UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ANNA CAROLINA MACHADO MARINHO

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE

RIO DE JANEIRO

2014

ANNA CAROLINA MACHADO MARINHO

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora:
Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto

RIO DE JANEIRO
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Marinho Machado, Anna Carolina.
Avaliação e caracterização de Eritropoetina Humana Recombinante / Anna Carolina Machado Marinho. –2014.
147f. : il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto

1. Eritropoetina Humana recombinante. 2. Eletroforese bidimensional. 3. Cromatografia em fase reversa. 4. Espectrometria de massas ESI-QTOF. I.Couto, Maria Antonieta Peixoto Gimenes. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Avaliação e caracterização de Eritropoetina Humana Recombinante.

ANNA CAROLINA MACHADO MARINHO

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em 12/03/2014.

_____
Profa. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, D.Sc. (Escola de Química /UFRJ)
Orientadora

_____
Profa. Claudia Maria da Conceição, D.Sc. (INCQS/ FIOCRUZ)

_____
Profa. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing. (COPPE/ UFRJ)

_____
Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D. (EQ/UFRJ)

Dedico este trabalho e agradeço profundamente à minha querida mãe, pelos ensinamentos e perseverança demonstrados, incentivo, dedicação, amor e por sempre valorizar os meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho, de suma importância para minha vida profissional, se deu graças a pessoas muito importantes e por isso não poderia deixar de evidenciar meus sinceros agradecimentos e compartilhar um sentimento único no qual estou vivendo de satisfação, de dever cumprido e que há um longo caminho a percorrer...

Pessoas que convivem comigo sabem que estes últimos meses, foram vividos dias de muita tristeza e incertezas. Mas nunca permiti ou permitiram que estas tristezas pudessem fazer com que eu esmoreça...

Primeiramente, agradeço a Deus por sentir sempre sua presença em minha vida, pois mesmo nos momentos mais difíceis, principalmente nestes últimos meses, me direcionou com sabedoria, perseverança e, sobretudo com humildade e amor ao próximo.

A minha mãe Lindava, pelo seu amor incondicional, pelas palavras de carinho e pela sua persistência pela vida. Sei que não é fácil pelo o que passamos, mas tenho certeza que isso foi mais um aprendizado. Tu, mãe, és motivo de muita admiração!

A minha tia Ivone, um anjo em minha vida, pelo apoio sempre e amor que foram e são fundamentais para minha vida. A minha segunda mãe...

Ao meu tio Isaias (*in memorian*) pela demonstração de carinho e fazer com que eu sinta que pai nem sempre é o biológico e sim aquele que cria com amor e respeito.

Aos meus primos Nubia Regina, Marta Cristiane, Júlio Cesar, Marcelo Luciano (*in memorian*) e Lucas Peres, mais do que primos são meus irmãos e amigos.

Ao meu noivo, Bruno Bittencourt, pelo incentivo, amor, companheirismo sempre e compreensão, principalmente, nestes últimos dias...

A minha amiga Claudia Maria da Conceição, importante para o meu crescimento profissional, seja em um olhar amigo, um conselho ou simplesmente passar o conhecimento que sem dúvida foram colocados neste trabalho.

Ao amigo Filipe Soares Quirino da Silva pela dedicação e reflexões que proporcionaram a concretização deste estudo.

A minha orientadora Professora Dr.ª Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, pelo incentivo, carinho, compreensão, dedicação e paciência. Sem dúvida ganhei uma grande amiga e que com certeza cultivarei esta amizade.

Aos meus amigos Rodrigo Coelho, Danilo Parmera, Eduardo Ruback, Esther Gutierrez e Maíra Pellegrini pelo apoio, companheirismo, amizade e pelas palavras de carinho.

Ao projeto EPO-Biomanguinhos/FIOCRUZ.

A todos do laboratório de Imunobiológicos do INCQS: Amanda Souto, Nathalia Meirelles, Camilla Oliveira, Julio Cesar Queiroz, Ozéias Leitão, Andreza e Clarissa.

A Biomanguinhos por permitir a realização deste trabalho.

Ao INCQS/ FIOCRUZ por permitir a realização dos experimentos no Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos de saúde/Setor de Imunobiológicos.

Ao Programa de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímcos, funcionários e professores.

A empresa Waters Ltda, pelo auxílio durante o desenvolvimento das análises.

“Pois quando a sabedoria entrar no teu coração,
e o conhecimento for agradável à tua alma,
o bom siso te guardará e a inteligência te conservará.”

Provérbios 2:10-11

RESUMO

MARINHO, Anna Carolina Machado. **AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE**. Orientadora: DSc. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)

A eritropoetina humana recombinante (EPO-hr) é uma das glicoproteínas terapêuticas mais utilizadas em todo o mundo. A caracterização estrutural detalhada de glicoproteínas deve ser realizada para avaliar a reprodutibilidade lote a lote. Este estudo objetivou caracterizar e avaliar três lotes (A, B, C) de ingrediente farmacêutico ativo (IFA) de EPO-hr, mediante determinações de concentração de proteínas, massa molar, perfil de isoformas e pureza, utilizando absorção no UV, SDS-PAGE, 2D-PAGE e CLAE-FR, respectivamente. O sequenciamento peptídico foi determinado por espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo eletrospray e analisadores quadrupolo e TOF (EM-ESI-QTOF). As concentrações protéicas nos lotes A, B e C foram 0,7133 mg/mL, 1,0476 mg/mL e 0,3789 g/mL respectivamente. As massas molares calculadas por SDS-PAGE foram 39,78, 40,09 e 39,32 kDa para os lotes A, B e C respectivamente, apresentando uma banda difusa em todos os lotes, o que é característico da micro-heterogeneidade glicídica. Os resultados obtidos para 2D-PAGE evidenciaram 6 isoformas majoritárias entre pI 4,5 e 6,5, com massa molar correspondente à EPO-hr para os três lotes de IFA avaliados. Para o ensaio de pureza, foram encontrados percentuais médios de 97,11, 98,56 e 97,96 % para os lotes A, B e C, respectivamente. Pela técnica EM-ESI-QTOF, peptídeos relativamente pequenos não foram identificados com auxílio da protease tripsina. Foi possível identificar por EM nos lotes B e C de IFA o sítio de O-glicosilação na serina. Pode-se, também, inferir que este sítio de O-glicosilação contém o fragmento HexNAc, pois há um incremento de massa de 203 Da entre o íon detectado com modificação e sem modificação. Sendo assim, os resultados obtidos com as metodologias empregadas neste trabalho visando o controle de qualidade e/ou controle em processo possibilitaram um maior entendimento das amostras de IFA de EPO-hr.

Palavras-chave: Eritropoetina Humana recombinante. Eletroforese bidimensional. Cromatografia em fase reversa. Espectrometria de massas ESI-QTOF.

ABSTRACT

MARINHO, Anna Carolina Machado. **EVALUATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN ERITHROPOIETIN** Supervisor: DSc. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, Rio de Janeiro, 2014. Dissertation (Master of Science in Chemical and Biochemical Processes Technology)

Recombinant human erythropoietin (rhEPO) is a glycoprotein, being one of the therapeutic proteins most used in the world. Detailed structural analysis and characterization of glycoprotein must be carried through to evaluate batch-to-batch consistency. This study aimed to characterize and to evaluate three batches (A, B, C) of active pharmaceutical ingredient (API) of rhEPO, by means of the determination of protein concentration, molar mass, isoforms profile and purity, using UV absorption, SDS-PAGE, 2D-PAG and RP-HPLC, respectively. Peptide mapping was carried out by mass spectrometry with electrospray ionization source and analyses quadrupole and time-of-flight (ESI-QTOF MS). The protein concentrations in the batches A, B and C were, 0.7133 mg/mL, 1.0476 mg/mL and 0.3789 g/mL, respectively. The molar masses calculated by SDS-PAGE had been 39.78, 40.09 and 39.32 kDa for batches A, B and C respectively, presenting a diffuse band, which is characteristic of the microheterogeneity of the carbohydrate structures on rhEPO. The results achieved for 2D-PAGE evidenced 6 major isoforms between pI 4.5 and 6.5, with the molar mass expected for rhEPO for the three batches of API. For the purity analysis, the average percentage of 97.11, 98.56 and 97.96% had been found, for batches A, B and C, respectively. Relatively small peptides were not detected by the ESI-QTOF MS with using trypsin. It was possible to identify in batches B and C the O-glycan glycoform in serine 126. It can also be inferred that this small O-glycan contains the fragment HexNAc, because there is an increment of mass of 203 Da between the ion y with and without modification. Thus, the results obtained in this work, aiming at the quality control and/or in-process control, make a deeper understanding of the EPO API samples possible.

