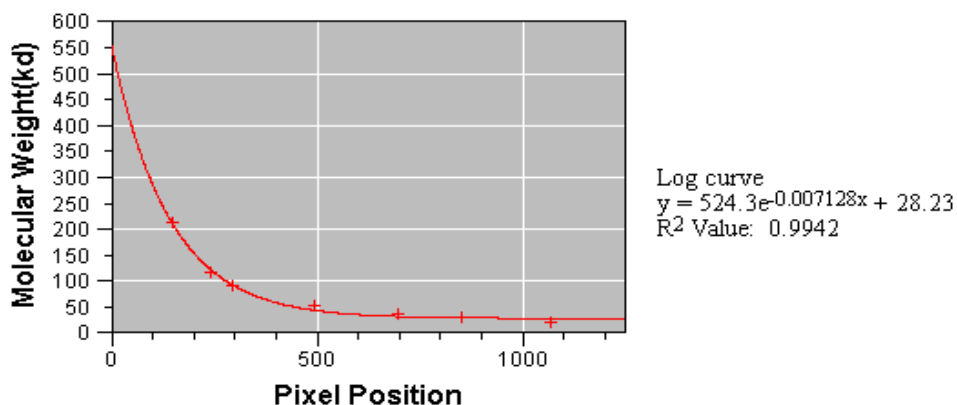
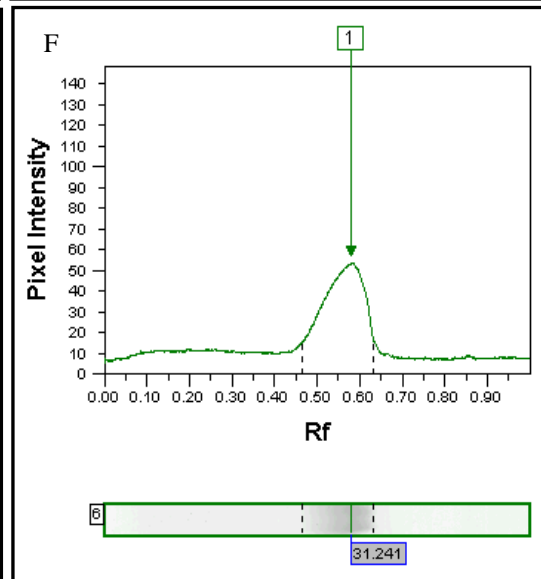
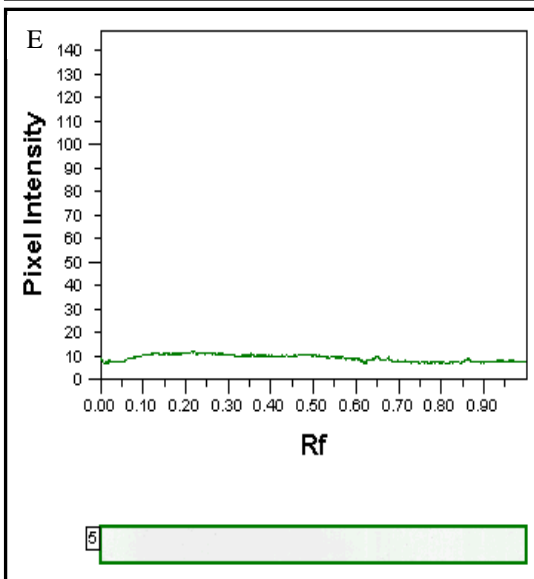
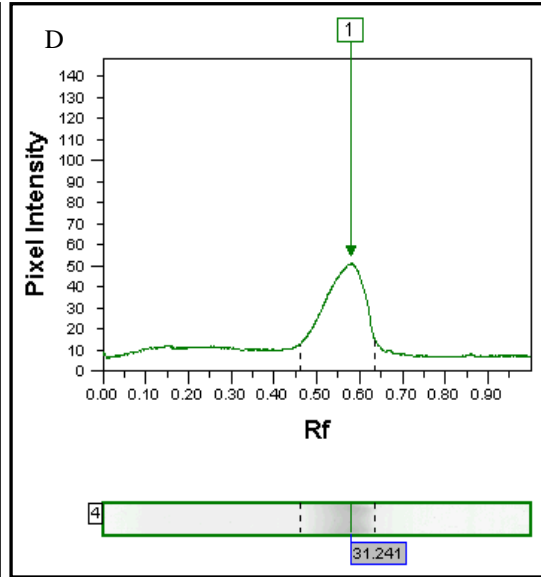
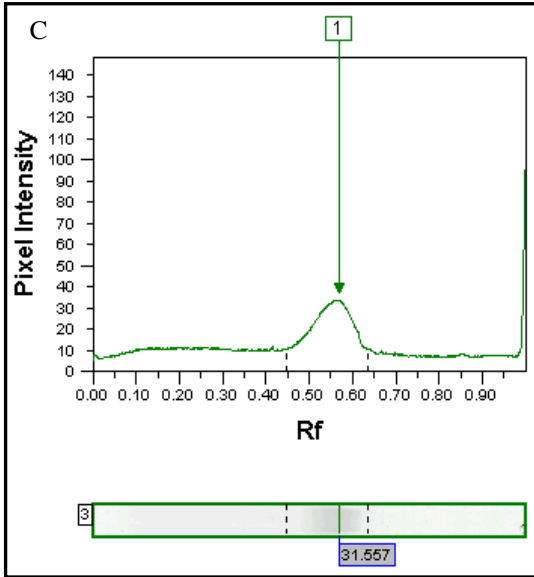
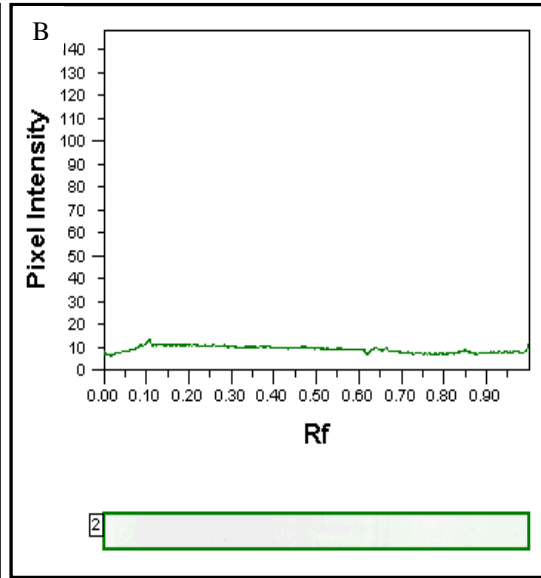
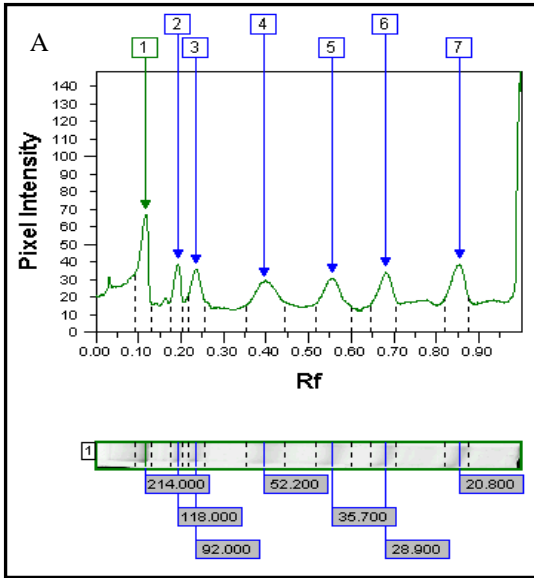


Figura 4.28: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr, obtida pelo programa ImageMaster®.



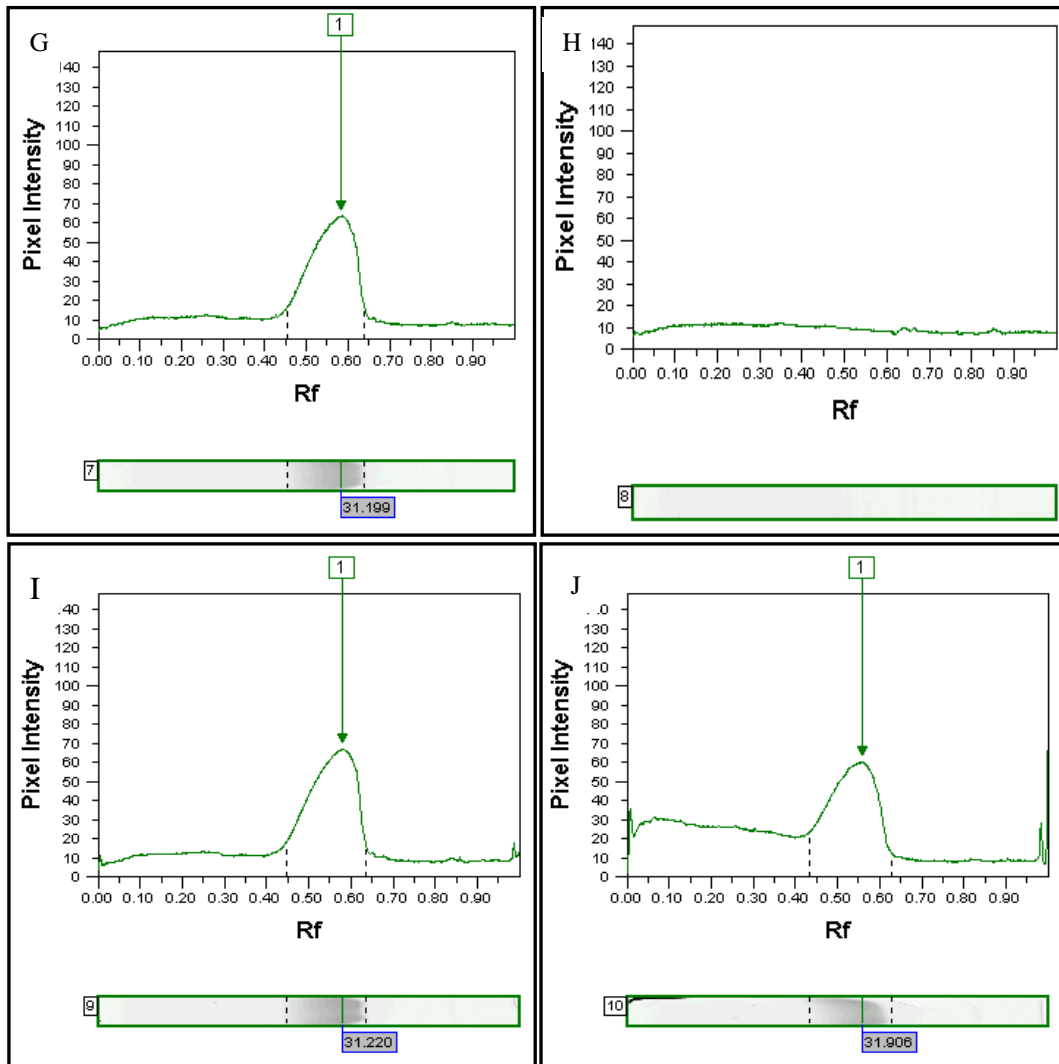


Figura 4.29: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel A), do Tampão de amostra (painel B, E e H) e do LEa EPOhr 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg, 12 µg, e 14 µg (painéis C, D, F, G, I e J), obtida pelo programa ImageMaster®.

Na tabela 4.11 pode-se verificar que houve pouca dispersão dos dados em relação às médias. A proporcionalidade entre a massa aplicada e o volume de banda se manteve em todas as corridas eletroforéticas conforme observado na figura 4.30.

Tabela 4.11: Média (M) e desvio padrão (S) do volume de banda nas diferentes massas de proteína (µg) do LEa EPOhr nas sete replicatas do gel (1 a 7) para avaliação do parâmetro intervalo

Volume de Banda x 10 <sup>4</sup>									
µg	1	2	3	4	5	6	7	M	S
4	54,0	47,71	45,30	38,04	43,33	61,51	49,60	49,00	7,67
6	74,98	56,73	64,27	47,54	56,59	80,05	71,75	64,56	11,65
8	90,89	76,63	78,52	61,48	68,12	104,14	87,03	80,97	14,38
10	101,86	85,62	89,67	75,74	86,40	116,72	101,85	93,98	13,66
12	121,11	103,77	103,76	86,41	95,83	137,49	113,60	108,85	16,92
14	137,46	111,74	117,61	99,55	102,93	152,36	126,54	121,17	19,01

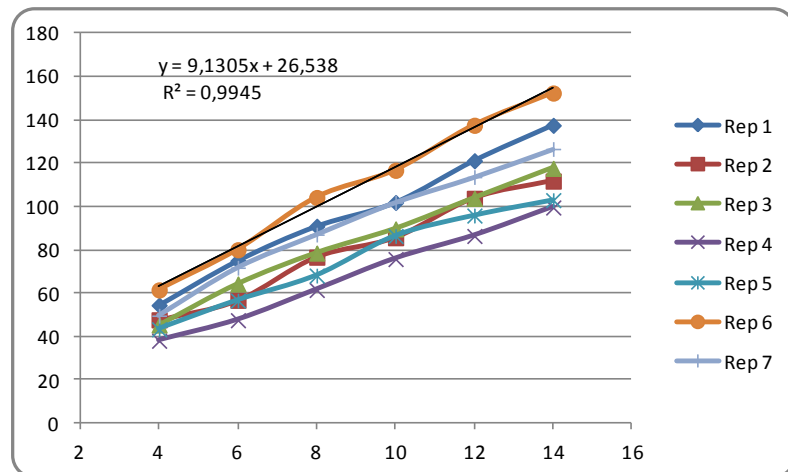


Figura 4.30: Curva entre o volume de banda e massa de proteína para avaliação do parâmetro intervalo nas 7 replicatas do gel.

#### 4.4.4- Repetibilidade

Para avaliação deste parâmetro foi aplicado 10 $\mu$ g do LEa EPOhr em 6 raia do gel, conforme observado na figura 4.31.

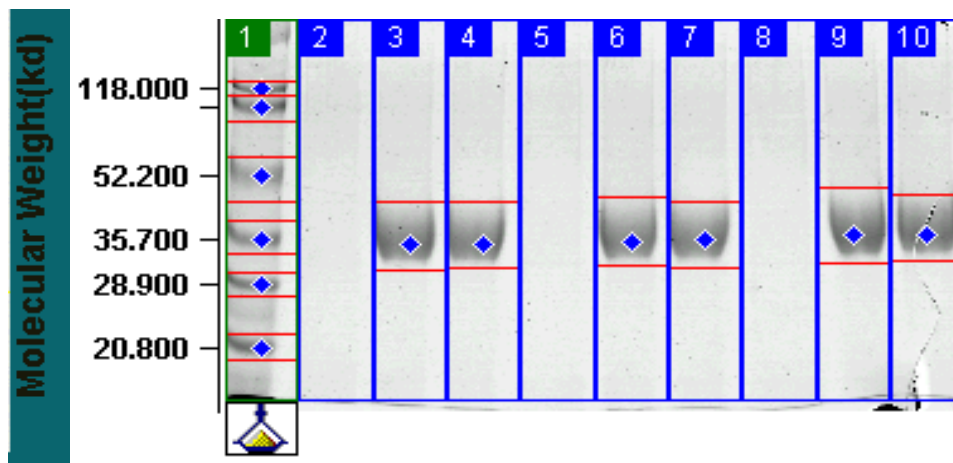


Figura 4.31: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr analisada pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raia 1: Padrões de peso molecular; Raia 2: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 3: LEa EPOhr 10  $\mu$ g; Raia 4: LEa EPOhr 10  $\mu$ g; Raia 5: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 6: LEa EPOhr 10  $\mu$ g; Raia 7: LEa EPOhr 10  $\mu$ g; Raia 8: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 9: LEa EPOhr 10 $\mu$ g e Raia 10: LEa EPOhr 10 $\mu$ g.

O peso molecular estimado para o LEa EPOhr nesta análise foi de 33,5 kDa (Figura 4.33), com um erro percentual menor do que 1,5%. O PM foi estimado contra curva de calibração apresentada na figura 4.32. O PPM *Prestained SDS-PAGE Standards – Broad Range* é mais adequado a análise da EPOhr em gel 12,5% se comparado ao PPM *Kaleidoscope Polypeptide Standards*, pois possui maior faixa de peso molecular.

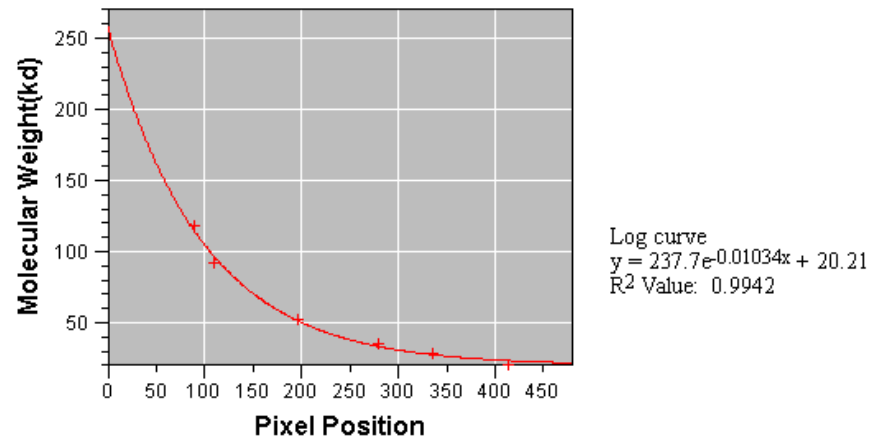
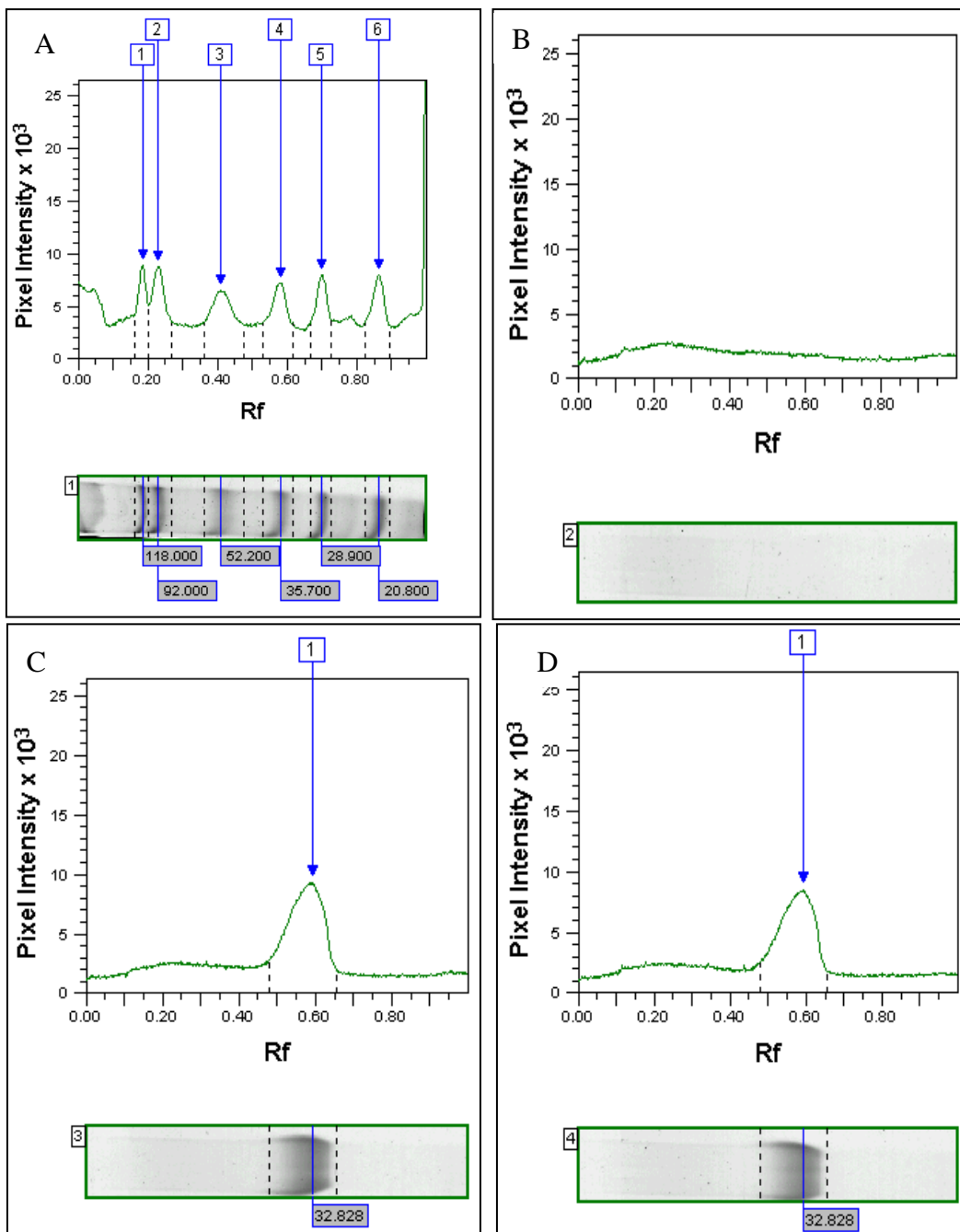


Figura 4.32: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do L<sub>EA</sub> EPOhr obtida pelo programa ImageMaster®.





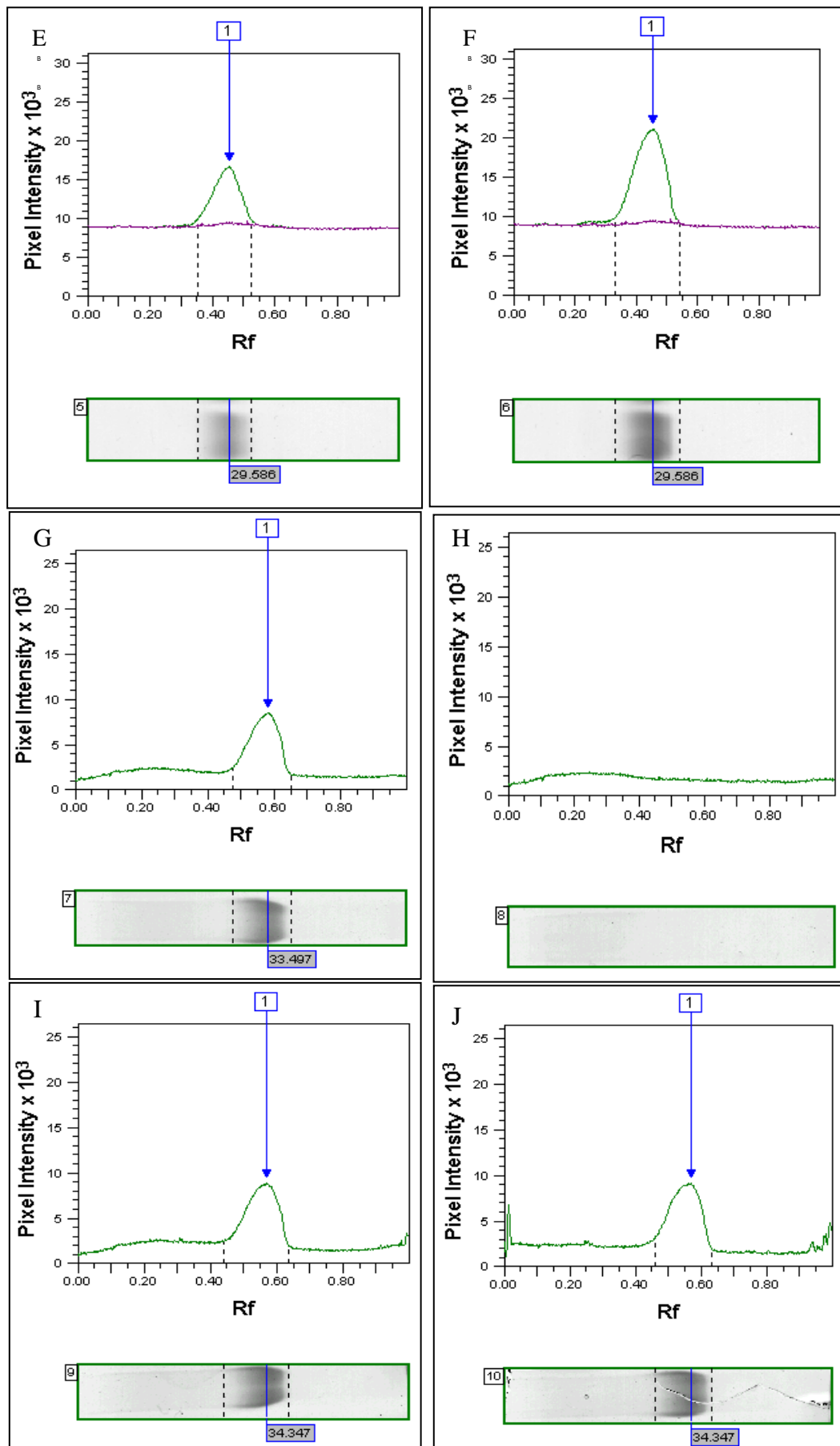


Figura 4.33: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel A), do Tampão de amostra (painel B, E e H) e do LEa EPOhr 10 µg (painéis C, D, F, G, I e J) obtida pelo programa ImageMaster®.

As bandas do LEa EPOhr apresentaram baixa variação de volume de banda, altura de pico e área, conforme pode ser observado pelos valores de desvio-padrão e coeficiente de variação descritos na Tabela 4.12

Tabela 4.12: Avaliação das bandas do LEa EPOhr apresentadas na Figura 4.33. Os valores de volume de banda, área e altura de banda foram estimados a partir da análise densitométrica das bandas de LEa aplicadas em um mesmo gel.

	<b>Volume da banda x 10<sup>6</sup></b>	<b>Altura do pico x 10<sup>3</sup></b>	<b>Área da banda x 10<sup>3</sup></b>
<b>1</b>	44,65	9,27	7,54
<b>2</b>	40,43	8,44	6,97
<b>3</b>	41,96	8,44	6,97
<b>4</b>	40,05	8,49	6,89
<b>5</b>	46,36	8,82	6,89
<b>6</b>	45,64	9,12	6,97
<b>M*</b>	43,18	8,77	7,04
<b>S*</b>	2,73	0,37	0,25
<b>CV%*</b>	6,32	4,21	3,55

\* M: Média; S: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação

A área de banda foi selecionada como parâmetro para comparar os resultados obtidos na análise da repetibilidade do SDS-PAGE em um mesmo gel, por apresentar a menor dispersão entre os resultados (Tabela 4.12). A avaliação das bandas do LEa mostrou que, para uma mesma concentração, a área das bandas relativas ao LEa EPOhr sofreu pouca variação quando a amostra foi aplicada em um mesmo gel (Tabelas 4.12 e 4.13). Tal precisão também foi notada mesmo quando a amostra foi submetida a corridas eletroforéticas em géis diferentes (Tabela 4.13), ou seja, desde que o sistema de revelação ou o gel de poliácridamida não mude, a metodologia de SDS-PAGE é reprodutível.

O coeficiente de variação (CV%) abaixo de 5% demonstra concordância entre os resultados de área de banda obtidos nas replicatas do gel, comprovando a repetibilidade do método. A comparação entre os resultados é melhor ilustrada na figura 4.34, onde observa-se que as áreas se distribuem próximas do valor médio, com nenhum valor discrepante visualizado.

Tabela 4.13: Avaliação das áreas das bandas relativas ao LEa EPOhr obtidas em sete corridas eletroforéticas diferentes. Em cada corrida foram aplicados seis amostras contendo 10 $\mu$ g do LEa EPOhr.

