

**INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE
EM SAÚDE/FIOCRUZ**

**CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA
QUALIDADE DE PRODUTOS, AMBIENTES E SERVIÇOS
VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE CONTROLE DE
QUALIDADE DE BIOMEDICAMENTOS DE TECNOLOGIA
DNA RECOMBINANTE DE USO HUMANO**

SINÉA MENDES DE ANDRADE

ORIENTADOR: Prof. Filipe Soares Quirino da Silva

**MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL EM QUALIDADE DE
PRODUTOS EM SAÚDE**

RIO DE JANEIRO / RJ: março/2007

SINÉA MENDES DE ANDRADE

**Avaliação de Metodologias de Controle de Qualidade de
Biomedicamentos de Tecnologia DNA Recombinante de
Uso Humano**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária como requisito parcial à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ.

Orientador: Prof. Filipe Soares Quirino da Silva.

RIO DE JANEIRO, 2007.

SINÉA MENDES DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE CONTROLE DE
QUALIDADE DE BIOMEDICAMENTOS DE TECNOLOGIA
DNA RECOMBINANTE DE USO HUMANO**

Esta monografia foi julgada adequada à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária e aprovada em sua forma final pelo Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ.

Rio de Janeiro, 09 de março de 2007.

Prof. Dr. Marcio Labastie
INCQS/FIOCRUZ/MS

Prof. Dr. Isabella Fernandes Delgado
INCQS/FIOCRUZ/MS

Prof. Filipe Soares Quirino da Silva
INCQS/FIOCRUZ/MS

Prof. Wilson Camargo (Suplente)
INCQS/FIOCRUZ/MS

FICHA CATALOGRÁFICA

1.1.1.1 Andrade, Sinéa Mendes. Avaliação de Metodologias de Controle de Qualidade de Biomedicamentos de Tecnologia DNA Recombinante de Uso Humano / Sinéa Mendes de Andrade. Rio de Janeiro: FIOCRUZ / INCQS, 2007.

x, 73 f. : il. ; tab. 31 cm.

Orientador: Filipe Soares Quirino da Silva

Monografia (lato senso) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007.

1. Produtos DNA recombinante. 2. Vigilância Sanitária – Tese. Avaliação de Metodologias de Controle de Qualidade de Biomedicamentos de Tecnologia DNA Recombinante de Uso Humano I. Silva, Filipe. II. Fundação Oswaldo Cruz, INCQS, Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária. III. Título. Quality control methodologies evaluation of recombinant DNA technology biopharmaceuticals for human use

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Andrade, Sinéa. (2007). Avaliação de Metodologias de Controle de Qualidade de Biomedicamentos de Tecnologia DNA Recombinante de Uso Humano. Monografia de Projeto Final em Qualidade de produtos em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 73 p.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela alegria de viver.

Aos meus filhos Flavia e Bruno, e ao meu marido, Flávio, pela compreensão e estímulo na continuidade desta meta;

Aos meus pais, pelo incentivo de toda uma vida ao meu crescimento como pessoa;

Ao meu orientador, Filipe, pela absoluta presença nesta tarefa, com empenho em me fazer completar este objetivo;

À Cláudia, colega de trabalho e amiga, que partilha comigo a tarefa de alcançar este degrau;

À todos os colegas e amigos do Departamento de Química pelo apoio constante;

Ao INCQS, por possibilitar o meu crescimento profissional.

“Devo tudo que sou a todos”

Moacir Scliar

RESUMO

Na década de 70, o advento da tecnologia DNA recombinante veio a impactar a produção de proteínas e peptídeos de interesse farmacêutico. A possibilidade de introdução de genes que codificam proteínas em bactérias foi o início de uma nova era nas ciências farmacêuticas. Proteínas endógenas, de difícil obtenção, cultivadas em linhagens celulares adequadas, foram produzidas em quantidade e com características que favoreciam a atividade biológica desejada e a pureza necessária que garantia o uso terapêutico.

O desenvolvimento da biologia molecular e avanços tecnológicos ampliaram o conhecimento sobre estrutura das proteínas, levando a grande produção de novos biomedicamentos, com especial ênfase na implementação de técnicas adequadas ao estudo destes novos produtos.

A necessidade do controle de qualidade dos biomedicamentos recombinantes, fez com que os órgãos regulatórios estipulassem monografias com parâmetros que garantissem a eficácia e segurança do uso.

Metodologias analíticas utilizadas para medicamentos sintéticos, foram ajustadas ao uso das complexas proteínas, como os métodos espectroscópicos, cromatográficos e eletroforéticos, buscando caracterizar a identidade da proteína. Farmacopéias internacionais, como a americana e européia definem em monografia de produtos de origem DNA recombinante todos os aspectos que devem ser controlados, desde a manipulação genética em que se garanta a identidade da proteína a ser produzida, até o bulk. As formulações finais, em que são adicionados os excipientes não são contempladas.

No Brasil, o INCQS, órgão de controle, as análises são realizadas seguindo parâmetros oficiais, quando estes não existem, são acatadas as especificações dos produtores. Devido a grande diversidade de produtos DNA recombinantes e ao mesmo tempo, cada produto ter um perfil único, é necessário à existência de

normas oficiais que contemplem o uso de metodologias cuja sensibilidade seja adequada para garantir a identidade, e acessibilidade de obtenção e manutenção.

É objetivo deste trabalho, a inclusão de proposta de monografia dos produtos biotecnológicos na Farmacopéia Brasileira, que contemple a caracterização molecular, quantificação do teor, com definição dos ensaios a serem realizados considerando as especificidades de cada biomedicamento.

Palavras-chave: Biomedicamentos 1, controle de qualidade 2, proteínas recombinantes terapêuticas 3.

ABSTRACT

In the seventies, the development of recombinant DNA technology caused a great impact on the production of proteins and peptides for pharmaceutical use. Since that time these molecules could be produced in large amounts with high purity.

More knowledge about proteins was also acquired, especially on three-dimensional structure and analytical techniques for sequence analysis and purity determination.

New products needed new regulatory definitions. National authorities from USA and European Union countries and pharmacopoeias determined rigid parameters for the production of some of these medicines in order to establish their efficacy and safety. All the aspects must be controlled, from the protein genetic manipulation, with the guarantee of its identity, to the bulk preparation. In many drugs there is no official monograph for final product.

INCQS, the Brazilian Official Quality Control Laboratory, follows the pharmacopoeia requirements. Brazilian Pharmacopoeia has monographs only for insulin and somatropin. However, for products that do not have these specifications, INCQS follows those used by the manufacturers.

In this monograph, we aimed at reviewing the scientific literature on protein analysis and comparing it to the different official recommendations for biopharmaceuticals. This will enable us to propose, to the Brazilian Pharmacopoeia, changes and suggestions for monographs of new products.

Key words: 1-biopharmaceuticals, 2-quality control, 3- therapeutical recombinant proteins.

SIGLAS e ABREVIATURAS

μM – Micromol

μ_{ep} – Mobilidade eletroforética

μ_{H} – Micro hertz

3D – Tridimensional

Å – Angstrom

aa – Aminoácido

ACN – Acetonitrila

AcONa – Acetato de sódio

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATZ - Anilinoiazolina

BHK – Rins de filhote de hamster

BSA – Soro albumina bovina

BSE – Encefalite espongiforme bovina

C^{13} – Carbono 13

cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar

CHO – Ovário de hamster chinês

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-FR – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa

DC – Dicroísmo circular

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E – Intensidade de campo elétrico

E. coli – *Escherichia coli*

EC – Eletroforese Capilar

EM – Espectroscopia de Massas

EP - European Pharmacopoeia
EPO –Eritropoetina
ESI – Electron spray ionization
EUA – Estados Unidos da América
FB – Farmacopéia Brasileira
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FSH – Hormônio folículo estimulante
GGMed – Gerência Geral de Medicamentos
GP – Glicoproteínas
H₂O - Água
hGH – Hormônio de crescimento humano
HPAEC – PAD - Cromatografia de alta pressão de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada.
HPIEC – Cromatografia de alta pressão de troca iônica
HPSEC – Cromatografia de alta pressão de exclusão de tamanho
HSA – Soro albumina humana
IEF – Focalização isoelétrica
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INF- α – Interferon alfa
INF- γ – Interferon gama
kDa - Quilodalton
MALDI-TOF – Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
mM - Milimolar
MS – Ministério da Saúde
N¹⁵ – Nitrogênio 15
NaOH – Hidróxido de sódio
ng – nanograma
NH₄⁺ - Amônia
NIST – National Institute of Standards and Technology
nm – Nanômetro
nPrOH – n-propanol

O₂ - Oxigênio
Oligos – Oligossacarídeos
pH – Potencial de hidrogênio
PITC - Fenilisotiocianato
pmol – Picomol
PROVEME – Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos
PTC – Feniltiocianato
PTH-AA – Aminoácido-fenilhidantoína
R₁ – Radical 1
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
rDNA –Ácido desoxirribonucleico recombinante
rf – Radiofrequência
RMN – Ressonância magnético nuclear
R_s - Resolução
SAI/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde
SAS – Secretaria de Atenção à Saúde
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SUS – Sistema Único de Saúde
TFA – Ácido trifluoroacético
t-PA – Ativador de plasminogênio tecidual
USP – Farmacopéia Americana
USP XXIX – United States Pharmacopoeia 29
UV-VIS - Ultravioleta-visível
ε_λ – Coeficiente de extinção molar
θ – Elipticidade
λ – Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1.1 – Esquema de transfecção.....	4
Figura 4.1 – Fluorescência de uma amostra de eritropoetina humana recombinante.....	19
Figura 4.2 – Análise de insulina humana recombinante por CLAE-FR.....	25
Figura 4.3 – Análise de somatropina humana recombinante por exclusão molecular.....	27
Figura 4.4 – Composição de monossacarídeos de eritropoetina humana recombinante.....	29
Figura 4.5 – As principais etapas da reação de Edman.....	30
Figura 4.6 – Mapa de peptídeos de somatropina humana recombinante por CLAE-FR.....	32
Figura 4.7 – Análise de composição de aminoácidos.....	33
Figura 4.8 – Análise de SDS-PAGE de amostra de interferon humano recombinante.....	36
Figura 4.9 – Desamidação de resíduos de asparagina presentes em proteínas.....	37
Figura 5.1 – Cromatograma de fase reversa de eritropoetina humana recombinante em formulações.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1.1 – Exemplos de medicamentos de uso clínico nos EUA, produzidos por esta nova tecnologia.....	2
Tabela 1.2 – Características dos principais sistemas de expressão de proteínas.....	4
Tabela 1.3 – Sistemas de expressão que são ou podem ser utilizados para a produção de biomedicamentos recombinante.....	5
Tabela 1.4 – Projetos de desenvolvimento de biomedicamentos no Brasil.....	8
Tabela 1.5 – Principais biomedicamentos comercializados no Brasil.....	9
Tabela 4.1 – Evolução da avaliação da insulina humana recombinante.....	16
Tabela 4.2 – Biomedicamentos X Farmacopéias.....	16
Tabela 4.3 – Ensaio físico-químicos utilizados na caracterização de proteínas.....	39
Tabela 4.4 – Viabilidade dos ensaios físico-químicos utilizados na caracterização de proteínas para a análise de produtos biotecnológicos.....	41
Tabela 4.5 – Critérios e métodos recomendados pela USP-XXIX para a avaliação de biomedicamentos.....	42
Tabela 4.6 – Monografias específicas de biomedicamentos da EP 5ª edição..	44

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2 – ETAPAS DE PRODUÇÃO DE BIOMEDICAMENTOS.....	3
1.3 – BIOMEDICAMENTOS E O MERCADO BRASILEIRO.....	8
1.3.1 – Programa de medicamentos excepcionais e biomedicamentos.....	10
1.3.2 – Registro e avaliação de biomedicamentos no país.....	11
2 – OBJETIVOS DO TRABALHO	13
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 – METODOLOGIA	14
4 – ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS E PRODUTOS BIOLÓGICOS	15
4.1 – HISTÓRICO.....	15
4.2 – PRINCIPAIS ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS E PRODUTOS BIOLÓGICOS.....	17
4.2.1 – Técnicas espectroscópicas.....	17
4.2.1.1 – Ultravioleta.....	17
4.2.1.2 – Espalhamento de luz.....	18
4.2.1.3 – Fluorescência.....	18
4.2.1.4 – Dicroísmo circular.....	19
4.2.1.5 – Infravermelho.....	20
4.2.1.6 – Difração de Raios X.....	21
4.2.1.7 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	22
4.2.1.8 – Espectrometria de Massas.....	22
4.2.2 – Métodos Cromatográficos.....	23
4.2.2.1 – Fase Reversa.....	24
4.2.2.2 – Interação Hidrofóbica.....	25
4.2.2.3 – Exclusão Molecular.....	26
4.2.2.4 – Troca Iônica.....	27
4.2.2.5 – Sequenciamento N-terminal.....	29

4.2.2.6 – Mapa de Peptídeos.....	31
4.2.2.7 – Composição de aminoácidos.....	32
4.2.3 – Métodos Eletroforéticos.....	34
4.2.3.1 – SDS-PAGE.....	34
4.2.3.2 – Focalização Isoelétrica.....	36
4.2.3.3 – Eletroforese Capilar.....	38
4.3 – APLICABILIDADE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
4.4 – MONOGRAFIAS FARMACOPEICAS E PRODUTOS BIOLÓGICOS	
DNA RECOMBINANTE.....	42
4.4.1 – United States Pharmacopeia – USP XXIX.....	42
4.4.2 – Farmacopéia Européia 5ª edição - EP.....	43
4.4.3 – Farmacopéia Brasileira 4ª edição - FB.....	45
5 – PROPOSTA DE INCLUSÃO DE PRODUTOS DNA RECOMBINANTE	
NA FARMACOPÉIA BRASILEIRA.....	46
5.1 – PROPOSTA DE ENSAIOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA	
ESTRUTURA MOLECULAR.....	47
5.2 – PROPOSTA DE ENSAIOS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR.....	49
5.3 – PROPOSTA FINAL PARA MONOGRAFIAS DA FB.....	50
6 – CONCLUSÃO.....	51
7 – BIBLIOGRAFIA.....	52

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos Gerais

A indústria farmacêutica desde o fim do século XIX fabrica produtos biotecnológicos. Inicialmente foram produzidos soros hiperimunes, preparados pela inoculação em cavalos de toxinas bacterianas, e vacinas preparadas pela inativação de microorganismos. No início do século XX, foi descrito o primeiro tratamento bem sucedido para pacientes diabéticos com insulina de origem animal. Já na década de 50, pesquisas começaram a ser desenvolvidas, no sentido de isolar, caracterizar e produzir, proteínas endógenas humanas, que apresentassem atividade terapêutica. Tais pesquisas tiveram como proteínas precursoras, a insulina, seguida de fatores de crescimento, interferons, interleucinas, eritropoetina e fatores neurotróficos (WALSH, 2003).