Keywords: Recombinant human erythropoietin, reversed-phase liquid chromatography, two-dimensional electrophoresis, ESI-QTOF mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de blocos esquemático para a produção de biofármacos 33

Figura 2: Relação do número de medicamentos disponíveis no Programa de Medicamentos Excepcionais entre os anos de 1993 e 2011 37

Figura 3: Marcos históricos no estudo e desenvolvimento da Eritropoetina Humana Recombinante/ EPO-hr 39

Figura 4: Mecanismo da Eritropoetina para aumentar a produção de hemácias pela demanda de oxigênio 41

Figura 5: Estrutura tridimensional da EPO-hr. a) Estrutura polipeptídica. b) Estrutura com a incorporação da cadeia glicídica 41

Figura 6: Sequência de aminoácidos de EPO-hr com os sítios de glicosilação identificados: N-glicosilação Asn 24; Asn 38 e Asn 83; O-glicosilação Ser 126 e as pontes dissulfeto 42

Figura 7: Diagrama de blocos geral para a produção de EPO-hr 43

Figura 8: Oligossacarídeo precursor para o processamento da N-glicosilação composto de 14 monômeros (duas unidades de GlcNAc, nove unidades de Man e três unidades de glicose –Glc: DPP-$GlcNAc_2Man_9Glc_3$) 45

Figura 9: Processamento da N-glicosilação catalisado pela enzima OST. 45

Figura 10: Glicanos de EPO-hr ligados em três asparaginas nas posições 24, 38 e 83 formando N-glicosilações e em uma serina na posição 126 formando uma O-glicosilação. 46

Figura 11: Componentes básicos que integram um espectrômetro de massas 54

Figura 12: a) Dispositivo para formação de gotículas para ESI. b) Processo de desolvatação 55

Figura 13: Fonte de ionização por ESI 56

Figura14: Espectrofotômetro, modelo UV 1601 (Shimadzu, Japão) 61

Figura15: Cromatografo líquido de alta peformance, modelo Ultimate® 3000, software Chromeleon® versão 6.8 b (Dionex, Alemanha) 62

Figura 16: Fonte eletroforética, modelo EPS 3501 XL, (Amershan Bioscience, Reino Unido) 62

Figura 17: Sistema Protean IEF Cell, modelo 163-2000 (Bio-rad, Estados Unidos) 63

Figura 18: Espectrômetro de massas por eletrospray, modelo Synapt ™ G2–S HDMS com mobilidade iônica, (Waters, Reino Unido) 63

Figura 19: SDS-PAGE para amostra de IFA lote: A. 1ª raia: Padrão de baixa massa molar; 3ª a 5ª raias: amostra em triplicata. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% desenvolvida em sistema vertical mini-protean III, Bio-Rad, espaçador de gel: 0,75cm. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25 mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo: 40 minutos. Volume aplicação das amostras e padrão: 10µL. 70

Figura 20: SDS-PAGE para amostra de IFA lote: B. 1ª raia: Padrão de baixa massa molar; 2ª a 4ª raias: amostra em triplicata. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% desenvolvida em sistema vertical mini-protean III, Bio-Rad, espaçador de gel: 0,75cm. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo: 40 minutos. Volume aplicação das amostras e padrão: 10µL. 70

Figura 21: SDS-PAGE para amostra de IFA lote: C. 1ª raia: Padrão de baixa massa molar; 3ª a 5ª raias: amostra em triplicata. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% desenvolvida em sistema vertical mini-protean III, Bio-Rad, espaçador de gel: 0,75cm. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo: 40 minutos. Volume aplicação das amostras e padrão: 10µL. 71

Figura 22: Eletroforese bidimensional para EPO lote: A. Volume aplicado: 125 µL de amostra e strip de 7 cm. Primeira dimensão: Mini-Protean II Cell; Strip 3 – 10; Segunda dimensão o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo: 240 minutos 73

Figura 23: Eletroforese bidimensional para EPO lote: B. Volume aplicado: 125 µL de amostra e strip de 7 cm. Primeira dimensão: Mini-Protean II Cell; Strip 3 – 10; Segunda dimensão o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo total: 240 minutos 73

Figura 24: Eletroforese bidimensional para EPO lote: C. Volume aplicado: 125 µL de amostra e strip de 7 cm. Primeira dimensão: Mini-Protean II Cell; Strip 3 – 10; Segunda dimensão o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo total: 240 minutos. 75

Figura 25: Perfil cromatográfico em fase reversa. **Em roxo:** Controle, e**m azul:** Fase móvel A (branco), **em preto:** lote A de IFA de EPO-hr em triplicata, **linha tracejada**: gradiente. **Condições:** Volume de Injeção: 100µL, Fase móvel A: 0,1% TFA; Fase móvel B: 0,1% TFA em ACN: 1-propanol (3:1); Coluna: C18 Ace; Fluxo: 1,0 mL/min; Comprimento de onda: 214nm. 76

Figura 26: Perfil cromatográfico em fase reversa. **Em roxo:** Controle, **em rosa**: Fase móvel A (branco), **em preto:** lote B de IFA de EPO-hr em triplicata, **linha tracejada**: gradiente. **Condições:** Volume de Injeção: 100µL, Fase móvel A: 0,1% TFA; Fase móvel B: 0,1% TFA em ACN: 1-propanol (3:1); Coluna: C18 Ace; Fluxo: 1,0 mL/min; Comprimento de onda: 214nm. 77

Figura 27: Perfil cromatográfico em fase reversa. **Em roxo:** Controle, **em rosa**: Fase móvel A (branco), **em preto:** lote C de IFA de EPO-hr em triplicata, **linha tracejada**: gradiente. **Condições:** Volume de Injeção: 100µL, Fase móvel A: 0,1% TFA; Fase móvel B: 0,1% TFA em ACN: 1-propanol (3:1); Coluna: C18 Ace; Fluxo: 1,0 mL/min; Comprimento de onda: 214nm. 78

Figura 28: Espectro m/z referente ao controle de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 82

Figura 29: Espectro total de massas referente ao lote A de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI-QTOF 85

Figura 30: Espectro total de massas referente ao lote B de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 87

Figura 31: Espectro total de massas referente ao lote C de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 89

Figura 32: Espectro de massas MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T2, peptídeo: LICDSR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 93

Figura 33: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T3, peptídeo: VLER. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 94

Figura 34: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T4, peptídeo: YLLEAK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 95

Figura 35: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T6, peptídeo: VNFYAWK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 97

Figura 36: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T8, peptídeo: MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 98

Figura 37: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T11, peptídeo: SLTTLLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 100

Figura 38: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T12, peptídeo: ALGAQK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 101

Figura 39: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T13, peptídeo: EAISPPDAASAAPLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 102

Figura 40: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T14, peptídeo: TITADTFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 104

Figura 41: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T16, peptídeo: LFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF (fonte de ionização Eletrospray – analisadores: quadrupolo e Time-of-flight) 105

Figura 42: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T17, peptídeo: VYSNFLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 106

Figura 43: Espectro de massas MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T20, peptídeo: LYTGEACR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 108

Figura 44: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T2, peptídeo: LICDSR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 109

Figura 45: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T3, peptídeo: VLER. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 110

Figura 46: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T4, peptídeo: YLLEAK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 111

Figura 47: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T6, peptídeo: VNFYAWK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 112

Figura 48: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T8, peptídeo: MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 113

Figura 49: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T11, peptídeo: SLTTLLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 115

Figura 50: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T12, peptídeo: ALGAQK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 116

Figura 51: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T13, peptídeo: EAISPPDAASAAPLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 117

Figura 52: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T14, peptídeo: TITADTFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 118

Figura 53: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T16, peptídeo: LFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 120

Figura 54: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T17, peptídeo: VYSNFLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 121

Figura 55: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T20, peptídeo: LYTGEACR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 122

Figura 56: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T3, peptídeo: VLER. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 124

Figura 57: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T4, peptídeo: YLLEAK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 125

Figura 58: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T6, peptídeo: VNFYAWK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 125

Figura 59: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T8, peptídeo: MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 126

Figura 60: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T10, peptídeo: AVSGLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 128

Figura 61: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T11, peptídeo: SLTTLLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 129

Figura 62: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T12, peptídeo: ALGAQK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 130

Figura 63: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T13, peptídeo: EAISPPDAASAAPLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 131

Figura 64: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T14, peptídeo: TITADTFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 133

Figura 65: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T16, peptídeo: LFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 134

Figura 66: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T17, peptídeo: VYSNFLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF 135

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Programa do Gradiente descrevendo as condições da corrida para o ensaio de pureza para cromatografia líquida em fase reversa 66

Tabela 02: Gradiente para mapeamento por espectrometria de massas por *electrospray* acoplada ao UPLC. 67

Tabela 3: Resultado das leituras das absorbâncias dos lotes de IFA, da concentração e da relação proteína/DNA respectivamente 69

Tabela 4: Resultados estatísticos relacionados ao tempo de retenção para os lotes A, B, C e controle encontrados para o ensaio de CLAE-FR. 79

Tabela 5: Resultados estatísticos de percentual de pureza para os lotes A, B, C encontrados para o ensaio de CLAE-FR. 79

Tabela 6: Peptídeos obtidos pelo programa Biopharmalynx® a partir da hidrólise de EPO-hr com a enzima tripsina. Fragmento (codificação estabelecida pelo programa); Modificação (tipos de modificações pós-traducionais que podem estar envolvidas); Início e fim do peptídeo; Massa Molecular em Dalton e Sequência de aminoácidos. As cisteinas envolvidas nas pontes de dissulfeto, as asparaginas com sítio de N-glicosilação e a serina com sítio de O-glicosilação estão destacadas em vermelho, azul e verde respectivamente 81

Tabela 7: Fragmentos encontrados para o controle de EPO-hr para espectrometria de massas ESI-QTOF 83

Tabela 8: Fragmentos encontrados no lote A para espectrometria de massas por ESI-QTOF 86

Tabela 9: Fragmentos encontrados no lote B para espectrometria de massas por ESI-QTOF. 88

Tabela 10: Fragmentos encontrados no lote C para espectrometria de massas por ESI-QTOF. 90

Tabela 11: Massas monoisotópicas de aminoácidos e seus respectivos códigos em 1 letra. 92

Tabela 12: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T2, peptídeo LICDSR identificado e a relação massa/carga experimental. 93

Tabela 13: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T4, peptídeo YLLEAK identificado e a relação massa/carga experimental. 96

Tabela 14: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T6, peptídeo VNFYAWK identificado e a relação massa/carga experimental. 97

Tabela 15: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T8, peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR identificado e a relação 99

massa/carga experimental.