Área de Banda x 10 <sup>6</sup>										
Banda de EPOhr	Corridas eletroforéticas							Avaliação estatística		
	1	2	3	4	5	6	7	M	S	CV(%)
1	7,64	7,34	7,30	7,54	7,31	7,61	7,14	7,41	0,19	2,56
2	7,12	7,12	7,15	6,97	6,99	7,19	7,06	7,08	0,08	1,13
3	6,90	6,90	6,93	6,97	7,40	7,30	7,31	7,10	0,22	3,09
4	6,78	6,98	7,39	6,89	7,37	6,81	7,06	7,04	0,25	3,55
5	7,05	7,05	7,04	6,99	7,23	7,30	7,70	7,19	0,24	3,34
6	6,19	6,37	6,89	6,87	6,73	6,71	6,97	6,67	0,29	4,35

\* M: Média; S: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação

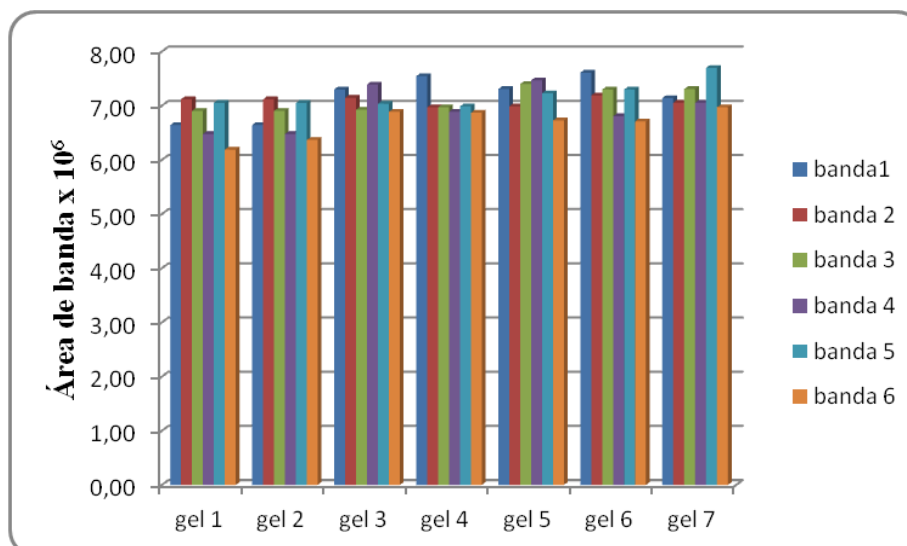


Figura 4.34: Gráfico comparativo entre a área das bandas do LEa EPO analisadas em corridas eletroforéticas diferentes.

#### 4.4.5- Precisão Intermediária

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. As quatro réplicas do gel realizadas por outro analista apresentaram uma única banda difusa nas raias em que foi aplicado o LEa EPOhr com peso molecular médio de 34,35 kDa, o qual foi definido pelo programa ImageMaster<sup>®</sup> a partir do PPM *BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder* (Figuras 4.39 e 4.41).

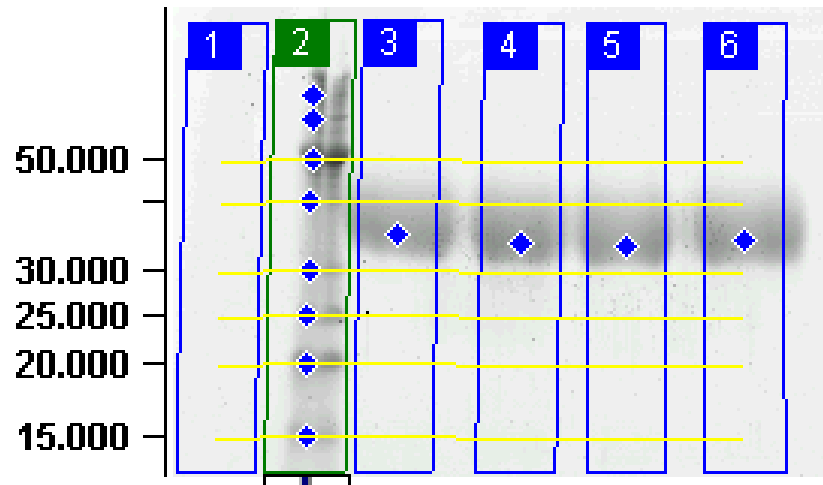


Figura 4.35: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr. Raia 1: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 3, 4, 5 e 6: LEa EPOhr 10 µg.

Conforme dito anteriormente, o peso molecular foi calculado em relação a uma curva de calibração (Figura 4.36), cujo coeficiente de determinação foi de 0,9983, perfeitamente aceitável pelos órgãos de Controle de Qualidade nacionais.

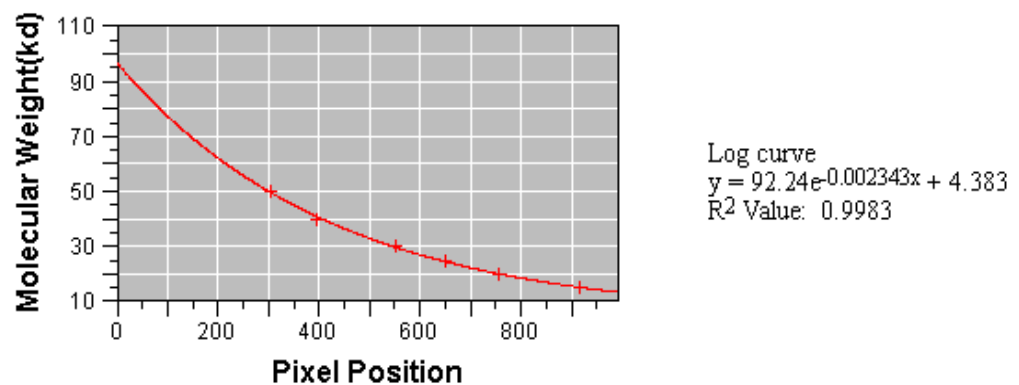
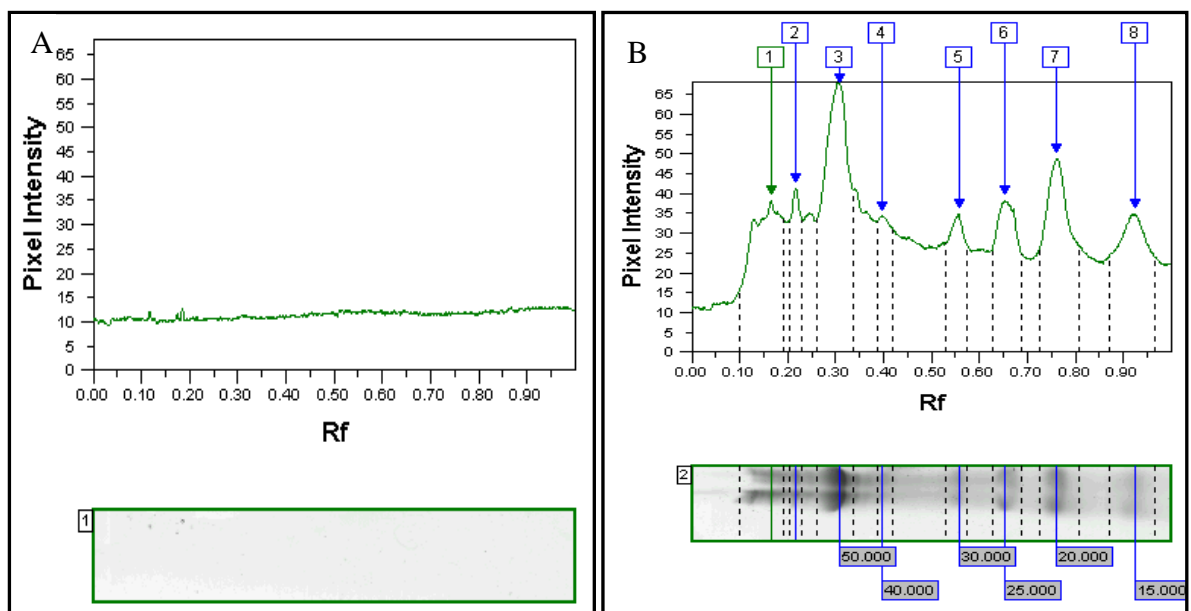


Figura 4.36: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster®.



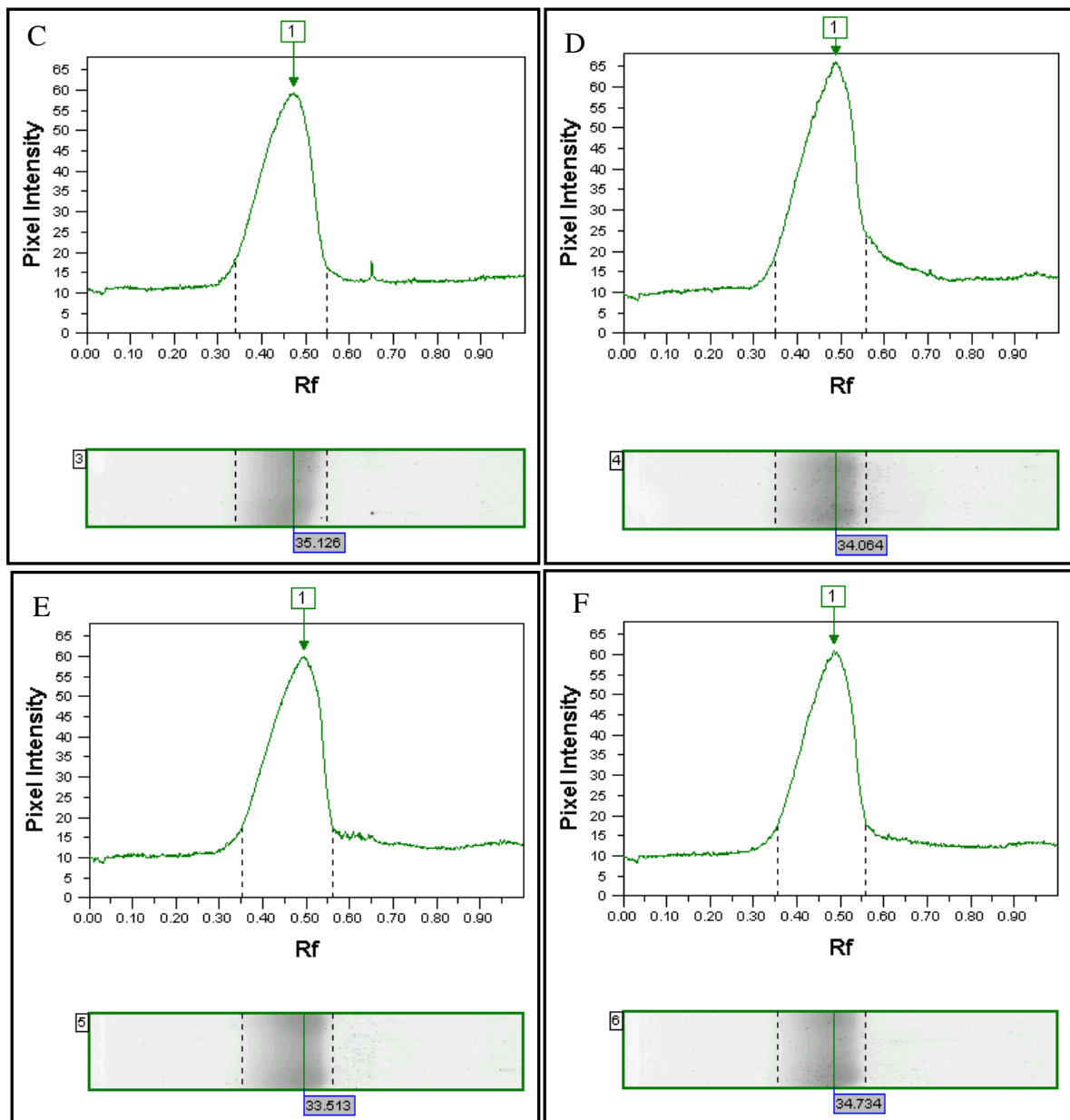


Figura 4.37: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel B) e do LEa EPOhr 10 µg (painéis C, D, E e F) obtida pelo programa ImageMaster®.

Os valores de Área de banda foram selecionados para comparação entre os valores obtidos para o parâmetro Precisão Intermediária e Repetibilidade, pois para análise destes dois parâmetros foi utilizado a mesma massa de proteína do LEa EPOhr (10µg). Os valores de área de banda mostrados na Tabela 4.14, apresentam pouco desvio em relação à média, o que é representado pelos baixos valores de desvio-padrão e coeficiente de variação. Sendo assim, a eletroforese em gel de poliacrilamida cumpre os parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela 4.14: Avaliação da Repetibilidade (Repet.) e Precisão Intermediária (P. Intermed.) do SDS-PAGE. Nas colunas 2 e 3 são mostradas os valores de área da banda de EPOhr  $\times 10^6$ . As demais colunas representam a Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).

	<b>Repet.</b>	<b>P. Intermed.</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>CV%</b>
<b>1</b>	7,61	7,31	7,46	0,214	2,81
<b>2</b>	7,19	7,29	7,24	0,069	0,95
<b>3</b>	7,30	7,40	7,35	0,072	0,98
<b>4</b>	6,81	7,57	7,19	0,539	7,49

A análise de tais resultados demonstra que houve concordância entre os resultados do mesmo laboratório com analistas diferentes. Apenas um resultado apresentou CV% acima de 5%, confirmando a baixa dispersão entre os dados.

#### 4.4.6- Limite de Quantificação

O Limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2003). Para definir o limite de quantificação, quantidades variadas do LEa EPOhr foram aplicadas em um gel de poliacrilamida, nas condições descritas na seção de Material e Métodos. Foram realizadas sete replicatas para melhor determinação do desvio-padrão das bandas de EPOhr observadas. Na figura 4.38 está representada uma das corridas eletroforéticas, onde observa-se o padrão característico da EPOhr por se apresentar como um banda difusa.

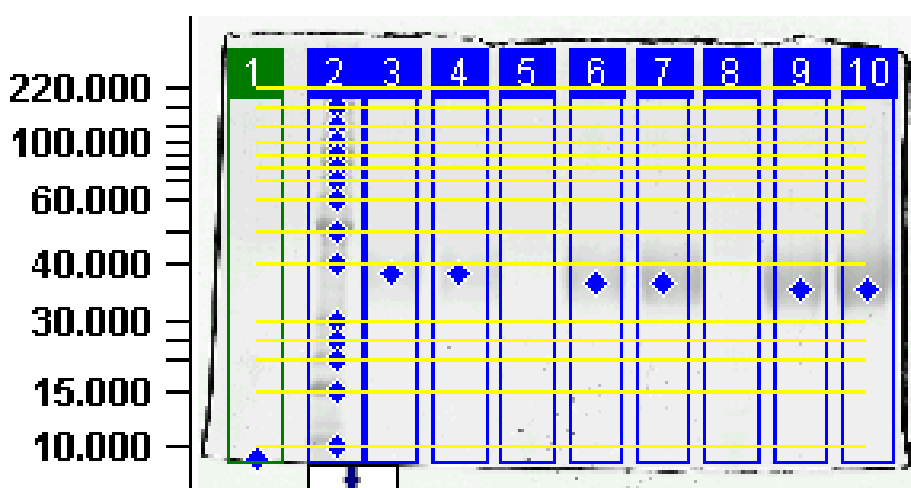


Figura 4.38: SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr. Raia 1: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raia 3: LEa EPOhr 0,5 µg; Raia 4: LEa EPOhr 1,0 µg; Raia 5: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 6: LEa EPOhr 2,0 µg; Raia 7: LEa EPOhr 3,0 µg; Raia 8: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 9: LEa EPOhr 4,0µg e Raia 10: LEa EPOhr 5,0µg.

O peso molecular foi estimado contra a curva de calibração apresentada na figura 4.39 e todos os géis analisados foram submetidos a estimativa do peso molecular com seus respectivos padrões internos, para garantir que a banda analisada correspondesse a EPOhr. Na figura 4.40 pode ser observado a densitometria das bandas do gel representado na Figura 4.38. O PM médio de 35,18 kDa está dentro do esperado para EPOhr, e o erro percentual é de aproximadamente 3,4% em relação ao PM teórico, sendo devidamente aceitável (Erro % <10%).

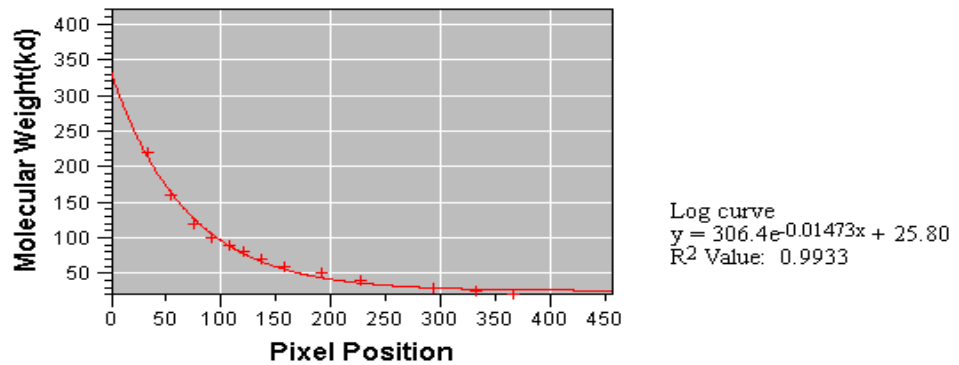
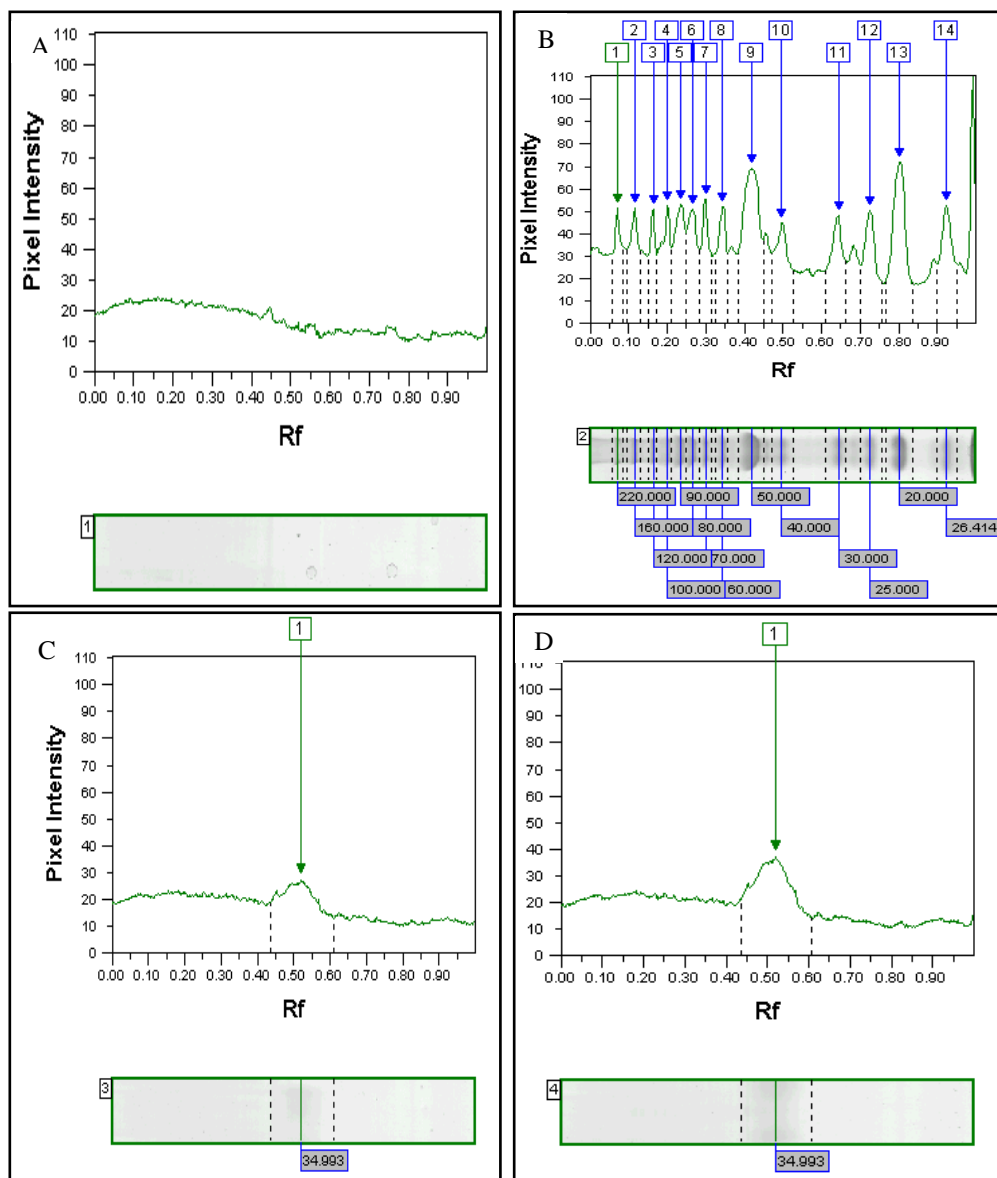


Figura 4.39: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster®.



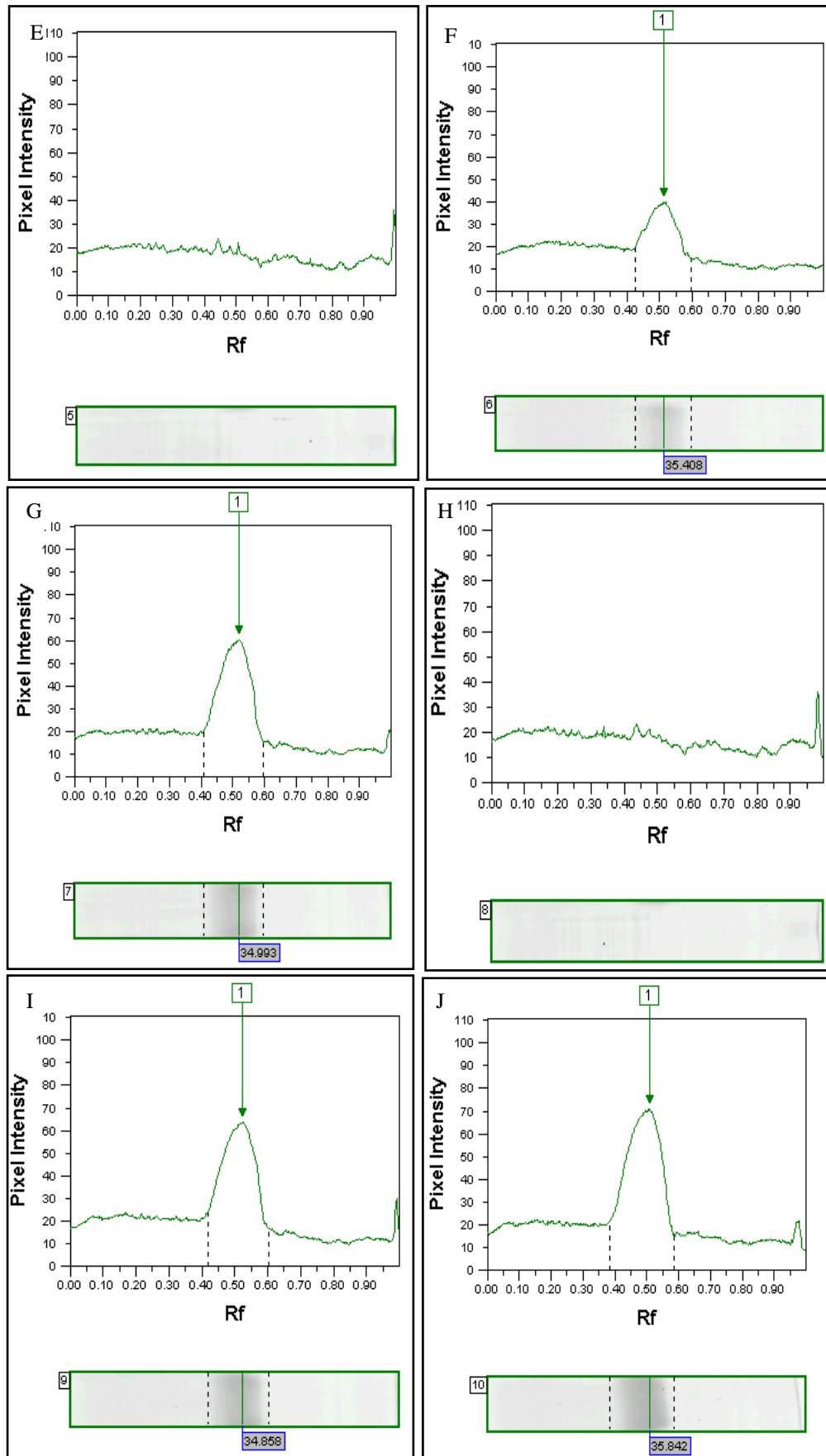


Figura 4.40: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel B), do Tampão de amostra (painel A, E e H) e do LEa EPOhr 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, e 5,0  $\mu\text{g}$  (painéis C, D, F, G, I e J) respectivamente, obtida pelo programa ImageMaster<sup>®</sup>.



O volume e área de banda fornecidos pelo programa ImageMaster<sup>®</sup> foram comparados com a massa de proteínas aplicada no gel, o que gerou os gráficos representados nas figuras 4.41 e 4.42 demonstrando proporcionalidade entre a massa e os valores dos parâmetros analisados. Além disso, tais dados nos permite concluir que a menor quantidade quantificada com precisão aceitável é 0,5µg, apesar da dificuldade de visualização desta banda no gel de SDS-PAGE.

A análise dos gráficos abaixo nos permite observar que o resultado obtido pela análise do parâmetro volume de banda teve comportamento mais linear se comparado aos dados da área de banda e, por esse motivo, tal parâmetro foi selecionado para a comparação entre as réplicas do gel (Tabela 4.15).

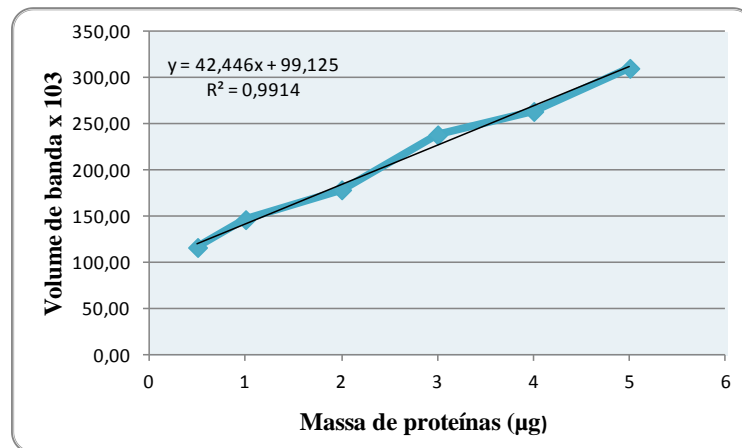


Figura 4.41: Curva de calibração volume de banda x massa de proteínas do LEa EPOhr aplicada no gel.