Desde esta época, o tratamento era limitado pelas respostas imunológicas às moléculas de proteínas heterólogas, contaminação por outras proteínas derivadas de fontes naturais complexas, dificuldades de obtenção de quantidades apreciáveis e a baixo custo de produtos de origem humana e animal. Estes fatores levavam à produção de medicamentos ora com propriedade biológica presente e a potência necessária, ora ausentes, gerando lotes não uniformes. Nesta época, foram desenvolvidos os bioensaios, que comprovavam a presença da atividade biológica e potência adequada. No entanto, o aspecto da caracterização físico-química ainda não dispunha de tecnologia desenvolvida, para obtenção de moléculas puras e devidamente caracterizadas (BIOLOGICAL Standartization, 1997).

Na década de 70, o advento da tecnologia DNA recombinante e a tecnologia do anticorpo monoclonal vieram a impactar a produção de proteínas e peptídeos de interesse farmacêutico. A possibilidade de introdução de genes que codificam proteínas de interesse farmacêutico em bactérias foi o início de uma nova era nas ciências farmacêuticas. (DAL MONTE; ROUAN; BAM, 2002)

A introdução dessa nova tecnologia levou à superação dos seguintes problemas:

- Aumento da disponibilidade da proteína com produção na quantidade desejada.
- Redução do risco de contaminação por agentes patológicos como vírus e prions.
- Possibilidade de produzir novas proteínas terapêuticas, com mudanças como a inserção, deleção, alteração de um simples resíduo de aminoácido ou substituição/deleção de um domínio inteiro. Esses produtos com seqüências inéditas podem apresentar vantagem sobre os produtos com a seqüência natural. (WALSH, 2003)

Esses fatores associados aos implementos de infra-estrutura tecnológica desenvolvidos fizeram com que a partir da década de 80, vários biomedicamentos fossem colocados no mercado, como os apresentados na tabela abaixo:

Tabela 1.1 Exemplos de medicamentos de uso clínico nos EUA, produzidos por esta nova tecnologia:

PRODUTO	CATEGORIA	USO TERAPÊUTICO	USO CLÍNICO (EUA)
Insulina	Hormônio	Diabetes	1982
Hormônio de Crescimento	Hormônio	Nanismo	1985
Interferon- α	Citocina	Terapia do câncer	1986
Interferon- β	Citocina	Terapia do câncer	1994
Interferon- γ	Citocina	Terapia do câncer	1990
Eritropoetina	Citocina	Anemia	1989
Ativador de Plasminogênio	Antitrombogênico	Infarto do miocárdio	1987
Fator VIII	Fator de Coagulação	Hemofilia A	1989
DNase I	Enzima	Fibrose cística	1994
Glucocerebrosidase	Enzima	Doença de Gaucher	1994
Vacina subunidade Hepatite B	Vacina	Prevenção da hepatite	1988

FROKJAER, HOVGAARD 2000.

1.2 – ETAPAS DE PRODUÇÃO DE BIOMEDICAMENTOS

Para a produção de um biomedicamento moderno, algumas etapas são necessárias. Essas etapas serão brevemente discutidas a seguir:

1ª Manipulação Genética: Esta manipulação tem início com o preparo do plasmídeo contendo o gene da proteína de interesse. Além disso, vários genes promotores podem ser utilizados para aumentar a produção da proteína de interesse e marcas de seleção diferentes podem ser tentadas.

Os plasmídeos são pequenos segmentos simples extracromossomiais circulares de DNA bacteriano isolados e auto-replicadores.

A tecnologia de manipulação genética básica envolve clivagem enzimática específica de um plasmídeo usando endonuclease de restrição, seguida pela inserção de um novo pedaço de DNA que contém o gene de interesse. O plasmídeo recombinante é introduzido no organismo hospedeiro pelo processo chamado de transfecção, onde ele passa a nova informação genética resultando na produção do produto protéico desejado. O plasmídeo tem que ser inserido na célula utilizando um processo de eletroporação, gene gun, entre outros. As marcas de seleção ajudam a "purificar" a linhagem que captou o plasmídeo e o expressa com estabilidade (ALBERTS, 1997). O esquema de manipulação genético é apresentado na figura 1.1.

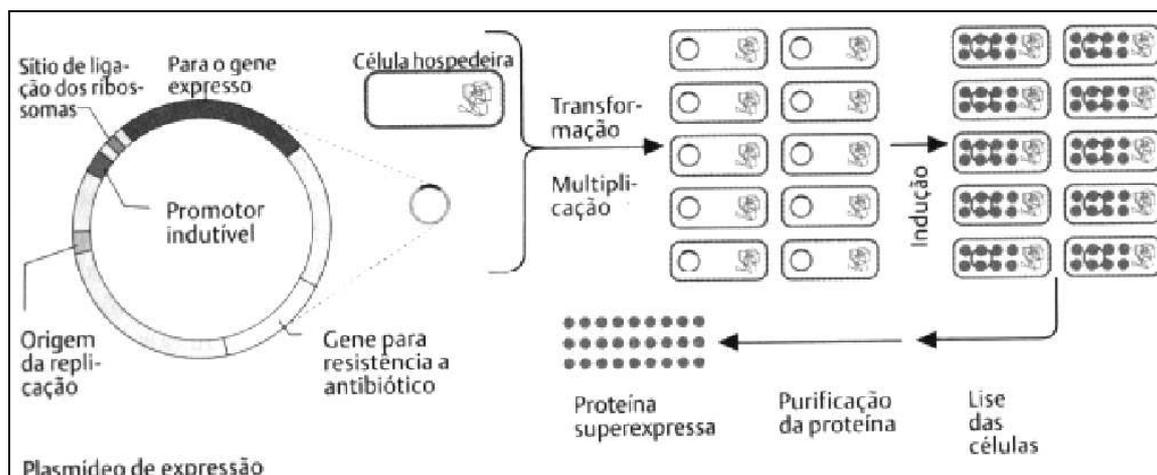


Figura 1.1: Esquema de transfecção (KOOLMAN; RÖHM, 2005).

2ª Estabelecimento da linhagem celular: A escolha do sistema de expressão celular deve considerar características próprias de cada um e a especificidade do produto recombinante que se deseja obter, apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 1.2: Características dos principais sistemas de expressão de proteínas:

Características	Bactéria	Levedura	Mamífero	Inseto
Proteólise	Talvez	Talvez	Sim	Sim
Glicosilação	Não	Sim	Sim	Sim
Secreção para o meio extra celular	Talvez	Sim	Sim	Sim
Estrutura Tridimensional	Talvez	Talvez	Sim	Sim
Fosforilação	Não	Sim	Sim	Sim
Acilação do N terminal	Não	Sim	Sim	Sim
Amidação do C terminal	Não	Não	Sim	Sim
% Rendimento (peso seco)	1 - 5	1	<1	30

(DERTZBAUGH, 1998).

Pode-se verificar que por suas diferentes características bioquímicas cada sistema processa os produtos de translação de uma maneira diferente. A necessidade de uma determinada modificação para a atividade farmacológica do produto determina a escolha do sistema (BHOPALE; NANDA, 2005). Na tabela 1.2, é possível observar a ausência de proteólise em sistemas do tipo bactéria e

levedura. Por outro lado a proteólise pode ser encontrada em sistemas do tipo células de mamífero e insetos. Desta forma, se o produto de interesse apresentar características relativas à presença de atividade proteolítica, se faz necessário escolher o sistema adequado de recombinação, capaz de gerar produtos com esta propriedade.

Os sistemas de expressão mais utilizados são a *Escherichia coli*, (BANEYX; MUJACIC, 2004) leveduras (CREGG; CEREGHINO, 2000) ou linhagens de células de mamíferos.(WURM, 2004). Em animais a proteína de interesse terapêutico é expressa para a secreção pelas glândulas mamárias, embora existam outros sistemas de expressão disponíveis, como mostrados na tabela 1.3.

Tabela 1.3: Sistemas de expressão que são ou podem ser utilizados para a produção de biomedicamentos recombinante

E. coli (e sistemas procarióticos adicionais, em geral *Bacilli*)
Levedura (particularmente *Saccharomyces cerevisiae*)
Fungos (particularmente *Aspergillus*)
Cultura celular animal (particularmente linhas celulares CHO e BHK)
Animais transgênicos (bode e carneiro)
Sistemas de expressão baseados em plantas (vários)
Sistemas de cultura celular de insetos

(WALSH, 2003)

De todas as possíveis modificações, a glicosilação é a mais importante. Em células de mamíferos, várias proteínas são glicosiladas. Isso significa que após a biossíntese das cadeias polipeptídicas, açúcares são ligados a sua estrutura, em determinados aminoácidos. Essa ligação pode ser através de resíduos de serina ou treonina (O glicosilação) ou de asparagina (N glicosilação). De uma forma geral, não apenas um açúcar é ligado ao aminoácido, mas vários, formando oligossacarídeos (oligos). Esses grupos podem ser classificados como ricos em manose (quando predomina este monossacarídeo), complexos (tem vários monossacarídeos diferentes) e mistos, que têm características de ambos. Estes

oligos modificam de várias maneiras as propriedades de proteínas. Várias funções já foram identificadas e são relacionadas abaixo: (GERNGROSS, 2004)

- Clearance plasmática: A influência das cadeias de oligossacarídeos nas propriedades farmacocinéticas de glicoproteínas é muito grande. O tempo de meia-vida no plasma varia de acordo com a estrutura do oligo, sendo que oligos terminados em ácido siálico tem um tempo de meia vida maior do que os terminados em galactose e manose. A explicação para tal fato é que receptores nos hepatócitos reconhecem a galactose e a manose, mas não reconhecem o ácido siálico. Além disso, os oligos dificultam a ação de proteases sobre as GP.
- Antigenicidade: Anticorpos podem reconhecer somente a porção oligos de GP. Por outro lado, os oligos podem também diminuir o caráter antigênico de GP, por bloquear epitopos relevantes e interferir na conformação da cadeia polipeptídica.
- Atividade específica: Em algumas GP, a porção oligo participa da interação com o receptor, sendo, portanto essencial para sua atividade biológica.
- Estabilidade térmica: As cadeias de oligos aumentam a estabilidade de GP frente ao calor, inibindo processo de agregação.

Devido a essas características, GP tem que ser produzidas em células de mamíferos ou em animais transgênicos. Plantas e leveduras não devem ser utilizadas porque as estruturas de oligossacarídeos que elas introduzem são muito diferentes dos oligossacarídeos de GP de mamíferos.

Uma vez estabelecida uma linhagem celular, essa deve ser guardada em um banco de células primário ou máster. Essas células são o cerne do processo, e devem ter sua identidade e estabilidade garantidas. As empresas mantêm um banco de trabalho secundário, de onde serão coletadas células que serão cultivadas em larga escala na etapa 3.

3ª Cultivo em larga escala das células: Nessa etapa os equipamentos, condições operacionais e meios de cultura necessitam de otimização (NÄRHI; NORDSTRÖM, 2004). A manipulação de bactérias e leveduras têm menor nível de exigência quanto aos meios de cultura e equipamentos. Utilizam fontes baratas de nitrogênio (como sais de NH_4^+ e uréia) e crescem de forma rápida. Fermentadores com sistemas de agitação podem ser utilizados, pois microorganismos têm grande resistência mecânica. As células de mamíferos são muito mais exigentes, precisam de meios ricos em aminoácidos, proteínas e vitaminas. Atualmente está em processo de otimização meios absolutamente livres de proteínas de origem animal para reduzir o risco de encefalite espongiforme bovina (BSE). Células de mamíferos não têm resistência mecânica (não tem parede celular) e precisam crescer aderidas a superfícies. Os sistemas mais utilizados são à base de fibra oca, polímero sintético formadores de membranas de alta porosidade e superfície de contato. Alterações de pH, concentração de O_2 e de NH_4^+ durante o processo podem comprometer o rendimento/qualidade de produção do biomedicamento (BRASS; KRUMMEN; MOLL-KAUFMANN, 1996).

4ª Purificação: Essa etapa é relevante no custo do processo e essencial para a qualidade do biomedicamento. São utilizadas as técnicas clássicas de cromatografia de proteínas, como troca iônica, afinidade e filtração molecular, só que em escala preparativa. Além da cromatografia, outras técnicas também são usadas, como centrifugação, diafiltração e precipitação. Ao final dessa etapa obtém-se o produto acabado a granel (DYIR; SUTTNAR, 1997).

5ª Formulação final: O produto acabado a granel é formulado com excipientes, envasado, rotulado e acondicionado em sua embalagem secundária. Essa etapa pode envolver um processo de liofilização para aumentar a estabilidade do produto.

1.3 – Biomedicamentos e o mercado brasileiro

Como em outras áreas da indústria farmacêutica, o Brasil está defasado no que refere-se à produção, em biomedicamentos. A partir de 1982, deu-se o início da produção própria de biomedicamentos no país, na indústria Biobrás, de Minas Gerais, com a fabricação de Insulinas bovina, suína e mista. Até essa ocasião, havia apenas produtos importados e distribuídos no mercado nacional. (PUPO, 1986)

Em 2000, a Biobrás patenteou nos Estados Unidos da América, a Insulina produzida por tecnologia DNA recombinante, em que os pesquisadores modificaram geneticamente a bactéria *Escherichia coli*, tornando-a capaz de produzir o hormônio. Este processo permitiu fabricar a Insulina em apenas trinta dias, sendo o primeiro processo nacional para a produção de biomedicamentos. A Biobrás foi uma das quatro indústrias que obteve a patente internacional de Insulina (PUPO, 1986). Os biomedicamentos produzidos e em desenvolvimento no Brasil, são apresentados na tabela 1.4.

Tabela 1.4: Projetos de desenvolvimento de biomedicamentos no Brasil

Tipo	Aplicação	Produtor	Estágio
Insulina humana recombinante	Diabetes	Biobrás/Novo Nordisk	Em produção
Eritropoetina- α recombinante	Anemia	Instituto Butantan	Em desenvolvimento
Anticorpos Monoclonais	Imunoterapia	FK Biotecnologia	Em desenvolvimento

(FERRER et al., 2004).

Apesar do pequeno número de projetos em desenvolvimento, há vários biomedicamentos disponíveis no mercado nacional. Na tabela 1.5 pode-se verificar os principais produtos que são comercializados no Brasil, com suas empresas responsáveis. As empresas transnacionais distribuem no país produtos importados de suas matrizes. As empresas nacionais representam laboratórios da Ásia e Europa oriental na distribuição desses produtos no país.

