

B2 Avaliação da homogeneidade da eritropoetina humana recombinante através de métodos Farmacopeicos

Ingrid Pinheiro de Medeiros¹, Hilton Jorge do Nascimento¹, Camila Faia de Sá¹, Eduardo da Silva Gomes¹, Melissa Chamon Alves Premazzi¹, Carina Cantelli Pacheco de Oliveira¹, Darcy Akemi Hokama¹, Daniel da Silva Guedes Jr.¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: 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.

Objetivo: Dentre as metodologias preconizadas pela Farmacopéia Européia (F.E.) para análise da homogeneidade da EPOhr, destacam-se IEF, CZE, SDS-PAGE, SEC-HPLC e RP-HPLC. O objetivo do estudo foi avaliar a homogeneidade da EPOhr através das técnicas preconizadas, bem como otimizar tais metodologias, visando ao controle de qualidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) da EPOhr em Bio-Manguinhos.

Metodologia: As análises foram realizadas utilizando-se as amostras IFA de EPOhr e a Preparação de Referência Biológica (BRP) da F.E. Foi utilizado para IEF uma combinação de anfólitos que gera um gradiente de pH ácido, 4 µg da EPOhr dessalinizada e coloração automatizada com nitrato de prata. A análise CZE foi realizada usando os parâmetros descritos na metodologia proposta pela F.E. ajustando-se temperatura, pressão, tempo de injeção e a concentração da amostra. Para a SDS-PAGE foi utilizada gel de poliacrilamida a 12,5% e coloração rápida com azul de coomassie. Para as análises cromatográficas foi ajustado a coluna analítica, fluxo, eluentes e gradiente de eluição. Em SEC-HPLC foi utilizada coluna analítica Gel de TSK G2500 e RP-HPLC foi usada a Vydac C8 e Bakerbond WP octadecil com um fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção.

Resultados: Em IEF evidenciou-se a presença de oito isoformas principais, e o pI estimado de 6,43 a 4,12. A percentagem de cada uma das isoformas foi calculada e comparada com o limite definido pela F.E. e pelo CIM, havendo concordância de resultados entre as réplicas. Uma vez estabelecidas as condições de análise por CZE, a técnica demonstrou sensibilidade e reprodutibilidade, sendo detectadas oito isoformas em eletroferogramas de alta resolução. A SDS-PAGE demonstrou ser como uma metodologia robusta e com excelente reprodutibilidade. As amostras são homogêneas e a média do PM encontrado foi de 34kDa. Em SEC-HPLC e RP-HPLC as amostras apresentaram um pico com tempo de retenção e área equivalentes

entre as réplicas. Foi possível definir o limite de quantificação e detecção. A análise foi realizada com a metade do tempo gasto pelo que é descrito pela F.E e CIM. A integração dos picos cromatográficos demonstra percentagem de pureza de acordo com as especificações.

Conclusão: Os métodos otimizados permitirão uma análise adequada do IFA de EPOhr quanto à homogeneidade e caracterização físico-química e deverão ser implementados na rotina do controle de qualidade a partir da produção do biofármaco em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Palavras-Chave: Qualidade, Homogeneidade, Eritropoetina