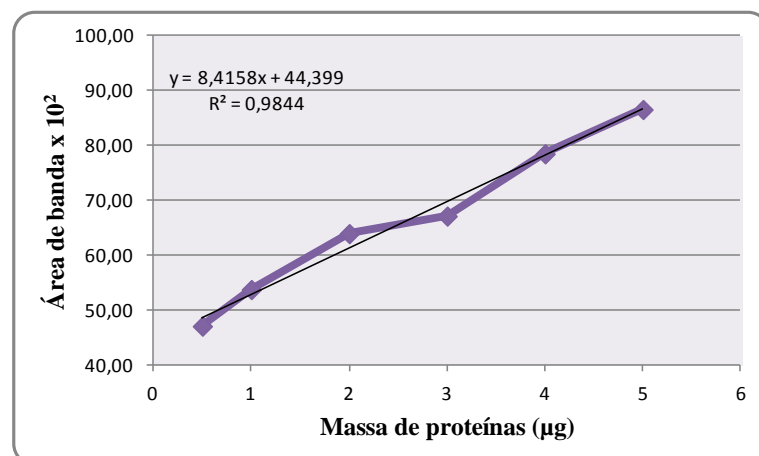


Figura 4.42: Curva de calibração de área de banda x massa de proteínas do LEa EPOhr aplicada no gel.

Tabela 4.15: Avaliação do limite de quantificação da EPOhr por SDS-PAGE 12,5%. Nas colunas de 1 a 7 estão representados os valores de volume de banda  $\times 10^3$  estimados nas diferentes corridas. As demais colunas representam a Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).

Volume de Banda $\times 10^3$										
( $\mu\text{g}$ ) <sup>*</sup>	1	2	3	4	5	6	7	M	S	CV%
0,5	116,73	114,07	115,95	113,60	123,09	115,95	113,95	116,19	3,27	2,82
1	158,41	153,43	146,14	147,85	156,10	146,14	156,14	152,03	5,21	3,43
2	196,99	189,51	168,51	170,71	196,89	178,51	198,51	185,66	12,93	6,96
3	252,43	231,04	248,16	251,79	266,84	238,16	258,16	249,51	11,98	4,80
4	312,46	256,08	263,55	249,83	310,97	263,55	299,55	279,43	27,13	9,71
5	329,42	298,28	310,36	294,20	320,09	310,36	312,36	310,72	12,03	3,87

\*Massa de EPOhr em  $\mu\text{g}$

O resultado relacionado na tabela acima nos permite concluir que entre as réplicas do gel houve baixa dispersão entre os resultados, onde o CV% foi maior de 5% apenas com 2 e 4  $\mu\text{g}$  de proteínas aplicadas no gel de SDS-PAGE. O limite de quantificação foi definido como 0,5  $\mu\text{g}$  do LEa EPO.

#### 4.4.7- Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro (Brasil, 2003). Para que o método apresente exatidão adequada para a análise é preciso que esteja em determinado intervalo de recuperação, na maioria das vezes, a faixa 70% a 120% são aceitas. Levando-se em consideração que 10 $\mu\text{g}$  é a concentração de trabalho, foram utilizadas as concentrações: 5  $\mu\text{g}$ , 7 $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 12  $\mu\text{g}$ , 14  $\mu\text{g}$  e 16  $\mu\text{g}$  do LEa, em sete replicatas do gel para confirmar a exatidão do teste. A amostra apresentou uma única banda difusa (Figura 4.43) com peso molecular médio de 34,30 kDa (Figura 4.45), o qual foi definido pelo programa ImageMaster<sup>®</sup> a partir do PPM *BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder*, contra curva de calibração apresentada na figura 4.44.

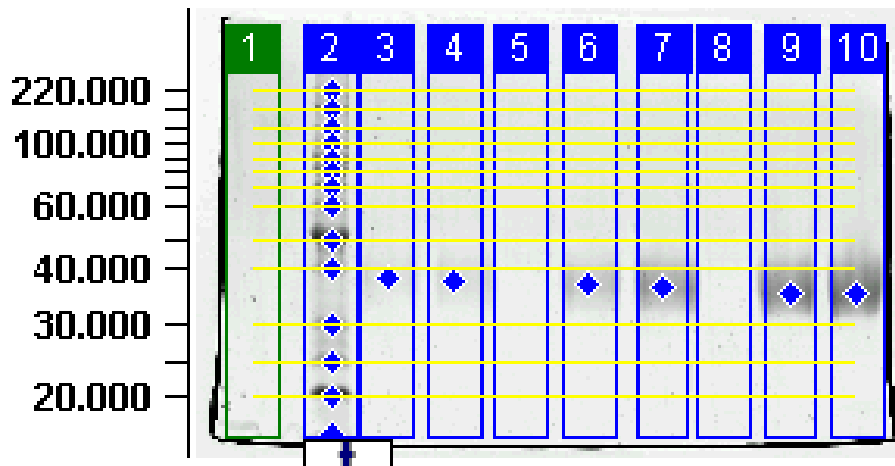


Figura 4.43: Avaliação da exatidão do SDS-PAGE 12,5% para análise do LEa EPOhr. Raia 1: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raia 3: LEa EPOhr 5,0 µg; Raia 4: LEa EPOhr 7,0 µg; Raia 5: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 6: LEa EPOhr 10 µg; Raia 7: LEa EPOhr 12 µg; Raia 8: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 9: LEa EPOhr 14µg e Raia 10: LEa EPOhr 16µg.

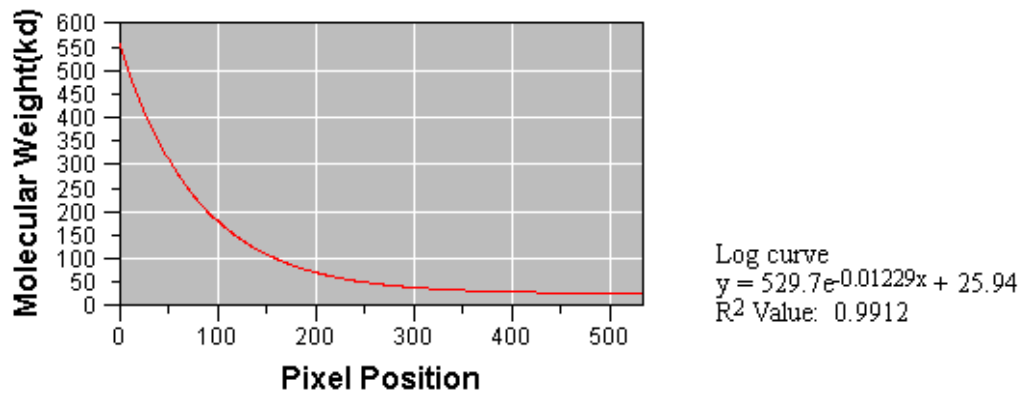
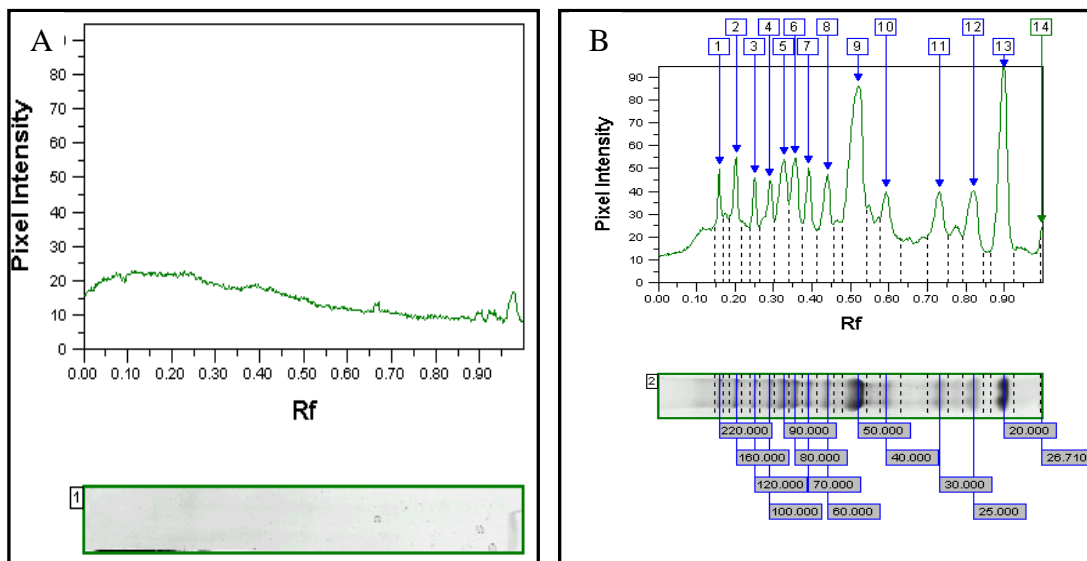
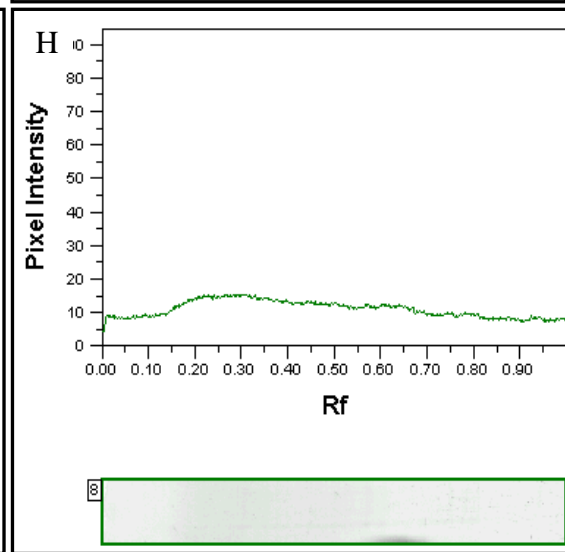
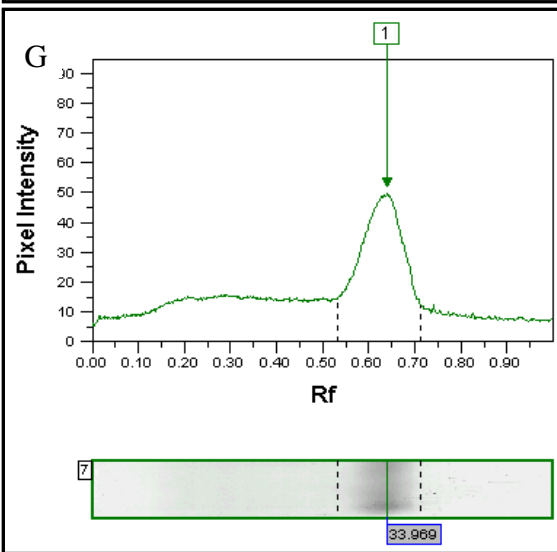
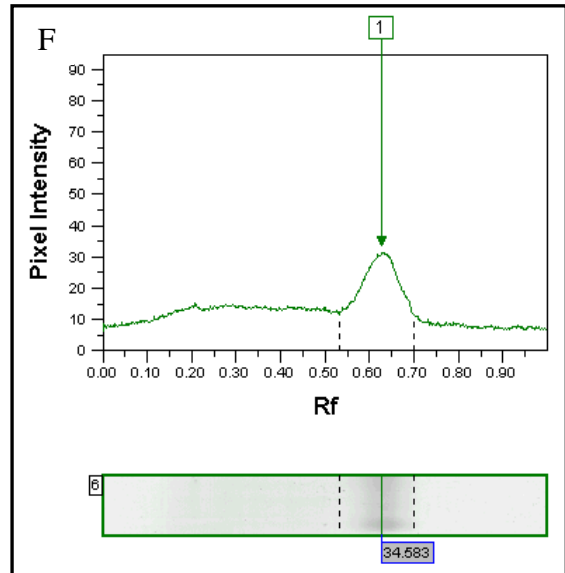
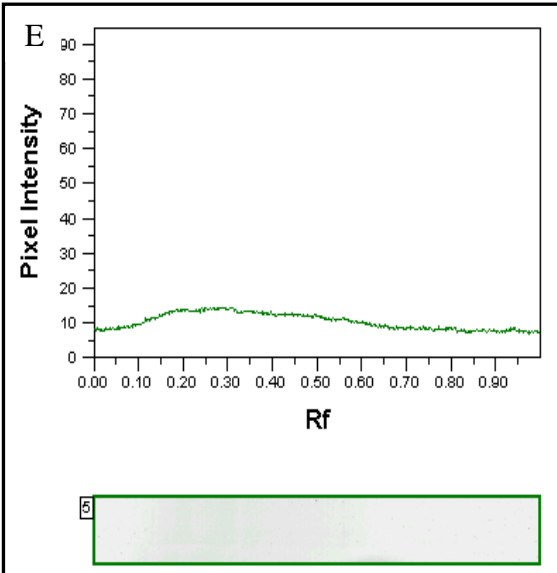
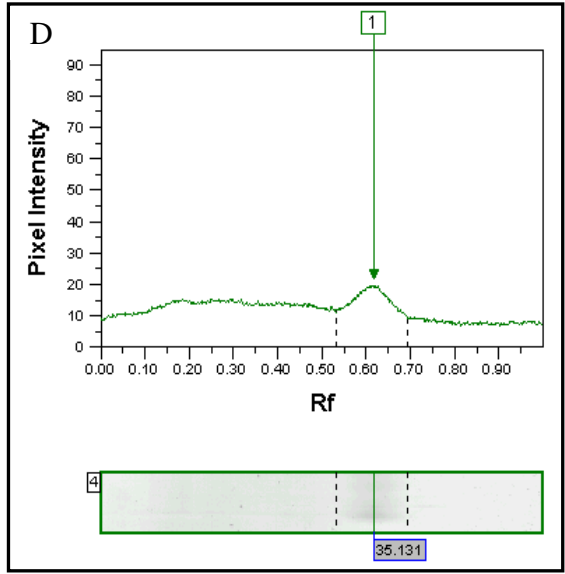
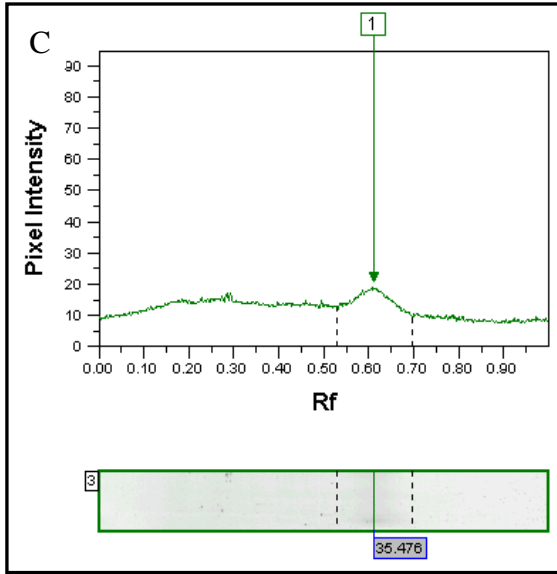


Figura 4.44: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster®.





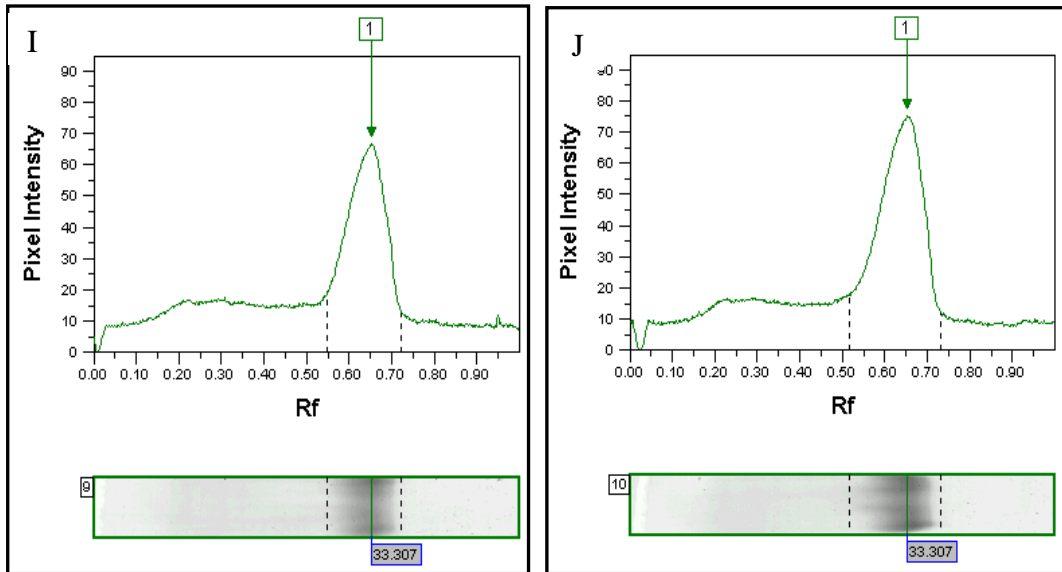


Figura 4.45: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel B), do Tampão de amostra (painel A, E e H) e do LEa EPOhr 5,0, 7,0,10, 12, 14, e 16  $\mu\text{g}$  (painéis C, D, F, G, I e J) respectivamente, obtida pelo programa ImageMaster<sup>®</sup>.

O gráfico elaborado (figura 4.46) demonstra que o volume de banda calculado a partir do programa ImageMaster<sup>®</sup> é proporcional a massa proteica aplicada, gerando uma equação linear com  $R^2$  igual a 0,9906, confirmando, desta maneira, a exatidão da metodologia. Além disso, a análise entre as réplicas do gel demonstram baixa dispersão entre os resultados, o que pode ser evidenciado através dos valores de desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) listados na tabela 4.16.

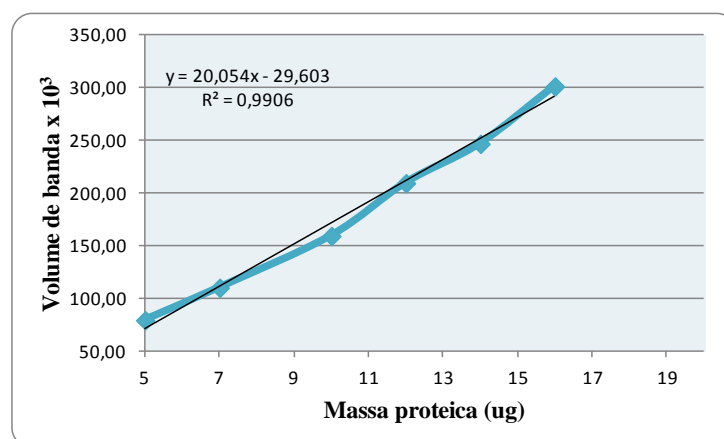


Figura 4.46: Curva de proporcionalidade entre o volume de banda e a massa de proteínas aplicada do LEa EPOhr.

Tabela 4.16: Avaliação da exatidão do SDS-PAGE 12,5%. Nas colunas de 1 a 7 estão representados os valores de volume de banda  $\times 10^3$ , estimados nas diferentes corridas. As demais colunas representam a Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).

Volume de Banda $\times 10^3$										
$\mu\text{g}^*$	1	2	3	4	5	6	7	M	S	CV%
5	89,12	90,98	93,61	94,73	90,98	93,61	90,98	92,00	2,00	2,18
7	109,98	107,12	107,27	104,90	108,12	107,27	108,12	107,54	1,52	1,42
10	159,19	133,19	151,69	141,33	133,40	151,69	137,19	143,95	10,26	7,13
12	209,40	211,40	217,78	196,25	199,14	207,78	213,40	207,88	7,69	3,70
14	246,78	276,78	275,89	216,41	226,78	257,89	246,78	249,61	22,87	9,16
16	301,38	352,38	326,23	332,22	352,38	336,23	352,38	336,17	18,77	5,58

\*Massa de EPOhr em  $\mu\text{g}$

#### 4.4.8- Robustez

É a medida da capacidade de um método de não sofrer alteração em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método (Lanças, 2004). Para avaliar a robustez do método, foram alterados três parâmetros: a porcentagem do gel de poliacrilamida foi modificada de 12,5% para 15%; a miliamperagem (mA) durante toda a corrida foi de 30 mA ao invés de 20mA até atingir o gel separador e 30 mA durante o restante da corrida e, o tampão de corrida utilizado desta vez foi o Tampão Borato EDTA (TBE), composto por Tris Base (0,89 M), Ácido Bórico (0,89 M) e EDTA (0,02 M). Para cada parâmetro alterado foram feitas triplicatas do gel, aplicando-se a mesma massa proteica do LEa EPOhr (10  $\mu\text{g}$ ) e o mesmo PPM (*BenchMark™ Protein Ladder*).

O gel de poliacrilamida 15% (Figura 4.47) analisado pelo programa ImageMaster® obteve curva de calibração de peso molecular com  $R^2$  igual a 0,9953 e média do peso molecular do LEa EPOhr igual a 33,74 kDa, estando de acordo com os resultados encontrados para o gel 12,5%. Entretanto, as bandas se apresentaram mais difusas e, por esse motivo, os valores de área e volume de banda foram maiores. A média dos resultados destes parâmetros em um mesmo gel foi utilizada para a comparação entre as réplicas (Tabela 4.17). A dispersão dos resultados foi baixa, como pode ser evidenciado através dos valores de desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) entre a triplicata do gel.

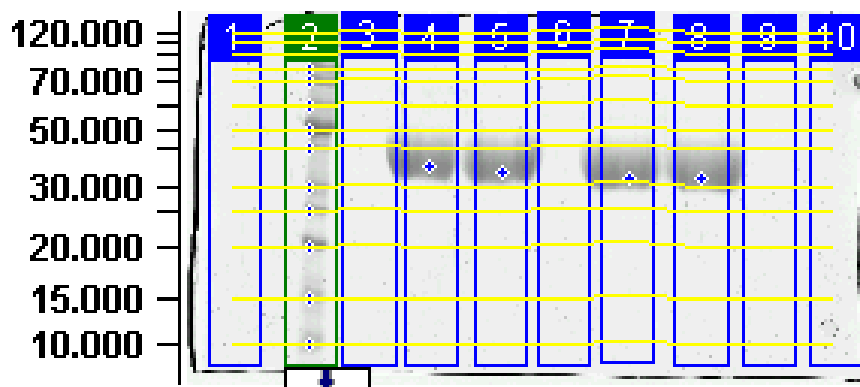


Figura 4.47: SDS-PAGE 15% do LEa EPOhr analisada pelo programa ImageMaster® (GE Healthcare). Raias 1, 3, 6, 9 e 10: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 4, 5, 7 e 8: LEa EPOhr 10 µg.

Tabela 4.17: Avaliação da robustez do SDS-PAGE 15%. Nas colunas de 1 a 3 estão representados os valores de volume de banda  $\times 10^3$ , estimados nas diferentes corridas. As demais colunas representam a Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).

	1	2	3	M	S	CV%
<b>Volume de banda <math>\times 10^3</math></b>	870,77	887,84	848,19	868,93	19,89	2,29
<b>Área de banda <math>\times 10^2</math></b>	129,92	134,40	135,52	133,28	2,96	2,22

Os géis que utilizaram corrente de 30mA (Figura 4.48) apresentaram curva de calibração de peso molecular com  $R^2$  igual a 0,9957 e média do peso molecular do LEa EPOhr igual a 34,29 kDa, estando de acordo com os resultados encontrados com a corrida a 25mA no máximo. Além disso, os valores de área e volume de banda tiveram baixa dispersão dos dados, como se pode observar através dos resultados de desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) presentes na tabela 4.18.

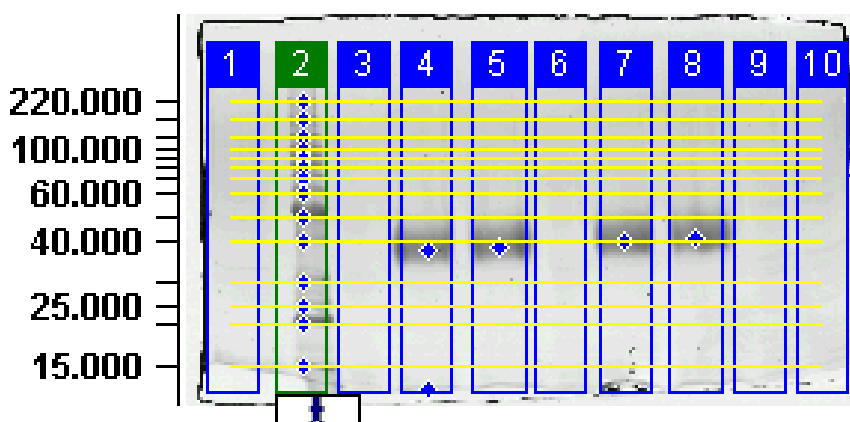


Figura 4.48: Avaliação de robustez do SDS-PAGE 12,5% com variação de corrente elétrica de 30mA. Raias 1, 3, 6, 9 e 10: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 4, 5, 7 e 8: LEa EPOhr 10 µg.

Tabela 4.18: Avaliação da robustez do SDS-PAGE 12,5% para análise de LEa EPO, com variação da corrente utilizada na corrida. Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%).

	1	2	3	M	S	CV%
<b>Volume de banda x 10<sup>3</sup></b>	250,56	267,45	248,67	255,56	10,34	4,05
<b>Área de banda x 10<sup>2</sup></b>	143,64	153,02	142,50	146,39	5,77	3,94

A corrida realizada com Tampão TBE (Figura 4.49) obteve curva de calibração de peso molecular com  $R^2$  igual a 0,9947 e média do peso molecular do LEa EPOhr igual a 25,85 kDa, sendo discrepante com análises anteriores. Isso se deve ao fato de que o Tampão de corrida interferiu na separação do PPM bem como na corrida da amostra, obtendo-se por esse motivo  $R_f$  diferente do encontrado na análise dos parâmetros anteriores. Dentre as quinze proteínas que compõem o PPM, foram detectadas apenas cinco proteínas, as quais possuem menor peso molecular. Por esse motivo, conclui-se que o tampão de corrida interfere na análise da proteína e, portanto, não pode ser substituído.

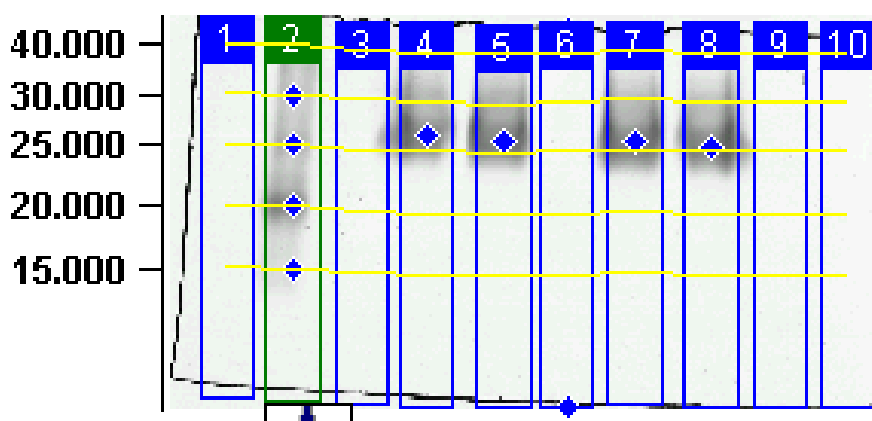


Figura 4.49: SDS-PAGE 12,5% e tampão de corrida TBE do LEa EPOhr. Raias 1, 3, 6, 9 e 10: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 4, 5, 7 e 8: LEa EPOhr 10 µg.