Tabela 1.5: Principais biomedicamentos comercializados no Brasil

Tipo	Principal apresentação e excipientes	Produtores	Etapa do processo que realiza no Brasil*
Insulina humana recombinante	Solução isotônica com 1,5-3 mg/frasco. Contém fenol e meta cresol	Novo Nordisk, Sanofi-Aventis, Eli Lilly	1, 2, 3, 4 e 5
Eritropoetina humana recombinante	Solução isotônica ou líofilo com 20-100 µg/frasco. Contem Soro albumina humana como excipiente.	Blausiegel, Biossintética, Quim. Farm, Bergamo, Eurofarma, Roche, Fiocruz Johnson & Johnson	5
Anticorpos Monoclonais	Solução isotônica ou líofilo com 20-100 µg/frasco. Contem Soro albumina humana como excipiente.	Abbott, EMS, Natures, Bergamo, Sigma, Allegan, Novartis, Mantecorp, Roche	-
Interferon α humano recombinante	Solução isotônica ou líofilo com 20-100 µg/frasco. Contem Soro albumina humana como excipiente.	Silvestre, FIOCRUZ, Zodiac, Blausiegel, Mantecorp, Bergamo	5
Interferon β humano recombinante	Solução isotônica ou líofilo com 20-100 µg/frasco. Contem Soro albumina humana como excipiente.	Serono, Eurofarma	5
t-PA humano recombinante	Solução isotônica ou líofilo com 20-100 µg/frasco. Contem Soro albumina humana como excipiente.	Boehringer	-
Somatropina humana recombinante	líofilo com 2 mg/frasco. Contem fenol como excipiente.	Pfizer, Pharmacia Brasil, Bergamo, Novo Nordisk, Serono, Eli Lilly	5

(ANVISA, 2007) * refere-se a etapas de produção de biomedicamentos discutidas anteriormente.

1.3.1 - Programa de medicamentos excepcionais e Biomedicamentos

Conforme discutido anteriormente, biomedicamentos são produtos de tecnologia de ponta e essa característica se reflete em seus preços, bastante superior a da maioria dos produtos convencionais. Em 1992 o governo federal criou o programa de medicamentos excepcionais, para garantir o fornecimento de produtos de elevado valor agregado à população.

Desde sua criação esse programa passou por várias fases. Recentemente o Ministério da Saúde publicou a portaria nº 2577 de 27 de outubro de 2006 (SAÚDE, 2006) que aprova o programa de Componente de medicamentos de dispensação excepcional, como parte da Política Nacional de Assistência Farmacêutica do SUS. Estes medicamentos constituem o grupo 36 – Medicamentos da tabela descritiva do sistema de informação ambulatorial do SUS (SAI/SUS). Conta com 92 drogas em sua relação, em várias apresentações, para diversas patologias, como insuficiência renal crônica, hepatite viral B e C, osteoporose, problemas de crescimento, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Gaucher e imunossupressores para pacientes transplantados, entre outras.

Do total de recursos aplicados pelo governo federal na assistência farmacêutica, em 2006, (mais de R\$ 4,2 bilhões), um terço (R\$ 1,4 bilhão) é investido no financiamento de medicamentos excepcionais, adquiridos e distribuídos pelas secretarias de saúde dos estados.

Do total de medicamentos, cerca de 20 são biomedicamentos, sendo que eles representam um percentual relevante do custo total. Quatro medicamentos de alto custo ou uso continuado: imiglucerase (indicado para o tratamento da doença de Gaucher), eritropoetina (para insuficiência renal crônica), interferon alfa (para hepatite C) e imunoglobulina (para imunodeficiências). Para esses quatro medicamentos, o investimento do governo federal é de R\$ 500 milhões por ano. Esse valor demonstra a importância econômica dos biomedicamentos dentro do programa. Este programa prevê, que todo o processo de absorção de novas tecnologias e medicamentos no SUS deve obedecer à relação “demanda X eficácia X custos” como forma de abranger o maior número possível de pacientes

com a oferta de medicamentos comprovadamente eficazes e seguros e, ainda, utilizar os recursos públicos em saúde de forma responsável. Essa preocupação é importante, pois um grande número de novos biomedicamentos é lançado anualmente. A incorporação direta desses produtos poderia elevar de forma relevante os custos (SAÚDE.2006). Seguindo a tendência de diminuição de custos, o MS encarregou Bio-manguinhos, da produção dos biomedicamentos EPO e INF- α . Esses medicamentos foram desenvolvidos pelo Instituto de Biologia Molecular de Cuba, que realiza as etapas de 1 a 4 do processo descrito anteriormente, que são a manipulação genética, estabelecimento da linhagem celular, cultivo em larga escala das células e a purificação. Atualmente no Brasil são realizadas as etapas de envase e rotulagem, embora a transferência de tecnologia preveja a nacionalização de todas as etapas no Brasil.

1.3.2 - Registro e avaliação de biomedicamentos no país

O registro de biomedicamentos no Brasil segue as determinações da RDC nº.315, de 26 de outubro de 2005; onde estão listados, entre outros produtos Hemoderivados, alergenicos, soros e vacinas. Os processos são conduzidos a Gerência Geral de Medicamentos (GGMed) que os encaminha à Unidade de Produtos Biológicos e Hemoterápicos, setor específico para a análise desses produtos. (ANVISA,2007)

Essa resolução coloca como pré-requisitos para o registro de biomedicamentos as características inerentes ao seu processo de produção. A documentação técnica de cada uma das cinco etapas de produção de um biomedicamento deve ser encaminhada junto à documentação de três lotes iniciais de produção.

As atribuições do INCQS dentro dessa RDC são as seguintes:

- Laboratório para realizar as análises laboratoriais para o registro, alteração ou revalidação de Produtos Biológicos terminados.

- Avaliar a conformidade dos métodos analíticos utilizados pelos produtores no processo de registro.
- Realizar a análise prévia desses produtos.

Além da participação no processo de registro, o INCQS participa de programas de avaliação da qualidade de medicamentos disponíveis no mercado e distribuídos pelo Sistema Único de Saúde, como o PROVEME (ANVISA), e o Programa de Medicamentos Excepcionais (Secretaria de Atenção à Saúde - SAS/MS). (MS/FIOCRUZ, 2007).

Embora estes programas sejam diferentes em relação aos gestores, são idênticos quanto à garantia para o consumidor ou requerente da análise, do perfil do medicamento quanto à eficácia e segurança de seu uso.

Para que seja alcançado este objetivo, é necessário que o INCQS, executor da parte analítica do controle da qualidade destes produtos, esteja pari passu com a mais recente tecnologia, a fim de assegurar a eficácia destes biomedicamentos.

No presente, o INCQS já realiza alguns ensaios. Todos os resultados experimentais mostrados ao longo desse trabalho foram realizados no Setor de Imunobiológicos, Departamento de Química do INCQS. Além dos ensaios que já são realizados, o Instituto também está desenvolvendo e validando outras metodologias, apresentadas nesta monografia.

2 – Objetivos do trabalho

2.1 – Objetivo Geral

Analisar através de revisão bibliográfica sistemática, a dimensão metodológica de avaliação físico-química de medicamentos obtidos por tecnologia DNA-recombinante.

2.2 – Objetivos Específicos

- Especificar os principais métodos físico-químicos em uso para a caracterização de proteínas.
- Especificar os métodos físico-químicos recomendados em monografias farmacopeicas para a análise de biomedicamentos.
- Definir a abrangência dos métodos referidos nos itens acima; e identificar os métodos mais adequados para a verificação da qualidade de biomedicamentos, obtidos a partir da comparação das metodologias preconizadas nas Farmacopéias e literatura científica.
- A partir dessas comparações será proposta uma base para iniciar a discussão de incorporação de novos biomedicamentos na Farmacopéia Brasileira.

3 – Metodologia

A metodologia para a obtenção dos dados, buscando acumular o conhecimento necessário ao embasamento teórico deste trabalho, baseia-se em pesquisa bibliográfica, através da análise de literatura já publicada, na forma de livros, farmacopéias, compêndios oficiais, disponibilizadas na Internet, através de banco de dados como o *Portal.Periódicos.CAPES*, *Scifinder Scholar*, digitalizados, CD-ROM.

4 – ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS E PRODUTOS BIOLÓGICOS

4.1 – Histórico

No controle da qualidade de medicamentos os parâmetros mais importantes se referem à identidade e concentração do princípio ativo, além da presença de impurezas. Em biomedicamentos há mais complicadores que em medicamentos sintéticos (SCHELLEKENS, 2004). Como já foi dito anteriormente, biomoléculas apresentam isoformas com efeitos farmacológicos distintos. A estrutura tridimensional é complexa e sujeita a mudanças conformacionais que alteram a atividade biológica.

Por esses motivos os ensaios tradicionais para o controle de biomedicamentos envolvem o uso de animais de laboratório, observando-se uma resposta específica quanto à eficácia (potência) e segurança (toxicidade). De um modo geral, a análise físico-química era restrita aos conservantes, pois a irregularidade, característica dos produtos biológicos aliados ao pequeno desenvolvimento das técnicas analíticas, impossibilitava o uso de análises físico-químicas. Na tabela 4.1 observa-se que a evolução dos principais parâmetros de avaliação acompanhou o desenvolvimento tecnológico tanto analítico quanto dos processos de produção.

Tabela 4.1 Evolução da avaliação da insulina humana recombinante.

Farmacopéia	Método de obtenção	Identificação	Teor
USPXXI NF16 ^{o*} 1985	Modificação enzimática do pâncreas suíno ou de síntese microbiana	Prova Biológica (comparação de efeito hipoglicêmico em modelo animal)	CLAE, com concordância do resultado da potência cromatográfica não diferir mais do que 6% da potência biológica.
Farmacopéia Européia, 3 ^a ed; 1997.	Obtenção, modificação enzimática do pâncreas suíno ou por método baseado na tecnologia DNA recombinante;	CLAE-FR	CLAE-FR
Farmacopéia Brasileira, 4 ^a edição, parte II, 1 ^o fascículo; 1996.	Modificação enzimática da insulina do pâncreas suíno, ou por síntese microbiana pela tecnologia DNA recombinante.	Bio identidade – ensaio biológico	CLAE-FR

* Até a USP XX só havia monografia para insulina suína, bovina ou mista.

A introdução de novos produtos recombinantes aumentou rapidamente a partir do início da década de 90. Esse aumento do número de biomedicamentos não significou a incorporação automática desses produtos a farmacopéias. Atualmente, a farmacopéia Européia é o compêndio que possui o maior número de biomedicamentos contemplados por suas monografias. O resumo das monografias e compêndios está apresentado na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Biomedicamentos X Farmacopéias

Fármaco	USP XXIX	EP 5 ^a Ed	FB 4 ^a Ed
Insulina	Produto final	Produto final	Produto final
Somatropina	Produto final	Produto final	Produto final
Interferon	-	Matéria prima	
Eritropoetina	-	Matéria prima	–
Imiglucerase	–	–	-

4.2 – PRINCIPAIS ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS E PRODUTOS BIOLÓGICOS

A complexidade estrutural de proteínas leva a necessidade do uso de um grande número de métodos diferentes para a caracterização desse tipo de produtos. A seguir serão discutidos os fundamentos da aplicação dos principais métodos para a análise de proteínas (LUYKX et al., 2005).

4.2.1 - Técnicas espectroscópicas

4.2.1.1 – Ultravioleta

A espectroscopia mede a transição eletrônica entre diferentes níveis energéticos de uma molécula acompanhada por absorção de luz ultravioleta ou visível (UV/Vis.)

Em proteínas, essas transições ocorrem em resíduos de aminoácidos específicos e dão origem à três intervalos de comprimentos de ondas (λ) distintos: comprimento de onda maior que 250nm é atribuído a cadeias laterais de fenilalanina, tirosina, triptofano e cistina, com absorção máxima em torno de 280nm. As bandas de absorção que aparecem entre 250 e 210nm são atribuído a presença de cadeias laterais aromáticas, e também à histidina, cistina, cisteína e metionina. Finalmente, comprimento de onda em torno de 220nm também apresenta absorção resultante da transição eletrônica de ligações peptídicas.

A absorção de UV/Vis, obedece à Lei de Lambert-Beer, logo a concentração de uma proteína purificada pode ser determinada se o coeficiente de extinção molar (ϵ_{λ}) a 280nm for conhecido. Se este coeficiente não estiver disponível, aplicam-se técnicas fotométricas tais como os métodos Lowry et al., Bradford, ácido bicinônico ou BSA, Biureto, em que todos utilizam um padrão protéico definido, usualmente Soro Albumina bovina.(FROKJAER, HOVGAARD, 2000).

4.2.1.2 – Espalhamento de luz

Estruturas macromoleculares em solução podem desviar a luz incidente, num fenômeno conhecido como espalhamento de luz. A medida da intensidade desse espalhamento a baixo ângulo em relação à fonte de luz é proporcional ao peso molecular médio das espécies em solução. Por esse motivo, tal técnica é comumente utilizada na determinação de pesos moleculares médios de sistemas polidispersos que apresentam pesos moleculares elevados, como de polímeros sintéticos. Em química de proteínas essa técnica é empregada para a determinação de peso molecular de vários tipos de complexos em solução, como a associação de várias cadeias polipeptídicas, complexos antígeno anticorpo e na análise de conjugados sintéticos como vacinas antibacterianas (CHIRINO; MIRE-SLUIJ, 2004).

4.2.1.3 - Fluorescência

Esta técnica mede basicamente a magnitude e comprimento de onda de luz emitido devido a transições eletrônicas do estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 de uma molécula. Proteínas emitem fluorescência na faixa de 300-400nm devido à presença de aminoácidos aromáticos triptofano e tirosina. As mudanças no espectro de fluorescência de proteínas indicam modificações no ambiente no qual encontram-se as cadeias laterais desses aminoácidos. (FROKJAER, HOVGAARD, 2000). Desta forma, é possível utilizar a espectroscopia de fluorescência para avaliar a estrutura terciária de proteínas recombinantes. Esta avaliação se faz necessária já que a manutenção da conformação protéica é fundamental para a atividade da mesma. Além disso, a fluorescência é uma técnica bastante sensível, o que facilita a detecção de agregados insolúveis de proteínas resultantes de processos de desnaturação. Como a concentração das proteínas recombinantes nas formulações é da ordem de microgramas, a sensibilidade acaba se tornando um dos fatores determinantes na escolha da metodologia de controle a ser empregada.

Finalmente, outro fator que deve ser levado em consideração é a natureza da metodologia empregada, no que se refere ao reaproveitamento do material. A espectroscopia de fluorescência é um método não destrutivo, o que torna possível reutilizar a mesma preparação protéica para outros ensaios de caracterização. Isto é um fator importante já que a quantidade, em massa, destes biomedamentos presentes nas formulações é pequena e o número de ensaios a serem realizados no controle de qualidade é relativamente grande.

Para exemplificar a evidência de modificações ocorridas na proteína após a utilização da técnica de fluorescência observemos a figura 4.1.

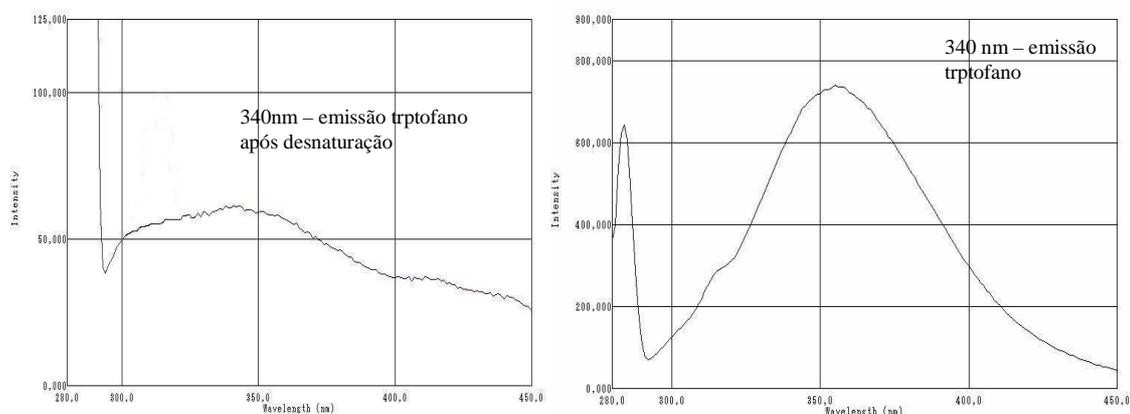


Figura 4.1: Fluorescência de uma amostra de eritropoetina humana recombinante à esquerda amostra desnaturada. A direita amostra nativa. O deslocamento deve-se a maior exposição dos resíduos de triptofano. (CONCEIÇÃO, 2003).