Tabela 16: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T11, peptídeo SLTTLLR identificado e a relação massa/carga experimental. 101

Tabela 17: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T12, peptídeo ALGAQK identificado e a relação massa/carga experimental. 102

Tabela 18: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T13, peptídeo EAISPPDAASAAPLR identificado e a relação massa/carga experimental. 103

Tabela 19: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T14, peptídeo TITADTFR identificado e a relação massa/carga experimental. 104

Tabela 20: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T16, peptídeo LFR identificado e a relação massa/carga experimental. 106

Tabela 21: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T17, peptídeo VYSNFLR identificado e a relação massa/carga experimental. 107

Tabela 22: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T20, peptídeo LYTGEACR identificado e a relação massa/carga experimental. 108

Tabela 23: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T2, peptídeo LICDSR identificado e a relação massa/carga experimental. 109

Tabela 24: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T6, peptídeo VNFYAWK identificado e a relação massa/carga experimental. 112

Tabela 25: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T8, peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR identificado e a relação massa/carga experimental 114

Tabela 26: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T11, peptídeo SLTTLLR identificado e a relação massa/carga experimental. 116

Tabela 27: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T12, peptídeo ALGAQK identificado e a relação massa/carga experimental. 117

Tabela 28: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T13, peptídeo EAISPPDAASAAPLR identificado e a relação massa/carga experimental. 118

Tabela 29: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T14, peptídeo TITADTFR identificado e a relação massa/carga experimental 119

Tabela 30: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T16, peptídeo LFR identificado e a relação massa/carga experimental. 120

Tabela 31: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T17, peptídeo VYSNFLR identificado e a relação massa/carga experimental. 122

Tabela 32: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T20, peptídeo LYTGEACR identificado e a relação massa/carga experimental. 123

Tabela 33: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T6, peptídeo VNFYAWK identificado e a relação massa/carga experimental. 126

Tabela 34: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T8, peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR identificado e a relação massa/carga experimental. 127

Tabela 35: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T10, peptídeo AVSGLR identificado e a relação massa/carga experimental. 128

Tabela 36: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T11, peptídeo SLTTLLR identificado e a relação massa/carga experimental. 129

Tabela 37: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T12, peptídeo ALGAQK identificado e a relação massa/carga experimental. 130

Tabela 38: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T13, peptídeo EAISPPDAASAAPLR identificado e a relação massa/carga experimental 132

Tabela 39: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T14, peptídeo TITADTFR identificado e a relação massa/carga experimental. 133

Tabela 40: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T16, peptídeo LFR identificado e a relação massa/carga experimental. 134

Tabela 41: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T17, peptídeo VYSNFLR identificado e a relação massa/carga experimental. 135

Tabela 42: Resultados obtidos para os três lotes de IFA de EPO-hr por diferentes técnicas de caracterização de proteínas. 136

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Produtos biológicos para diversas indicações terapêuticas aprovados pelo FDA entre 2008 e 2011 24

Quadro 2: Principais sistemas de expressão disponíveis e algumas características 32

Quadro 3: Algumas proteínas recombinantes obtidas a partir do cultivo de células animais 32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23

1.1 APRESENTAÇÃO DO TEMA 23

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO 27

1.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA 28

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 29

2.1 BIOTECNOLOGIA E BIOFÁRMACOS 29

2.2 CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS 31

2.3 O PROGRAMA DE MEDICAMENTOS EXCEPCIONAIS 36

2.4 ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE 37

2.5 PRODUÇÃO DE ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE 42

2.6 GLICOSILAÇÃO: O CASO DA EPO-hr 44

2.7 CONTROLE EM PROCESSO E CONTROLE DE QUALIDADE DE EPO-hr 47

2.7.1 Aspectos regulatórios para a EPO-hr 48

2.7.2 Espectrometria de massas aplicada a biomoléculas 54

2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS 58

3.OBJETIVOS 59

3.1 OBJETIVO GERAL 59

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 59

4. MATERIAIS E MÉTODOS 60

4.1 MATERIAIS 60

4.1.1 Amostras 60

4.1.2 Reagentes e padrões 60

4.1.3 Equipamentos 61

4.1.3.1 Sistema espectrofotométrico 61

4.1.3.2 Sistema cromatográfico 62

4.1.3.3 Sistema de eletroforese para SDS-PAGE 62

4.1.3.4 Sistema de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) 63

4.1.3.5 Sistema de espectrometria de massas 63

4.2 MÉTODOS 64

4.2.1 Dessalinização das amostras 64

4.2.2 Determinação da concentração de proteínas pela técnica de espectrometria por absorção no ultravioleta (UV) 64

4.2.3 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 65

4.2.4 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE) 65

4.2.5 Pureza por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) 66

4.2.5.1 Preparo da fase móvel 66

4.2.5.2 Condições da corrida cromatográfica 66

4.2.6 Mapeamento peptídico por espectrometria de massas por ESI-QTOF 66

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 68

5.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA E QUÍMICA DO IFA PARA EPO-HR 68

5.1.1Determinação da concentração de proteínas pela técnica de espectrofotometria por absorção no ultravioleta (UV) 68

5.1.2 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 69

5.1.3 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE) 71

5.1.4 Pureza por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) 75

5.1.5 Espectrometria de massas por *electrospray* para EPO-hr 79

5.1.5.1 Espectro m/z total para o controle e amostras (lotes A, B e C) 81

5.1.5.2 Sequenciamento peptídico mediante interpretação dos espectros de fragmentação MS^E 91

5.1.5.2.1 Sequenciamento peptídico para o lote A 92

5.1.5.2.2 Sequenciamento peptídico para o lote B 109

5.1.5.2.2 Sequenciamento peptídico para o lote C 124

5.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS 136

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES 137

6.1. Conclusões 137

6.2. Sugestões 139

7. REFERÊNCIAS 140

Capítulo 1
1. INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO DO TEMA

A indústria farmacêutica tem investido bastante em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Em 2011, os gastos mundiais atingiram aproximadamente 135 bilhões de dólares, dos quais 35% representaram gastos com o desenvolvimento de produtos biológicos como anticorpos monoclonais, proteínas recombinantes terapêuticas e vacinas. Entre os anos de 2008 e 2011, foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) 27 produtos biológicos para diversas indicações terapêuticas, conforme Quadro 1 (ZHU, 2012). Em 2013, no Brasil, os produtos biológicos consumiram 43% dos recursos do Ministério da Saúde para medicamentos correspondendo a quatro bilhões de reais ao ano (BRASIL, 2014).

A inserção da tecnologia do DNA recombinante, em 1970, com o surgimento das enzimas restrição possibilitou manipulação genética de micro-organismos, com a clonagem dos genes de proteínas em diferentes sistemas de expressão. Pode-se pleitear então, a obtenção de produtos biológicos, principalmente de biofármacos, em quantidade considerável pelas indústrias farmacêuticas (CANDEIAS, 1991). Assim, as técnicas tradicionais quando factíveis, em que a proteína era extraída de uma fonte natural com rendimento bastante reduzido, foram, em muitos casos,

substituídas pela produção de proteínas mediante tecnologia de DNA recombinante (CONCEIÇÃO, 2003). Por permitir a obtenção das moléculas de interesse em larga escala, essa tecnologia levou à produção de proteínas, como, por exemplo, insulina e hormônio de crescimento com grau de pureza satisfatório, viabilizando sua comercialização (WALSH, 2003).

Quadro 1: Produtos biológicos para diversas indicações terapêuticas aprovados pelo FDA entre 2008 e 2011 (Adaptado de ZHU, 2012).

Produto	Ano	Fabricante	Indicação
Fibroblasto autólogo	2011	Fibrocell Science	Tratamento de sulcos nasogenianos
Belatacept	2011	BMS	Prevenção de rejeição em transplante renal
Ipilimumab	2011	BMS	Melanoma metastático
Belimumab	2011	HGS	Lúpus eritematoso sistêmico
Denosumab	2010	Amgen	Osteoporose
Krytexxa	2010	Savient	Gota
Liraglutide	2010	Novo Nodisk	Diabetes
Pancrelipase	2010	J&J	Insuficiência pancreática exócrina
Incobotulinumtoxin A	2010	Merz	Blefaroespasmo
Velaglucerase	2010	Shire	Doença de Gaucher
Vacina conjugada meningocócica	2010	Novartis	Prevenção doença meningocócica invasiva
Vacina para câncer de próstata	2010	Dendreon	Câncer de próstata metastático
Colagenase	2010	Auxilium	Moléstia de Dupuytren
Alglucosidase alfa	2010	Genzyme	Doença de Pompe
Vacina conjugada pneumocócica 13-valente	2010	Wyeth	Pneumonia
Tocilizamab	2010	Genentech	Artrite idiopática juvenil
Vacina contra Papiloma vírus humano tipo 16 e 18	2009	GSK	Câncer do colo do útero
Ustekinumab	2009	Centocor/ J&J	Psoríase
Ofatumumab	2009	Genmab	Leucemia linfocítica crônica
Antitrombina III	2009	GTC (Genzyme)	Inibição da coagulação
Golimumab	2009	Centocor/ J&J	Artrite
Canakimumab	2009	Novartis	Síndrome periódica associada à Criopirina
Certolizumab pegol	2008	UCB	Doença de Crohn
Romiplostim	2008	Amgen	Púrpura
Rilonacept	2008	Regeneron	Síndrome auto inflamatória familiar desencadeada pelo frio
Vacina contra Rotavírus	2008	GSK	Prevenção de gastroenterites por rotavírus
Inibidor C1	2008	Lev	Angiodema hereditário

A tecnologia de DNA recombinante é baseada na inserção de genes que codificam a síntese de proteínas, dentro de células hospedeiras, comumente chamadas de sistemas de expressão, como, por exemplo, a bactéria *Escherichia coli (*WILSON & WALKER, 2010*).* Após serem geneticamente modificadas, estas células são cultivadas em reatores industriais contendo nutrientes para seu crescimento celular sob controle, durante todo o processo produtivo. Algumas variáveis como temperatura, agitação, pressão osmótica e pH são controlados. Consequentemente, após o final do processo, fazem-se necessárias a recuperação e a purificação da proteína de interesse, mediante o uso de métodos de separação pré-estabelecidos. Finalmente, a substância ativa ou ingrediente farmacêutico ativo (IFA) pode ser formulado e acondicionado adequadamente para sua posterior comercialização (DRANITSARI *et al*., 2011).