Com exceção do parâmetro robustez, todos os outros parâmetros analisados para a validação do método apresentaram padrão de migração da amostra similar. Isto mostra o quanto a metodologia de eletroforese de poliacrilamida pode ser confiável, dentro dos parâmetros estabelecidos, tais como de porosidade do gel, condições elétricas de corrida, volume de aplicação e outros. Mesmo a alteração da porosidade do gel não representou grande modificação no perfil difuso da EPOhr e em seu peso molecular experimental. Caso fosse optado diminuir a concentração do gel, para por exemplo 7,5%, a alteração seria mais drástica, de tal forma que poderia acarretar a não visualização da banda da EPOhr. Na Tabela 4.19 pode-se observar a variação do  $R_f$  médio do LEa EPOhr obtido em cada um dos



parâmetros de validação. Os maiores valores de Rf foram obtidos nos parâmetros que requereram aplicações crescentes do LEa EPOhr, acarretado pela maior dificuldade para a definição do centro de banda.

Tabela 4.19: Valores médios de Rf encontrados na avaliação dos parâmetros de validação

<b>Parâmetro de Validação</b>	<b>Valor médio do Rf</b>
<b>Especificidade</b>	0,489
<b>Linearidade</b>	0,487
<b>Intervalo</b>	0,569
<b>Repetibilidade</b>	0,491
<b>Precisão Intermediária</b>	0,493
<b>Limite de Quantificação</b>	0,521
<b>Exatidão</b>	0,512
<b>Robustez</b>	0,571

Validar um método significa garantir que o procedimento, que inclui as condições de operação do equipamento e a sequência analítica, seja aceito como correto (ANVISA, 2004). Sendo assim, a validação de métodos analíticos é de fundamental importância para comprovar que o método desenvolvido é capaz de obter resultados tecnicamente válidos (ICH, 2005).

Um processo de validação bem definido oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (Ribani et al. 2004). Por esse motivo, o presente estudo definiu os parâmetros analisados para a validação das técnicas IEF e SDS-PAGE tendo como base a classificação dos testes segundo a Resolução 899 da ANVISA. Os dados da curva área ou volume da banda eletroforética *versus* massa de EPOhr aplicada apresentaram  $R^2$  próximo a 1, confirmando a linearidade e, sugerindo que as amostras podem ser quantificadas por meio da avaliação destes parâmetros obtidos através do programa ImageMaster<sup>®</sup>. Além disso, todos os parâmetros necessários para a validação foram realizados, obtendo-se baixa dispersão entre as réplicas, indicando desta maneira a precisão da metodologia analítica. Após a análise dos resultados apresentados, pode-se concluir que a metodologia analítica foi adequadamente validada para a análise da EPOhr.

#### 4.5- Análise da homogeneidade das amostras de EPOhr

A homogeneidade das amostras de EPOhr utilizadas nesse estudo foi evidenciada utilizando a metodologia SDS-PAGE anteriormente validada. Para isso, foi utilizado as amostras BRP, LEa e IFA EPOhr, aplicando-se 10 $\mu$ g de massa proteica de cada. O gel contendo as três amostras foi realizado em triplicata e a análise dos mesmos realizada através do programa ImageMaster<sup>®</sup>. As amostras apresentaram uma única banda difusa (Figura 4.50) com peso molecular médio de 31,53 kDa, o qual foi definido a partir do PPM *BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder* (Figura 4.52), contra curva de calibração com R<sup>2</sup> igual a 0,9953 (Figura 4.51).

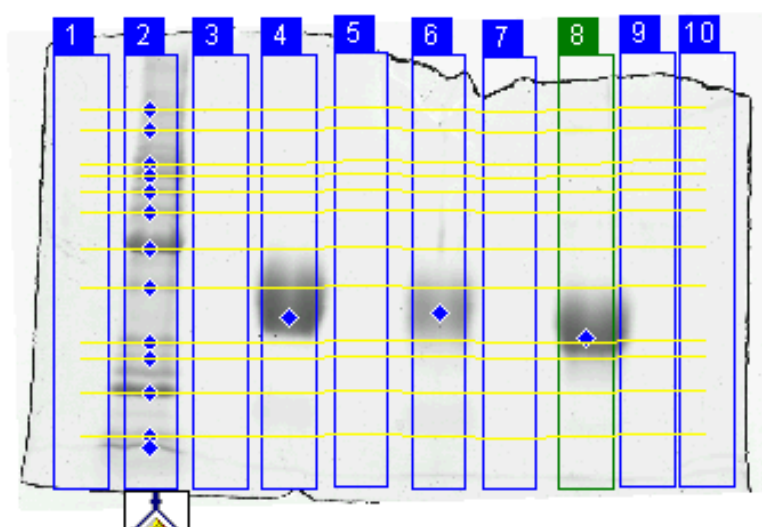


Figura 4.50: SDS-PAGE 12,5% analisado pelo programa ImageMaster<sup>®</sup> (GE Healthcare). Raias 1, 3, 5, 7, 9 e 10: Tampão de amostra (controle negativo); Raia 2: Padrões de peso molecular; Raias 4, 6 e 8: BRP, LEa e IFA EPOhr 10  $\mu$ g respectivamente.

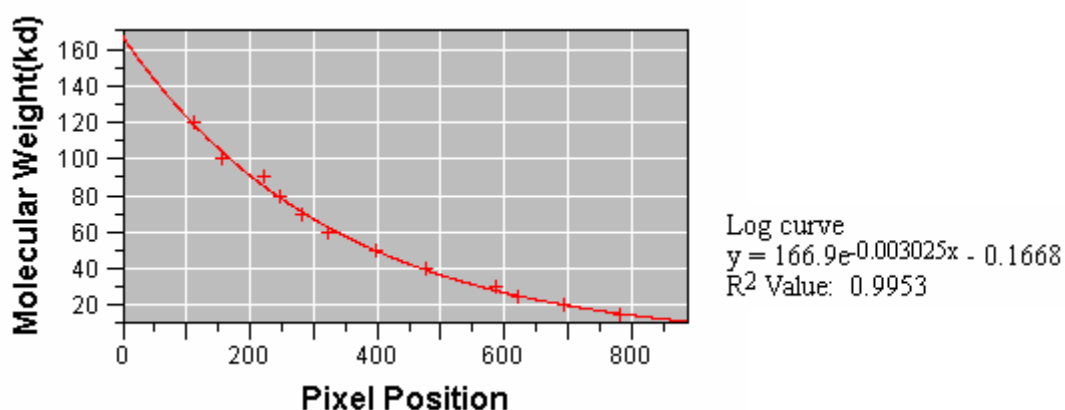
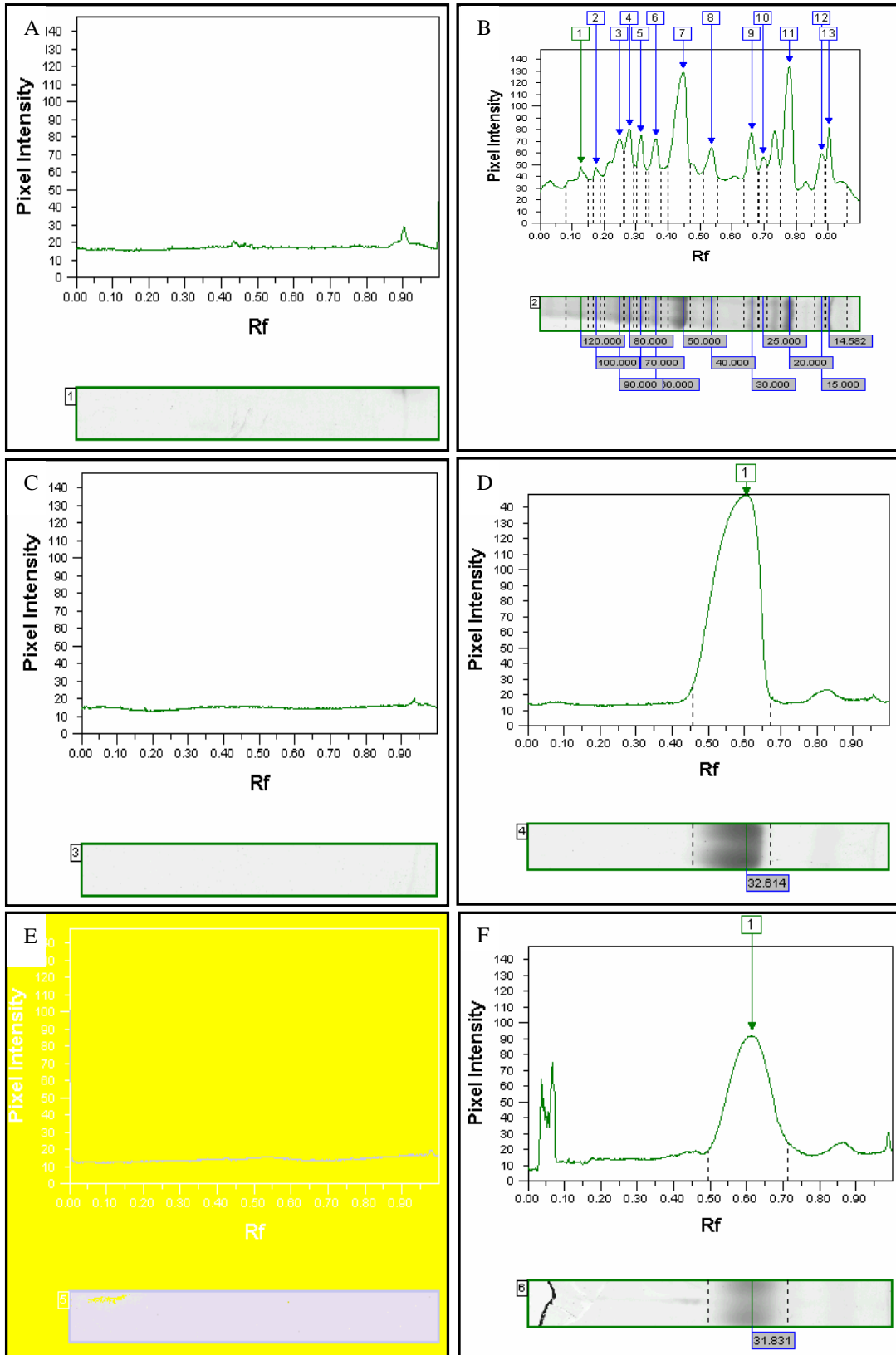


Figura 4.51: Curva de calibração de peso molecular da SDS-PAGE 12,5% do LEa EPOhr obtida pelo programa ImageMaster<sup>®</sup>.



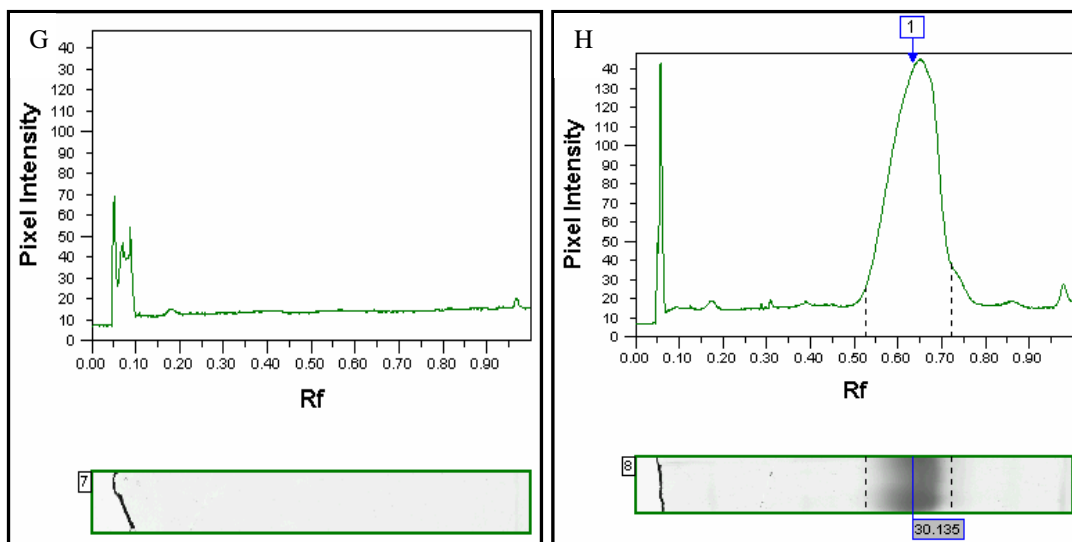


Figura 4.52: Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 12,5% do padrão de peso molecular (painel B), do Tampão de amostra (painéis A, C, E e G), BRP EPOhr 10µg (painel D), LEa EPOhr 10µg (painel F) e IFA EPOhr 10µg (painel H), obtida pelo programa ImageMaster®.

Os valores médios de volume de banda, área de banda e Rf das três amostras da triplicata do gel foram obtidos pelo programa ImageMaster®, os quais estão listados na tabela 4.20 juntamente com os valores da média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) entre eles.

Tabela 4.20: Média (M), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do volume de banda (V), área de banda (A) e Rf das amostras BRP, LEa e IFA EPOhr.

10µg	V x 10 <sup>4</sup>	A x 10 <sup>3</sup>	Rf
<b>BRP</b>	199,27	20,9	0,606
<b>LEa</b>	193,53	21,34	0,615
<b>IFA</b>	196,72	19,03	0,651
<b>M</b>	196,49	20,42	0,624
<b>S</b>	2,89	1,23	0,024
<b>CV%</b>	1,47	6,02	3,84

As análises dos dados apresentados acima demonstram concordância entre as amostras devido à baixa dispersão encontrada, a qual é evidenciada pelos valores de desvio padrão e CV%. Além disso, a detecção de uma única banda com peso molecular similar a literatura, comprova a homogeneidade da EPOhr utilizada nesta dissertação. Em todos os géis de

poliacrilamida 12,5%, nas raias em que foram aplicadas a EPOhr, a banda eletroforética mostrou-se difusa. Isso se deve a característica dessa glicoproteína, que apresenta isoformas com mobilidades eletroforéticas muito próximas devido à microheterogeneidade de suas cadeias glicídicas (Schmidt, 2003).

As variações de PM encontrados durante a padronização do SDS-PAGE 12,5%, embora não significativas, estão de acordo com as especificações do CIM e apresentou coerência com os dados da literatura, que relatam a possibilidade de variações no PM devido à heterogeneidade das cadeias glicídicas da glicoproteína em estudo (Lasne & Ceaurriz, 2000; Lasne et al. 2002, Moraes et al. 2008). Ademais, vale ressaltar que o PM obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida é uma estimativa, podendo apresentar incerteza de cerca de 5%, de acordo com Hames & Rickwood (1990). 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 eletroforética e, conseqüentemente, um peso molecular aparente maior do que o real (Segrest & Jackson, 1972). Como a EPOhr apresenta aproximadamente 40% da sua massa composta por glicídeos (Gokana et al. 1997), 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). Além disso, a escolha de PPM apropriado é de suma importância. Dentre os padrões de PM utilizados o *BenchMark™ Protein Ladder* se adequou melhor as análises.

A técnica SDS-PAGE é o método eletroforético mais utilizado para avaliação do PM e pureza de proteínas, devido principalmente a sua facilidade, eficácia e baixo custo (Ward & Swiatek, 2009). Dentre as revelações estão àquelas realizadas com coomassie blue e nitrato de prata. Apesar de a segunda ser mais sensível (Reichel, 2009), a coloração por coomassie blue é menos trabalhosa e demonstrou-se eficaz para análise da EPOhr. Outro ponto importante é a escolha do método para avaliação final da homogeneidade da proteína. Neste contexto, a densitometria realizada pelo programa ImageMaster® forneceu resultados satisfatórios. Portanto, a padronização e validação da técnica SDS-PAGE 12,5% permitirá a avaliação da homogeneidade do IFA EPOhr pelo controle de qualidade em Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, estando em concordância com especificações da F.E. e CIM.

#### 4.6- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular (SEC-CLAE)

Goldwasser (1991) descreveu a EPOhr como uma molécula estável que permanece essencialmente em forma monomérica quando armazenada a 2-8 °C. No entanto, quando o produto é exposto a temperaturas mais elevadas ou certas condições de stress, dímeros e agregados podem ser formados (Srinivas, 2007), o que constitui uma das principais vias de degradação da proteína e é motivo de grandes preocupações para os fabricantes e autoridades reguladoras devido ao poder imunogênico destes agregados (Girad et al. 2012). A estabilidade da EPOhr pode ser monitorada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular (SEC-CLAE), que resolve as formas de agregação da proteína monomérica. No entanto, como em muitos outros biofármacos comercializados, para proteger a proteína contra a desnaturação ou formação de agregados, alguns excipientes, tais como polissorbato 80 e albumina, são incluídos como estabilizadores, o que pode interferir na detecção do agregado porque os seus picos tem tempo de retenção similar ao da EPOhr (Veiga et al. 2011). Por esse motivo, tal técnica foi padronizada para produto intermediário submetido a dessalinização, conforme recomendações da Farmacopéia Européia 7.0 e também do CIM (PNO-5067). A solução Tampão Fosfato-salina (PBS) pH 6,0 foi utilizada como branco na coluna TSK Gel G2500 SWxl e não demonstrou pico cromatográfico em 220 nm. (Figura 4.53).



Figura 4.53: Cromatografia de exclusão molecular da solução PBS em coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5µm equilibrada em solução tampão PBS pH6., fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.

O BRP EPOhr 30  $\mu\text{g}$  apresentou tempo de retenção (TR) de 5,82 minutos (Figura 4.54) e área média de 210,93 (Tabela 4.21). Apenas um pico referente ao monômero foi observado, sem a presença de picos minoritários com tempo de retenção menores ou maiores do que 5,82 minutos, indicando a ausência de agregados, dímeros ou degradação da amostra. Na tabela 4.21 pode-se observar que não houve variação no tempo de retenção do BRP EPOhr e que a variação na área do pico foi mínima.

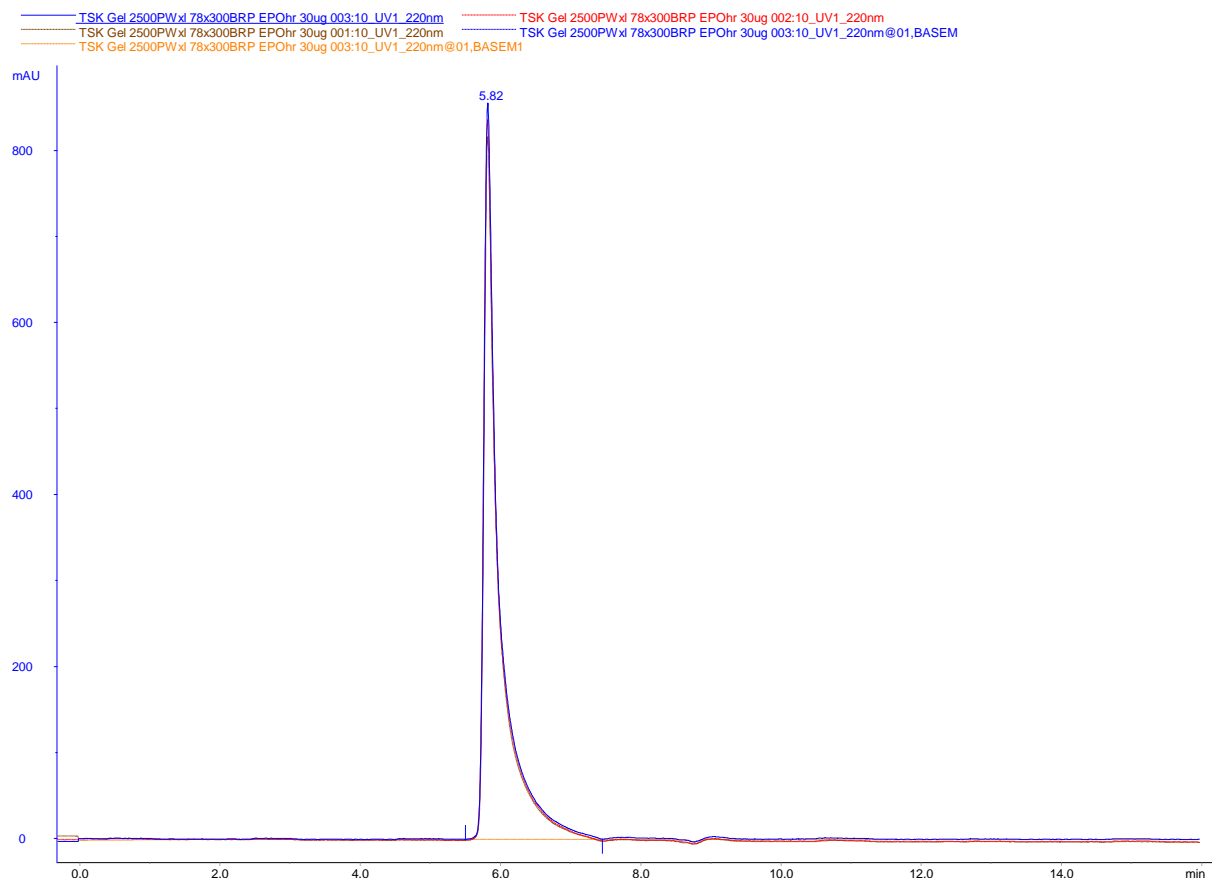


Figura 4.54: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30 $\mu\text{g}$  de massa proteica do BRP EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6., fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu\text{L}$ , pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.

Tabela 4.21: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção e área das triplicatas do BRP EPOhr 30 $\mu\text{g}$ .

BRP EPOhr 30 $\mu\text{g}$	TR (min)	Área (mAU/min)
Réplica 1	5,82	204,70
Réplica 2	5,82	211,46
Réplica 3	5,82	216,63
M	5,82	210,93
S	0	5,98
CV%	0	2,83

O LEa EPOhr 30  $\mu\text{g}$  apresentou tempo de retenção de 5,82 minutos assim como o BRP EPOhr, sugerindo dessa maneira, que tal pico cromatográfico é referente a EPOhr (Figura 4.55). Entretanto, pode-se observar que a área referente ao pico do LEa é inferior a área do BRP apesar de ter sido utilizado a mesma massa de proteínas (Tabela 4.22). Outra diferença a ser considerada é a presença de picos minoritários logo após a EPOhr, o que pode estar relacionado com EPOhr com baixo teor de glicídio, sem glicídio ou ainda degradação da proteína. Porém tais picos minoritários não foram integrados para avaliação do pico principal.

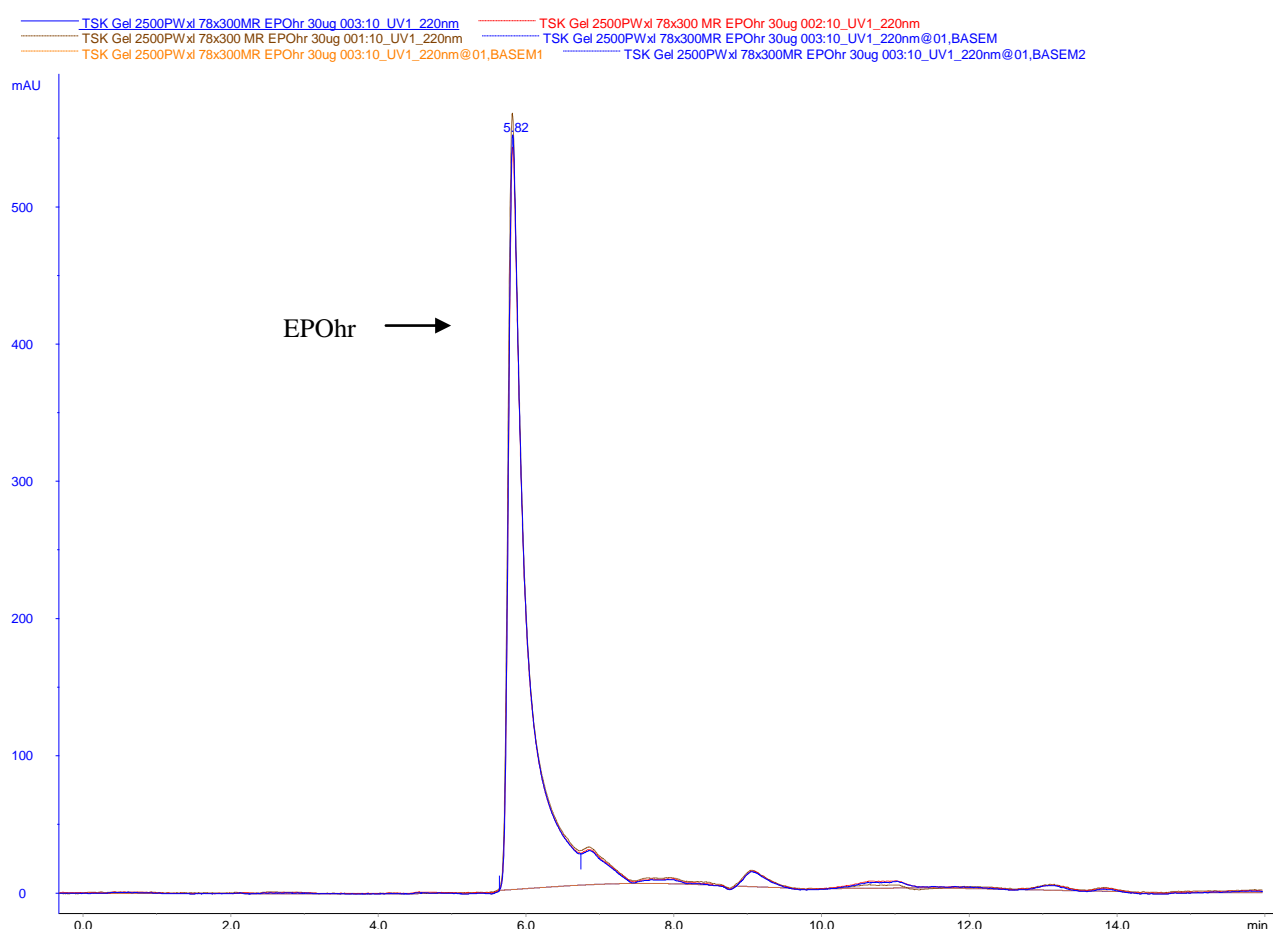


Figura 4.55: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30 $\mu\text{g}$  de massa proteica do LEa EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu\text{L}$ , pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.



Tabela 4.22: Avaliação do pico principal do LEa EPOhr obtido por SEC-CLAE em coluna TSK Gel2500SWxl. Média (M), Desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área das triplicatas do LEa EPOhr 30 $\mu$ g.

LEa EPOhr 30 $\mu$ g	TR (min)	Área (mAU/min)
Réplica 1	5,82	154,59
Réplica 2	5,82	149,89
Réplica 3	5,82	151,61
M	5,82	152,03
S	0	2,37
CV%	0	1,56

Um dos parâmetros necessários avaliar foi o limite de detecção para o LEa EPOhr. Nesse contexto, diferentes quantidades desta amostra foram aplicadas, a saber: 0,6 $\mu$ g, 1,2 $\mu$ g, 2,4  $\mu$ g, 3,6  $\mu$ g e 4,8  $\mu$ g. Conforme pode ser observado na figura 4.56 o tempo de retenção foi constante e a área aumentou proporcionalmente a massa do LEa EPOhr (Tabela 4.23 e Figura 4.57).