4.2.1.4 – Dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular (DC) é utilizada em controle de qualidade de biomedamentos como uma ferramenta importante para a avaliação de elementos da estrutura secundária de proteínas. Desta forma é possível utilizar o DC, tanto para avaliar a presença de alfa-hélice, folhas beta pregueadas e elementos randômicos, assim como para quantificá-los em uma estrutura protéica.

A identificação e a quantificação destes elementos se faz importante, pois as perdas de elementos da estrutura secundária constituem um indicativo de que o

biomedicamento também apresenta perdas na estrutura terciária e estas perdas podem levar a redução total ou parcial da atividade do mesmo.

A ordenação de estrutura secundária das proteínas é inerentemente assimétrica, gerando moléculas opticamente ativas que interagem com a luz circular polarizada e provocam alteração da luz incidente.

A técnica de DC detecta essa alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda após passar através da amostra. A informação obtida pelo DC é a elipticidade (θ).

Desta forma, o espectro de DC é obtido, plotando-se θ contra comprimento de onda, e sua forma é dependente do elemento e de seu conteúdo presente na estrutura secundária. Sendo assim, é possível verificar as proporções de hélices, estruturas β , alças e estrutura aleatória (XIE; SCHOWEN, 1999). As perdas de elementos da estrutura secundária de proteínas são avaliadas por DC a partir do deslocamento de bandas específicas para cada elemento anteriormente mencionado. Por exemplo, sabe-se que proteínas formadas basicamente por alfa-hélice apresentam uma banda negativa em torno de 208 nm com intensidade maior e outra banda negativa em torno de 218 nm com intensidade menor, perdas de elementos da estrutura secundária destas proteínas são detectados pelo deslocamento ou supressão destas bandas do espectro.

4.2.1.5 – Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho mede a liberação de energia absorvida durante a transição de uma molécula de um modo vibracional para outro. A espectroscopia no infravermelho baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem freqüências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). Tais freqüências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibracional. O espectro de infravermelho é

característico da molécula como um todo, porém certos grupos de átomos dão origem à bandas que ocorrem mais ou menos na mesma freqüência, independentemente da estrutura da molécula. Os modos vibracionais associados com os grupos trans-peptídicos das proteínas (bandas amidas) são muito sensíveis à conformação do esqueleto polipeptídico. Em teoria, nove diferentes bandas amídicas são consideradas informativas a respeito de estrutura secundária proteica. Na prática, somente banda amida I ($1620 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) e banda amida III ($1200 - 1330 \text{ cm}^{-1}$) são freqüentemente utilizadas para estimar o conteúdo de estrutura secundária usando absorção máxima local. Como a avaliação dos dados é subjetiva, devido à interferências como por exemplo, da molécula de água.

4.2.1.6 – Difração de Raios X

A cristalografia de raios X baseia-se no estudo dos ângulos e das intensidades com que um feixe de raios X de comprimento de onda na faixa 1.54 \AA são espalhados ou difratados, pelos elétrons que circundam cada átomo no espaçamento das unidades moleculares ou atômicas repetidas regularmente nos cristais da proteína de interesse e são impressos em filme fotográfico.

A difração do feixe ao colidir com os cristais da proteína leva a informação da posição dos núcleos dos átomos, aqueles com densidade eletrônica mais elevada difratam os raios X com maior intensidade, e os de menor densidade difratam com menor intensidade. O cristal pode ser considerado como um padrão tridimensional de densidade eletrônica, que possui altos valores perto dos centros de átomos e valores baixos ou de zero entre eles (NG; GAVIRA; GARCIA-RUÍZ, 2003).

4.2.1.7 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências (rf) em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função da presença de determinados átomos na molécula. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidade. Segundo a teoria da ressonância nuclear, um próton em um campo magnético estático pode assumir somente duas orientações correspondentes às energias $\pm \mu_H$. A orientação de menor energia corresponde ao estado em que o momento nuclear magnético está alinhado paralelamente ao campo magnético externo, e a orientação de maior energia corresponde ao estado em que o momento nuclear magnético está alinhado antiparalelamente (oposto) ao campo magnético externo. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear protéica busca obter informações sobre a estrutura e a dinâmica das proteínas (LEMERCINIER; MARTINEZ-CABRERA; JONES, 2000). A amostra para RMN é preparada em meio aquoso e obtida de proteínas altamente purificadas. Os núcleos de maior interesse para RMN de proteínas são o C^{13} e o N^{15} . Como esses núcleos são pouco abundantes na natureza, os espectros requerem um tempo de análise relativamente grande (WÜTHRICH, 1990).

4.2.1.8 – Espectrometria de Massas

O equipamento espectrômetro de massas mede a proporção massa/carga de íons, que é obtido pela ionização da amostra e os íons de diferentes massas são separados e sua abundância relativa avaliada pela medida de intensidades do fluxo de íons. É composto por três partes: uma fonte de íon, um analisador de massa, e um sistema detector. Existem vários tipos de fontes de íons e analisadores diferentes, sendo que os equipamentos são dotados com

modelos específicos de acordo com a aplicação que se deseja (ASHCROFT; 2003).

A espectrometria de massas de proteínas e peptídeos é um método importante para caracterização dessas moléculas (TEARBOPOULOS; et al., 1994). Os dois mais utilizados são a ionização eletrospray (ESI) e a *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI)(APFFEL, A. et al., 1998). No primeiro, a amostra é ionizada num sistema do spray, formando-se um aerosol onde a medida que as gotas de líquido evaporam as moléculas presentes ganham carga e então são introduzidas no analisador de massas, geralmente do tipo quadrupolo. No segundo, a amostra é misturada a uma solução com moléculas orgânicas (matriz) e essa solução é cristalizada em uma superfície sólida. O cristal resultante é bombardeado com um laser e ocorre a ionização das moléculas da amostra, passando a fase gasosa. Na fase gasosa os íons são direcionados para o analisador do tipo tempo de voo (*time of flight*). (ZHOU; et al., 1999) e (CINDRIĆ; VULETIĆ, 2003) e (ZHENG; WU; HANCOCK, 2006).

4.2.2 – Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos são métodos bastante utilizados na química de proteínas. Sua aplicabilidade vai desde metodologias empregadas na avaliação da homogeneidade protéica, até em ensaios de caracterização e quantificação.

A utilização de métodos cromatográficos pode se dar por diferentes técnicas de separação, que estão relacionadas com os suportes utilizados durante a separação, desta forma, é possível encontrar na literatura métodos cromatográficos que envolvem a separação de proteínas com base em suas diferentes propriedades físico-químicas. As propriedades físico-químicas mais importantes e mais comumente utilizadas em cromatografia são o grau de hidrofobicidade, das proteínas, e neste caso são utilizadas as cromatografias de fase reversa e interação hidrofóbica, e o anfoterismo das proteínas, onde são utilizadas as diferentes técnicas de cromatografia de troca iônica (catiônica e aniônica) dentre outras. A seguir são apresentadas as principais técnicas

cromatográficas utilizadas em química de proteínas e suas aplicações (AGUILAR, 2000), com inclusão daquelas que requerem preparo específico da amostra, como seqüenciamento N-terminal e composição de aminoácidos.

4.2.2.1 – Fase Reversa

É um processo de separação dependente do mecanismo reversível de adsorção/dessorção das moléculas do soluto com vários graus de hidrofobicidade em relação à fase estacionária hidrofóbica.

São utilizadas colunas contendo fase estacionária com suporte de sílica ou polímeros, nas quais estão presos um significativo número de grupamentos apolares do tipo fenil, butil, octil ou octadecil. Durante a eluição das proteínas pela coluna de fase reversa, o mecanismo de adsorção/dessorção é controlado por um gradiente crescente de concentração de um solvente orgânico do tipo acetonitrila, iso-propanol, metanol e outros.

Pode-se adicionar aos eluentes ácidos orgânicos, tais como trifluoroacético, heptafluorbutírico, com a finalidade de ter o efeito íon-par, que aumenta a hidrofobicidade das proteínas.

A cromatografia de fase reversa tem a vantagem da flexibilidade nas condições de separação, de maneira que a molécula de interesse seja retida enquanto contaminantes passem através da coluna, ou os contaminantes fiquem retidos enquanto a molécula de interesse passe pela coluna. Possui alta resolução e é utilizada para separar moléculas com pequenas diferenças estruturais, por exemplo, aquelas provocadas por digestão enzimática ou falha após síntese peptídica (BARTOLOMEU; MAISANO, 2006).

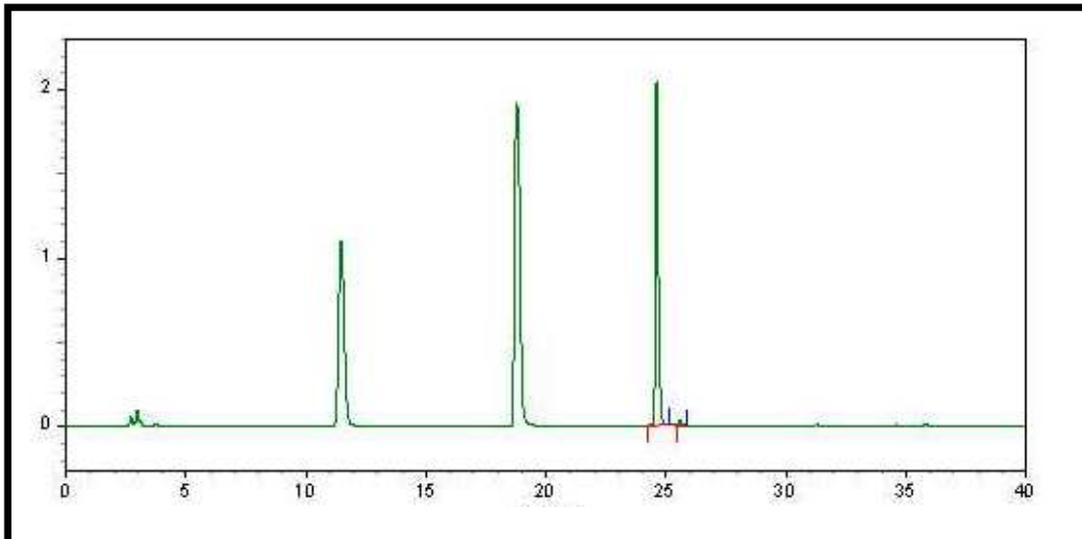


Figura 4.2 : Análise de Insulina humana recombinante por CLAE-FR. Foi utilizada uma coluna C18, com partículas de 5 μm , poros de 300 \AA . tamanho de (4,6x300 mm) e detecção em 214 nm. Os dois primeiros picos do cromatograma correspondem a fenol e metacresol utilizados como conservantes, que absorvem no mesmo comprimento de onda da insulina. A interpolação da área do pico de insulina com as áreas de picos de padrão permitem a quantificação do biomedicamento. (INCQS/ Laboratório de Biológicos e Artigos e Insumos de Saúde/ Setor de Imunobiológicos, 2007).

4.2.2.2 – Interação Hidrofóbica

Neste tipo de cromatografia líquida a partícula da fase estacionária é formada de alguns grupamentos apolares, do tipo butil, octil ou fenil, ligados à matriz, geralmente de agarose. A retenção da molécula protéica é diretamente proporcional à concentração de sal, e a separação ocorre com gradiente salino (sulfato de amônio, citrato, ou fosfato) que diminui em concentração durante a separação. As proteínas mais hidrofóbicas são mais retidas. Uma vantagem desta modalidade cromatográfica, é que a proteína não é desnaturada, pois a separação é realizada em ambiente exclusivamente aquoso. É mais usada para isolar e purificar a proteína, menos comum para controle (LIENQUEO; et al., 2003).

4.2.2.3 – Exclusão Molecular

Têm como fundamento a separação do soluto em função do binômio forma-peso molecular, ou em termos técnicos, volume hidrodinâmico. É uma técnica amplamente usada para purificação e análise de polímeros biológicos e sintéticos tais como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos. A estrutura altamente porosa do meio gel filtração proporciona a separação das moléculas e é basicamente uma questão de volumes acessíveis. Em uma coluna todas as moléculas que têm acesso ao líquido entre as partículas, dá origem ao volume morto ou volume de exclusão e equivale a aproximadamente 30% do volume da coluna.

Para proteínas globulares é possível obter-se valores de volume de eluição e relacioná-los aos seus pesos moleculares como função inversa de seus logaritmos, isto porque estas proteínas possuem formas bem semelhantes. Pode-se estimar empiricamente o peso molecular de uma proteína, desde que se construa uma curva padrão com proteínas globulares de peso molecular conhecidos nas mesmas condições cromatográficas, relacionando-os aos respectivos volumes de eluição.

Esta técnica cromatográfica é de baixa resolução, sendo utilizada na fase final de polimento da purificação. Pode determinar a estrutura quaternária de proteínas purificadas desde que as condições preservem em solução a forma nativa da proteína, mantendo as interações macromoleculares.

A vantagem deste método é poder aplicar várias soluções sem interferir com o processo de filtração, preservando a atividade biológica da proteína (WANG, 2004). Na figura 4.3 é apresentado um cromatograma típico obtido a partir da análise de somatropina humana recombinante.