Diferentes sistemas de expressão são utilizados, sendo cerca de 90% de todos os produtos biológicos produzidos por *E. coli*, leveduras ou células de ovários de *hamster* chinês (*Chinese Hamster Ovary cells* - CHO) (DRANITSARI *et al.*, 2011). Sistemas procariotos, como *E. coli*, foram os primeiros a serem manipulados para a produção de proteínas de interesse terapêutico, por serem de fácil cultivo e terem alta produtividade quando submetidos a escala industrial. Entretanto, este sistema de expressão não pode ser aplicado à produção de todas as moléculas de interesse, principalmente às proteínas mais complexas, como as proteínas glicosiladas ou glicoproteínas (proteínas que incorporam oligosscarídeos à sua cadeia polipeptídica em uma sequência consenso de aminoácidos), devido à ausência de aparatos bioquímicos para a realização de modificações pós-traducionais como, por exemplo, formação de pontes de dissulfeto, desamidação, desaminação, gama-carboxilação e glicosilação (DRANITSARI *et al.*, 2011 e BUTLER*,* 2008).

Em 2012, havia aproximadamente 200 biofármacos comercializados no mundo sendo mais da metade glicoproteínas. Devido à complexidade destas biomoléculas, houve a necessidade de se utilizar sistemas de expressão com capacidade metabólica de realizar modificações pós-traducionais, permitindo a produção de proteínas terapêuticas complexas equivalentes às proteínas humanas nativas (ZHU, 2012). A glicosilação, modificação pós-tradução mais amplamente estudada, envolve inúmeras etapas de processamento realizadas no interior do

retículo endoplasmático (reações para adição e remoção de carboidratos) e posteriormente no complexo de Golgi (reações catalisadas por transferases) (BUTLER, 2008). Esta modificação tem impacto direto na conformação, hidrofobicidade e carga da proteína. Além disso, os oligossacarídeos dificultam a ação das proteases sobre as glicoproteínas. Sendo assim, motivou-se o desenvolvimento de cultivos de células animais em escala industrial. Entretanto, o custo da manutenção de cultivo de células animais é alto, o que tem impacto direto no valor do produto final para comercialização (BHOPALE e NANDA, 2005).

Para a produção de eritropoetina humana recombinante (EPO-hr), uma proteína glicosilada, foco do presente estudo, são empregadas células CHO, cujo padrão de glicosilação é análogo à proteína endógena. Avaliações estruturais da cadeia polipeptídica e da porção glicídica são fundamentais para o controle de qualidade da EPO-hr ou de qualquer outra glicoproteína de interesse terapêutico. Alterações na cadeia polipeptídica podem afetar sua potência (MIRE-SLUIS *et al.,* 1996 e CASTILHO *et al.,* 2008). Além disso, as cadeias de oligossacarídeos ligadas à cadeia polipeptídica da proteína exercem influência sobre suas propriedades farmacocinéticas (GILG *et al.,* 1996).

Do ponto de vista químico, os oligossacarídeos representam 40% da massa molar da EPO-hr e podem apresentar uma estrutura bastante variada, o que deve ser avaliado, já que muitos destes oligossacarídeos são responsáveis pela interação de EPO-hr com os receptores celulares (WALSH & JEFFERIS, 2006). A taxa de depuração da EPO-hr varia de acordo com a estrutura do oligossacarídeo e, por este motivo, oligossacarídeos terminados em ácido siálico possuem um tempo de meia vida maior (8,5h) do que aqueles terminados em galactose e manose (4h) (MELLADO & CASTILHO, 2008; FRIED, 1995; PAREKH, 1991). A explicação para tal fato é que os receptores presentes nos hepatócitos reconhecem a galactose e a manose, mas não o ácido siálico (KWON *et al.,* 2006).

O estudo da cadeia polipeptídica e dos oligossacarídeos em glicoproteínas representa um desafio analítico quando comparado a outras classes de biomoléculas e como consequência, exige um conjunto de metodologias para esta finalidade. Independentemente do padrão de glicosilação da proteína, diferentes

análises podem ser empregadas para elevar o grau de precisão dos resultados, já que separadamente fornecem informações limitadas. Algumas técnicas já são utilizadas há algum tempo, como cromatografia líquida e eletroforese. Recentemente, a análise por espectrometria de massas foi incorporada a estas metodologias e vem sendo bastante utilizada e difundida para caracterizar proteínas recombinantes (JIANG *et al*., 2012).

Diante do exposto, surgiu a motivação para o desenvolvimento do presente trabalho, cuja parte experimental foi realizada no Instituto Nacional Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, no Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos de saúde/Setor de Imunobiológicos (FIOCRUZ) e no laboratório de pesquisa e desenvolvimento da empresa Waters Ltda, em São Paulo.

Para esta dissertação foram estudados a homogeneidade, pureza, mapeamento peptídico e O-glicosilação para EPO-hr por métodos químicos e físico-químicos.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho está estruturado em sete capítulos. Neste primeiro capítulo é feita uma breve introdução do tema, sendo apresentada a estrutura do documento e listada a produção científica. A revisão bibliográfica, com o embasamento teórico do estudo, é apresentada no capítulo 2. Os principais objetivos desta dissertação são dispostos no capítulo 3. Os materiais utilizados e as metodologias estabelecidas para atingir os objetivos propostos são detalhados no capítulo 4. O capítulo 5 apresenta os resultados e discussões, cujas principais conclusões são sinalizadas no capítulo 6, bem como as sugestões de continuidade deste estudo. As referências citadas nesta dissertação são listadas no capítulo 7.

1.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1.3.1 Trabalho completo publicado em anais de eventos científicos:

MARINHO, A. C. M.; COUTO, M.A.G.; SILVA, F.S.Q. da; CONCEIÇÃO, C.M.; ALVES, da A.S. **AVALIAÇÃO DO MAPA DE OLIGOSSACARÍDEO PARA ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE** – XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – 09 a 12 de setembro de 2012, Búzios, RJ.

1.3.2 Apresentação de trabalhos em eventos científicos:

CONCEIÇÃO, C. M.; SILVA JÚNIOR, J.G.; SILVA, F.S.Q.; LEITÃO, O. L.; MARINHO, A. C. M. **EVALUATION OF A CANDIDATE NATIONAL STANDARD FOR RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN BY UPLC/HDMS** – Pôster apresentado no I Seminário Nacional Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos – 12 a 14 de agosto de 2013, Rio de Janeiro, RJ.

CONCEIÇÃO, C. M.; ALMEIDA, J.G. A.; SILVA JÚNIOR, J.G.; SILVA, F.S.Q.; LEITÃO, O. L.; MARINHO, A. C. M.; ALVES, A. S.; RIBEIRO, N. M. **ESTABLISHMENT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN REFERENCE MATERIAL FOR 2-D GEL ELECTROPHORESIS** – Pôster apresentado na XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – 18 a 21 de maio de 2013, Foz do Iguaçu, PR.

MARINHO, A. C. M.; SILVA JÚNIOR, J.G.; CONCEIÇÃO, C. M.; SILVA, F.S.Q.; ALVES, A. S.; RIBEIRO, N. M. **RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN REFERENCE MATERIAL ESTABLISHMENT –** Pôster apresentado na XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – 19 a 22 de maio de 2012, Foz do Iguaçu, PR.

Capítulo 2

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOTECNOLOGIA E BIOFÁRMACOS

O termo biotecnologia foi primeiramente relatado no ano de 1919 por Karl Ereky e foi definido como sendo uma aplicação característica para produzir e/ou modificar produtos e processos de origem biológica, organismos vivos e seus derivados (BUD, 1989). Décadas depois, em 1989, Marx caracterizou biotecnologia como uma tecnologia que envolve o uso de células para viabilizar a produção de produtos com diferentes aplicações. No mesmo ano, Stenesh ampliou este conceito verificando a possibilidade de produção em escala industrial (PEREIRA JR. *et al*., 2008)

Em 1993, a definição de Rehn e Reed se destacou pela inferência da necessidade de diferentes áreas de conhecimento para a manufatura de bioprodutos em escala industrial (PEREIRA JR *et al.,* 2008)

Em comum, para os diferentes conceitos da biotecnologia está o uso de células ou seus derivados, sejam modificados geneticamente ou não, para a produção de produtos biotecnológicos, podendo ser tratado como uma vasta área que envolve desde o uso de células em pelo menos uma etapa da cadeia produtiva

até o uso de micro-organismos para tratamento de efluentes industriais (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

Neste contexto, pode-se dividir a biotecnologia em duas fases: a primeira onde produtos eram fabricados por fermentação, proteínas não recombinantes obtidas a partir de culturas de células (moléculas de interesse terapêutico, codificadas pelo próprio genoma celular) ou produtos obtidos a partir de organismos vivos. A segunda fase pode ser classificada com o advento de duas técnicas em 1970: a tecnologia DNA recombinante e a tecnologia de hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais (RADER, 2005). Tanto a tecnologia de DNA recombinante e a tecnologia de hibridomas revolucionaram a área da bioquímica e da biologia molecular, abrindo novos horizontes para a produção de produtos biológicos, principalmente biofármacos, possibilitando a modificação genética de organismos de acordo com o interesse terapêutico (RAPLEY, 2010).