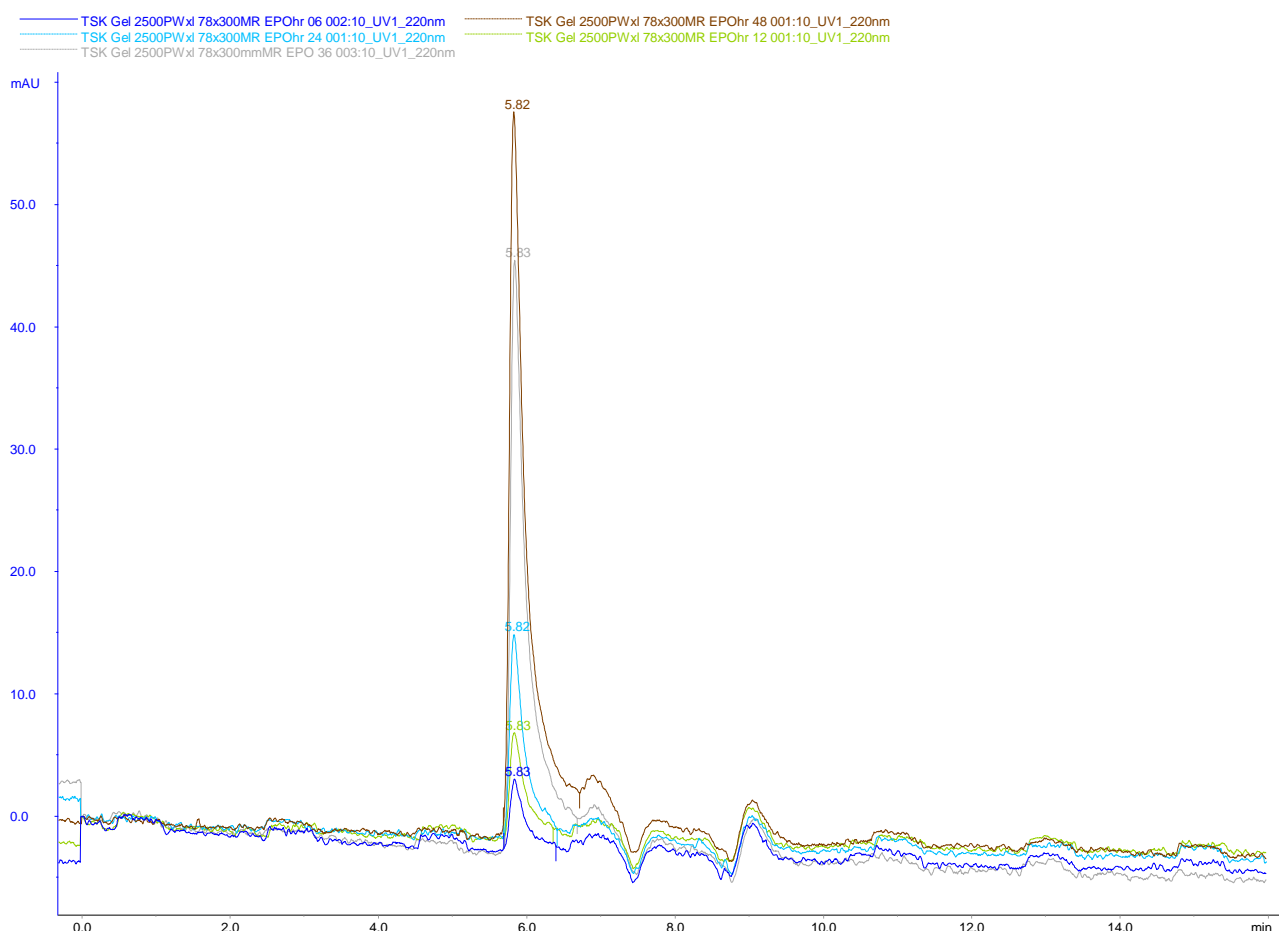


Figura 4.56: Sobreposição dos perfis cromatográficos do LEa EPOhr avaliada por SEC-CLAE em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm), em diferentes concentrações da amostra: 0,6 $\mu$ g (azul escuro), 1,2 $\mu$ g (verde), 2,4 $\mu$ g (azul claro), 3,6 $\mu$ g (cinza) e 4,8 (marrom).

Tabela 4.23: Resultado da integração do pico principal do LEa EPOhr analisado por SEC-CLAE em diferentes massas aplicadas.

Massa do LEa EPOhr	TR (min)	Área (mAU/min)
0,6µg	5,83	5,54
1,2µg	5,83	17,09
2,4µg	5,82	26,55
3,6µg	5,83	47,54
4,8µg	5,82	57,67

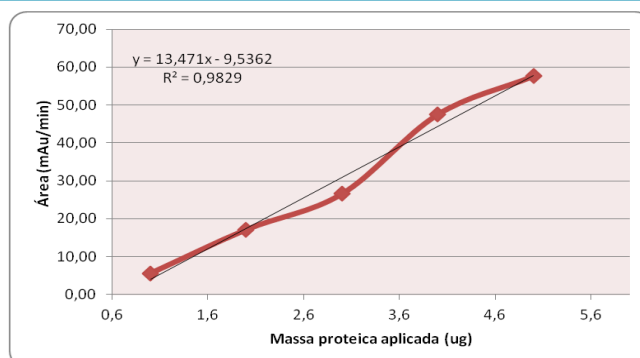


Figura 4.57: Gráfico demonstrando proporcionalidade entre massa protéica do LEa EPOhr avaliada por SEC-CLAE e área do pico principal observado a 220nm.

De acordo com a Figura 4.56 é possível detectar a EPOhr por SEC-CLAE na coluna TSK 2500xl até a massa de 0,6 µg. Em quantidades menores o sinal do pico principal referente ao monômero se confundiria ao sinal da linha de base, dificultando a detecção e a quantificação da EPOhr. O limite de detecção foi considerado como 0,6 µg EPOhr utilizando o método visual aceito pelo INMETRO, mas o limite de quantificação foi definido em 3,6 µg de EPOhr relacionando o sinal ao ruído na proporção 3:1. As proporções geralmente aceitas da relação sinal-ruído é 3:1 ou 2:1 (Ribani et al., 2004).

Para avaliar a recuperação de cada corrida foram utilizadas amostras diluídas representando 16% da amostra concentrada (30µg), ou seja, 4,8µg. Este ensaio é aceito se o pico do monômero correspondente a EPOhr for superior a 98% e todos os picos detectados tiverem área inferior ao pico de 4,8 µg. Sabendo-se que a F.E. e o CIM recomendam utilizar 2% de 30µg (0,6µg), foi ajustado o critério de aprovação para 16% de 30µg, para que a detecção fornecesse resultados mais confiáveis.

A integração dos picos cromatográficos das triplicatas do LEa com 4,8µg está demonstrada na figura 4.58. Os resultados dispostos na tabela 4.24 demonstram que a metodologia é reprodutível, evidenciada pela baixa dispersão entre os resultados. Além disso, o pico correspondente a EPOhr é superior a 98%, não sendo detectados picos com amplitude inferior ao pico correspondente a massa de 4,8µg, estando conformidade com as especificações.

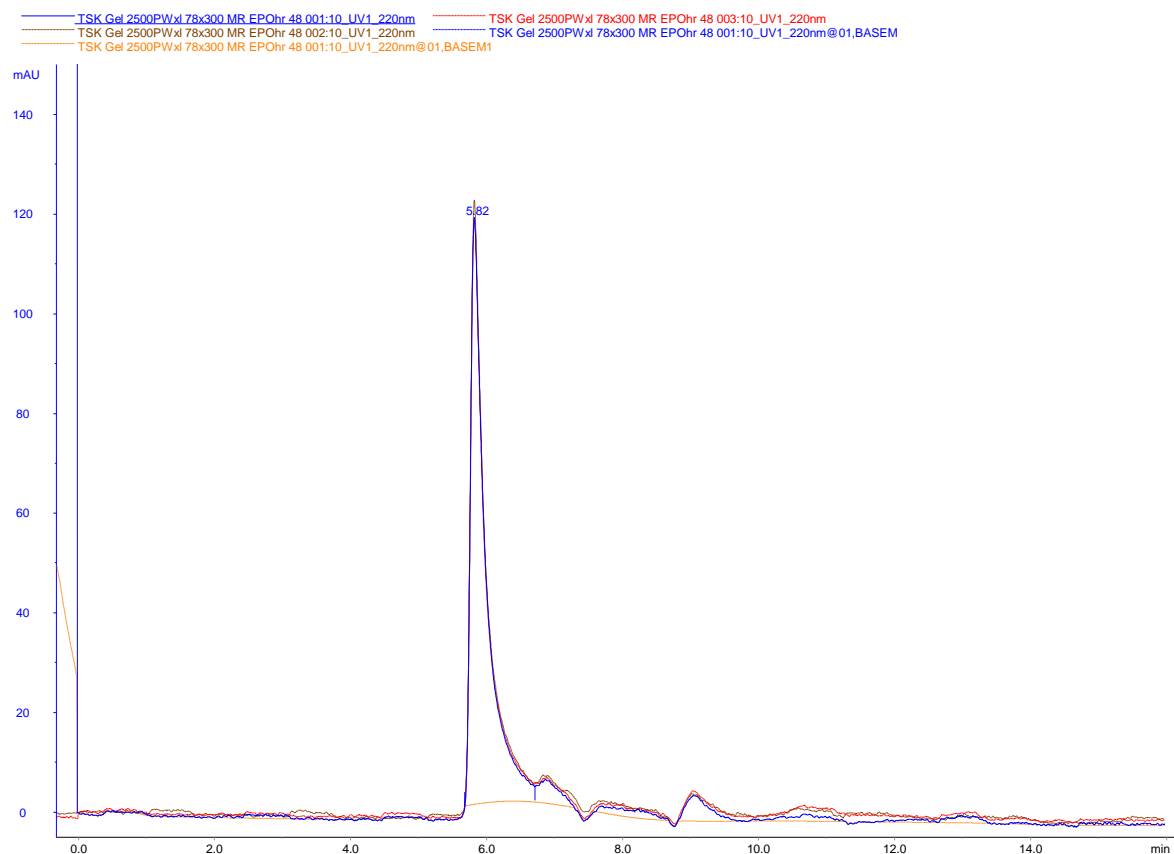


Figura 4.58: Sobreposição dos perfis cromatográficos do LEa EPOhr avaliada por SEC-CLAE em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) e detecção a 220nm. Em cada uma das três corridas cromatográficas foram aplicados 4,8µg de LEa EPOhr.

Tabela 4.24: Resultado da integração do pico principal das triplicatas de LEa EPOhr 4,8µg analisado por cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Del 2500xl. Média (M), Desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área das triplicatas do LEa EPOhr 4,8µg.

LEa EPOhr 4,8µg	TR (min)	Área (mAU/min)
Réplica 1	5,82	31,03
Réplica 2	5,82	31,47
Réplica 3	5,82	34,31
M	5,82	32,27
S	0	1,78
CV%	0	5,51

Para avaliar a especificidade da coluna TSK gel 2500xl frente ao analito EPOhr, duas outras amostras foram analisadas, uma de IFA EPOhr e o padrão da F.E. para EPOhr (BRP) sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas para o LEa EPOhr. Nas Figuras 4.59 e 4.60 pode-se observar que o perfil cromatográfico do IFA foi similar ao do LEa, entretanto, o pico minoritário, que elui logo após a fração principal não está visível, mesmo na aplicação de 30µg do IFA (Figura 4.60).

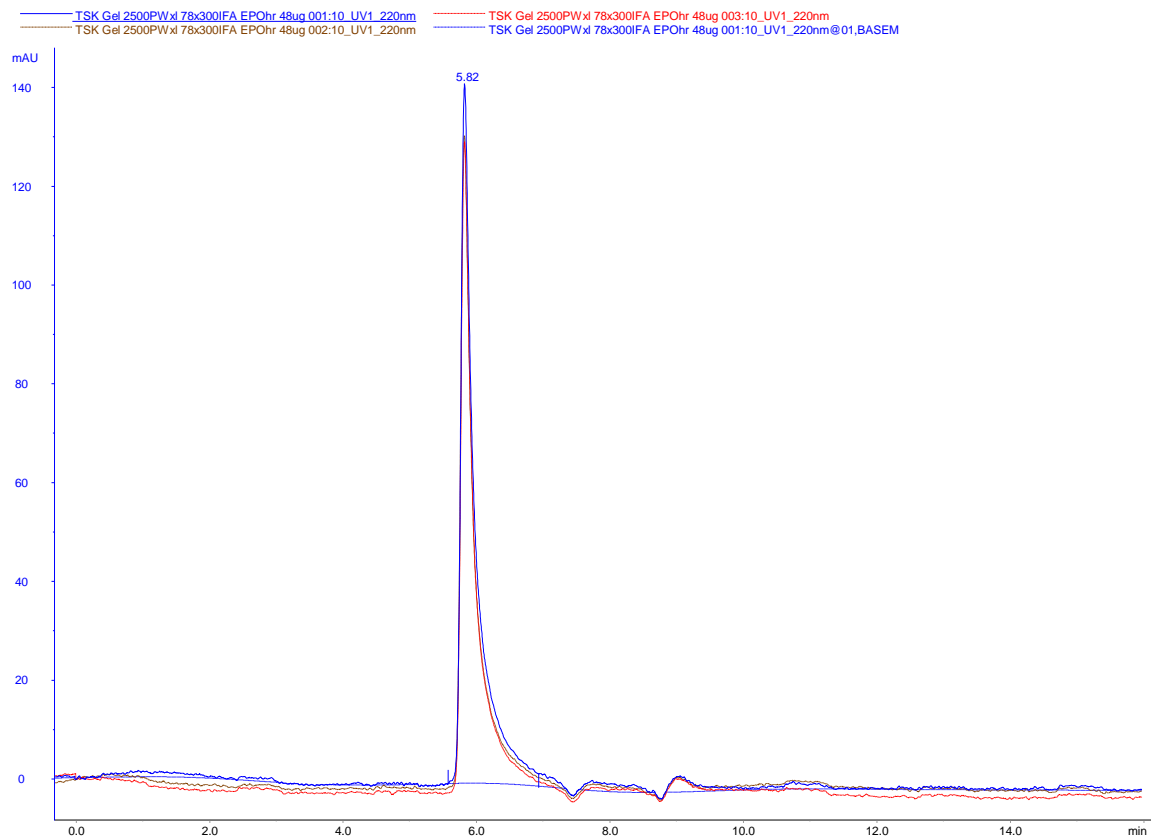


Figura 4.59: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 4,8µg de massa proteica do IFA EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6., fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.

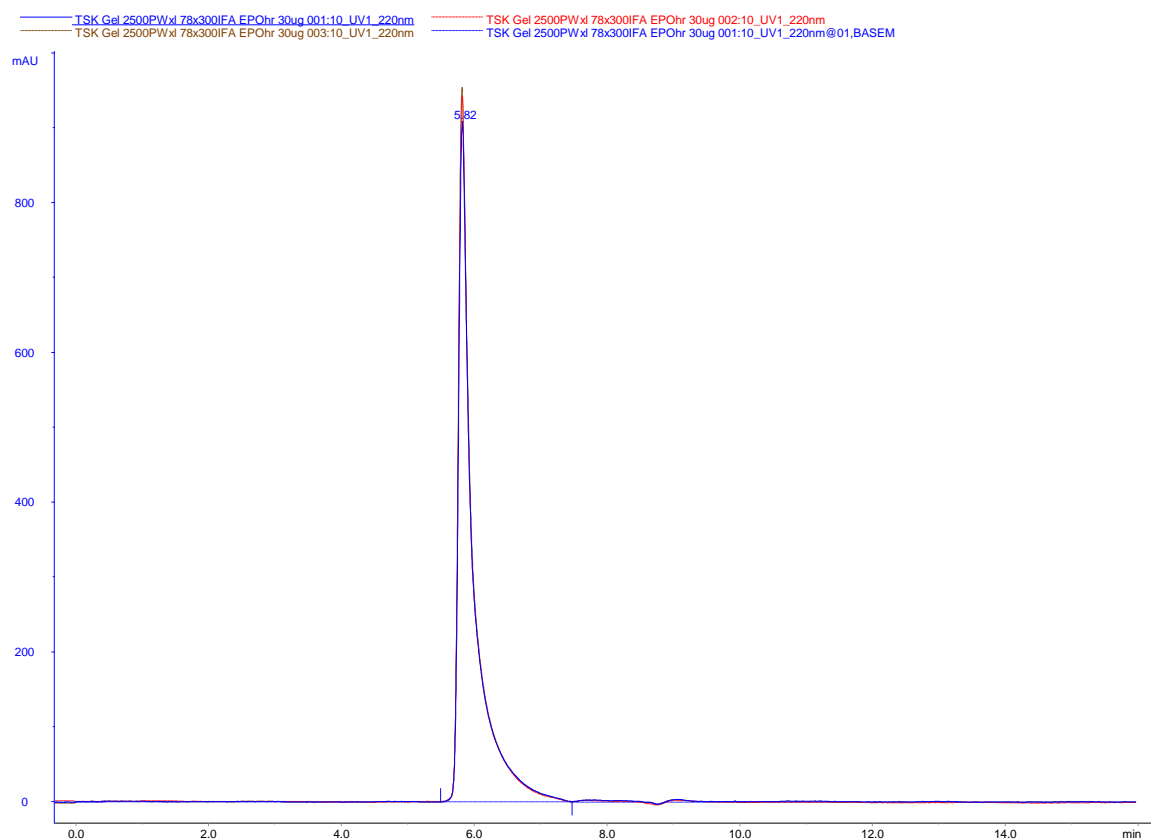


Figura 4.60: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30µg de massa proteica do IFA EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6., fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.

Essa diferença, apesar de ambas as amostras serem da mesma origem, se tratam de glicoproteínas com alto teor de glicídios, e por tanto, pode ocorrer microheterogeneidade glicídica de lote para lote (Storring et al. 1998). Os resultados apresentados na tabela 4.25 mostram que não ocorreu variação no tempo de retenção do pico de EPOhr contido no IFA (baixo desvio padrão e CV%), e o percentual de pureza é maior do que 98%, de acordo com o CIM.

Tabela 4.25: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área das triplicata do IFA EPOhr 4,8 µg e 30µg.

IFA EPOhr	TR (min)	Área (mAU/min) 4,8µg	Área (mAU/min) 30µg
Réplica 1	5,82	36,10	231,97
Réplica 2	5,82	32,03	235,88
Réplica 3	5,82	31,30	242,28
M	5,82	33,15	236,71
S	0	2,59	5,20
CV%	0	7,81	2,19

A sobreposição dos perfis cromatográficos do LEa e IFA 4,8µg, evidencia que o pico principal representa a mesma fração da EPOhr (Figura 4.61).

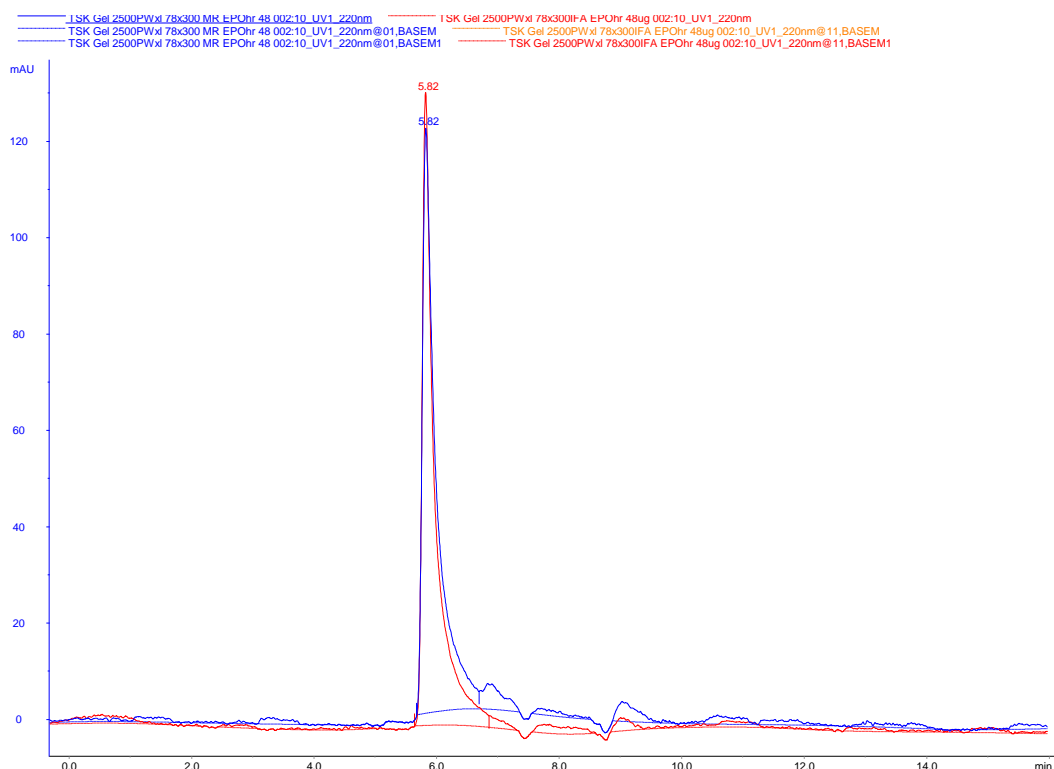


Figura 4.61: Integração dos cromatogramas do LEa EPOhr (em azul) e IFA EPOhr (em vermelho) com 4,8µg de massa. Coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5µm equilibrada em solução tampão PBS pH6., fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.

Tal análise é corroborada pelo baixo desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) obtido entre o tempo de retenção e a área dessas duas amostras, como pode ser evidenciado através dos dados dispostos na tabela 4.26.

Tabela 4.26: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área do LEa e do IFA EPOhr 4,8 µg.

Amostra	TR (min)	Área (mAU/min)
LEa EPOhr 4,8µg	5,82	31,47
IFA EPOhr 4,8µg	5,82	32,03
M	5,82	31,75
S	0	0,39
CV%	0	1,23

Foi realizada integração dos picos cromatográficos do LEa, IFA e BRP 30µg (Figura 4.62), bem como o cálculo do desvio-padrão e coeficiente de variação entre os tempos de retenção e as áreas dos mesmos (Tabela 4.27).

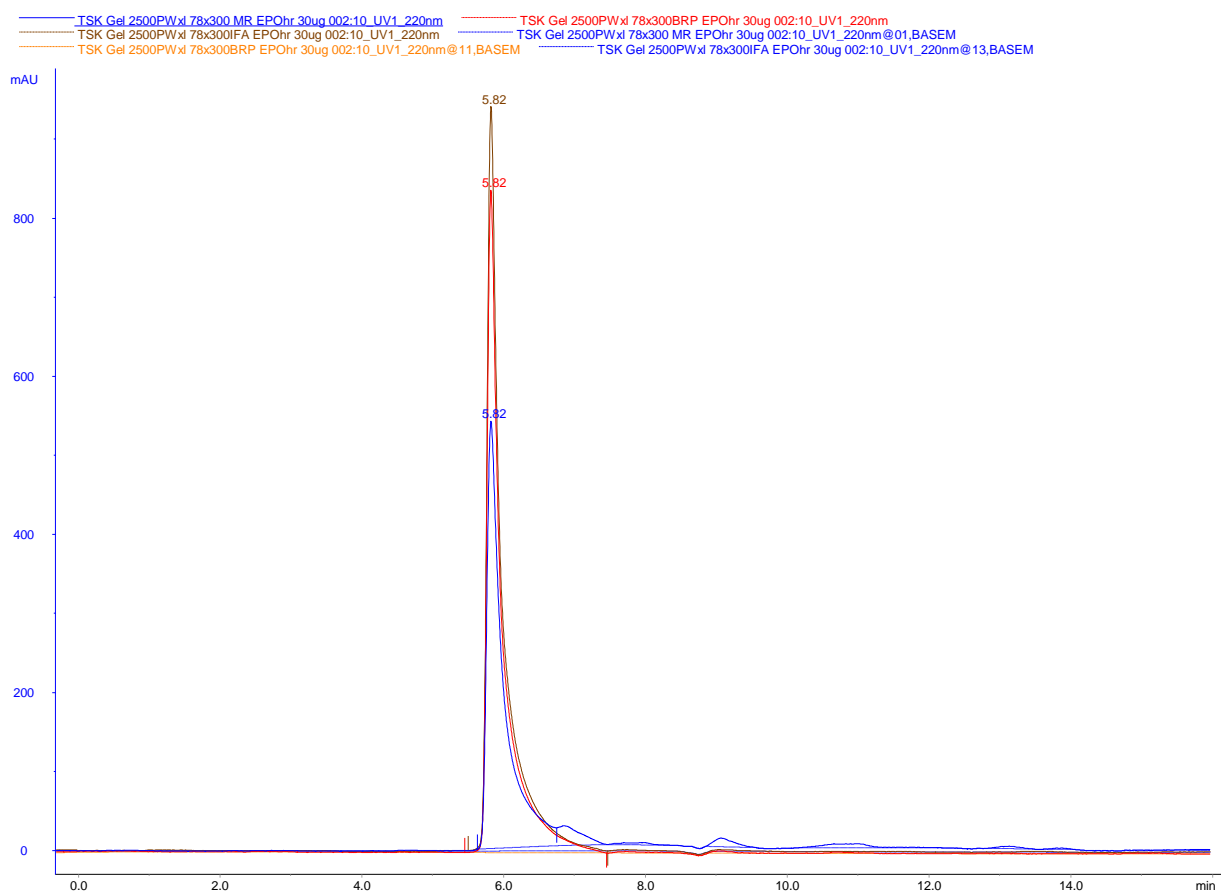


Figura 4.62: Integração dos cromatogramas do LEa EPOhr (em azul), IFA EPOhr (em marrom) e BRP EPOhr (em vermelho) com 30µg de massa. Coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5µm equilibrada em solução tampão PBS pH6., fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.

Tabela 4.27: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área do LEa, IFA e BRP EPOhr 30 $\mu$ g.

Amostra	TR (min)	Área (mAU/min)
LEa EPOhr 30 $\mu$ g	5,82	149,89
IFA EPOhr 30 $\mu$ g	5,82	235,88
BRP EPOhr 30 $\mu$ g	5,82	211,46
M	5,82	199,08
S	0	44,31
CV%	0	22,26

A análise dos dados demonstra que apesar do tempo de retenção ser o mesmo, as áreas obtidas após integração dos cromatogramas do LEa, IFA e BRP EPOhr diferiram entre si, gerando, por esse motivo, desvio-padrão e coeficiente de variação elevado entre as três amostras. Apesar da pequena diferença entre o perfil cromatográfico das amostras analisadas em coluna TSKgel 2500xl, pode-se perceber que não houve detecção de agregados em nenhuma das amostras analisadas, visto que não houve detecção de picos cromatográficos com tempo de retenção diferentes do que o TR da EPOhr

Neste caso, pode-se inferir que o LEa, apesar de estar na mesma concentração e formulação que o IFA e o BRP, deve haver alguma variação na molécula da EPOhr que proporciona diferença na absorbância a 220nm. Como a EPOhr é uma glicoproteína com várias isoformas, esta diferença pode estar relacionada a cadeia glicídica da molécula e/ou ao teor de ácido siálico da mesma, o que poderia ser confirmado por outras análises tais como o mapeamento peptídico e a quantificação de ácido siálico.

Outra possibilidade da diferença de resultados entre o LEa e as outras amostras analisadas seria a introdução de algum contaminante durante a dessalinização da mesma. Além disso, a estabilidade da molécula poderia ter sido afetada pelo fato do frasco utilizado para a análise ter sido dessalinizado semanas antes. Sendo assim, tendo perdido os estabilizadores da EPOhr através da dessalinização, a glicoproteína poderia estar sendo degradada. Para confirmar se a diferença ocasionada é relacionada à amostra, ao procedimento ou ao método, foram realizadas corridas sob as mesmas condições, porém utilizando outro frasco do mesmo lote da amostra, modificando-se o processo de dessalinização pela adaptação da Amicon®Ultra10.000 realizada imediatamente antes da análise, outra coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5 $\mu$ m e outro equipamento de CLAE da mesma marca utilizada anteriormente (ÄKTA).