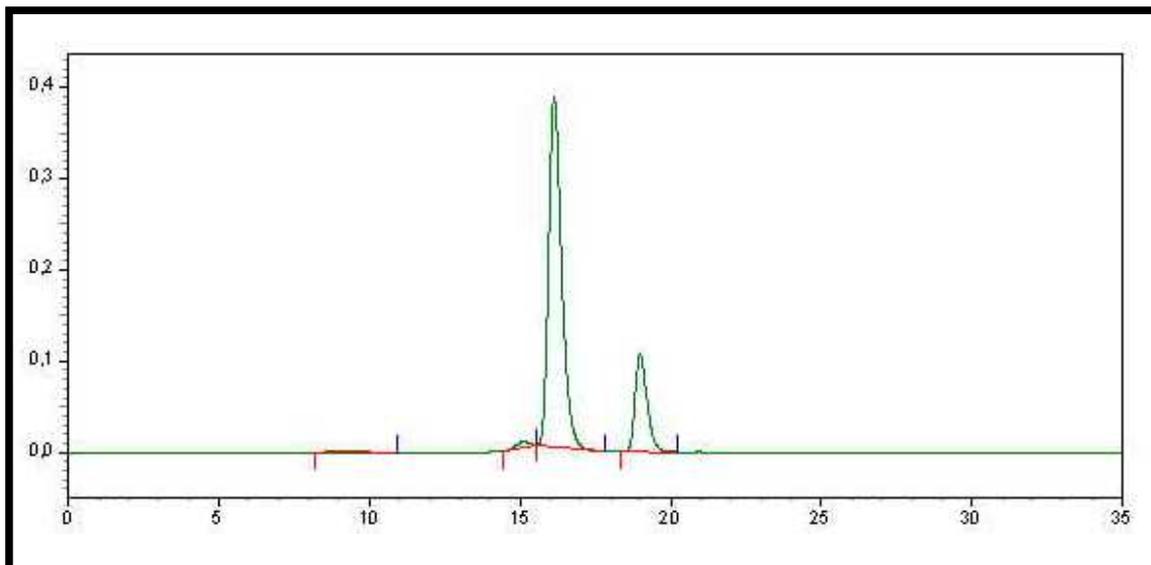


Figura 4.3 : Análise de somatotropina humana recombinante por exclusão molecular. Foi utilizada uma coluna TSKgel G3000 SW_{XL}, com partículas de 5 mm, poros de 300Å, tamanho de (7,8x300 mm), fase móvel tampão fosfato pH7:00:isopropanol (97:3), fluxo: 0,6mL/min e detecção em 214 nm. O primeiro pico corresponde a agregados de somatotropina, o maior pico é a somatotropina (19 KDa) e o menor pico são outros componentes da formulação, que também absorvem nesse comprimento de onda. A interpolação da área do pico de insulina com as áreas de picos de padrão permitem a quantificação do biomedicamento. (INCQS/ Laboratório de Biológicos e Artigos e Insumos de Saúde/ Setor de Imunobiológicos, 2007).

4.2.2.4 – Troca iônica

O princípio da troca iônica consiste na separação dependente da adsorção reversível de moléculas de soluto como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos, carregadas por grupos de troca iônica imobilizada de carga oposta. Esta interação é um equilíbrio dinâmico que pode ser influenciado por concentração de sal ou pH. A dessorção ocorre quando há uma mudança de pH ou na concentração de sal no eluente.

Esta técnica é utilizada para isolar ou purificar proteínas na sua forma bioativa, sendo o método de escolha para proteínas de tamanho maior que 20 KDa, com manutenção da conformação nativa e bioatividade. É também útil para análise de misturas de peptídeos e proteínas, porque apresenta uma base de retenção e seletividades diferentes da CLAE-FR. É utilizada para mistura de compostos que apresentam cargas diferentes e também quando apresentam a mesma carga devido à distribuição irregular das cargas na proteína.

Troca iônica é também usada combinada com CLAE-FR para isolar misturas complexas de proteínas (HARTMANN et al., 2003). A escolha das condições para separação está nas opções da utilização de sal, solventes orgânicos tais como acetonitrila e isopropanol e para melhorar a separação, variam-se às condições de gradiente (SNYDER, 1997).

A troca iônica também é uma técnica fundamental na análise da porção de carboidratos de glicoproteínas. Como os monossacarídeos e os oligossacarídeos podem se ionizar em pH alcalino, utiliza-se a troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (essa técnica é conhecida em inglês pela sigla HPAE-PAD). (JANDIK et al.,1999) Para a determinação da composição de monossacarídeos as amostras de glicoproteínas são hidrolisadas em meio ácido e depois submetidas a análise. (figura 4.4).

Para a determinação dos oligossacarídeos presentes em glicoproteínas, a amostra deve ser submetida a hidrólise por enzimas do tipo endoglicosidases, que cortam a ligação entre o oligossacarídeo e a proteína. Os oligos assim obtidos são então submetidos a análise, eluindo da coluna de acordo com o seu teor de ácido siálico. O mapa preparado dessa forma é considerado uma impressão digital dos carboidratos da glicoproteína e a similaridade entre vários lotes representa uma boa consistência de produção, ou seja, a homogeneidade entre os vários lotes do produto.

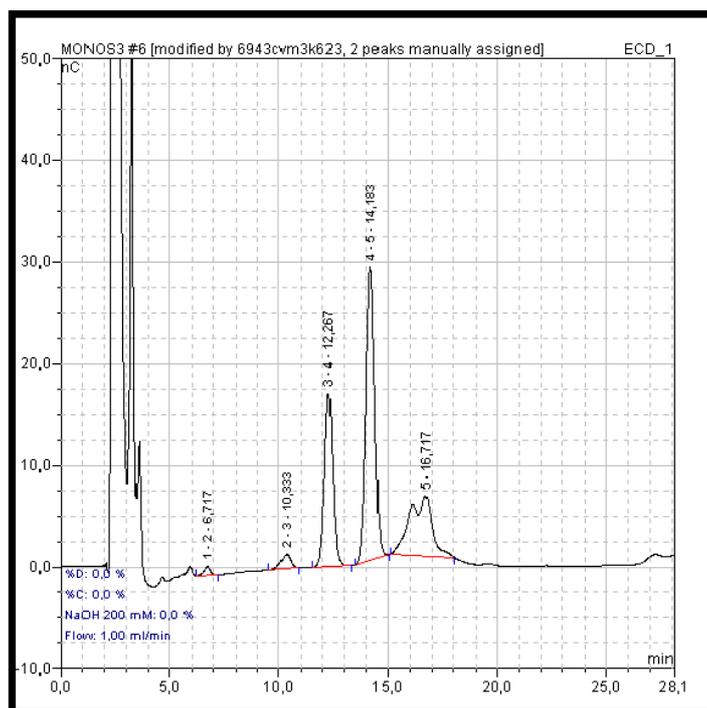


Figura 4.4: Composição de monossacarídeos de eritropoetina humana recombinante. A amostra foi submetida a hidrólise por ácido trifluoroacético e depois análise em coluna PA-10, utilizando a fase móvel NaOH 200mM. (INCQS/ Laboratório de Biológicos e Artigos e Insumos de Saúde/ Setor de Imunobiológicos, 2007).

4.2.2.5 – Sequenciamento N-terminal

O sequenciamento protéico é utilizado no controle de qualidade de biomedicamentos porque pode dar informação sobre a estrutura primária, ou seja, a seqüência de aminoácidos. Para biológicos rDNA –derivados, esta metodologia têm a função adicional de confirmar o DNA complementar (cDNA), predizer a seqüência de aminoácidos, homogeneidade protéica, e a extensão potencial de quebras proteolíticas. (USP, 2006)

Sequenciamento N-terminal é realizado por degradação de Edman, que devido ao avanço das metodologias analíticas, permite atualmente a determinação rápida e automatizada de até os primeiros 100 resíduos de aminoácidos N-terminal da maioria das proteínas, e usualmente a quantidade necessária de amostra é menor que 1µM. (WALSH, 2003).

O método é baseado na reação de acoplamento do resíduo amino terminal de uma proteína ou peptídeo com o fenilisotiocianato (PITC). O derivativo

aminoácido-PTC resultante é clivado da proteína por um ácido orgânico perfluorado (geralmente trifluoracético ou ácido heptafluorobutírico) que expõe o aminoácido adjacente. Este processo é repetido até um número apropriado, em que 8 a 10 aminoácidos são removidos. O resíduo aminoácido modificado resultante do ciclo de clivagem (anilintiazolina [ATZ]) é geralmente convertido na presença de ácido e calor para aminoácido-feniltiohidantoína (PTH-AA), sendo este determinado por análise CLAE-FR. A reação de Edman é mostrada na figura 4.5. O limite de detecção é de 10pmol, logo pequenas quantidades de peptídeos e proteínas podem ser analisadas.

(USP, 2006)

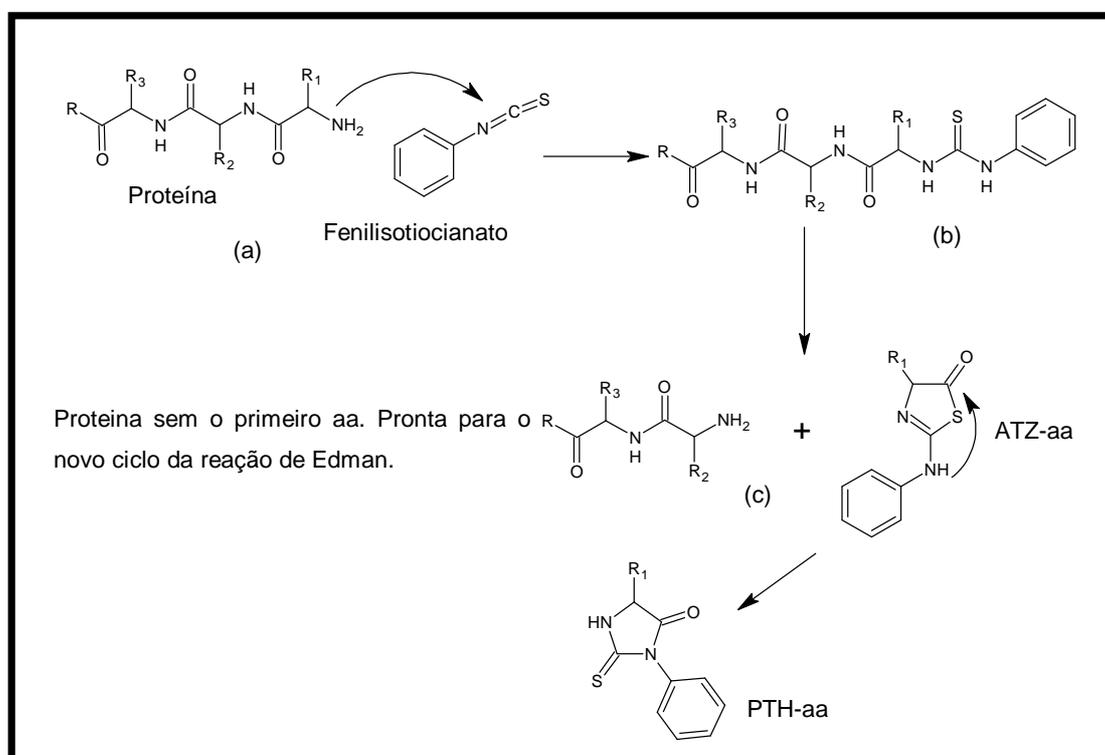


Figura 4.5: As principais etapas da reação de Edman. Após o acoplamento entre a proteína e o fenilisotiocianato no N terminal ocorre a liberação do primeiro aa da proteína (r1) e formação do respectivo ATZ-aa, que após rearranjo em meio ácido dá origem ao PTH-aa, que é identificado por CLAE-FR.

4.2.2.6 – Mapa de Peptídeos

A maior preocupação em relação à biomedicamentos produzidos em sistemas alto-expressão recombinantes é a potencial ocorrência de mutações pontuais no gene do produto, deleções e inserções de seqüências originando uma estrutura primária alterada. Erros na transcrição ou translação genética poderia ter conseqüências similares. Para detectar tais alterações na seqüência de aminoácidos o procedimento indicado é o mapa peptídico.(WALSH, 2003)

O mapa peptídico pode ser entendido como sendo a impressão digital de uma proteína e é o produto final de vários processos químicos ou enzimáticos que “quebram” a proteína de maneira previsível. O mapa peptídico não é um método geral, envolvendo a otimização de condições específicas para cada proteína. Além das informações já citadas, o mapa de peptídeos pode fornecer informações sobre a degradação química da cadeia lateral dos aminoácidos, como a oxidação de metionina e a desamidação de asparagina. (SIMPSON, 2003) (HOUDE et al., 2006)

São necessárias quatro etapas para o procedimento: isolamento e purificação da proteína, se esta faz parte de uma formulação; clivagem seletiva de bandas peptídicas; separação cromatográfica dos peptídeos; e análise e identificação dos peptídeos. (USP, 2006)

O mapa peptídico acarreta a exposição do produto protéico à reagentes que promovem hidrólise de ligações peptídicas em pontos específicos da cadeia polipeptídica. Isto gera uma série de fragmentos peptídicos que podem ser separados por uma variedade de técnicas, como eletroforese uni ou bi-dimensional, capilar e em particular, CLAE-FR. Uma amostra padronizada do produto protéico, quando submetido ao procedimento, irá fornecer uma impressão digital característica, ou mapa peptídico, que será obtido lote a lote, podendo ser então subseqüentemente comparados (O’CONNOR, 1993). Na figura 4.6 é mostrado o cromatograma típico do mapa de peptídeos de somatropina humana recombinante.

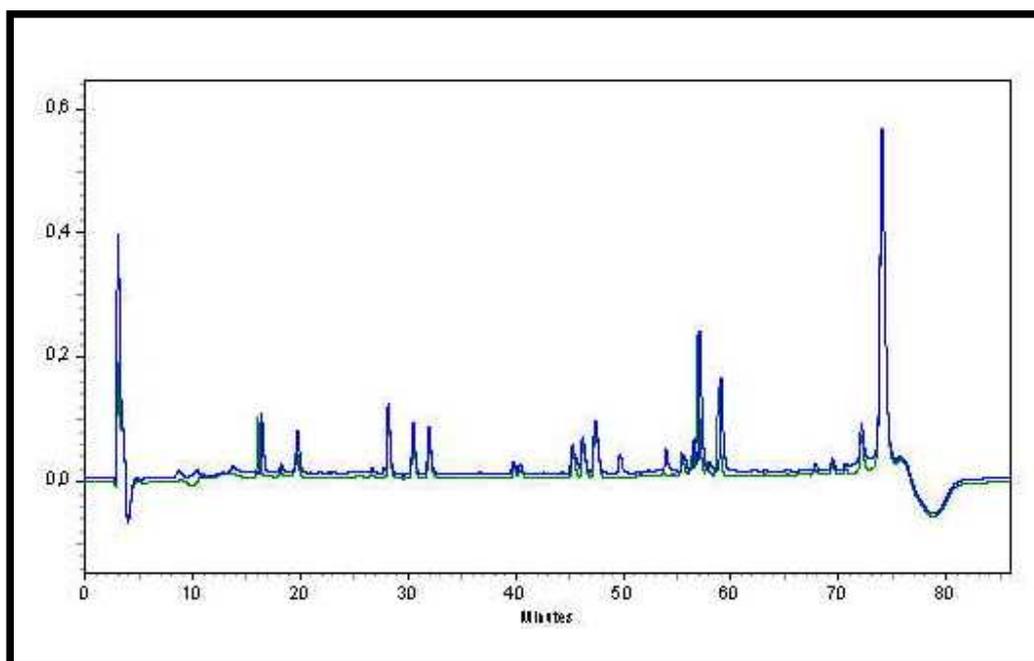


Figura 4.6 Mapa de peptídeos de somatropina humana recombinante por CLAE-FR. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₈, com partículas de 5 mm, poros de 300Å. Tamanho 4,6x250 mm, fase gradiente de H₂O/TFA 0,1% e H₂O (10%)/ACN(90%)/TFA 0,1% e detecção em 214 nm. A amostra e o padrão foram submetidos a hidrólise com tripsina por 18h antes da injeção. O padrão corresponde ao cromatograma escuro e a amostra ao mais claro. A perfeita equivalência ente os picos caracteriza a conformidade do produto. (INCQS/ Laboratório de Biológicos e Artigos e Insumos de Saúde/ Setor de Imunobiológicos, 2007).