A tecnologia do DNA recombinante tem como base a inserção de um gene que codifica uma proteína de interesse em uma célula hospedeira (procariota ou eucariota). A primeira proteína terapêutica obtida a partir da tecnologia do DNA recombinante utilizando célula bacteriana (*E. coli*), foi a insulina em 1982 e empregando células de mamíferos, foi o ativador do plasminogênio tecidual (tPA) em 1986 (WILSON & WALKER, 2010).

No início de 1980, a palavra biofármacos foi relacionada, pela primeira vez, a proteínas terapêuticas produzidas mediante o uso da tecnologia de DNA recombinante, podendo abranger a tecnologia de hibridomas quando se tratando de anticorpos monoclonais. Entretanto, há diferentes definições para a palavra biofármacos (WALSH, 2003).

Para a Federação Latino-Americana da Indústria Farmacêutica (2006), biofármacos são substâncias terapêuticas homólogas ou que ainda possam interagir com proteínas humanas. Apresentam estrutura molecular extremamente complexa e seu componente ativo é heterogêneo, por se tratarem, principalmente, de glicoproteínas. Segundo essa referência, biofármacos podem ser obtidos a partir de duas origens: fontes naturalmente ocorrentes e fontes modificadas geneticamente. O primeiro caso se refere ao uso de micro-organismos, de órgãos ou de tecidos de

origem vegetal ou animal, células ou fluidos de origem humana ou animal, em que não haja modificação genética. O segundo caso diz respeito a proteínas obtidas a partir de células modificadas geneticamente.

Segundo MELLADO *et al.* (2008), biofármacos são produtos farmacêuticos de origem biológica, manufaturados a partir de uma proteína e/ou ácido nucléico, com finalidade terapêutica ou diagnóstico *in vivo*, obtidos por tecnologia do DNA recombinante e/ou tecnologia de hibridomas, portanto não incluindo produtos obtidos por extração direta de uma fonte biológica.

No âmbito deste trabalho, biofármacos foram definidos como uma classe de biomedicamentos, caracterizada por proteínas terapêuticas recombinantes, obtido mediante a tecnologia do DNA recombinante com finalidade terapêutica, profilática, curativa ou, ainda, para fins de diagnóstico.

2.2 CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS

Biofármacos têm sido tradicionalmente produzidos mediante o cultivo de diferentes sistemas de expressão como células de mamíferos, bactérias, leveduras e células de inseto, sendo o primeiro preferido para a produção de biofármacos mais complexos devido à sua capacidade de realizar corretamente diversas modificações pós-traducionais. Estas modificações são requeridas para completa atividade da biomolécula, tornando imprescindível a escolha adequada do sistema de expressão a partir do conhecimento das características do produto recombinante a ser manufaturado (WALSH, 2010). O quadro 2 lista algumas propriedades para realização das modificações pós-traducionais em diferentes sistemas de expressão (ROSE *et al,*. 2005 *apud* SWIECH *et al*., 2012).

Atualmente, mais de 70% das proteínas recombinantes disponíveis no mercado são produzidas em células animais (principalmente células CHO e células de rim de *hamster* neonato: BHK: *baby hamster kidney* devido à sua capacidade metabólica de realizar modificações pós-traducionais, em especial a glicosilação, que é variável dependendo da linhagem celular (ZHU, 2012; WALSH, 2007). Esse

tipo de modificação pós-tradução influência diretamente em diversas propriedades da proteína através da adição de estruturas glicídicas, sendo dependente também das condições do cultivo (RUSH *et al.*,1995).

Quadro 2: Principais sistemas de expressão disponíveis e algumas características
Fonte: ROSE *et al.* (2005), *apud* SWIECH (2012).

Sistema / Características	Bactérias	Leveduras	Células de mamíferos	Inseto
Glicosilação	Não	Sim	Sim	Sim
Estrutura tridimensional	Talvez	Talvez	Sim	Sim
Acilação na extremidade N terminal	Não	Sim	Sim	Sim
Amidação na extremidade C terminal	Não	Não	Sim	Sim
Fosforilação	Não	Sim	Sim	Sim

No quadro 3, abaixo são apresentadas algumas proteínas recombinantes de uso terapêutico obtidas a partir do cultivo de células de mamíferos (ZHU, 2012; MELLADO & CASTILHO, 2008).

Quadro 3: Algumas proteínas recombinantes obtidas a partir do cultivo de células animais. (Adaptado de ZHU, 2012; MELLADO & CASTILHO, 2008).

Biofármaco	Ano de aprovação	Fabricante	Célula	Indicação
tPA	1986	Genentech	CHO	Acidente vascular cerebralisquêmico agudo
Eritropoetina	1989	Amgen, Roche, J&J	CHO	Anemia associada à insuficiência renal crônica
Fator VIII	1993	Bayer Health Care	BHK	Hemofilia A
Interferon-β	1996	Biogen	CHO	Esclerose múltipla
Fator IX	1997	Genetic Institute	CHO	Hemofilia B

A ampla utilização da linhagem celular CHO deve-se à sua capacidade de realização de modificações pós-traducionais, mas, também, à sua resistência a infecções virais correspondendo a uma produção segura e ainda ao crescimento em

meio livre de soro com alta concentração celular, essencial para o desenvolvimento do cultivo em grande escala (NOH *et al*., 2013).

Para a produção de biofármacos são seguidas quatro etapas (Figura 1), descritas sucintamente a seguir. Vale ressaltar que a produção de proteínas recombinantes terapêuticas deve obedecer não somente as particularidades do processo como também a manutenção das boas práticas de fabricação em todas as etapas do processo produtivo (JUNGBAUER, 2013; DOBLHOFF-DIER & BLIEM, 1999).

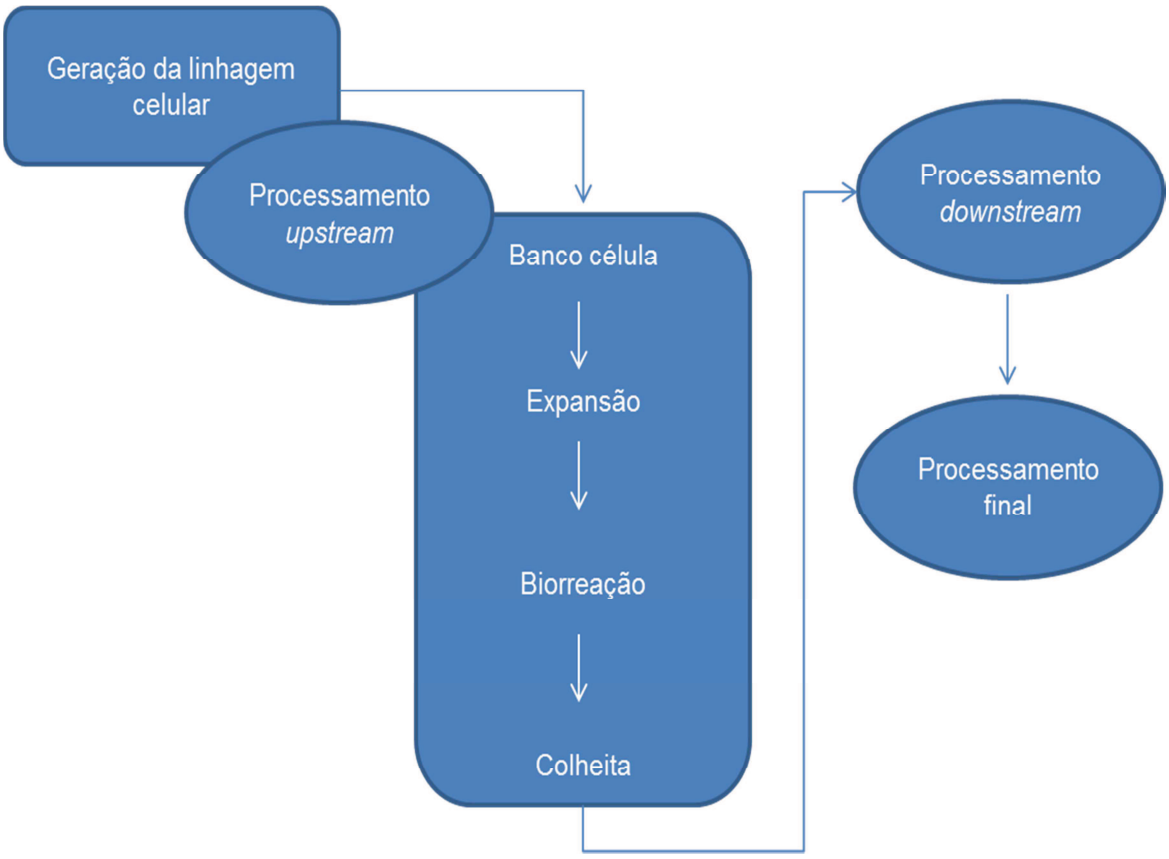

Figura 1: Diagrama de blocos esquemático para a produção de biofármacos (Adaptado de JUNGBAUER, 2013; CARINHAS *et al*.; 2012)

<u>Primeira etapa: Construção do DNA recombinante e desenvolvimento da linhagem celular</u>

Inicia-se pela clonagem do gene que codifica a proteína de interesse em um vetor de DNA e a transferência deste para uma célula hospedeira (procariota ou eucariota) mediante métodos biológicos, físicos ou bioquímicos (transfecção). Após esta etapa, o gene de interesse pode ser expresso transientemente (1 a 3 dias) e,

em um segundo estágio, a célula pode passar a expressar o gene de forma estável (3 a 14 dias) após a incorporação do DNA exógeno ao genoma do hospedeiro (CARINHAS *et al*.; 2012; BOLLATI-FOGOLÍN & COMINI; 2008). Após isolamento de células únicas (clones) e propagação para obtenção de linhagens celulares clonais, a mais promissora é selecionada, e dá origem ao banco de células a ser criopreservado (NOH, 2013).