Desta vez, o LEa apresentou amplitude e área equivalente as outras amostras analisadas. A figura 4.63 representa as análises realizadas em triplicata do LEa 30 $\mu$ g e a tabela 4.28 dispõe os valores de tempo de retenção e área, bem como a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação entre as réplicas. Essa análise permite-nos inferir que provavelmente a estabilidade da EPOhr dessalinizada anteriormente foi perdida, e que os picos com tempo de retenção maior do que o pico da EPOhr indicam degradação, o que não aconteceu com a amostra quando foi dessalinizada imediatamente antes da análise por SEC-CLAE.

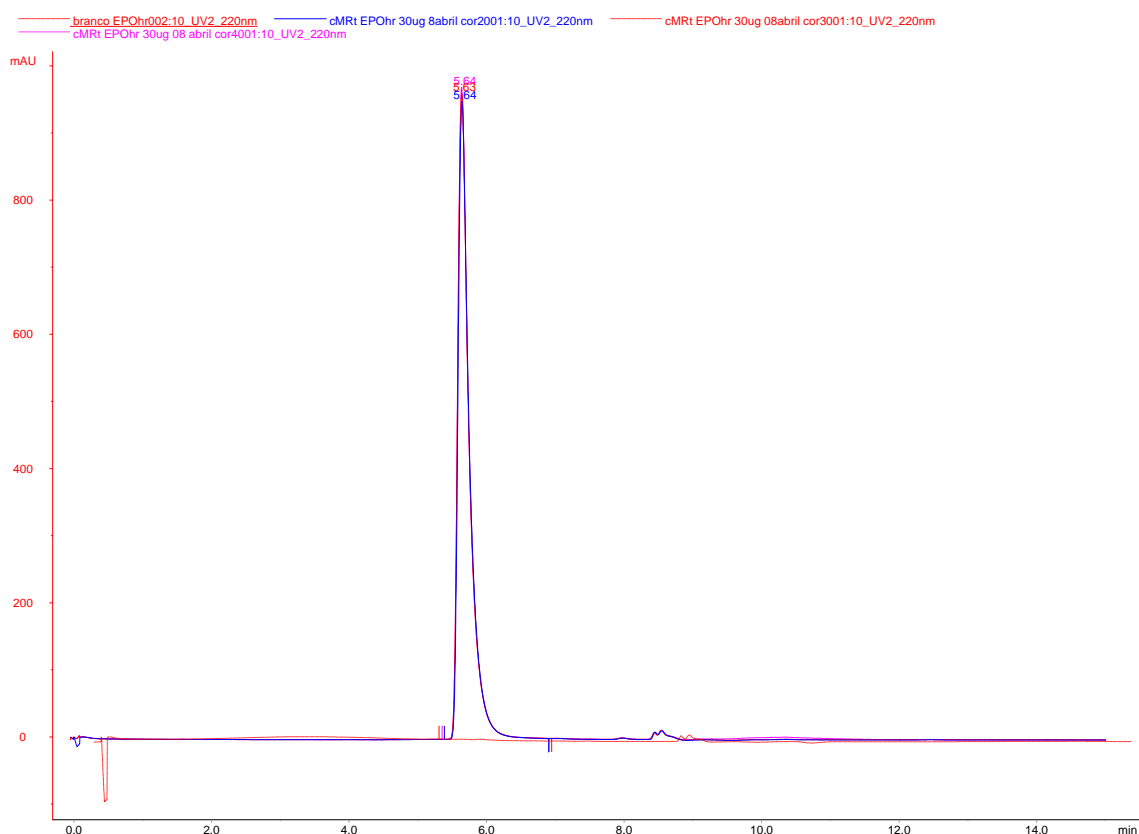


Figura 4.63: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30 $\mu$ g de massa proteica do LEa EPOhr dessalinizado em coluna Amicon®Ultra 10.000. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6., fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm. As avaliações foram feitas em triplicata.

Tabela 4.28: Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) do tempo de retenção (TR) e área da triplicata do LEa EPOhr 30 $\mu$ g.

LEa EPOhr	TR (min)	Área (mAU/min) 30 $\mu$ g
Réplica 1	5,64	244,40
Réplica 2	5,63	248,72
Réplica 3	5,64	256,59
M	5,64	249,90
S	0,01	6,18
CV%	0,17	2,47



A figura 4.64 representa a sobreposição dos cromatogramas obtidos da análise do LEa 30 $\mu$ g e 4,8  $\mu$ g, através do qual observa-se mesmo perfil cromatográfico entre as duas diferentes massas de proteína. Os picos evidenciados após o pico correspondente a EPOhr na aplicação de 4,8  $\mu$ g de massa provavelmente está relacionado aos componentes da formulação que não foram completamente separados durante a dessalinização, visto que a coluna utilizada separa a EPOhr de moléculas menores que 10 kDa e que tais picos também aparecem nos cromatogramas com o LEa 30 $\mu$ g, mas a visualização é prejudicada devido a amplitude do pico principal.

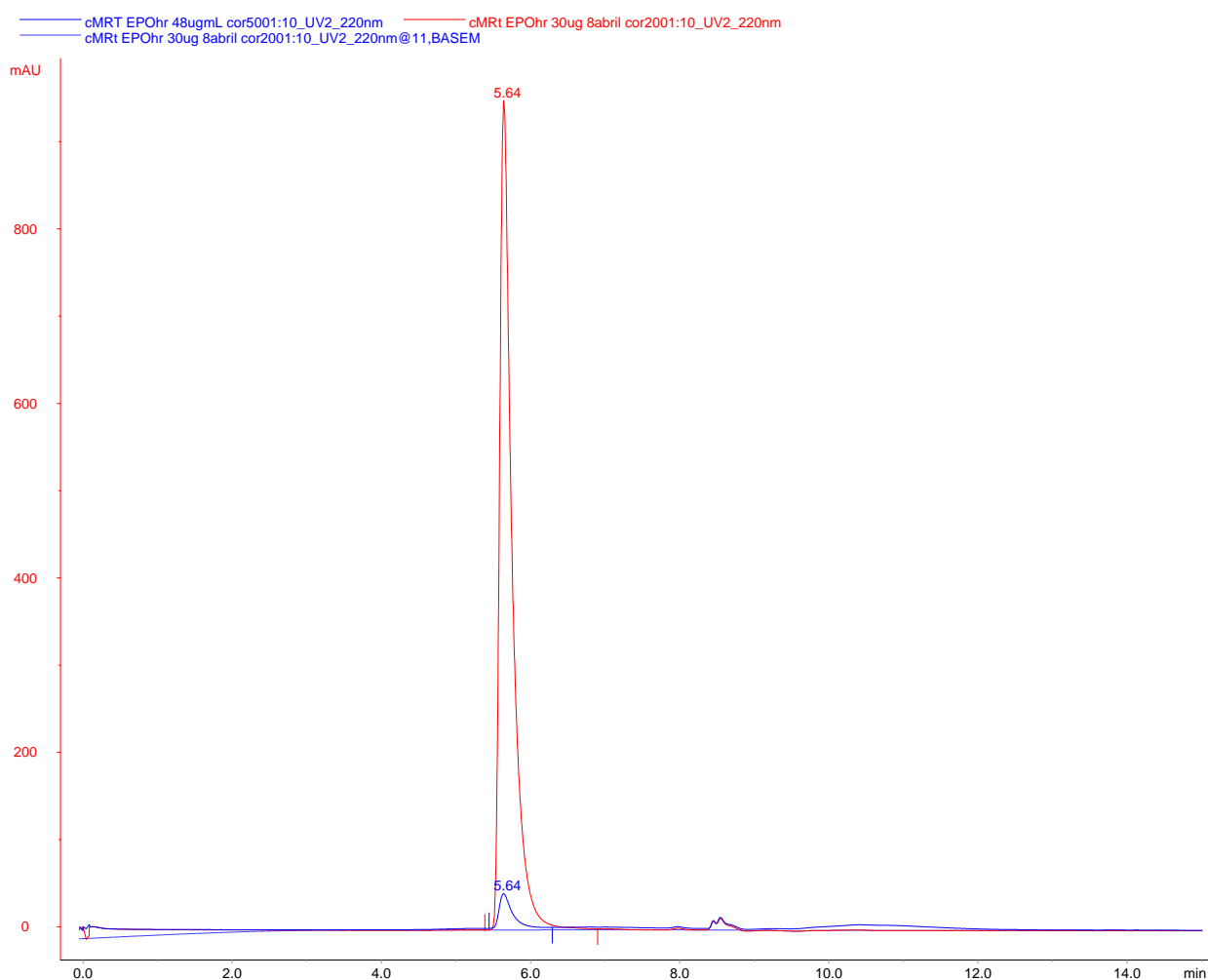


Figura 4.64: Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) de 30 $\mu$ g (em vermelho) e 4,8 $\mu$ g (em azul) de massa proteica do LEa EPOhr. A coluna analítica foi previamente equilibrada em solução tampão PBS pH6, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.

Através das análises realizadas, pode-se perceber que não houve detecção de agregados e produtos de degradação da EPOhr em nenhuma das amostras analisadas, visto que não houve detecção de picos cromatográficos com tempo de retenção inferior ou superior ao da EPOhr.

A desnaturação térmica do LEa EPOhr, apresentada na Figura 4.65, exibe um perfil de agregação mais intenso do que o esperado para um processo de agregação natural, mas exemplifica bem um resultado de reprovação de uma amostra de EPOhr. A curva vermelha da Figura 4.65 representa o LEa EPOhr não desnaturado, as demais curvas são relativas a mesma massa de EPOhr aplicada, porém submetida a tratamento térmico por 12h e 24h para indução da agregação. O perfil cromatográfico entre estas amostras diverge tanto quanto o número de picos observados, quanto na área percentual das frações encontradas (Tabela 4.29). A homogeneidade abaixo de 98% seria o suficiente para descartar as amostras tratadas termicamente. As variações em relação ao tempo de retenção, quando comparadas com as cromatografias em TSK gel2500xl realizadas anteriormente, estão relacionadas ao fato de que os experimentos de análise da agregação foram feitos em outro sistema AKTA 10 purifier, com tubulações menores do que a utilizada no início do experimento.

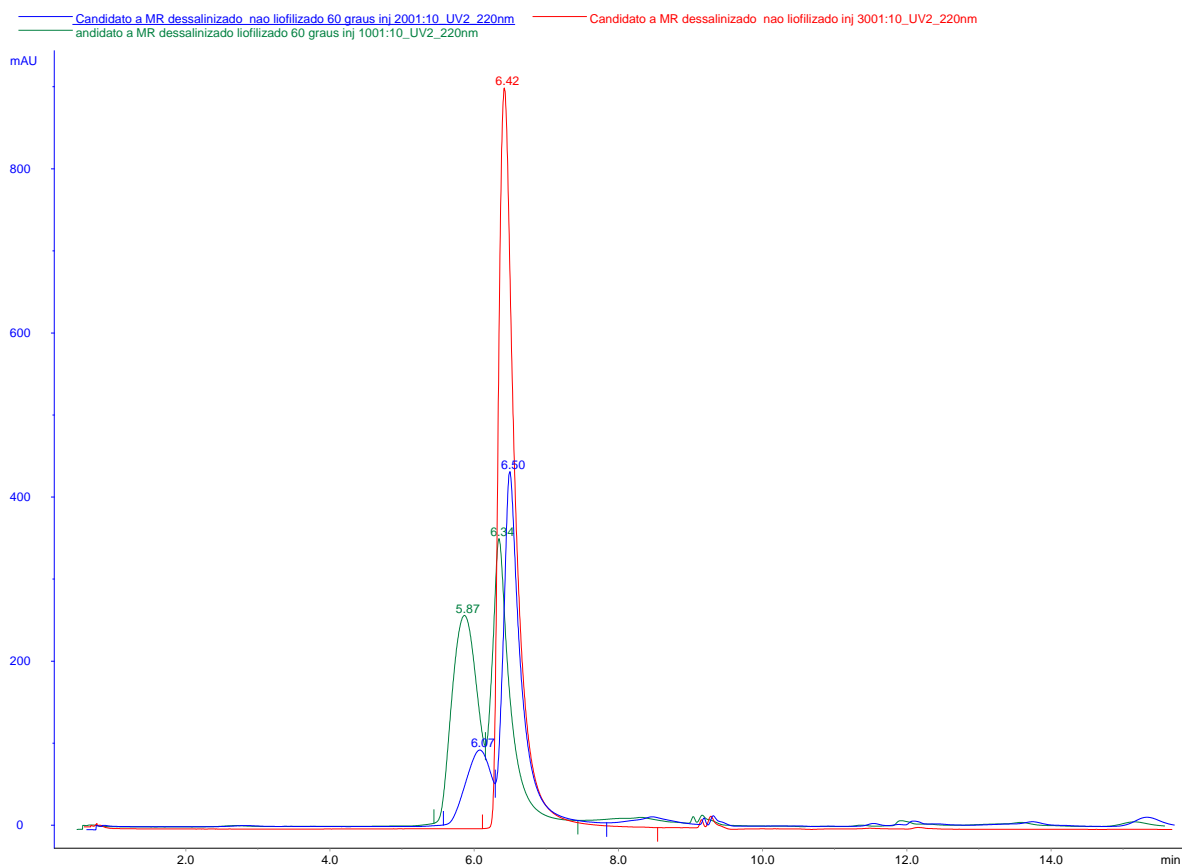


Figura 4.65: Perfil cromatográfico do LEa EPOhr nativo (em vermelho), submetido a 60°C durante 12h (em azul) e submetido a 60°C durante 24h (em verde) obtidos da análise por SEC-CLAE em coluna analítica TSK Gel G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5µm equilibrada em solução tampão PBS pH6, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220nm.

Tabela 4.29: Área percentual dos picos encontrados nos cromatogramas relativos ao LEa EPOhr 30µg nativa e desnaturada por aquecimento a 60°C durante 12 horas e 24 horas. A área percentual foi calculada seguindo a fórmula: Área % = área do pico x 100 / área total

Área percentual		
LEa EPOhr	Pico do agregado	Pico do monômero
Nativa	-	100
60°C 12h	22,5	77,5
60°C 24h	49,5	50,5

Os resultados da desnaturação térmica sugerem que houve indução da agregação e que o primeiro pico é referente ao agregado. Yoshiyuki et al. (1992) demonstraram que a EPOhr submetida a temperatura a partir de 60°C induz agregação irreversível observada a partir de um pico cromatográfico com tempo de retenção inferior ao pico referente a EPOhr. Wilczynska et al. (2005) e Agilent Technologies (2011) demonstram que na SEC-CLAE a formação de agregados é visualizada através de picos cromatográficos antes do pico do monômero e degradações e impurezas são detectadas após o pico do monômero. Além disso, tal análise permite diferenciar o perfil cromatográfico da amostra na presença de agregados. Com isso, pode-se inferir o percentual de homogeneidade e definir se a amostra está em concordância ou não com a legislação seguida.

A SEC é uma técnica utilizada rotineiramente e bem estabelecida no controle de qualidade com a vantagem de detectar quantidades muito pequenas de agregados de amostras (Girard et al. 2012). A sensibilidade alcançada por esta técnica é principalmente dependente do método de detecção utilizado, tais como UV, dispersão de luz ou fluorescência (Srinivas et al. 2007). Este último tem sido utilizado para contornar os problemas com a presença de albumina e polissorbato 80 (Girard et al. 2012). Além disso, outro problema que vem sendo relatado é a contaminação da formulação contendo EPOhr por alumínio, o qual vem sendo quantificado através da SEC juntamente com a espectrometria de absorção atômica (Veiga et al. 2011).

Neste trabalho, a detecção foi realizada a 220 nm em confronto com dados da F.E. e do CIM, que recomendam 214 nm. Além disso, a coluna analítica utilizada foi a TSK Gel

G2500 SWxl (300 x 7,8 mm) 5 $\mu$ m, enquanto que o CIM e F.E. recomendam o uso da TSK Gel G2000, utilizada para proteínas de maior peso molecular. A fluxo utilizada foi o dobro (1mL/min) do que é descrito na F.E. e CIM, diminuindo o tempo de corrida pela metade. Outro parâmetro alterado foi o pH da fase móvel, o qual é recomendado em torno da neutralidade e neste trabalho foi utilizado o pH ácido para conservar a fase estacionária da coluna que é composta por sílica.

A técnica de SEC-CLAE em coluna TSK GEL 2500xl demonstrou-se eficaz e reprodutível para análise de agregados na formulação intermediária de EPOhr bem como para a confirmação da estabilidade da molécula. Para ser implantada no controle de qualidade em Bio-Manguinhos, esta metodologia precisa antes ser validada, o que será realizado de acordo com a RE 899.

#### **4.7- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-CLAE)**

A cromatografia de fase reversa é uma técnica bastante utilizada para purificação e avaliação da pureza de proteínas, através da diferença de hidrofobicidade entre as moléculas (Ahrer K. & Jungbauer A., 2006). Para avaliação da pureza da EPOhr é descrito na literatura o uso de colunas Vydac C4, C8 e C18 (Ahrer K. & Jungbauer A., 2006; Almeida et al. 2012). Nesse trabalho foi utilizada a coluna C8, em consonância com a metodologia preconizada pelo CIM.

Na figura 4.66 observa-se a cromatografia em fase reversa realizada com o LEa EPOhr, a qual apresentou dois picos cromatográficos principais, com tempos de retenção de 2,50 min e 13,26 min, e vários picos minoritários entre 2,50 min e 8,0 min. O IFA EPOhr apresentou um perfil similar ao do LEa EPOhr em relação ao picos principais (Figura 4.67). Entretanto, o IFA EPOhr apresentou menor complexidade, com apenas dois picos cromatográficos minoritários com tempos de retenção 4,60 e 7,84 minutos respectivamente.

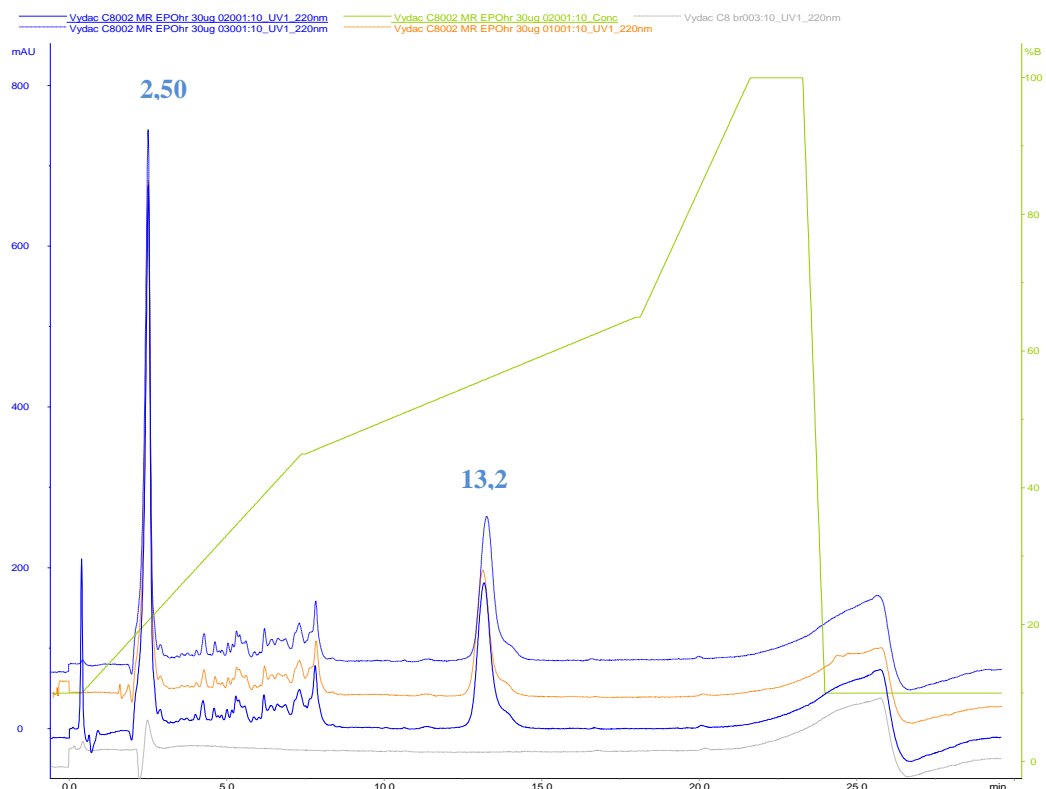


Figura 4.66: Cromatografia em Fase Reversa de 30 $\mu$ g de massa do LEa EPOhr realizada em triplicata. Em cinza: branco realizado com fase móvel A (TFA 0,1%); em verde: Gradiente de concentração; em azul e coral: LEa EPOhr 30  $\mu$ g. Coluna analítica Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5 $\mu$ m, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220 nm.

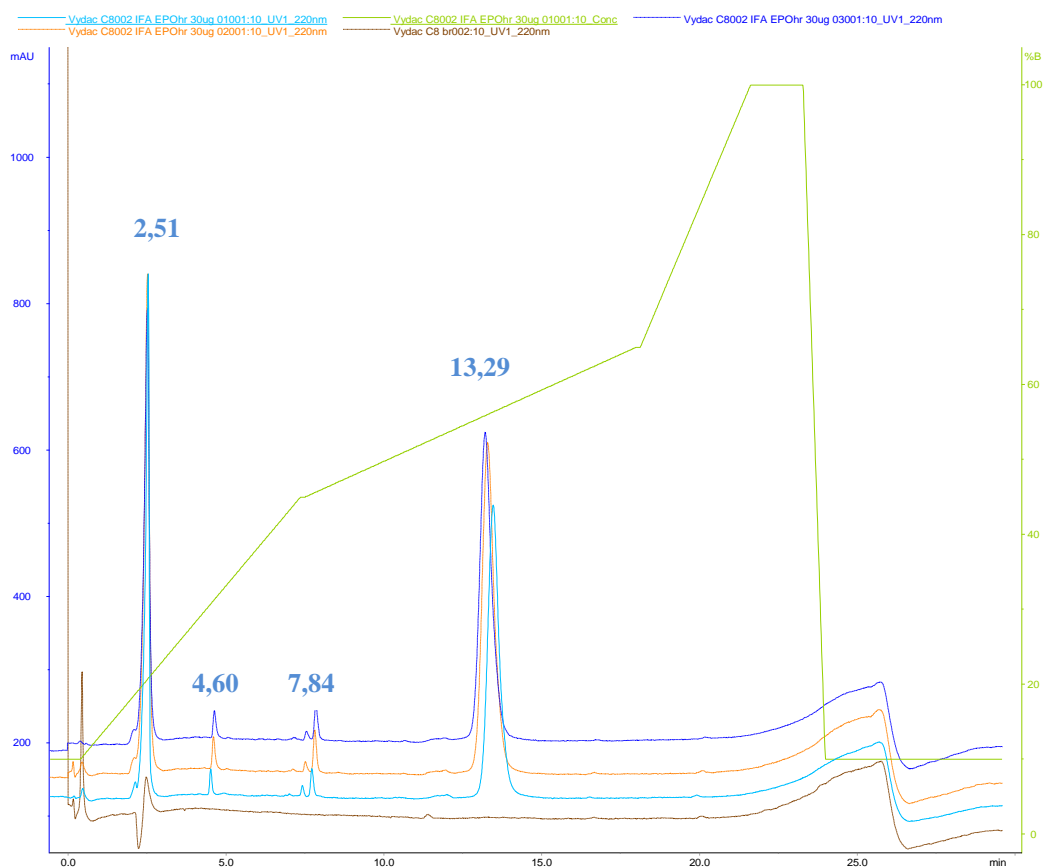


Figura 4.67: Cromatografia em Fase Reversa de 30 $\mu$ g de massa do IFA EPOhr realizada em triplicata. Em marrom: branco realizado com fase móvel A (TFA 0,1%); em verde: Gradiente de concentração; em azul claro, azul escuro e coral: IFA EPOhr 30  $\mu$ g. Coluna analítica Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5 $\mu$ m, fluxode 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220 nm.

O padrão BRP EPOhr apresentou uma complexidade proteica menor do que a observada nos perfis cromatográficos do LEa e do IFA EPOhr, o que é demonstrado na figura 4.68. Pode-se visualizar que todas as amostras da EPOhr avaliadas apresentaram os dois picos principais (Figura 4.68).

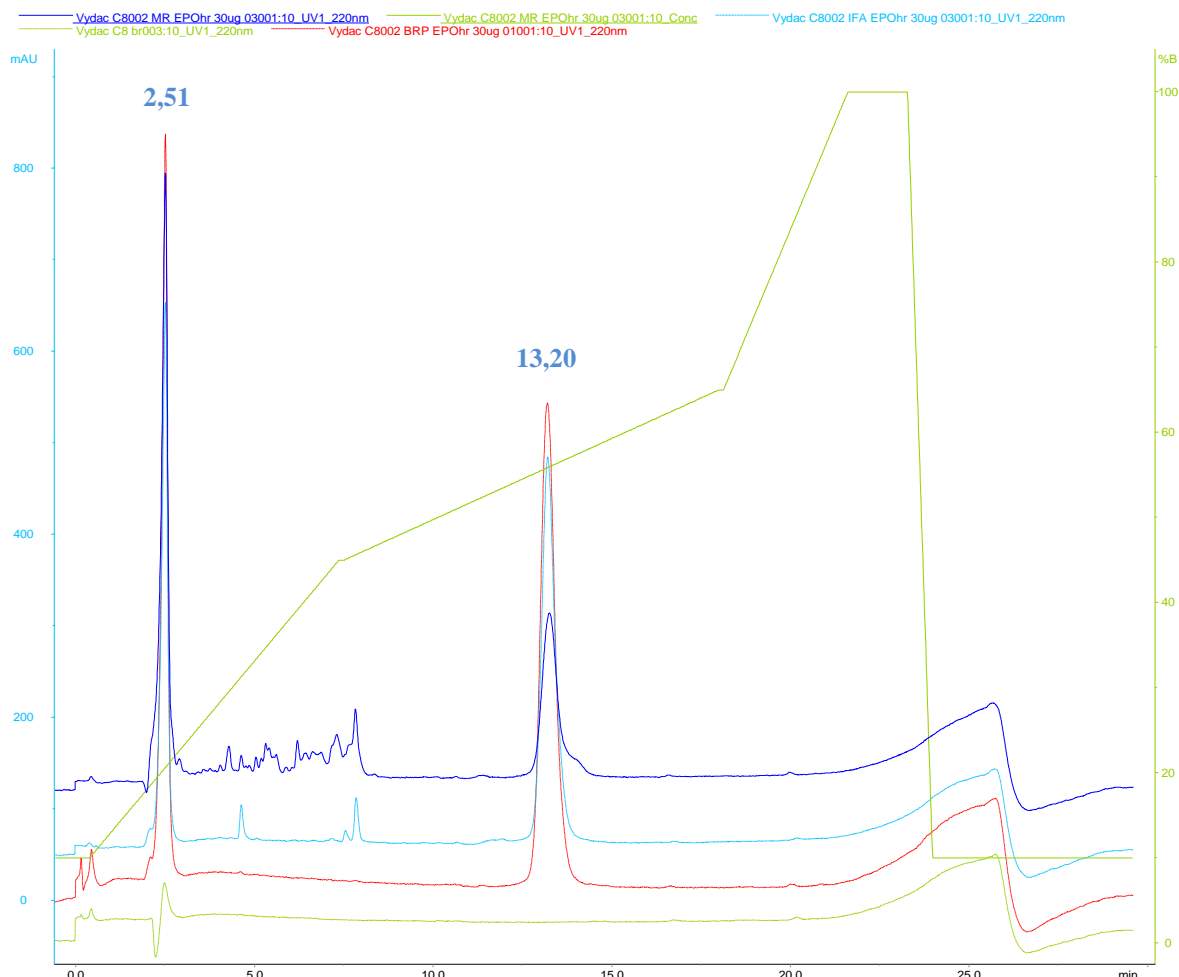


Figura 4.68: Comparação entre os perfis cromatográficos das amostras analisadas em fase reversa: LEa EPOhr (em azul escuro); IFA EPOhr (azul claro) e BRP EPOhr (em vermelho). Em linha verde pontilhada: branco realizado com fase móvel A (TFA 0,1%); em linha verde contínua: gradiente de concentração. Coluna analítica Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5 $\mu$ m, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100  $\mu$ L, pressão limite 10 mPa, detecção a 220 nm.