4.2.2.7- Composição de aminoácidos

É a metodologia usada para determinar quais aminoácidos compõe uma proteína ou peptídeo, ou outras preparações farmacêuticas.

A composição de aminoácidos em proteínas e peptídeos pode ser usada para: - quantificação; - determinação da identidade destes baseado na sua composição de aminoácidos; - para apoio da análise de estrutura; - avaliação de estratégias de fragmentação para mapa peptídico, e para detectar a possível presença de aminoácidos atípicos. No caso de proteínas recombinantes expressas em *E. coli*, existe a possibilidade da incorporação de norleucina no lugar da metionina. (RANDHAWA et al., 1994). A composição de aminoácidos de um polipeptídeo é determinada pela sua hidrólise completa, seguida pela análise dos aminoácidos liberados.

Os métodos usados na composição de aminoácidos são baseados na separação cromatográfica dos aminoácidos após a hidrólise do biomedicamento. Um instrumento de análise de aminoácidos é um cromatógrafo de alta pressão, capaz de gerar gradientes de fase móvel que possibilitem a separação. Faz parte do método uma etapa de derivatização da amostra, que pode ser efetuada antes ou depois da cromatografia, tornando o aminoácido facilmente detectável, pois a maioria dos aminoácidos não possui grupos cromogênicos. Em seguida, os aminoácidos são detectados pelos seus tempos de retenção característicos. Os detectores podem ser UV-VIS ou fluorescência dependendo do método de derivatização usado. Deve ter também um integrador para transformar o sinal do detector e permitir a quantificação (USP, 2006). Na figura 4.7 é apresentado o esquema básico do mecanismo de análise de aminoácidos.

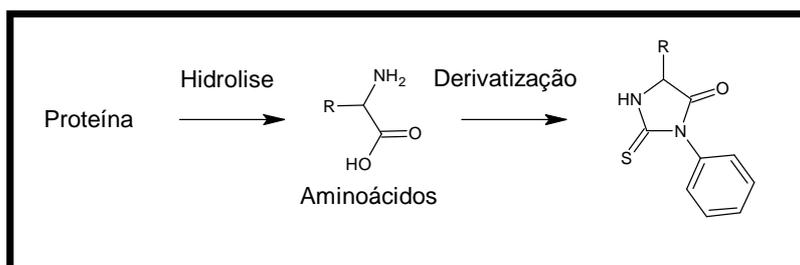


Figura 4.7: Análise de composição de aminoácidos. A proteína é inicialmente submetida a hidrólise e os aminoácidos devem ser submetidos a derivatização para a análise. A EP 5^a Ed. recomenda o método da derivatização com fenilisotiocianato e detecção no ultravioleta em 254 nm.

4.2.3 – Métodos eletroforéticos

4.2.3.1- SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas em bioquímica atualmente. É um método apropriado para identificar e assegurar a homogeneidade de proteínas em biomedicamentos, além de estimar os pesos moleculares de subunidades de proteínas bem como verificar a presença de subunidades proteicas. (CATZEL et al., 2006).

Sob a influência de um campo elétrico, partículas carregadas migram na direção do eletrodo de polaridade oposta. Os géis têm tamanhos de poros característicos, e os movimentos das partículas são retardados por interações de força elétrica e de peneiramento molecular resultam em velocidades de migração diferentes de acordo com o tamanho, formas e cargas das partículas. As separações moleculares são, portanto, baseadas nos efeitos de peneiramento e na mobilidade eletroforética. É uma técnica com alta resolução. Bandas com pelo menos 100ng de proteína podem ser visualizadas por coloração do gel com corantes tais como Azul de Comassie, subsequentemente o gel pode ser submetido a um densitômetro a laser que permite a determinação quantitativa do conteúdo protéico de cada banda, permitindo a quantificação das impurezas proteicas no produto. O uso de coloração de nitrato de prata aumenta a sensibilidade de detecção acima de 100 vezes, com bandas coradas com 1ng de proteína.

O SDS é utilizado com o objetivo de minimizar os efeitos de carga e forma. A combinação desse detergente fortemente aniônico com calor e redutores são usados para dissociar as proteínas que são aplicadas no gel. Os polipeptídeos desnaturados ligam-se ao SDS, tornando-se negativamente carregados e exibindo uma proporção consistente carga/peso e formas parecidas independentemente do tipo de proteína. O SDS liga-se à proteína na proporção de 1,4g de SDS por g de

proteína (cerca de uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos).

A mobilidade eletroforética total do complexo detergente-polipeptídeo resultante assume a mesma relação funcional de pesos moleculares de polipeptídeos. A migração em direção ao anodo ocorre de maneira previsível, sendo que os complexos de baixo peso moleculares migram mais rápido do que os de maior peso. A mobilidade eletroforética relativa varia linearmente com o logaritmo das suas massas moleculares. É possível estimar o peso molecular de uma proteína fazendo uma eletroforese com padrão de peso molecular conhecido na faixa em que se situa a amostra.

A possibilidade das subunidades polipeptídicas manterem sua estrutura tri-dimensional na proteína por ligações de pontes de dissulfeto pode ser testada por meio do tratamento com redutores como o 2-mercaptoetanol ou ditioneitol, que resultarão em desdobramento da cadeia polipeptídica e subsequente formação de complexo com SDS.

Em algumas análises, pode ser desejável que a manutenção das ligações covalentes dissulfídicas permaneçam intactas, preservando a forma oligomérica da proteína. O complexo oligomérico SDS-proteína migra mais lentamente do que suas unidades SDS-polipeptídicas, e as proteínas não reduzidas não são completamente saturadas com SDS e, por isso não mantêm a razão carga/peso, diminuindo a possibilidade de determinação do peso molecular sendo necessário que os padrões e proteínas estejam em configurações similares para comparações válidas. No entanto, a coloração de uma simples banda é um critério de pureza (USP, 2006). Na figura 4.8 é apresentado o eletroferograma resultante da estimativa de peso molecular de interferon humano recombinante.

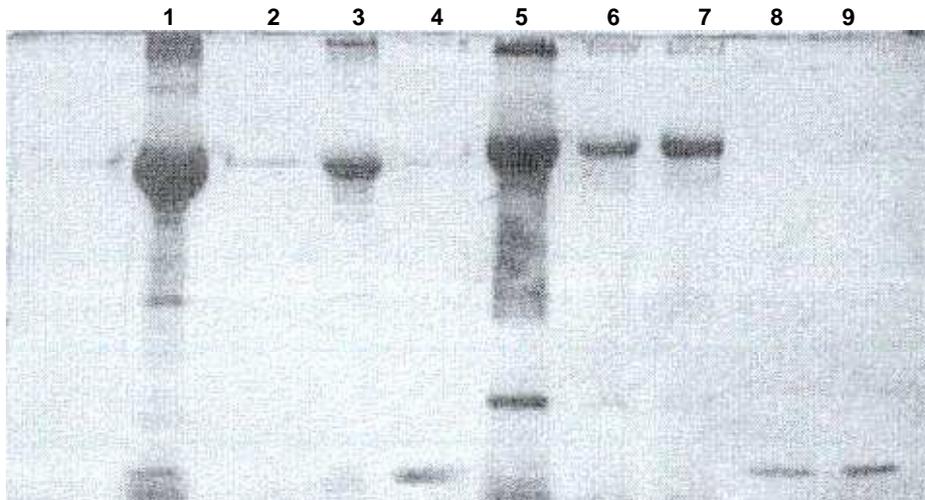


Figura 4.8: Análise de SDS PAGE de amostra de interferon humano recombinante. Amostras aplicadas nas linhas (1) Formulação concentração X (2) formulação X/10 (3) formulação X/5 (4) padrão de interferon FE (5) Formulação concentração X (6) formulação X/10 (7) formulação X/5 (8) e (9) padrão de interferon FE. As amostras (1) a (4) foram preparadas em condições nativas e (5) a (9) em condições redutoras. A banda mais intensa corresponde a soro albumina humana (66 KDa) utilizada como excipiente da formulação. A banda menos intensa corresponde ao interferon (19 KDa). Pode-se perceber no gel em condições redutoras um artefato com peso molecular menor linha (5). Concentração do gel 12%. Revelação pelo nitrato de prata. (INCQS/ Laboratório de Biológicos e Artigos e Insumos de Saúde/ Setor de Imunobiológicos,2007).

4.2.3.2- Focalização Isoelétrica

Focalização isoelétrica é um método que separa proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico, faixa de pH onde a carga líquida da proteína é zero. A separação ocorre em gel que pode ser de acrilamida ou agarose e contém uma mistura de eletrólitos anfotéricos (anfólitos) que submetidos à campo elétrico, estes migram no gel para criar um gradiente de pH. A proteína é diluída em pequeno volume de uma solução contendo um detergente não-iônico, junto com mercaptoetanol e uréia, como agente desnaturante. Esta solução solubiliza, desnatura e dissocia todas as cadeias polipeptídicas, mantendo sua carga intrínseca. A proteína é então aplicada ao gel com o gradiente de pH, aplica-se a voltagem, faz com que a proteína mova-se em direção ao gradiente de pH que corresponde ao seu ponto isoelétrico e ali permaneça, concentrando-a, ou seja,

focalizando a proteína. Cuidados especiais são necessários na preparação da amostra como, por exemplo, não conter sal.

Essa técnica, de forma diferente do SDS PAGE, separa as proteínas por carga. A resolução entre as bandas pode atingir até 0,001 unidades de pH.(USP, 2006)

Esta técnica é utilizada também na indústria biofarmacêutica para determinar a homogeneidade do produto. A homogeneidade é indicada pelo aparecimento de uma banda simples exibida no valor de ponto isoelétrico esperado. No caso de glicoproteínas variando ligeiramente em seu conteúdo de carboidratos irão variar em seu conteúdo de ácido siálico, e, portanto exibindo valores de ponto isoelétrico ligeiramente diferentes. Em tais situações, a análise de focalização isoelétrica, procura estabelecer a consistência lote a lote em termos de padrões de banda observados.

A focalização isoelétrica é também usada para análise de estabilidade de biomedicamentos, visto que a desamidação da asparagina introduz novas cargas negativas, como mostrado na figura 4.9 (WALSH, 2003).

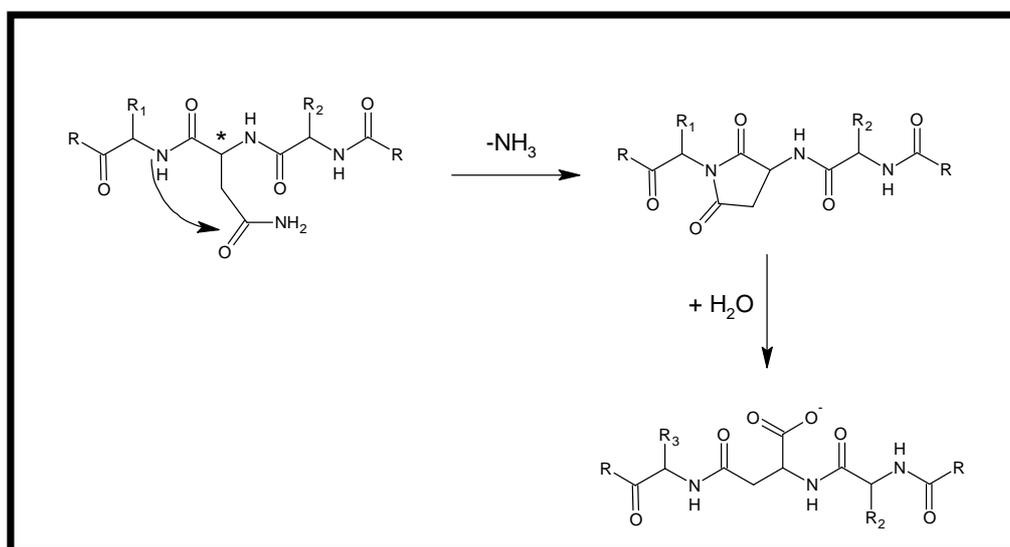


Figura 4.9: Desamidação de resíduos de asparagina presentes em proteínas. Se R1 for um hidrogênio, a velocidade da reação é bastante rápida. A formação do isoaspartato leva ao surgimento de carga elétrica no produto resultante.

4.2.3.3 – Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar é uma técnica na qual a separação é conduzida em tubos capilares (diâmetro interno de 20 a 75 μ m). Esses capilares têm o poder de dissipar rapidamente o calor, permitindo o uso de campos elétricos muito elevados, o que reduz o tempo da eletroforese para alguns minutos. A eletroforese capilar apresenta resolução extremamente elevada e pode ser automatizada da mesma forma que no CLAE, isto é, com a introdução automática da amostra e detecção dos componentes no capilar. (VOET, 2002).

O princípio geral da eletroforese capilar está baseado na velocidade de migração do analito sob a intensidade de um campo elétrico, E , determinadas pela mobilidade eletroforética do analito, e mobilidade eletrosmótica do tampão dentro do capilar. A mobilidade eletroforética de uma proteína (μ_{ep}) depende de características do soluto (carga elétrica, tamanho molecular e forma) e características do tampão no qual a migração ocorre (tipo e força iônica do eletrólito, pH, viscosidade e aditivos)

A separação entre duas bandas (expressa pela resolução R_s) pode ser obtida por modificação da mobilidade eletroforética dos analitos, pela mobilidade eletrosmótica induzida pelo capilar, e pelo aumento da eficiência de cada banda para cada analito.(USP, 2006).

A vantagem desta técnica para a análise de proteínas é a possibilidade de conduzi-la sob vários modos, com diferentes mecanismos de separação usando o mesmo equipamento e diferentes tipos de capilares. Os modos de separação que podem ser utilizados incluem eletroforese zona livre (separação pela carga líquida da proteína no tampão), focalização isoelétrica capilar (semelhante à focalização isoelétrica em gel), eletroforese gel capilar com SDS (utilizando capilar preenchido com acrilamida) e cromatografia eletrocínética micelar capilar (uso de micelas de SDS em capilares sem preenchimento). Dentro das vantagens da eletroforese capilar estão: alta resolução, tempo analítico relativamente curto, baixo custo

operacional e habilidade para automação. (RAČAITYTĖ; KIESSIG; KÁLMÁN, 2005).

Desta forma, a partir das informações gerais apresentadas nas técnicas analíticas descritas anteriormente, é possível apresentar um resumo dos métodos utilizados para caracterização dos biomedicamentos e sua aplicação, além do nível de informação estrutural possível de ser analisada, tabela 4.3.