Segunda etapa: Cultivo celular para a produção de biofármacos

Esta etapa inicia-se pelo descongelamento das células a serem cultivadas de uma ampola de criopreservação a partir de um banco de células. A manutenção de um banco de células tem o intuito de garantir a consistência e reprodutibilidade dos lotes de produção (WURM, 2004). Após o descongelamento da ampola as células são suspensas em meio de cultivo apropriado para serem incubadas e propagadas em diferentes biorreatores, por exemplo, para a expansão celular em suspensão: propagação em frascos estacionários, propagação em frascos agitados, propagação em biorreator de volume intermediário e, posteriormente, ao acúmulo de massa celular suficiente, inoculação em biorreator de maior capacidade, conhecido como biorreator de produção ou biorreação (CHICO *et al*., 2008).Este escalonamento tem por objetivo reproduzir em escala industrial os resultados otimizados em escala piloto. Devem ser controlados o pH do meio de cultivo, temperatura, suprimento adequado de oxigênio e suprimento de nutrientes fornecidos pelo meio de cultivo (BANDARANAYAKE & ALMO, 2013). Estas etapas compõem o chamado processamento *upstream* (CARINHAS *et al*.; 201; KRATJE & ETCHEVERRIGARAY, 2008).

Terceira etapa: Purificação do biofármacos

Ao final do cultivo ou até mesmo durante a biorreação, faz se necessário a separação celular mediante dispositivos específicos para que o biofármaco possa ser purificado. Nesta etapa denominada também de processamento *downstream* é necessário o isolamento da proteína de interesse comercial de contaminantes ou a um nível aceitável mediante o estabelecimento de processos adequados de purificação, atingindo um percentual ideal de pureza superior ou igual a 98%

(CROMMELIN *et al*., 2003 e; DOBLHOFF-DIER & BLIEM, 1999). Para alcançar este percentual são estabelecidas diferentes e sucessivas técnicas cromatográficas. O uso de distintas técnicas cromatográficas eleva ainda mais o custo do processo produtivo e tem o intuito de explorar diferenças entre as propriedades físico-químicas da proteína de interesse e seus contaminantes, promovendo a purificação. Ao final das etapas cromatográficas, submete-se o produto intermediário à filtração esterilizante para obtenção do ingrediente farmacêutico ativo (IFA). É de extrema importância a escolha adequada das técnicas cromatográficas para não prejudicar o rendimento (KRATJE & ETCHEVERRIGARAY, 2008).

Quarta etapa: Formulação e envase de biofármacos para comercialização

Nesta etapa, denominada também de processamento final, os excipientes são selecionados adequadamente e agregados ao IFA, onde as condições de armazenamento são estabelecidas mediante estudos de estabilidade com intuito de aumentar a estabilidade do biofármaco. Nesta etapa, também podem ser desenvolvidas diferentes dosagens a partir de cálculos realizados para a formulação. Deve ser considerada a adição de substâncias com função anti-adsorvente para evitar desnaturação protéica quando em contato com a superfície do frasco e seringas, por exemplo, e adição de albumina (estabilizante) ou surfactantes em baixa concentração. Agentes osmóticos, antioxidantes e tampões também devem ser considerados no desenvolvimento da formulação. A liofilização, processo de secagem a baixas temperaturas, também pode ser incorporada nesta etapa, aumentando assim a estabilidade do produto (CROMMELIN *et al*., 2003).

A complexidade e particularidade do processo produtivo de biofármacos contribuem para o elevado custo destes biomedicamentos, dificultando, assim, a disponibilização para o tratamento e causando uma dependência de importação pelo país. Este custo pode ser reduzido com o vencimento da patente e o interesse das indústrias farmacêuticas brasileiras na produção de biofármacos. Entretanto, a inacessibilidade aos dados de manufatura do biofármaco inovador torna desafiador o desenvolvimento por outras indústrias farmacêuticas, consequentemente, tornando a prática da intercambialidade inviável entre o inovador e o similar (SAAVEDRA & QUIÑONES, 2006).

2.3 O PROGRAMA DE MEDICAMENTOS EXCEPCIONAIS

Para facilitar o acesso da população a medicamentos de alto custo, inclusive biofármacos, para o tratamento de doenças específicas ou de tratamento crônico, o Governo Brasileiro implantou, em 1993, o Programa de Medicamentos Excepcionais, de alto custo ou de dispensação em caráter excepcional, para garantir o fornecimento de produtos de elevado valor agregado à população contemplando dois medicamentos, a EPO-hr e a ciclosporina (BRASIL, 1993). Em 1995, esta lista foi ampliada para 18 medicamentos e no ano seguinte, para 32 medicamentos. Somente em 2002, ocorreu a inclusão significativa de medicamentos e diferentes apresentações farmacêuticas, totalizando 101 medicamentos e 223 apresentações (BRASIL, 2010). Entre os anos de 2002 e 2008, alguns medicamentos foram excluídos por falta de comercialização no Brasil e outros foram incluídos, por exemplo, adalimumabe e etanercepete (ambos indicados para tratamento de artrite reumatóide), ampliando ainda mais a lista (BRASIL, 2010). Em 2009, esse programa contava com 109 medicamentos em sua relação, e seu custo foi de R$ 2,3 bilhões (BRASIL, 2014). Em 2011, do total de medicamentos contemplados, cerca de trinta eram medicamentos biológicos (Figura 2), sendo que eles representavam um percentual relevante de custo total (CARIAS *et al.,* 2011). Atualmente, esse programa possui 141 medicamentos e funciona mediante o repasse de recursos do governo federal para os estados, que se encarregam da compra e distribuição desses produtos (BRASIL, 2014).

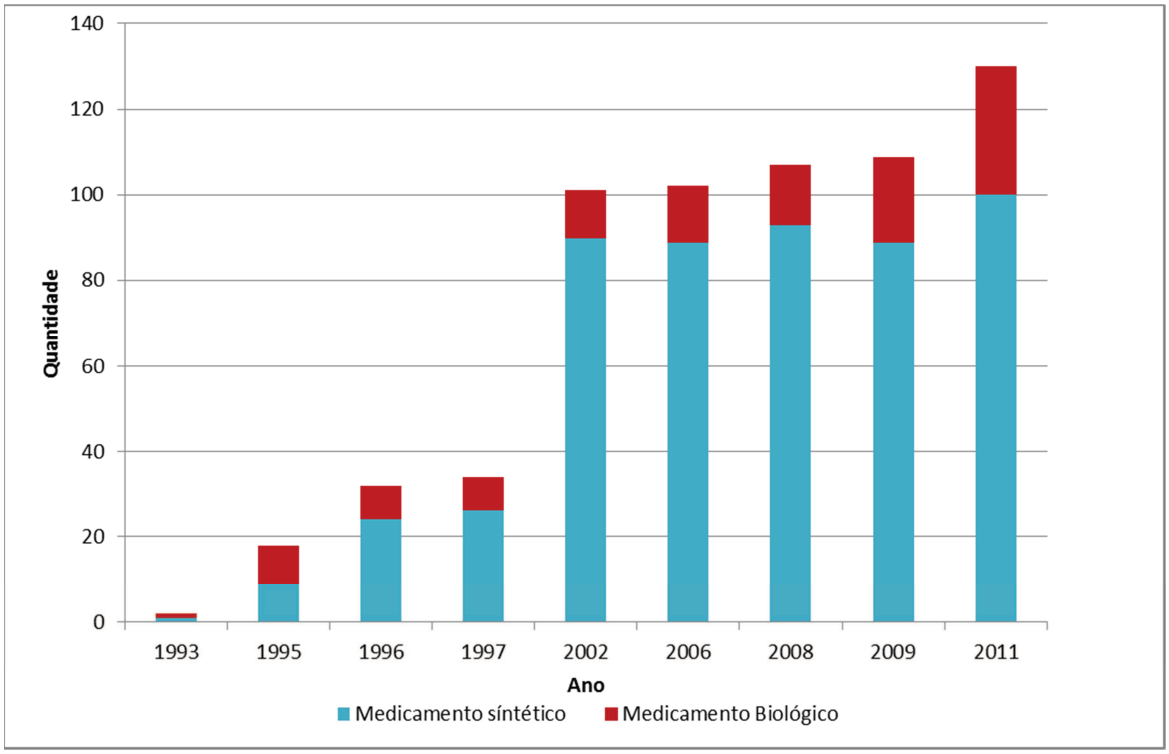

Figura 2: Relação do número de medicamentos disponíveis no Programa de Medicamentos Excepcionais entre os anos de 1993 e 2011 (Adaptado de CARIAS *et al.,* 2011; BRASIL, 2010)

Os medicamentos excepcionais são dispensados em farmácias específicas para este fim, obedecendo a regras e critérios como diagnóstico, esquemas terapêuticos, monitoramento / acompanhamento e demais parâmetros, contidos nos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas, estabelecidos pela Secretaria de Assistência à Saúde (SAS) do Ministério da Saúde. Este programa fornece a EPO-hr para o tratamento da anemia associada à insuficiência renal crônica em diferentes apresentações farmacêuticas. Injetáveis: Alfaepoetina 2.000 UI, 4.000 UI e 10.000 UI (BRASIL, 2011).