O pico cromatográfico com tempo de retenção de 2,51 minutos eluiu no volume morto da coluna Vydac, uma vez que este pico co-eluiu com o pico de condutividade (Figura 4.69). Esta fração pode ser composta por ácido siálico liberado pela hidrólise da EPOhr pelo TFA 0.1% utilizado como eluente inicial da cromatografia de fase reversa, conforme descrito por Fu-Tai et al.(1998). Neste caso, a forma principal da EPOhr sem ácido siálico seria representada pelo pico com tempo de retenção de 13,20 minutos e os demais picos

minoritários apresentados podem estar relacionados a formas intermediárias da EPOhr com ácido siálico ou fragmentos glicídicos contendo ácido siálico.

Para confirmação desta hipótese, seria necessário dados adicionais, como determinação do teor de ácido siálico, composição de aminoácidos, espectro de massa ou sequenciamento N-terminal para a identificação inequívoca das frações em questão. Além disso, poderia ser testado a utilização de sistemas de eluentes sem o íon-par TFA para descartar a hipótese de hidrólise da porção de ácido siálico da EPOhr, pois os picos não proteicos poderiam ser desconsiderados para o cálculo de área total e assim os dados presentes na tabela 4.30 não descartariam o IFA e o LEa EPOhr em relação ao BRP EPOhr.

Os picos cromatográficos intermediários foram integrados para a avaliação do percentual de pureza da EPOhr nas três amostras analisadas. Fazendo-se a avaliação desta maneira pode-se perceber que o percentual de pureza das amostras LEa e IFA EPOhr está abaixo das especificações do CIM.

Tabela 4.30: Área total, área do pico principal, resultantes da integração dos cromatogramas das triplicatas e percentual de pureza das três amostras analisadas (LEa, IFA e BRP EPOhr).

Amostra	Área total (mAu/min)	Área EPOhr (mAU/min)	Percentual de pureza
LEa EPOhr 30µg	2.401.028	1.992,757	82,99%
IFA EPOhr 30µg	3.115.131	2.996,804	96,20%
BRP EPOhr 30µg	2.020.162	2.020,162	100%

Um problema da cromatografia de fase reversa é o tempo de análise. Geralmente, para gradientes mais resolutivos, utilizam-se corridas de 60 a 90 minutos. Associado a isto, a obrigatoriedade de realização de brancos entre cada corrida dificulta o uso mais eficiente da RP-CLAE em controles de processo. Nesse contexto, foi testado duas condições de gradientes lineares, um com variação linear de 5 volumes de colunas (VC) e outra com 10VC, conforme mostrado na Figura 4.69. O gradiente com 5 volumes de coluna apresentou perfil cromatográfico com boa distinção entre os picos e menor tempo de corrida, o que possibilita um maior número de análises por dia (Figura 4.69A). No gradiente linear com 10VC houve uma redução no tempo de corrida de 5 minutos em relação ao gradiente utilizado no CIM (Figuras 4.69B). Entretanto, foram detectados menos picos cromatográficos entre os picos principais, acarretando maior percentual de pureza para a amostra LEa (Tabela 4.31).

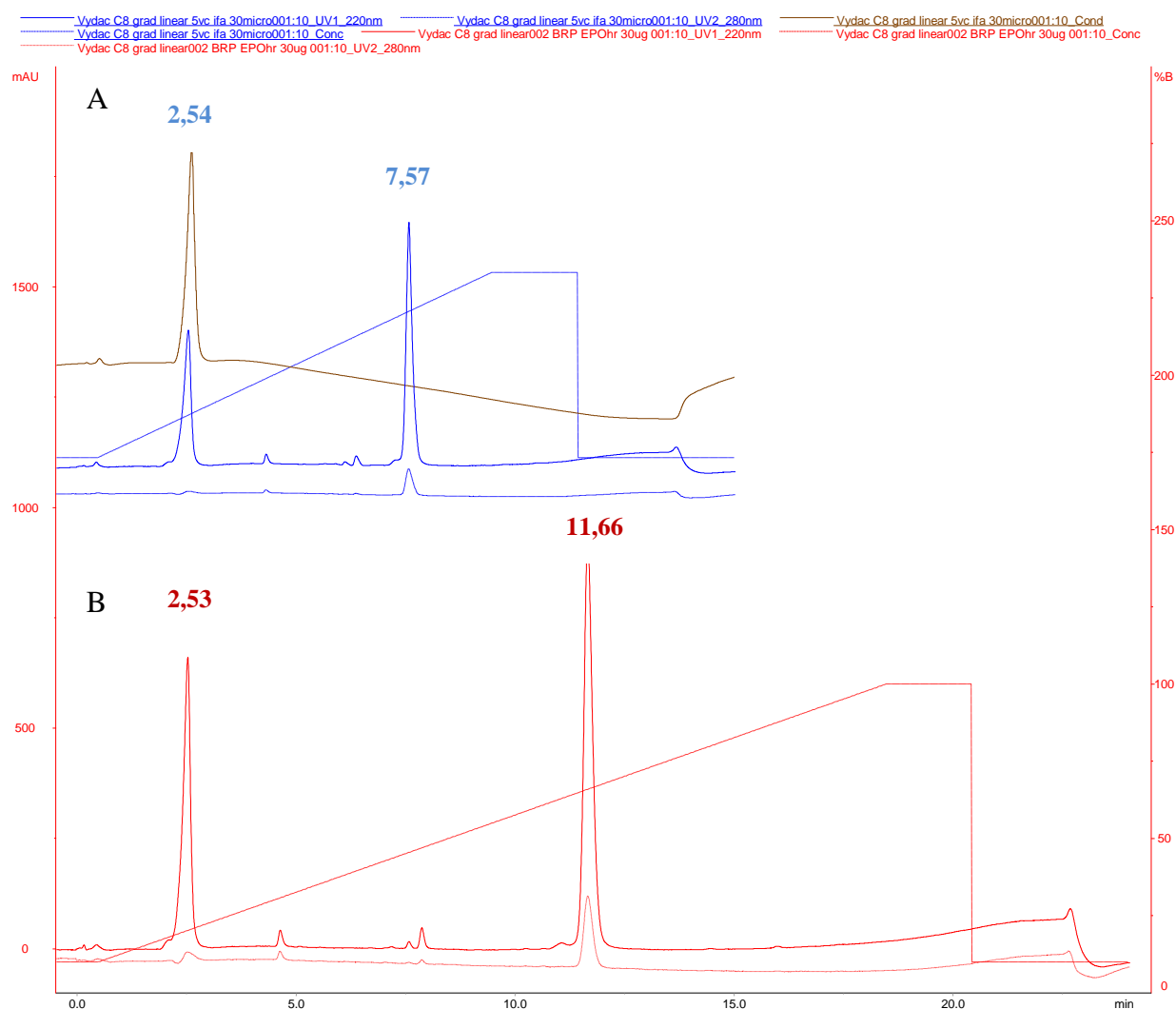


Figura 4.69: Esquema representativo dos perfis cromatográficos de LEa EPOhr 30 µg utilizando gradiente linear com 5 volumes de coluna (A) e 10 volumes de coluna (B). Linha pontilhada: Detecção a 280nm; linha contínua: detecção a 220nm; em marrom: condutividade. Coluna analítica Vydac C8 (150 x 4,6 mm) 5µm, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100µL, pressão limite 10 mPa, detecção a 220 nm.

Tabela 4.31: Área total, área do pico principal, e percentual de pureza do LEa analisado em gradiente linear com 5 (5v) e 10 volumes de coluna (10v).

LEa EPOhr 30µg	Área total (mAu/min)	Área EPOhr (mAU/min)	Percentual de pureza
5v	2.163.390	2.025.037	93,60%
10v	2.416.973	2.255.279	93,31%



Para testar a robustez da cromatografia de fase reversa, a EPOhr foi analisada por RP-CLAE utilizando outro sistema cromatográfico, outra coluna (Bakerbond WP octadecyl) e a estação de trabalho CLAE-Waters 2695 Alliance. O gradiente, fluxo e eluentes foram mantidos para efeito comparativo. A Figura 4.70 mostra o perfil das cinco corridas realizadas utilizando 30 $\mu$ g do LEa. O tempo de retenção da EPOhr foi de 15,755, o pico apresenta aspecto homogêneo, com uma sutil inflexão a direita, que pode ser característico da heterogeneidade glicídica da EPOhr (Figura 4.70B). O número de frações minoritárias está reduzido em relação à coluna C8, as quais devem ter ficado mais retidas na coluna, provavelmente formando o pico com TR 13 minutos. Além disso, a escala utilizada dificulta a visualização de picos minoritários. A tabela 4.32 lista os valores de área e tempo de retenção (TR) encontrados para as réplicas, demonstrando boa reprodutibilidade da metodologia, evidenciada através da baixa dispersão entre os resultados.

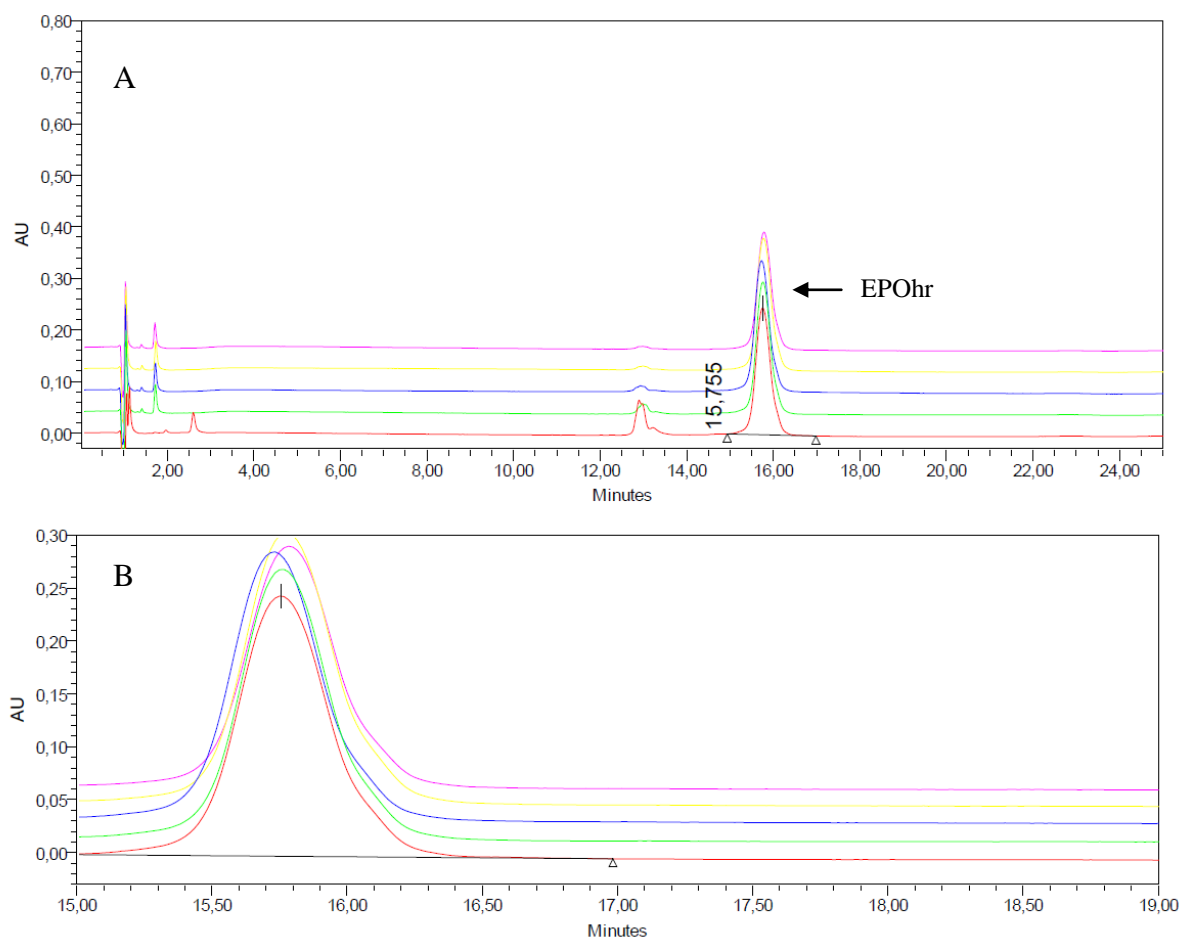


Figura 4.70: Integração dos cromatogramas das réplicas do LEa EPOhr em fase reversa(A). Aumento do pico cromatográfico referente a EPOhr (B). Coluna analítica Bakerbond WP C18, 5  $\mu$ m, 4,6 x 100mm, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu$ L, detecção a 214 nm.

Tabela 4.32: Tempo de retenção (TR) e área do pico principal resultantes da integração dos cromatogramas das replicatas do LEa EPOhr 30 $\mu$ g. Média (M), desvio-padrão (S) e coeficiente de variação (CV%) entre as réplicas.

LEa EPOhr 30 $\mu$ g	TR	Área EPOhr (AU)
<b>Réplica 1</b>	15,75	608,26
<b>Réplica 2</b>	15,76	614,37
<b>Réplica 3</b>	15,73	618,05
<b>Réplica 4</b>	15,77	621,38
<b>Réplica 5</b>	15,78	550,64
<b>M</b>	15,75	602,54
<b>S</b>	0,019	29,42
<b>CV%</b>	0,12	4,88

Para avaliar a linearidade da fase reversa em coluna C18 foram utilizadas três diferentes concentrações do LEa, a saber: 20  $\mu$ g/mL, 30  $\mu$ g/mL e 40  $\mu$ g/mL. Na Figura 4.71 observa-se que os dados obtidos para a C18 também apresentam boa correlação entre área do pico e quantidade de amostra aplicada, evidenciado pelo coeficiente de determinação igual a 0,9996.

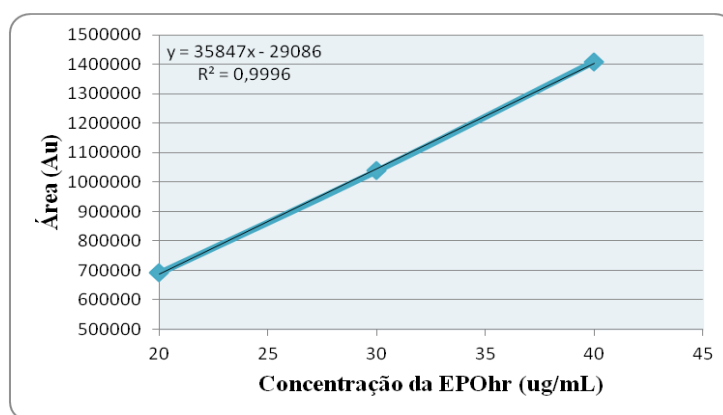


Figura 4.71: Gráfico da área obtida por RP-CLAE *versus* concentração de proteínas do LEa.

A fim de sugerir a metodologia de RP-CLAE para quantificação da EPOhr, foi utilizado o MR estabelecido através de estudos colaborativos entre o CIM, INCQS e Bio-Manguinhos, o qual possui albumina em sua composição. A figura 4.72 representa o cromatograma obtido da análise do MR EPOhr na concentração de 18,65  $\mu$ g/mL.

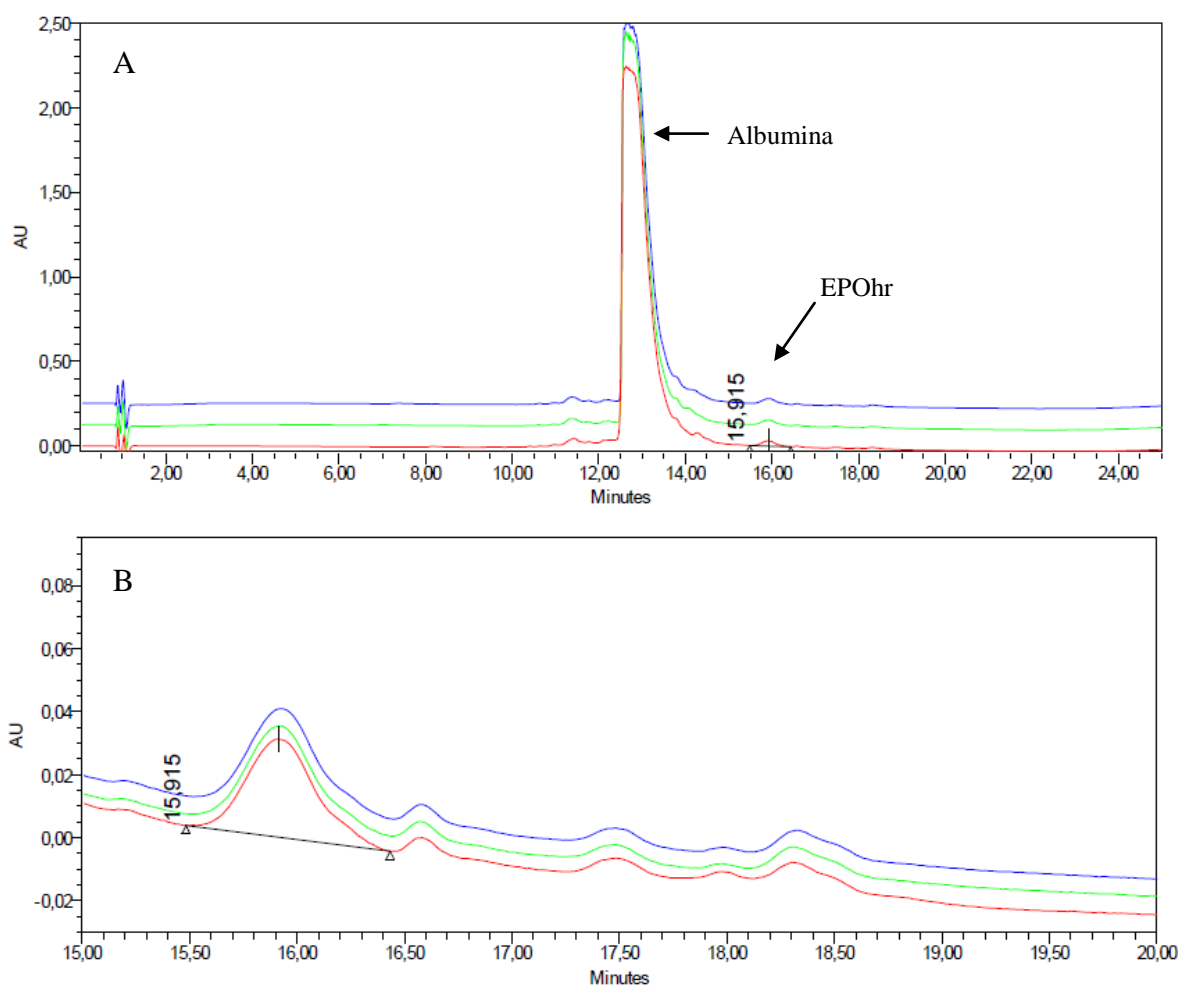


Figura 4.72: Integração dos cromatogramas das réplicas do MR EPOhr em fase reversa(A). Aumento do pico cromatográfico referente a EPOhr (B). Coluna analítica Bakerbond WP C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 100mm, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu\text{L}$ , detecção a 214 nm.

Levando-se em consideração que a área obtida do MR equivale à concentração de 18,65  $\mu\text{g/mL}$ , esta foi relacionada à área obtida pelo LEa com a concentração teórica de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Dessa maneira, pode-se quantificar a amostra em relação ao MR. O cálculo foi feito com três diferentes concentrações do MR e do LEa em  $\mu\text{g/mL}$  relacionando-os com a área obtida (Tabela 4.33).

Tabela 4.33: Concentração do LEa EPOhr ( $\mu\text{g/mL}$ ) relacionada a concentração do MR EPOhr ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Concentração e área MR	Concentração teórica e área LEa	Concentração corrigida LEa
18,65 $\mu\text{g/mL}$ (70,71 Au)	20 $\mu\text{g/mL}$ (69,18 Au)	18,25 $\mu\text{g/mL}$
30 $\mu\text{g/mL}$ (73,87 Au)	30 $\mu\text{g/mL}$ (101,27 Au)	41,13 $\mu\text{g/mL}$
37,3 $\mu\text{g/mL}$ (140,73 Au)	40 $\mu\text{g/mL}$ (137,67 Au)	36,49 $\mu\text{g/mL}$

Como foi utilizado o MR que contém albumina em sua composição, foi realizada uma curva de adição padrão a fim de demonstrar que o excipiente não interfere na análise da EPOhr. Para isso, foi adicionado albumina a diferentes concentrações do LEa EPOhr, tais como: 20  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  e 60  $\mu\text{g/mL}$ . A figura 4.73 demonstra a integração dos cromatogramas das replicatas realizadas com LEa 30  $\mu\text{g/mL}$  com a adição de albumina.

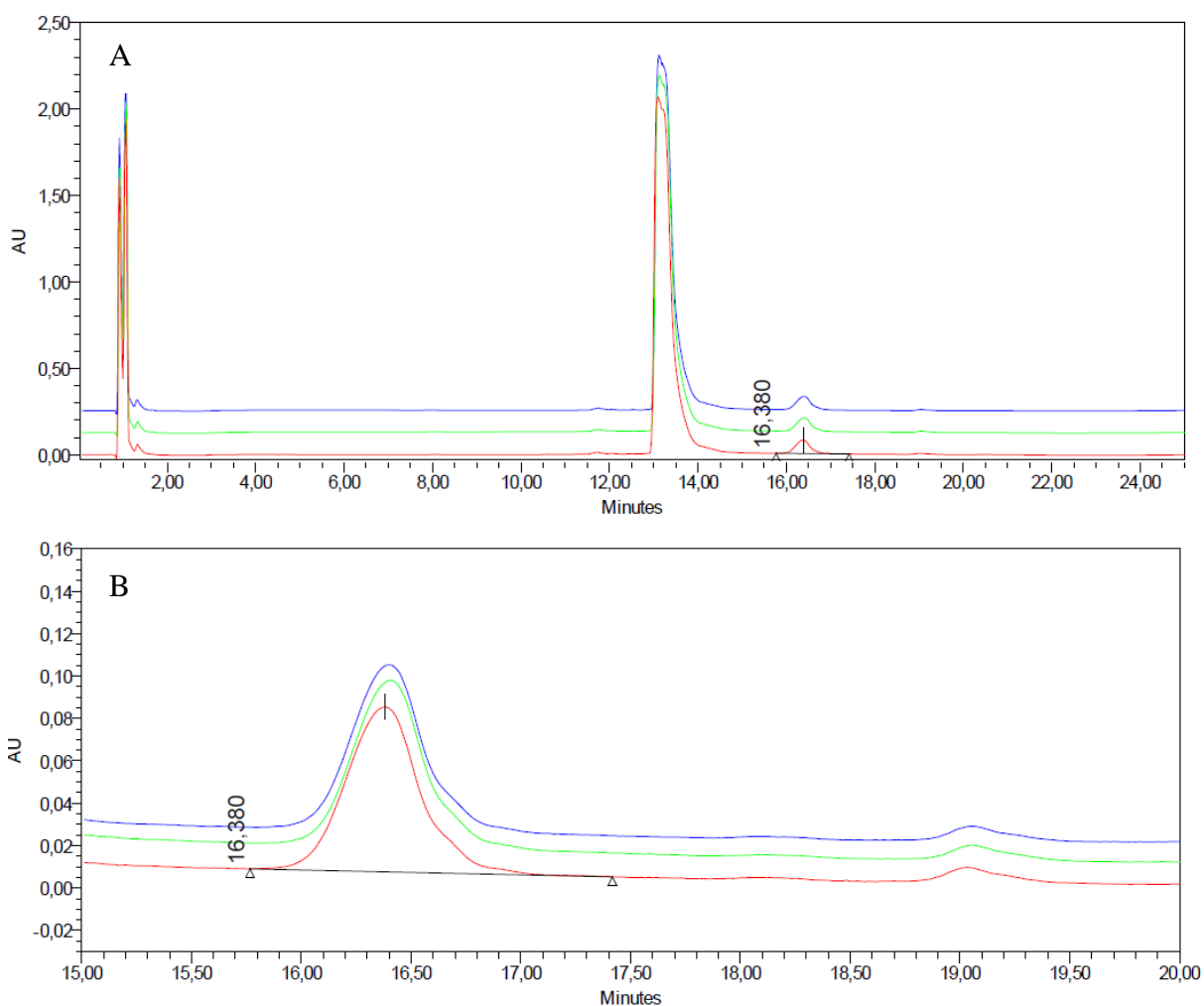


Figura 4.73: Integração dos cromatogramas das réplicas do LEa EPOhr acrescido de albumina em fase reversa(A). Aumento do pico cromatográfico referente a EPOhr (B). Coluna analítica Bakerbond WP C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 100mm, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 100 $\mu\text{L}$ , detecção a 214 nm.

A relação entre a concentração e área obtida através da análise por RP-CLAE é demonstrada no gráfico abaixo (Figura 4.74), o qual evidencia proporcionalidade entre as variáveis, corroborando com a hipótese de que a presença da albumina não interfere na análise da EPOhr.

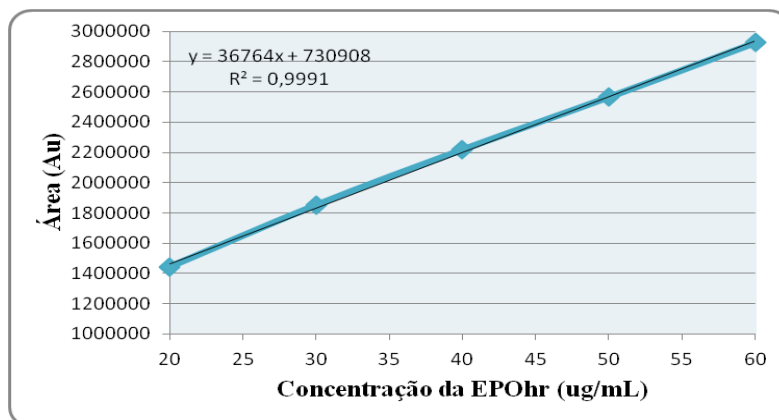


Figura 4.74: Gráfico da área obtida por RP-CLAE *versus* concentração da EPOhr no LÉa acrescido de albumina.

Recentemente, métodos cromatográficos estão sendo desenvolvidos para análise do produto final sem a necessidade de pré-tratamento da amostra, fazendo com que alguns excipientes como albumina e sal não interfiram na análise da proteína (Almeida et al.2012, Rane et al. 2012). Nessa dissertação demonstrou-se a possibilidade de análise da EPOhr na presença de albumina utilizando a coluna C18, pois a adição do excipiente não prejudicou a detecção e a análise da EPOhr, demonstrando dessa maneira a especificidade da técnica. Entretanto, alguns parâmetros tais como o limite de detecção e quantificação ainda precisam ser avaliados, o que deverá ser feito na validação da técnica.