Tabela 4.3: Ensaio físico-químico utilizados na caracterização de proteínas

A - Métodos espectroscópicos

Método	Estrutura				Aplicação
	1 ^ª área	2 ^ª área	3 ^ª área	4 ^ª área	
Ultravioleta		X	X		Agregação e quantificação
Espalhamento de luz			X	X	
Fluorescência		X	X	X	Desnaturação
Dicroísmo circular		X	X		
Infravermelho		X			
Raio-X	X	X	X	X	Integridade Conformacional
Espectrometria de Massas	X				Identidade e modificações químicas
Ressonância Magnética Nuclear	X	X	X		Estrutura 3D e desamidação

B - Métodos cromatográficos

Método	Estrutura				Aplicação
	1 ^{ária}	2 ^{ária}	3 ^{ária}	4 ^{ária}	
Fase Reversa		X	X		Modificações Químicas
Interação Hidrofóbica		X	X	X	
Exclusão Molecular				X	Agregação
Troca Iônica	X	X	X		Modificações Químicas e glicosilação
Sequenciamento N-terminal	X				Identidade
Mapa de Peptídeos	X				Identidade e modificações químicas
Composição de aminoácidos	X				Quantificação e Modificações químicas

C - Métodos eletroforéticos

Método	Estrutura				Aplicação
	1 ^{ária}	2 ^{ária}	3 ^{ária}	4 ^{ária}	
SDS PAGE	X	X	X		Pureza, peso molecular, identidade.
Focalização Isoelétrica		X	X		Modificações Químicas e glicosilação
Eletroforese capilar		X	X		Modificações Químicas e glicosilação

(DIPAULO; et al.,1999).

4.3 – APLICABILIDADE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Todos os métodos anteriormente descritos são importantes e têm grande aplicação em campos específicos da pesquisa com proteínas. Porém esses métodos tem diferenças muito grandes quanto à possibilidade de uso em rotinas analíticas que acompanham processos produtivos, como no caso da produção de proteínas recombinantes para fins terapêuticos. (PARKINS; LASHMAR, 2000) Essas diferenças envolvem características técnicas dos métodos, sensibilidade, disponibilidade de pessoal treinado e a tolerância a contaminantes. Também devem ser consideradas as questões de natureza econômica, como o custo da

implementação e manutenção de equipamentos e o gasto com reagentes ao longo do tempo.

Levando em consideração tais fatores estabeleceu-se uma ordem de aplicabilidade para os métodos já discutidos. Considerou-se que os principais critérios são: 1- custo para implementação e manutenção; 2- tempo para a análise 3- disponibilidade recursos humanos. Esses fatores devem ser considerados tanto para o setor regulado (empresas) quanto aos órgãos públicos. Essa ordem de prioridade para a aplicabilidade dos métodos analíticos foi estabelecida da seguinte forma:

Alta – atende a todos os critérios.

Média – restrição em pelo menos um.

Baixa – restrição em mais de mais de um critério.

A aplicação desses critérios (tempo, custo, depreciação) aos ensaios relacionados anteriormente nos levou a preparação da tabela 4.4, onde estão sumarizadas as informações para cada método.

Tabela 4.4: Viabilidade dos ensaios físico-químicos utilizados na caracterização de proteínas para a análise de produtos biotecnológicos

Método	Viabilidade	Observações
Ultravioleta	Alta	*****
Espalhamento de luz	Baixa	Relacionado ao tipo de informação
Fluorescência	Média	Custo de implementação alto
Dicroísmo circular	Baixa	Custo de implementação /manutenção
Infravermelho	Alta	*****
Difração de Raios-X	Baixa	Demorada, alto custo
Espectrometria de Massas	Média	Rápida, custo de manutenção baixo (TOF)
Ressonância Magnética Nuclear	Baixa	Demorada, alto custo Aplicado em outros produtos biológicos
Cromatografia Líquida*	Alta	*****
Seqüenciamento N-terminal	Baixa	Custo de reagentes elevado
Eletroforese	Alta	*****
Eletroforese capilar	Média	Incorporação rápida pela indústria

*incluiu as técnicas de fase reversa, troca iônica, exclusão molecular, interação hidrofóbica

4.4 – MONOGRAFIAS FARMACOPEICAS E PRODUTOS BIOLÓGICOS DNA RECOMBINANTE

4.4.1 – United States Pharmacopoeia – USP XXIX

Conforme apresentado na tabela 4.2, a USP XXIX contempla apenas insulina e somatropina como monografias específicas. Apesar de não estar disponível uma monografia oficial para outros biomedicamentos, a USP sugere uma serie de requisitos que deverão ser avaliados e sugere métodos para essa avaliação. Na tabela 4.5 são enumerados esses requisitos e as possíveis metodologias a serem utilizadas.

Tabela 4.5: – Critérios e métodos recomendados pela USP-XXIX para a avaliação de biomedicamentos

Critério a ser avaliado	Metodologia	Técnica
Teor do Biomedicamento	Espectrofotometria no UV/Vis.	Reação específica para proteínas.
	Dosagem de Nitrogênio protéico.	Kjeldahl
Estrutura primária	Sequenciamento Composição de aminoácidos, Mapa peptídico.	Edman; Pode usar espectrometria de massas CLAE com derivatização. CLAE
Pureza	Eletroforese Cromatografia	SDS PAGE e IEF CLAE-FR, HPIEC e HPSEC
Estrutura de carboidratos	Espectrofotometria no UV/Vis. Cromatografia	Reação colorimétrica para monossacarídeos Mapa de oligossacarídeos por HPAEC-PAD

Adotando essa postura, a USP permite que cada produtor utilize a metodologia que julgar mais apropriada. Dessa forma segue-se uma tradição cultural norte americano de cada companhia ser responsável por seus produtos e ter a liberdade de estabelecer sua própria estratégia para esse fim. Acreditamos que esse modelo não é perfeitamente compatível com a tradição Brasileira, que prevê uma regulamentação maior.

Ainda dentro dessa lógica, uma observação que deve ser feita é que não há uma indicação específica sobre a aplicabilidade dos ensaios a etapas intermediárias e ao produto final, ficando a critério do fabricante.

4.4.2 – Farmacopéia Européia 5ª edição – EP

Da mesma maneira que a USP, a EP também prevê requisitos gerais para produtos de biotecnologia DNA recombinantes. A EP determina que o produto deve ser caracterizado quanto a sua identidade, pureza, potencia e estabilidade, utilizando métodos químicos, físicos, imunoquímicos e biológicos. Nenhum ensaio específico é apontado. Algumas metodologias são sugeridas para a determinação de consistência de produção. Essas metodologias são relacionadas abaixo:

- Composição de aminoácidos
- Sequenciamento N terminal
- Mapa de peptídeos
- Proteína total
- Proteínas do sistema de expressão

Esses controles são recomendados para o processo e produto final. Um aspecto interessante a ser observado é a não existência de uma preocupação especial para a caracterização de glicoproteínas.

No final das recomendações gerais a EP determina que nas monografias específicas ensaios aplicáveis a cada produto sejam listados. Por outro lado, além dos produtos mais tradicionais, são contempladas monografias para eritropoetina e o interferons α e γ , em todos os casos matéria prima. Essas monografias demonstram uma preocupação com aspectos regulatórios maior que nos EUA. Na tabela 4.6 são listados os ensaios recomendados para esses produtos.

Tabela 4.6: Monografias específicas de biomedicamentos da EP 5ªEd.

Monografia Interferon α	Monografia Interferon γ	Monografia Eritropoetina
Mapa de peptídeos CLAE-FR	Mapa de peptídeos CLAE-FR	Mapa de peptídeos CLAE-FR
Focalização isoeletrica	Deamidação de asparagina por HPIEC	Eletroforese capilar em zona livre
SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE + imunoblot
Teor de proteínas	Teor de proteínas	Teor de proteínas
	Sequenciamento N-terminal	Sequenciamento N-terminal
Proteínas relacionadas	Dímeros por HPSEC	Dímeros por HPSEC
	Composição de aminoácidos	de Teor de ácido siálico.
Potencia	Potencia	Potencia

EUROPEAN, Pharmacopoeia, 2005.

Analisando-se os ensaios da tabela acima a informação que cada um deles fornece de acordo com a tabela 4.6 pode-se observar uma certa redundância. O mapa de peptídeos, o sequenciamento N-terminal e no caso da EPO o imunoblot fornecem informações sobre a identidade da proteína recombinante. A seqüência N terminal da proteína forma um dos peptídeos presentes no mapa. Ou seja, um erro na seqüência N terminal vai gerar uma diferença no tempo de retenção desse peptídeo. Assim como, a composição de aminoácidos no interferon γ visa determinar a incorporação de norleucina no lugar da metionina, esses peptídeos que incorporam norleucina devem ter comportamento cromatográfico diferente dos peptídeos normais.

Uma observação interessante é que a EP e a USP não recomendam ensaios que avaliam de forma mais direta a estrutura tridimensional de produtos recombinantes.

4.4.3 – Farmacopéia Brasileira 4ª edição – FB

A Farmacopéia Brasileira 4ª edição contém as monografias de insulina e somatropina, onde os parâmetros e metodologias a serem observados são idênticos aos citados na USP XXIX. Não existem recomendações gerais para produtos DNA recombinante nem monografias para outros biomedicamentos. Isso nos motivou a propor sugestões para a inclusão desses produtos na FB.

5 – PROPOSTA DE INCLUSÃO DE PRODUTOS DNA RECOMBINANTE NA FARMACOPEIA BRASILEIRA

Para propor a inclusão desses produtos na FB, devemos levar em consideração a realidade nacional nessa área específica. Como já mostrado hoje o Brasil importa a matéria prima desses produtos e apenas etapas de envase e rotulagem são feitas no país. Num primeiro momento, seria mais importante estabelecer monografia para produto final.

Para propor monografias para produto final, as características desse tipo de material devem ser levadas em consideração. Biomedicamentos são moléculas muito potentes, e no caso da EPO e dos INF- α e INF- γ , as concentrações finais estão na faixa de microgramas. Em se tratando de proteínas, isso significa que a concentração está na faixa de nano mols. Os ensaios propostos devem então ser sensíveis o suficiente para a detecção nessa escala. Além disso, é comum a presença de vários excipientes, principalmente soro albumina humana (HSA). Essa proteína entra nas formulações com a finalidade de estabilizar o produto, inibindo a agregação das moléculas do ativo. A concentração usual de cerca 1,5 mg, bastante acima do ativo. Essa concentração é muito superior a do biomedicamento, dificultando a realização das análises.

Além dessas particularidades, as características gerais para monografias de produtos biotecnológicos não devem ser esquecidas. Ou seja, devem ser propostos ensaios que caracterizem a estrutura molecular, visto que biomedicamentos são moléculas complexas e seu efeito pode ser afetado por pequenas modificações. (DEFELIPPIS & LARIMORE, 2006). Além disso, é interessante desenvolver ensaios que avaliem o teor do princípio ativo. Há a discussão na literatura científica que a associação das duas medidas pode substituir os ensaios de potência, que utilizam animais. (WHO, 1991)

Seguindo essa lógica, vamos dividir essa proposta por partes. Na primeira parte vamos discutir ensaios para a caracterização de estrutura molecular e na segunda parte, ensaios para a determinação do teor.

5.1 – PROPOSTA DE ENSAIOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR

Como as etapas iniciais do processo de produção não são realizadas no país, não há por parte das empresas nacionais o acesso ao produto acabado a granel. Logo não é possível a caracterização da estrutura molecular nessa etapa, restando apenas a possibilidade de caracterização no produto formulado. O primeiro passo para essa caracterização é a separação do componente ativo de outros componentes presentes na formulação. Já se encontra iniciado esse trabalho no Setor de Imunobiológicos do DQ/INCQS, desenvolvendo um método para a separação da EPO de outros componentes da formulação, por CLAE FR. Seria necessário o desenvolvimento de métodos semelhantes para outros biomedicamentos.

Como já foi comentado, o melhor método para a caracterização da estrutura molecular de proteínas é o mapa peptídico. Tradicionalmente esse mapa é preparado por CLAE FR com detecção por UV. Porém, na concentração que o INF e a EPO se apresentam nas formulações esse método não tem sensibilidade suficiente para a detecção. Isso torna impossível a análise, que se baseia na comparação de um cromatograma da amostra com o cromatograma do padrão.

A alternativa para essa técnica é utilizar a espectrometria de massas. A EM é mais sensível que a CLAE FR, detectando facilmente peptídeos na faixa de nano mols. A EM determina a massa molecular absoluta dos peptídeos, sendo necessária apenas à comparação dos valores obtidos com os esperados de acordo com a seqüência de proteína. Recentemente conseguimos no laboratório avaliar a identidade de EPO em formulações combinando a separação dos demais componentes da formulação por CLAE FR e EM do tipo MALDI TOF (figura 5.1). Esse tipo de experimento tem que ser desenvolvido com outros biomedicamentos, como os INF, para estabelecer as condições cromatográficas.

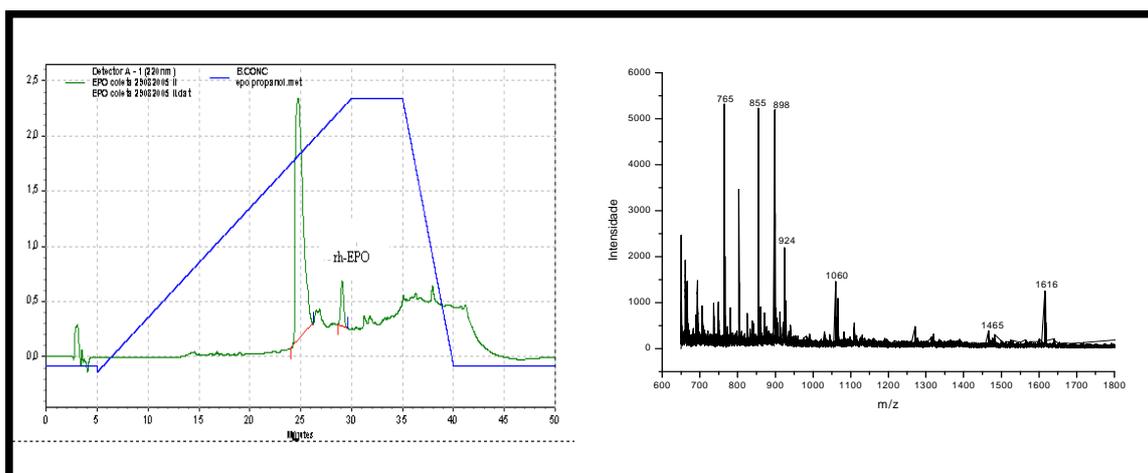


Figura 5.1: À esquerda um cromatograma de fase reversa de EPO em formulações. O maior pico presente corresponde a HSA. A EPO é o pico menor assinalado. A coluna é uma C₁₈ com 5µm, 300Å de poro, 4,6x300 mm. Fase móvel H₂O(TFA 0,1%)/3ACN:1nPrOH:1H₂O(TFA 0,1%). À direita espectro de massas obtido do pico de EPO. A amostra foi coletada, seca em evaporador centrífugo tipo Speed-Vac®, hidrolisada com tripsina. O espectro de massas foi obtido em um equipamento do tipo MALDI-TOF, utilizando-se ácido alfa ciano p-hidroxi cinâmico como matriz. Amostras lidas no modo refletido positivo. Os picos assinalados correspondem aos peptídeos obtidos da hidrólise da EPO pela tripsina. (CONCEIÇÃO, 2003).

Pelos motivos explicados anteriormente acreditamos que a identidade por EM pode substituir outros ensaios a composição de aminoácidos em INF γ e o sequenciamento N terminal. Mudanças na estrutura primária como a incorporação de norleucina, desamidação da asparagina, oxidação de metionina e erros na expressão e na formação de pontes de sulfeto podem ser identificados.