2.4 ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE

Até a aprovação pelo FDA da Eritropoetina Humana Recombinante (EPO-hr), em 1989, para o tratamento de anemia por insuficiencia renal crônica (IRC), alguns marcos que auxiliaram o seu desenvolvimento podem ser destacados, conforme mostrado na figura 3. Inicialmente, por Richard Bright, em 1836, evidenciou a anemia como uma complicação da insuficiência renal crônica. Décadas mais tarde, Denis Jourdanet associou o aumento da produção de eritrócitos a pessoas que

vivem em atmosfera com baixa concentração de oxigênio. Em 1906, Carnot e Deflandre descreveram a existência de um hormônio responsável pela eritropoiese a partir de descobertas então recentes, o qual eles denominaram de hemopoetina (JELKMANN, 1996). Três decádas depois, em 1940, Krumdieck *et al.* comprovaram que a demanda por oxigênio pode influenciar a produção de eritrócitos imaturos (reticulócitos). Em 1957, foi comprovado por Jacobson *et al*. que o principal produtor de eritropoetina é o rim, de modo que se buscou purificá-la a partir da urina de pacientes com anemia aplásica 20 anos depois. Em 1983, dois grupos de cientistas conseguiram clonar e expressar o gene da EPO humana, possibilitando estabelecer o uso de EPO-hr para corrigir a anemia em pacientes com IRC alguns anos depois (FRIED, 1995).

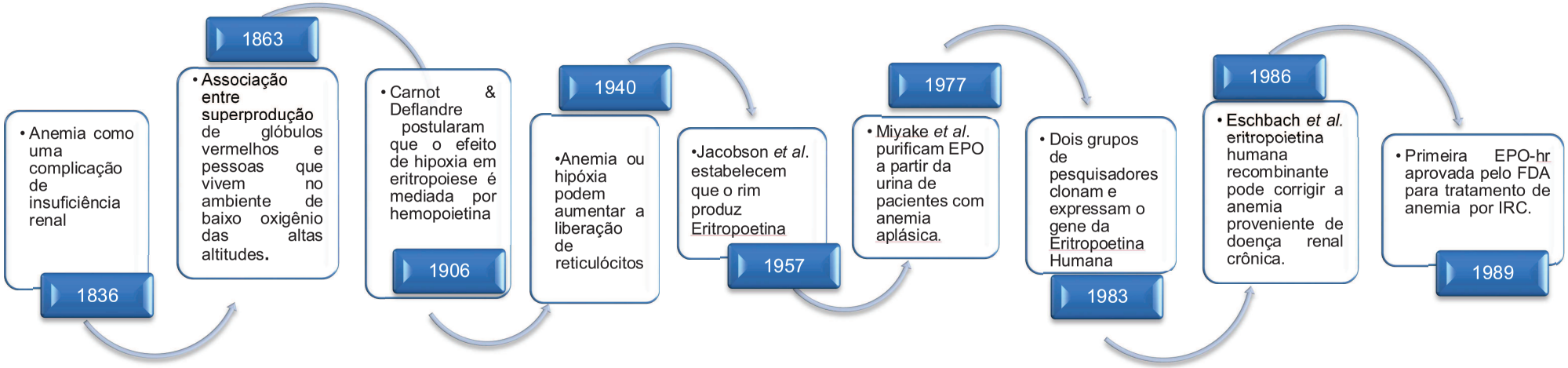

Figura 3: Marcos históricos no estudo e desenvolvimento da Eritropoetina Humana Recombinante/ EPO-hr (JELKMANN, 1996).

Sendo assim, a eritropoetina natural é uma glicoproteína produzida principalmente pelo córtex renal, mas outros órgãos também têm a capacidade de produção, como o cérebro, o útero e, em fetos, o fígado. A produção de eritropoetina é estimulada pela baixa concentração de oxigênio nas artérias renais, diminuição da concentração de hemácias por perda de sangue ou destruição excessiva e maior demanda tecidual por oxigênio. A eritropoetina atua como fator hormonal de estimulação mitótica e de diferenciação celular, através da proliferação das células-tronco precursoras de glóbulos vermelhos ao nível da medula óssea, aumentando, assim, a formação de eritrócitos maduros (GUYTON & HALL, 2006; GILG *et al.*, 1996).

Graças ao seu efeito no organismo humano (Figura 4), a eritropoetina humana recombiante (EPO-hr) tem sido usada na medicina humana em doenças como: insuficiência renal crônica, doenças hematológicas, cânceres, tumores, linfomas e mieloma múltiplo (SPIVAK, 1993; WALSH, 2007). A adesão ao tratamento pelo paciente diminui a necessidade de transfusão sanguínea, da morbidade, da mortalidade, melhorando significativamente a qualidade de vida de portadores de insuficiência renal crônica. Com aproximadamente oito semanas de tratamento, as taxas de hemoglobina e hematócrito podem atingir valores entre 11 g/dl e 12 g/dl ou entre 33% a 36%, respectivamente. Caso seja necessário, deve-se incluir a reposição de ferro durante o tratamento para que o biomedicamento em questão atue de forma adequada. (JELKMANN, 2010; ELLIOTT *et al.*, 2008).

A EPO-hr apresenta estrutura terciária globular composta de quatro hélices alfa, estabilizadas por ligação hidrogênio dentro da cadeia e folhas beta antiparalelas, entre filamentos peptídicos (GILG *et al.*, 1996). Na figura 5, é apresentada de forma esquemática a estrutura tridimensional da EPO-hr. À esquerda é apresentada a estrutura polipeptídica e à direita é apresentada a estrutura polipeptídica com a incorporação da cadeia glicídica.

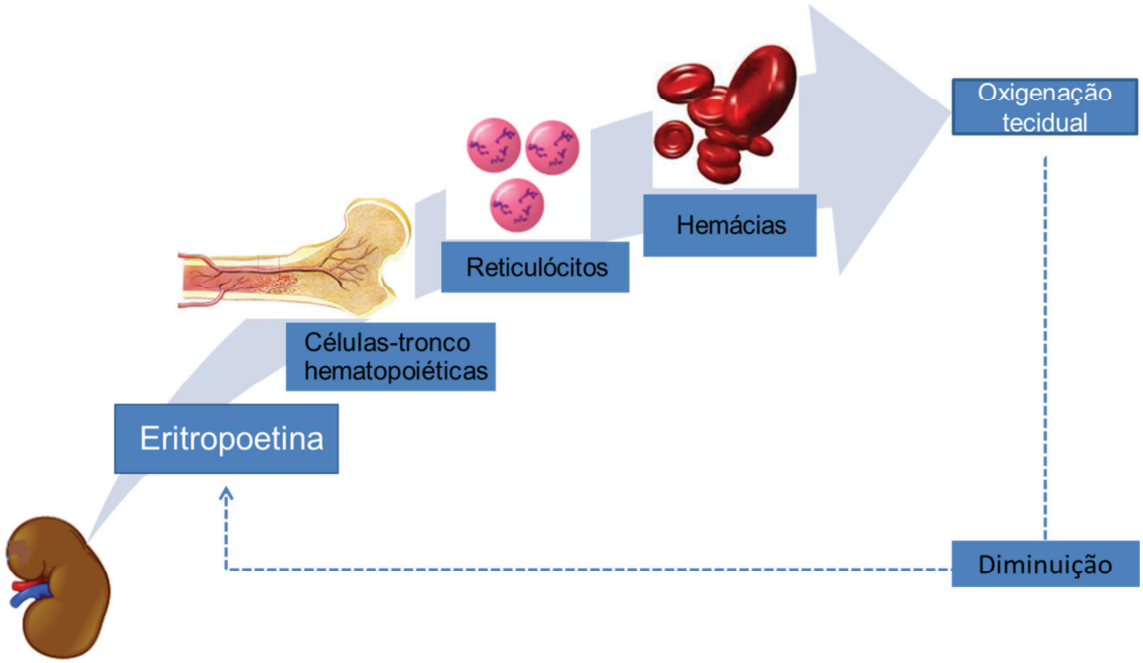

Figura 4: Mecanismo da Eritropoetina para aumentar a produção de hemácias pela demanda de oxigênio (Adaptado de GUYTON &HALL, 2006).