Sendo assim, foi demonstrado a possibilidade de avaliar a homogeneidade do produto final da EPOhr, o qual contém albumina em grandes quantidades na formulação, através da Cromatografia em Fase Reversa, o que não é possível através das técnicas eletroforéticas padronizadas nessa dissertação.

Desta forma, pode-se dizer que a metodologia é reprodutível e atende às necessidades do Controle de Qualidade em Bio-Manguinhos para a análise do percentual de pureza de produto intermediário da EPOhr. Para isso, a metodologia deverá ser validada conforme RE 899 da ANVISA.

## 5-CONCLUSÕES

Com a transferência de tecnologia da alfapoetina advinda do CIM, o estabelecimento de técnicas comuns a ambas instituições para o controle de qualidade deste biofármaco, torna possível os estudos de equivalência do produto transferido. Neste contexto, as metodologias padronizadas e otimizadas nessa dissertação, bem como os resultados obtidos, são devidamente relatados e discutidos com o CIM, a fim de propor a implantação de melhorias e assegurar que as análises do IFA em Bio-Manguinhos serão realizadas em consonância com o CIM.

A utilização de padrões internos de ponto isoeletricos nas análises por focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida aumenta o grau de segurança na identificação das isoformas da EPOhr. Os padrões de pI 3-9 e 2,5-6,0 podem ser utilizados nas análises de IEF-PAGE otimizadas com gradiente de pH específico para EPOhr, todavia é necessário uma reavaliação da quantidade de padrão a ser aplicado por gel, uma vez que o método de revelação com prata é muito sensível.

A utilização do método de revelação com prata automatizado, seguindo a programação do do Kit de coloração, garante melhor reprodutibilidade na visualização das bandas, menor tempo gasto no processo de revelação e maior sensibilidade, o que é observado pela identificação de um maior número de isoformas da EPOhr em relação aos resultados do CIM.

O SDS-PAGE mostrou-se como uma metodologia robusta e com excelente reprodutibilidade, a despeito da característica difusa da banda da EPOhr. A utilização de programas de avaliação de imagens como o ImageMaster (GE healthcare) garantem uma avaliação precisa das bandas da EPOhr e torna possível a utilização desta metodologia não só para avaliação da homogeneidade e determinação de peso molecular, mas também como metodologia de quantificação. A seleção do Padrão de Peso molecular para o SDS-PAGE é fundamental para a determinação precisa do PM da EPOhr, os quais devem se apresentar no intervalo tal que o PM médio da EPOhr deve se localizar na porção central da curva de calibração de PM.

Uma vez estabelecida as condições de análise por CZE os resultados mostraram-se reprodutíveis e confiáveis para o âmbito de controle de qualidade. Além disso, a técnica demonstrou sensibilidade e reprodutibilidade para análise das isoformas da EPOhr.

A técnica de SEC-CLAE em coluna TSK GEL 2500xl demonstrou-se eficaz e reprodutível para análise de agregados na formulação intermediária da EPOhr, bem como para a confirmação da estabilidade da molécula. A RP-CLAE mostrou-se sensível, reprodutível e com a possibilidade de ser aplicada até mesmo na avaliação do produto final da EPOhr. Os problemas observados nessas duas técnicas cromatográficas evidenciam que para o âmbito de controle de qualidade as amostras de EPOhr uma vez dessalinizadas devem ser manipuladas imediatamente, para evitar degradação da glicoproteína analisada.

Apesar de ter sido comprovada a homogeneidade do padrão da Farmacopéia Européia (BRP), este não pode ser utilizado como padrão de referência interno, pois difere da EPOhr do CIM em relação as isoformas presentes e a hidrofobicidade. Por esse motivo, há necessidade de avaliação de um lote candidato a material de referência que seja comum as Instituições.

O presente estudo nos permite concluir que se faz necessário uma combinação de metodologias para uma completa avaliação do biofármaco alfapoetina, uma vez que estes ensaios não provem informação suficiente separadamente. Deste modo, métodos baseados em separação por diferença de carga líquida (IEF-PAGE, CZE), peso molecular (SEC-CLAE e SDS-PAGE) e hidrofobicidade (RP-CLAE) a serem implantados na rotina do Controle de Qualidade em Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, permitirão uma adequada análise do IFA EPOhr quanto a sua homogeneidade e caracterização físico-química.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agilent Technologies. **CE Primer - High Performance Capillary Electrophoresis**, 2009

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

Alahmad Y., Tran N.T., Taverna M. **Capillary Electrophoresis of Carbohydrates From Monosaccharides to Complex Polysaccharides**. Humana Press, 2011, pp. 173–204.

Allon M. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of darbepoetin alfa and epoetin alfa in patients undergoing dialysis**. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2002, v.72, p 546-555.

Amadeo, G. I., Moreira, R., Lima, R., Teixeira, D., Kratje, R., Etcheverrargaray, M. **Screening of Lectins from South American Plants Used as Affinity Ligands to Purify rhEPO**. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2003; v. 20, n. 1 (Jan), pp. 21-26.

ANVISA. Resolução- RE nº 899, de 29 de maio de 2003

ANVISA. **Guia para qualidade em química analítica: uma assistência a acreditação**. Brasília, 2004. 76 p. (Série Acreditação, 1).

Anvisa. **Nota técnica sobre produtos biológicos** [on line]. 2011 [capturado em 21 de março de 2011] Disponível em: [www.portalanvisa.org.br/J:\Nota+Tecnica+sobre+produtos+Biologicos.mht](http://www.portalanvisa.org.br/J:\Nota+Tecnica+sobre+produtos+Biologicos.mht).

Barbosa J., Sanz-Nebot V., Benavente F., Giménez E. **Characterization of Glycoproteins by Capillary Electrophoresis Electrospray Mass Spectrometry (CE-ES-MS). Applications to Diagnosis in Biomedicine**. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 2006, 31, 63-69.

Barth,T., Oliveira, P.R., Davila, F.B., Dalmora,S.L. **Validation of the normocythaemic mice bioassay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations**. *Journal of Aoac International*, 2008; v. 91, p. 285-291.



Behr-Gross M.E, Daas A. e Bristow A.F. **Collaborative Study for the Establishment of Erythropoietin BRP Batch.** Pharmeuropa Bio, 2007; pp23-33

Benghanem, A., Winchenne, J. J., Lopez, C., Chrétien, S., Dubarry, M., Craescu, C. T., Le Caer, J. P., Casadevall, N., Rouger, P., Cartron, J. P., Lambin, P. **Purification and Biological Activity of a Recombinant Human Erythropoietin Produced by Lymphoblastoid Cells.** Preparative Biochemistry, 1994, v. 24, n. 2, pp. 127-142.

Bento, R.M.A. *et al.* **Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão.** Rev Bras Med Esporte, 2003 Vol. 9, Nº 3.

Berglung, B. & Ekblom B. **Effect of recombinant human erythropoietin administration on blood pressure and some hematological parameters in healthy males.** Int. J. Sports Med. 1991, 229, p-125-130.

Bietlot H., Girard M. **Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high-performance capillary electrophoresis.** Journal of Chromatography A, 1997, 759 177-184

Bill, R. M., Flitsch, S. L., Bicknell, R. **COS-1 Cell Expression and Onestep Affinity Protein Purification and Activity of Epitope-tagged Human Erythropoietin and of Site-directed Mutants.** Biochimica et Biophysica Acta, 1997; v. 1340, n. 1 (Jun), pp. 13-20.

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

Bio-Manguinhos. Fiocruz. **Biofármacos: quem é quem?** BioNotícias, agosto/setembro 2008, no37, 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, no 40, p. 4-5.

Birchard K. **Past, present, and future of drug abuse at the Olympics.** Lancet 2000;356:1008.

Bonsdorff, E. & Jalavisto, E. **A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis.** Acta Physiol. Scand, 1948; 16,p-150-170.

Boucher S., Kane A., Girard M. **Qualitative and quantitative assessment of marketed erythropoiesis-stimulating agents by capillary electrophoresis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012 207– 213

Brasil. **Farmacopeia Brasileira.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. Vol. 2546p.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 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 Nº 315, de 26 de outubro de 2005.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, 24 de outubro de 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, 19 de abril de 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 55, de 16 de dezembro de 2010.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, 13 de dezembro de 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 49, de 20 de setembro de 2011.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, 19 de setembro de 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 53, de 19 de outubro de 2011.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, 18 de outubro de 2011.

Brinks, V., Hawe, A., Basmeh, A., Schellekens, H. **Quality of original and biosimilar epoetin products.** Pharm Res, 2010, 28:386-393.

Broudy, V. C., Tait, J. F., Powell, J. S. **Recombinant Human Erythropoietin: Purification and Analysis of Carbohydrate Linkage.** Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988; v. 265, n. 2 (Sep), pp. 329-336.

Burns, S., Arcasoy, M. O., Li, L., Kurian, E., Selander, K., Emanuel, P. D., Harris, K. W. **Purification and Characterization of the Yeast-expressed Erythropoietin Mutant Epo (R103A), a Specific Inhibitor of Human Primary Hematopoietic Cell Erythropoiesis.** Blood, 2002; v. 99, n. 12 (Jun), pp. 4400-4405.

Carnot, P. & De Flandre, C. **Sur L' activité hematopoiétique dès différents organes au cours de la régénération du sang.** C.R. Acad. Sci., 1906; Paris, 143, p-432.

Casadevall, N. **Antibodies against EPOhr: native and recombinant.** Nephrol. Dial. Transplant, 2002; 17, 42–47.

Catlin DH & Hatton CK. **Use and abuse of anabolic and other drugs for athletic enhancement.** Adv Intern Med 1991;36:399-424.

Chateauvieux, S., Grigorakaki, C., Morceau, F., Dicato, M., Diederich, M. **Erythropoietin, erythropoiesis and beyond.** Biochemical Pharmacology, 2011, 1291–1303

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

Chuan L & Robinson D. K. **Industrial choices for protein production by large-scale cell culture.** Current Opinion in Biotechnology, 2001; 12:195-201.

Chung, B. S., Jeong, Y. T., Chang, K. H., Kim, J. S. **Effect of Sodium Butyrate on the Glycosilation of Recombinant Erythropoietin.** Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001; v. 11, n. 6 (Dec), pp. 1087-1092.

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; 2006.

Cooper , M.S. **Quality control in the pharmaceutical industry.** New York: Academic Press, 1979. 245p

Cotes, P.M. **Erythropoietin: The developing story.** Br. Med.J. 226 (6625), 1988; p-805-806.

Crespo, Y. **Identidade mediante eletroforese desnaturalizante em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western Blot.** Laboratório de Bioquímica, 2010.

Dabek-Zlotorzynska, & Timerbaev, A.R. **Capillary electrophoresis: the stateof-the-art in metal speciation studies.** Analytica Chimica Acta, 1998. 359: 1–26.

Damm, J. B. L. **The Application of Glycobiology for the Generation of Recombinant Glycoprotein Therapeutics.** Bioseparation and Bioprocessing: a Handbook, 1998; vol. II, cap 5, 1ª ed.

Derby, P.L., Strickland, T.W., Rohde, M.F. **Identification of the residues involved in homodimer formation of recombinant human erythropoietin.** *Int. J. Pept. Protein. Res.*, 1996, v.47, n.3, p-201-208.

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

Dordal, M.S., Wang, F.F., Goldwasser, E. **The role of carbohydrate in erythropoietin action.** *Endocrinology*, 1985; 116, p-2293-2299.

Dubé, S., Fisher, J.W., Powell, J.S. **Glycosylation at specific sites of Erythropoietin is essential for Biosynthesis, Secretion, and Biological function.** *J. Biol. Chem.*; 1988; 263 (33), p-17516-17521.

Erslev, A.J. **Humoral regulation of red cell production.** *Blood*, 1953; 8, p-349-357.

Eschbach, J.W., Adamson, J.W. **Anemia of end stage renal disease (ESRD).** *Kidney Int.* 28, 1,1985.

European Pharmacopoeia 7.0. **Erythropoietin concentrated solution.** França: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2007; 1813-7.

Fisher, J.W. & Birdwell, B.J. **The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused Kidney.** *Acta Haematol.*, 1961; 26, p-224-232.

Fisher, J.W. **Pharmacologic Modulation of Erythropoietin Production.** *Ann. Rev. pharmacol. Toxicol.*, 1988; 28, p-101-122.

Frede S, Freitag P, Geuting L, Konietzny R, Fandrey J. **Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC.** *Blood* 2011;117:4905–14.

Frutos M., Cifuentes A., Diez-Masa J.C. **Differences in capillary electrophoresis profiles of urinary and recombinant erythropoietin.** *Electrophoresis* , 2003, 24, 678–680.

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.

Fu-Tai A.C., Thomas S.D., Ramon A.E. **Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis.** *Glycobiology*, 1998, vol. 8 no. 11 pp. 1045–1052.

Gild, D., Riedl, B., Zier, A.; Zimmermann, M.F. **Analytical methods for characterization and quality control of Pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an exemple.** *Pharmac. Acta Helvetiae*, 1996; 71, p-383-394.

Girard M., Puertab A., Diez-Masab J.C. **High resolution separation methods for the determination of intact human erythropoiesis stimulating agents. A review.** *Analytica Chimica Acta*, 2012, 7– 22.

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.

Goldwasser E. **Control of Cellular Division and Development.** Liss Inc., New York, 1991, pp. 487–494.

Gore C.J., Parisotto R., Ashenden M.J., Stray-Gundersen J., Sharpe K., Hopkins W . **Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes.** *Haematol*, 2003; Mar vol. 88no. 3 333-344

Gowen , A.A., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., Bell, S.E.J. Recent applications of chemical imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, vol. 69, 10-22.

Griffiths, E. **In polypeptide and proteins drugs production, characterization and formulation England.** Ellis Horwwod, 1991.

Grigorakaki C, Morceau F, Chateauvieux S, Dicato M, Diederich M. **Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of erythropoiesis involves GATA-1/ GATA-2 balance impairment and PU.1 over-expression.** *Biochem Pharmacol* 2011;82:156–66.

Grunwal, P. **Neue Horizonte in der Biotechnologie.** *Nachr. Chem. Tech. lab*, 1995. 43, p-1292-1297.

Guo-Hua, Z., Guo-An, L., Yong, Z., Ke-yu, Z., Xiao-Dano, Z., Le-Qun, H. **Application of capillary electrophoresis, liquid chromatography, electrospray-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization-tiume off light-mass spectrometry to the characterization of recombinant human erythropoietin.** *Electrophoresis*, 1998, 2348-2355.

Halstenson, C.; Mark M.; Stephen A.; James R.; Masakazu W.; Joseph T.; Paul A. **Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta.** *Clinical Pharmacology and Therapeutics* (1991) **50**, 702–712.

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

Hartmann, Eval. **Comparison of reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for the separation of amphipathic  $\alpha$ -helical peptides with L- and D-amino acid substitutions in the hydrophilic face.** *Journal of Chromatography*, 2003, v. 1009, p. 61-71,

Hermeling S.J., Jiskoot W., Crommelin D.J., Schellekens H. **Reaction to the paper: interaction of polysorbate 80 with erythropoietin: a case study in protein-surfactant interactions.** *Pharm Res.*, 2006, 23:641-642

Hjort, E. **Reticulocyte increase after injection os anemic serum.** *Norsk Mag. F. Laegevidensk*, 1936; v.97, p-270-277.

**ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(r1)** Current *step 4* version parent guideline,1994 (complementary guideline on methodology dated 6 november 1996 incorporated in november 2005)

Inoue, N., Wada, M., Takeuchi, M. **An Improved Method for the Purification of Human Erythropoietin with High In-Vivo Activity from the Urine of Anemic Patients.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1994; v. 17, n. 2 (Feb), pp. 180-184.

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. **Eritropoetina humana recombinante: [alfaepoetina humana recombinante]: monografia do produto.** Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos; 2011. 20p.

Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W., Plzak, L. **Role of the Kidney in erythropoiesis.** *Nature*, 1957; 170, p-633-634.

Jorgenson, J. W. & Lukacs K. D. **Zone Electrophoresis in Open-tubular Glass Cappilaries.** *Anal. Chem.*, 1981.

Joyner M.J. **Second generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes: effective but not preventive?** *Haematologica/the hematology journal*, 2004; 89 39-41|

Khafagy & Morishita M. **Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 531–539.

Kaltashov I.A., Bobst, C.E., Abzalimov R. R., Wang G., Baykal B., Wang S. **Advances and challenges in analytical characterization of biotechnology products: Mass spectrometry-based approaches to study properties and behavior of protein therapeutics.** *Biotechnology Advances*, 2012, 210–222.

Kannamkumarath, S. **Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis.** *J. Chromatogr.*, 2002; 975:245-266.

Kinoshita, M.; Murakami, E., ODA, Y. **Comparative studies on the analysis of glycosylation heterogeneity of sialic acid-containing glycoproteins using capillary electrophoresis.** *J. Chromatogr. A*, 2000; v. 899, p-261-271.

Kishino, S & Miyazaki, K. **Separation Methods for Glycoprotein Analysis and Preparation.** *Journal of Chromatography B*, 1997; v. 699, n. 1-2 (Oct), pp. 371-381.

Kratje, R.; Amadeo, I.; Oggero, M.; Zenclussen, M.; Robles, L. **A single monoclonal antibody as probe to detect the entire set of native and partially unfolded rhEPO glycoforms.** *Journal of Immunological Methods* vol. 293 issue 1-2 October, 2004. P. 191-105.

Krundieck, N. **Erythropoietic substance in the serum of anemic animals.** *Proc. Soc. Espl. Biol. Med.*, 1943; v.54, p 14-17.

Kuhn, R. & Hoffstetter-Kuhn S. **Capillary Electrophoresis: Principles and Practice.** Springer Laboratory, Berlin, 1993.

Kumpalume P. & Ghose S. **Chromatography: The High Resolution Technique for Protein Separation.** In: Hatti-Kaul R, Mattiasson B. (eds), *Isolation and Purification of Proteins*, 2003 1<sup>st</sup> ed, chapter 6, New York, Marcel Dekker.

Kuratowska, Z., Lewartowski, B, Michalak, E. **Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs.** *Blood*, 1961; 18, p-527-534.

Lacombe, C. & Mayeux, P. **The molecular biology of erythropoietin.** *Nephrol. Dial.*, 22, 1999.

Ladisch MR. **Bioseparations Engineering: Principles, Practice and Economics**. New York, John Wiley & Sons, 2001 1<sup>a</sup> ed.

Laemmli, V. K. **Cleavage of structural during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, 1970; 227: 680-685.

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

Lamb DH, Lei QP, Hakim N, Rizzo S, Cash P. **Determination of meningococcal polysaccharides by capillary zone electrophoresis**. *Anal Biochem* 2005; 15;338(2):263-9.

Lamon S., Robinson, N., Saugy, M. **Procedures for monitoring Recombinant Erythropoietin and analogs in doping**. *Endocrinol metab Clin*, 2010, 141-154.

Lasne F. & Ceaurriz J. **Recombinant erythropoietin in urine**. *Nature* 2000;405:635.

Lasne, F., Martin L., Crepin N., Ceaurriz J., **Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in anti-doping control**. *Anal. Biochem*, 2002; 311/119–126.

Lee, G. M., Kim, E. J., Kim, N. S., Yoon, S. K., Ahn, Y. H., Song, J. Y. **Development of a Serum-free Medium for the Production of Erythropoietin by Suspension Culture of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells Using Statistical Design**. *Journal of Biotechnology*, 1999; v. 69, n. 2-3 (Apr), pp. 85-93.

Lehninger AL, Nelson D L, Cox MM. **Principles of biochemistry**. 4th ed. Nova Iorque: W. H. Freeman; 2004.

Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H.. **Cloning and expression of the human erythropoietin gene**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1985, 82-7580.

Llop, E., Gutiérrez-Galego, R., Segura, J., Mallorquí, J., Pascual, J.A. **Structural analysis of the glycosylation of gene-activated erythropoietin**. *Analytical Biochemistry*, 2008, 243-254.



Ludwig, H., Fritz, E., Kotzmann, H., Hocker, P., Gisslinger, H., Barnas, U. **Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma.** N. Engl. J. Med., 1990; 322, 1693–1699.

MacPhee D.J. **Methodological considerations for improving Western blot analysis.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2010, 171–177

Marie, E. V.; Audran, M.; Lejeune, M.; Bonafoux, B.; Sicart, M.T.; Marti, J.; Piquemal, D.; Commes, T. **Analysis of human reticulocyte genes reveals altered erythropoiesis: potential use to detect recombinant human erythropoietin doping.** Haematologica 2004; 89(8): 991-997.

Miller, C., Plataniias, L., Mills, S., Zahurak, M., Ratain, M., Ettinger, D., Jones, R. **Trial of erythropoietin in the treatment of cisplatin-associated anemia.** J. Natl. Cancer Inst., 1992; 84, 98–103.

Miyake, T., Kung, C.K.H., Goldwasser, E. **Purification of human erythropoietin.** J.Biol.Chem., 1977; 252, p-5558-5564.

Montgomery, D. C. Design and Analysis of Experiments. Wiley, 2008.

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

Mosaabadi J.M. **Improving purification of recombinant human interferon expressed in *Escherichia coli*; effect of removal of impurity on the process yield.** Protein Expression & Purification, 2006; 51:147.

NCBI. National center for biotechnology information. **Bookshelf: Essentials of Glycobiology** [on line]. Bethesda, EUA; 2011 [capturado em 10 nov. 2011] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch8&rendertype=figure&id=ch8.f8>

Nett, J.H., Gomathenayagem, S., Hamilton, S., Gosg, B., Davidson, R.C. **Optimization of erythropoietin production with controlled glycosylation PEGylated erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris*.** Journal of Biotechnology, 2011, 198-206.

Peixoto M.M *et al.* **Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana-BA.** Revista Pharmacia Brasileira, 2005; 9(47): 69-73.

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

Poitevin M., Morin A., Busnel J.M., Descroix S., Hennion M.C., Peltre G. **Comparison of different capillary isoelectric focusing methods - use of "narrow pH cuts" of carrier ampholytes as original tools to improve resolution.** Journal of Chromatography A, 2007; 1155 230–236

Quelle, F. W., Caslake, L. F., Burkert, R. E., Wojchowski, D. M. **High-level Expression and Purification of a Recombinant Human Erythropoietin Produced Using a Baculovirus Vector.** Blood, 1989; v. 74, n. 2 (Aug), pp. 652-657

Rane S., Ajamerib A., Modyb R., Padmaja P. **Development and validation of RP-CLAE and RP-UPLC methods for quantification of erythropoietin formulated with human serum albumin.** Journal of Pharmaceutical Analysis, 2012;2(2):160–165

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.

Reichel C., Kulovics R., Jordan V., Watzinger M., Geisendorfer T. **SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: benefits and limitations of the method for application in doping control Drug Test.** Analysis, 2009, 1, 43–50

Reisinger, V. & Eichacker, L. A. **Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE.** Journal of proteomics, 2008, 277–283

Ribani, M.; Bottoli, C.; Collins, C.; Jardim, I.; Melo, L. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, 2004, v. 27, n.5, p.771-780,

Righetti P.G. **Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing.** Journal of Chromatography A, 1037, 2004, 491–499

River L, Saugy M. **Peptides hormones abuse in sport: state of the art in the detection of growth hormone and erythropoietin.** J Toxicol-Toxin Reviews, 2003.

Roche. **Biofármacos** [online]. Brasil; 2007. [capturado em 30 de maio de 2007] Disponível em: <http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD2-8951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf>

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 C.A., Codevilla C.F., Fronza M., Casali R.G., Dalmora S.L. **Physico-chemical characterization and biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products.** *Lat Am J. Pharm* 2003; 22 (4): 343-50.

Segrest J.P., Jackson R.L. **Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate.** *Methods Enzymol*, 1972; 28: 54-63.

Skibeli V, Nielsen-Lie G, Torjesen P. **Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin.** *Blood* 2001;98:3626-34.  
Silva Junior J.G. **Cromatografia de proteínas – guia teórico e prático.** Rio de Janeiro:InterCiência; 2004; 1ª ed.

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

Srinivas R. Gunturi A, Ghobrial I, Sharma B. **Development of a sensitive size exclusion CLAE method with fluorescence detection for the quantitation of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) aggregates.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 2007, 213–221.

Storring, P.L, Tiplady, R.J., Gaines Das, R. E., Stenning, B.E.; Lamikanra, A.; Rafferty, B., Lee, J. **Epoetin Alfa and Beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties.** *British J. of Hematol.* 1998; 100, p-19-89.

Tanaka, T., Nangaku, M. Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents. *Experiemental Cell Research*, 2012.

Tavares, MFM. **Eletroforese capilar: conceitos básicos.** *Química Nova*, 19: 176-181, 1996.

Tiselius, A. **The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins.** Tese de Doutorado, University of Uppsala, Suécia, 1930.

Triola, M. F. *Introdução à estatística (Vol. 10).* Rio de Janeiro: LTC, 2005.

U.S. Food and Drug Administration. New Hampshire Avenue. Silver Spring, MD 20993 Ph. 1-888-INFO-FDA (1-888-463-6332).

Veiga M., Bohrer D. Noremberg S., Nascimento P.C., Carvalho L.M. **Evidence for aluminum-binding erythropoietin by size-exclusion chromatography coupled to electrothermal absorption atomic spectrometry.** Journal of Inorganic Biochemistry 105, 2011, 1500–1504

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

Wang M. D., Yang, M., Huzel, N., Butler, M. **Erythropoietin Production from CHO Cells Grown by Continuous Culture in a Fluidized-Bed Bioreactor.** Biotechnology and Bioengineering, 2002; v. 77, n. 2 (Jan), pp. 194-203.

Ward, W.W. & Cormier, M.J. **An Energy Transfer Protein in Coelenterate Bioluminescence: Characterization of the *Renilla* Green- Fluorescent Protein.** J. Biol. Chem., 1979, 254, 781-88.

Ward , W.W. & Swiatek G. **Protein Purification.** Current Analytical Chemistry, 2009; 1573-4110/09.

Werner R. G. **Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals.** Journal of Biotechnology, 2004; 113:171-182.

Wilczynska J. D., Roman I., Anuszevska E. **The Separation of EPO from other proteins in medical products formulated with different stabilizers.** Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research, 2005 - Vol. 62 No. 3 pp. 177n182.

World Health Organization- Forty-fifth report of the WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. Geneva (Switzerland); 2011, 440p.

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.

Yoshiyuki Endo, Hiroshi Nagai, Yoshihiko Watanabe, Kiyoshige Ochi, Toshio Takag. **Heat-Induced Aggregation of Recombinant Erythropoietin in the Intact and Deglycosylated States as Monitored by Gel Permeation Chromatography Combined with a Low-Angle Laser Light Scattering Technique.** J. Biochem., 1992 - 112, 700-706

Zanette, D., Soffientini, A., Sottani, C., Sarubbi, E. **Evaluation of Phenylboronate Agarose for Industrial-scale Purification of Erythropoietin from Mammalian Cell Cultures.** Journal of Biotechnology, 2003; v. 101, n. 3 (Mar), pp. 275-287.

Zhang J, Chakraborty U, Villalobos AP, Brown JM e Foley JP. **Optimization and qualification of capillary zone electrophoresis method for glycoprotein isoform distribution of erythropoietin for quality control laboratory.** J Pharm Biomed Anal, 2009, 50: 538-43.

Zhang Y., XiongY., Mahmood A., Meng Y., Schallert T., Chopp M. **Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit.** Brainresearch, 2009, 153–164.