A espectrometria de massas sozinha não pode assegurar todos os parâmetros necessários para a avaliação da estrutura molecular de biomedicamentos. O peso molecular também é uma medida importante da integridade do produto. Para a avaliação de peso molecular pode-se utilizar o SDS PAGE com revelação pelo nitrato de prata, devido à baixa concentração do ativo.

No caso de glicoproteínas a determinação das diversas isoformas é importante para garantir as propriedades farmacocinéticas. Conforme a tabela 4.6 a EP recomenda o uso da EC em zona livre para essa determinação. Há na literatura referência ao uso dessa técnica em EPO produto final (GIRARD, 1997). Para tanto é necessário o uso de cloreto de níquel no tampão de separação. Segundo os autores esse sal ajuda a aumentar a migração da HSA, separando-a da EPO.

5.2 – PROPOSTA DE ENSAIOS PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR

A determinação do teor de ativo em biomedicamentos não pode ser feita utilizando-se os métodos colorimétricos descritos no item 4.2.1.1, devido à presença dos excipientes. Para a quantificação do ativo seriam necessários métodos de separação, como a cromatografia e eletroforese, para eliminar os interferentes. Nesse tipo de método a quantificação é feita por padronização externa, de forma semelhante aos medicamentos sintéticos.

Um problema que aparece nessa estratégia é a falta de padrões de proteínas recombinantes estabelecidos para ensaios físico químicos. Recentemente foi publicada uma metodologia para a separação HSA/EPO baseada em troca iônica (JONGEN, 2005). Os autores demonstraram que apesar da separação ser adequada, não há uma boa correlação entre os valores obtidos por ensaios biológicos e o teor determinado pela cromatografia. Os autores atribuem esse efeito ao fato de o padrão distribuído pela EP ter sido estabelecido por ensaios biológicos.

Para a determinação do teor a primeira etapa então seria estabelecer um padrão via método físico-químico. No caso da EPO e do INF- α , Bio-manguinhos seria o fornecedor natural de material para esse estabelecimento. O método para o estabelecimento desse padrão é a composição de aminoácidos quantitativa, já o NIST disponibiliza um padrão de aminoácidos.

5.3 – PROPOSTA FINAL PARA MONOGRAFIAS DA FB

Como proposta final de monografias para a FB temos os seguintes métodos a propor:

Monografia produto final ensaio

- Mapa de peptídeos por EM
- Determinação de isoformas por EC
- Determinação do Peso molecular por SDS PAGE
- Determinação do teor por CLAE

6 – CONCLUSÃO

Diante da complexidade estrutural das moléculas protéicas, sua análise demanda o domínio de um grande número de técnicas físico químicas, capazes de elucidar e complementar informações relativas a atividade e potência.

A discussão aqui apresentada demonstra que essa variedade metodológica não significa que todas as técnicas possam ser aplicadas ao controle de qualidade de biomedicamentos. Para uma metodologia analítica ser aplicável no controle de qualidade de um produto ela deve ser rápida e de baixo custo, além de sensível. Levando em consideração esses critérios percebemos que na realidade o número de técnicas úteis em rotinas analíticas diminui bastante.

De um modo geral esses critérios justificam as metodologias presentes na USP XXIX e na EP 5ªEd. Há uma certa redundância entre os métodos recomendados, principalmente na caracterização da estrutura primária.

A espectrometria de massas pode substituir os procedimentos mais tradicionais com a vantagem de ser mais sensível e precisa. O seu uso seguiria a tendência de aumentar o conhecimento do produto para melhor controlar.

A quantificação do biomedicamento é um parâmetro importante, embora hoje as monografias só apresentem ensaio de potência. A maior dificuldade da implementação das metodologias de controle para produtos de origem recombinante é o estabelecimento de padrões para ensaios físico químicos quantitativos.

Espera-se que a partir do levantamento bibliográfico apresentado nesta dissertação seja possível escolher e implementar efetivamente os ensaios de controle de qualidade para biomedicamentos. As informações aqui discutidas servirão de base para as justificativas, com relação a fatores técnicos e financeiros, no sentido de tornar a relação custo-benefício favorável.

Por outro lado, para a efetiva implementação destas técnicas, em alguns casos, serão necessários estudos interlaboratoriais para melhor estabelecer os protocolos, antes de oficializar qualquer método na FB.

7 – BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, Marie-Isabel. **High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins**. In: REID, Ronald E. (ed.) Peptide and Protein Drug Analysis. M. Dekker, 2000. p. 309-344.
- ALBERTS, Bruce et al; **Biologia molecular da célula**. Trad. Amaury Braga Simonetti et al. 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Registro, Alteração Pós-Registro e Revalidação de Registro de Produtos Biológicos Terminados. Resolução n.315 de 26 de outubro de 2005. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 20 jun 2006.
- ANVISA, Resultado de Consulta de Produtos de Empresas – Medicamentos. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_detalhe.asp>. Acesso em: 19/01/2007.
- APFFEL, Alex et al. **Application of New Analytical Technology to the Production of a «Well-Characterized Biological»** Brown F. Lubiniecki A, Murano G. (eds) Characterization of Biotechnology Pharmaceutical Products. *Dev. Biol. Stand.* Basel Karger, v. 96, p.11-28, 1998.
- ASHCROFT, Alison E. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. **Nat. Prod. Rep.** v. 20, p. 202-215, 2003.
- ATZEL, Dallia et al. Fractionation of follicle stimulating hormone charge isoforms in their native form by preparative electrophoresis technology. **Journal of Biotechnology** v. 122, p. 73-85, 2006.
- BANEYX, François; MUJACIC, Mirna. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*, **Nature Biotechnology**, v. 22, n.11, nov. 2004.
- BARTOLOMEO, Maria Paola; MAISANO, Federico. Validation of a Reversed-Phase HPLC Method Amino for Quantitative Acid Analysis. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 17, n. 2, p.131-137, 2006.
- BHOPALE, G. M.; NANDA R. K. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. **Current Science**, v. 89, n. 4, aug. 2005.

- Biological Standardization and control.** A Scientific Review commissioned by the UK National Biological Standards Board (NIBSB). 1997. 22 p
- BOLGIANO, Barbara et al. Effect of physico-chemical modification on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-CRM₁₉₇ conjugate vaccines. **Vaccine** v.19, p. 3189-3200, 2001.
- BRASS, Johann M. ; KRUMMEN, Kurt; MOLL-KAUFMANN, Christine. Quality assurance after process changes of the production of a therapeutic antibody, **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 71, p. 395-403, 1996.
- BRITISH Pharmacopoeia 2007. London. The stationery Office, 2007 CD-ROM.
- CHIRINO, Arthur J.; Mire-Sluis, Anthony. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, nov. 2004.
- CINDRIĆ, Mario; VULETIĆ, Marko. Characterisation of interferon α -2b by liquid chromatography and mass spectrometry techniques. **Journal of Separation Science**, v. 26, p.1263-1268, jun. 2003.
- CONCEIÇÃO, Claudia Maria da, **Isolamento e Caracterização Físico-Química e Química Parcial de Eritropoetina Humana Recombinante de Formulações Terapêuticas**.2003. 175f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.
- CREGG, James M.; CEREGHINO, Joan Lin. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.
- DAL MONTE, Paul r.; ROUAN, S. Kathy Edmond; BAM, Narenda B., **Biotechnology-Based Pharmaceuticals**. In: DEKKER, Marcel. **Modern Pharmaceuticals**, 4 ed. Rev. New York, 2002. p.838.il. (Drugs and Pharmaceutical Sciences, 121).
- DEFELIPPIS, Michael R.; LARIMORE, Frederick S. The role of formulation in insulin comparability assessments. **Biologicals**, v. 34, p. 49-54, 2006.
- DERTZBAUGH, Mark T. Genetically Engineered Vaccines: An overview. **Plasmid**. v. 39, p.100-113, nov.1998.
- DIPAOLLO, Byron et al. Monitoring impurities in biopharmaceuticals produced by recombinant technology. **Pharmaceutical Science & Technology Today** v.2, n.2, feb. 1999.

- DYIR, J. Evangelista; SUTTNAR J. Separation used for purification of recombinant proteins. **Journal of Chromatography B**, v. 699, p. 383-401, 1997.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. 5 ed. Strasbourg: council of Europe, 2005. 1CD-ROM.
- FERRER, Marcela et al. The scientific muscle of Brazil's health biotechnology. **Nature Biotechnology**, v. 22, supplement. Dec. 2004.
- FROKJAER, Sven; and Hovgaard Lars(Ed.).**Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins**. London. Taylor & Francis: 2000. 238p.
- GERNGROSS, Tillman U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, nov. 2004.
- GIRARD, M.; BIETLOT, H.R., Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 759, p. 177-184, 1997.
- HARTMANN, Eva; et al. Comparison of reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for the separation of amphipathic α -helical peptides with L- and D-amino acid substitutions in the hydrophilic face. **Journal of Chromatography A**, v. 1009, p. 61-71, 2003.
- HOUDE, Damian et al. Determination of protein oxidation by mass spectrometry and method transfer to quality control. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, p. 189-198, 2006.
- JANDIK, Petr et al. Analysing mixtures of amino acids and carbohydrates using bi-modal integrated amperometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 732, p. 193-201, 1999.
- JONGEN, Peter M. J. M. et al. High-performance anion-exchange chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to determine erythropoietin in pharmaceutical products **Journal of Chromatography A**, v. 1078, p.113–119, 2005.
- KOOLMAN, Jan; RÖHM, Klaus Heinrich. **Bioquímica Texto e Atlas**. Trad. Edison Capp. 3 ed. Porto Alegre. Artmed, 2005.
- LEMERCINIER, Xavier; MARTINEZ-CABRERA, Ileana, JONES, Christopher. Use and Validation of na NMR Test for the Identity and O-acetyl content of *Salmonella typhi* Vi Capsular Polysaccharide Vaccine. **Biologicals** v. 28, p. 17-24, 2000.

- LINQUEO, M. Elena et al. Methodology for predicting the separation of proteins by hydrophobic interaction chromatography and its application to a cell extract. **Journal of Chromatography A**, v. 1009, p. 189-196, 2003.
- LUYKX, Dion M.A.M. et al. HPLC and tandem detection to monitor conformational properties of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography B**, v. 821, p. 45-52, 2005.
- MARINHO, Anna Carolina Machado et al. Evaluation of Recombinant Human Erythropoetin in Drugs by Mass Spectrometry. In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2006, Águas de Lindóia. **XXXV Reunião Anual Programa**. SP, 2006. p. 69.
- MODERN PHARMACEUTICS, 4.ed. rev. New York. Marcel Dekker, 2002. 838p. il. (Drugs and Pharmaceutical Sciences, 121).
- MS/FIOCRUZ/Instituto Nacional de Controle de Qualidade-INCQS. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/incqs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>> Acesso em 19/01/2007.
- NÄRHI, Marko; NORDSTRÖM Katrina. Manufacturing regulatory and commercial challenges of biopharmaceuticals production: a Finnish perspective. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 397-405, jan. 2005.
- NELSON, David L.; Cox, Michael M. **LEHNINGER, Princípios da Bioquímica**, trad. Arnaldo Antunes Simões (coord.); Wilson Roberto Navega Lodi. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NG, Joseph D.; GAVIRA, José A.; GARCIA-RUIZ, Juan M. Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied cristallographic structure determination. **Journal of Structural Biology**, v. 142, p. 218-231, 2003.
- O'CONNOR, John V., The Use of Peptide Mapping for the Detection of Heterogeneity in Recombinant DNA-derived Proteins, **Biologicals**, v. 21, p. 111-117, 1993.
- PARKINS, Dave A.; LASHMAR Ulla T. The formulation of biopharmaceutical products. **Pharmaceutical Science & Technology Today** v. 3, n. 4, apr. 2000.
- PUPO, Armando Aguiar. Insulina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 32, n. 11/12, p. 205 – 207, nov./dez. 1986.

- RAČAITYTĖ, K.; KIESSIG, S.; KÁLMÁN, F. Application of capillary zone electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography in the biopharmaceutical industry for the quantitative analysis of the monosaccharides released from a highly glycosylated therapeutic protein. **Journal of chromatography A**, v. 1079, p. 354-365, 2005.
- RANDHAWA, Zafar I. et al. Incorporation of Norleucine at Methionine Positions in Recombinant Human Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF, 4-153) /expressed in *Escherichia coli*: Structural analysis, **Biochemistry**, v. 33, p. 4352-4362, 1994.
- Saúde. Ministério da Saúde. Portaria GM n. 2577 de 27 de outubro de 2006. Aprova o Componente de Medicamentos Excepcionais. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PT_2577_Comp_Medicam_Disp_Excep.pdf Acesso em: 19/01/2007.
- SCHELLEKENS, Huub. How similar do 'biosimilars' need to be? **Nature Biotechnology**, v. 22, n.11, nov. 2004.
- SIMPSON, Richard J. **Proteins and Proteomics a laboratory manual**. ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003. 926 p.
- SMITH Emil L. et al. **Bioquímica Aspectos Gerais**, 7 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1985 trad. Patrícia Lydie Voeux Pinho.
- SNYDER, Lloyd; KIRKLAND, Joseph J.; GLAJCH Joseph L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York. John Wiley & Sons, 1997. 765 p.
- TEARBOPOULOS, Anthony et al. Comparative Mapping of Recombinant Proteins and Glycoproteins by Plasma desorption and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 13, jul. 1, 1994.
- TEMPST, Paul et al. Internal sequence analysis of proteins separated on polyacrylamide gels at the submicrogram level: Improved methods, applications and gene cloning strategies. **Electrophoresis**, v. 11, p. 537-555, 1990.
- THE UNITED States Pharmacopeia. 29.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006. 3539 p. il. 1 CD-ROM.
- VOET, Donald; Voet, Judith G.; Pratt, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica**. 1ª reimpressão. São Paulo. Artmed ed. 2002. 931p. Trad. Artur Germano Fett Neto.

- WALSH, Gary. **Biopharmaceuticals, Biochemistry and Biotechnology**. 2 ed. England. Wiley, 2003. 551 p.
- WANG, Wei. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 1-30, 2005.
- WHO expert committee on biological standardization. Forty-first report. Geneva: WHO, 1991. 79 p. (WHO Technical Report Series, 814)
- WURM, Florian M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, nov. 2004.
- WÜTHRICH, Kurt. Protein Structure Determination in Solution by NMR Spectroscopy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 36 p. 22059-22062, 1990.
- XIE, Minli; SCHOWEN, Richard L. Secondary Structure and Protein Deamidation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1. jan. 1999.
- ZHENG, Xiaoyang; WU, Shiaw-Lin; HANCOCK, William S. Glycation of interferon-beta- 1b and human serum albumin in lyophilized glucose formulation Part III: Application of proteomic analysis to the manufacture of biological drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 136-145, 2006.
- ZHOU Ghuo-Hua et al. Study on the quality of recombinant proteins using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. **World Journal of Gastroenterology, WJG**, v. 5, n. 3, p. 235-240, jun. 1999.