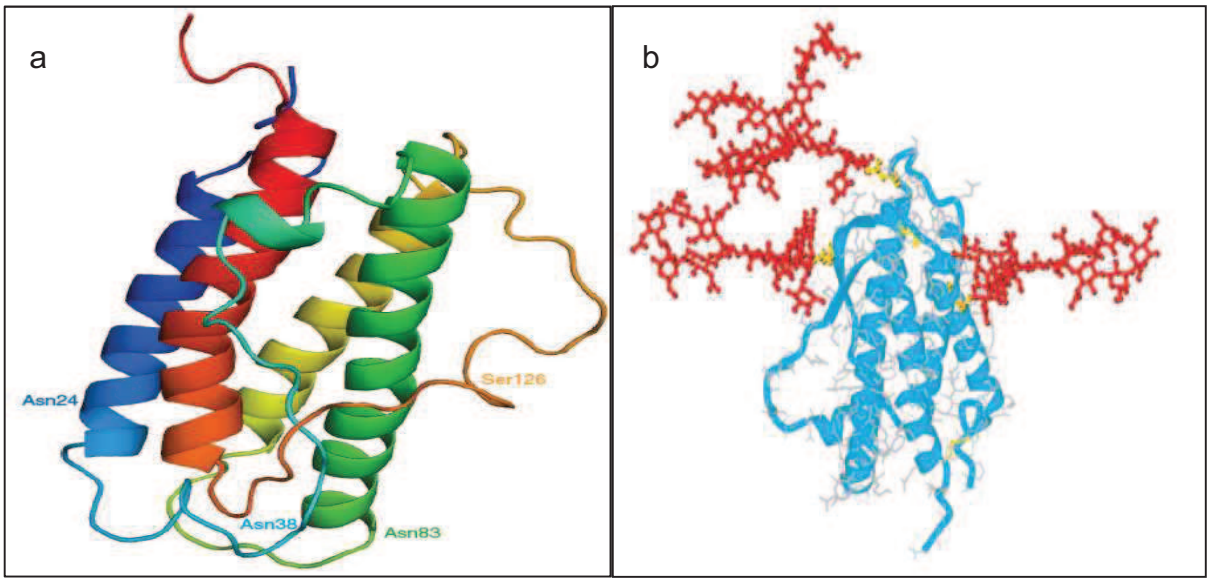

Figura 5: Estrutura tridimensional da EPO-hr. a) Estrutura polipeptídica. b) Estrutura com a incorporação da cadeia glicídica (Fonte: SHERIDAN, 2007).

A EPO-hr contém 165 aminoácidos (Figura 6) massa molar entre 34.000 e 40.000 Dalton, possui N-glicosilações em três asparaginas (Asn24, Asn38 e Asn83) e O-glicosilação em uma serina (Ser126), apresentando conteúdo de glicídios correspondente a 40% da sua massa molar e duas pontes dissulfeto intramoleculares (Cis7-161 e Cis 29-33) (BERG *et al.,* 2007).

Figura 6: Sequência de aminoácidos de EPO-hr com os sítios de glicosilação identificados: N-glicosilação Asn 24; Asn 38 e Asn 83; O-glicosilação Ser 126 e as pontes dissulfeto (Adaptado de WANG *et al*., 2013)

2.5 PRODUÇÃO DE ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE

A EPO-hr é obtida pela tecnologia DNA recombinante com sequência de aminoácidos idêntica à da eritropoetina natural, utilizando células de ovário de hâmster chinês (células CHO) nas quais o gene da eritropoetina humana foi inserido (ANDRADE, 2007).

Desde o desenvolvimento da linhagem celular, passando pelo descongelamento da ampola do banco de trabalho até o cultivo celular em biorreatores dá-se o nome de processamento *upstream.* Após esta etapa, é necessário iniciar o processo de separação de células e purificação, já que na colheita há resíduos de outras proteínas celulares e outros resíduos remanescentes do meio de cultivo (ANDRADE, 2007).

O processo de recuperação e purificação (processamento *downstream*) implica em várias etapas cromatográficas para atingir um alto grau de pureza do biofármaco. Após a etapa de purificação, há necessidade de realizar a filtração esterilizante para obter o Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) e prosseguir para o processamento final, onde são incorporados excipientes, e seguindo-se para o envase, rotulagem e acondicionamento em embalagem secundária (JUNGBAUER, 2013).

A figura 7 apresenta o diagrama de blocos geral para a produção de EPO-hr.

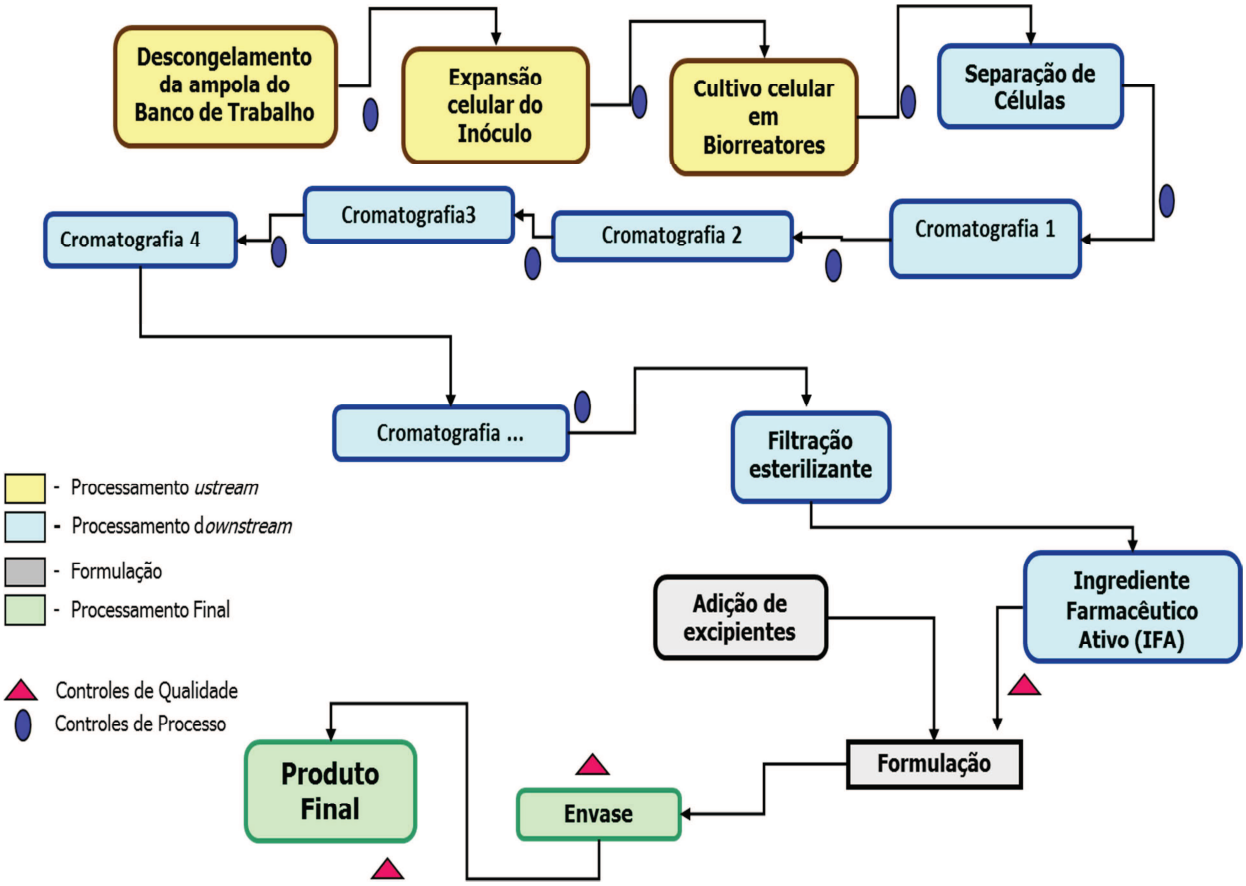

Figura 7: Diagrama de blocos geral para a produção de EPO-hr (Adaptado de: JUNGBAUER, 2013 e WURM, 2004).

A maioria das formulações de EPO-hr disponíveis para comercialização contêm grandes quantidades de soro albumina humana (HSA), que é um excipiente com a função de estabilizar a formulação. Na União Européia, a HSA não pode ser mais utilizada, devido ao risco de transmissão de doenças. Atualmente, alguns fabricantes já substituíram a albumina por uma mistura de aminoácidos, uma vez

que são compostos de origem não animal oferecendo maior segurança à formulação (ARAKAWA, 2007).

2.6 GLICOSILAÇÃO: O CASO DA EPO-hr

Como já dito em tópicos anteriores, a glicosilação, forma de modificação pós-tradução amplamente estudada e realizada por enzimas citoplasmáticas dentro do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, exerce papel bastante significativo na conformação protéica, resistência a proteases, controle do tempo de meia vida e interação com receptor, dentre outros. A glicosilação pode ser de dois tipos: N-glicosilação e O-glicosilação (WILSON &WALKER, 2010). Os N-glicanos, compostos de um pentassacarídeo central contendo três manoses (Man) e dois resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc), são sempre ligados a resíduos de asparagina (N) pertencente a uma sequência consenso Asn-X-Ser/Thr onde X pode ser qualquer aminoácido diferente de prolina e Ser/Thr. Os O-glicanos, são estruturas menores, do tipo mucina, onde há a adição de N-acetilgalactosamina (GalNAc) em resíduos de serina ou treonina (WILSON & WALKER, 2010).

A N-glicosilação tem maior relevância, pois apresenta impacto no enovelamento de proteínas, reconhecimento de receptores, atividade biológica, estabilidade, entre outros efeitos (WALSH & JEFFERIS, 2006).O processamento da N-glicosilação acontece em duas etapas subsequentes. A primeira etapa é realizada no interior do retículo endoplasmático, consistindo na formação de um composto de 14 monômeros (duas unidades de GlcNAc, nove unidades de Man e três unidades de glicose - Glc), mostrado na figura 8, e sua adição à sequência consenso, catalisada pela enzima oligossacariltransferase (OST). Após a adição, ocorrem sucessivas reações de remoção de resíduos de Man e Glc. Ao final destas reações, resta uma estrutura com alto teor de manose (duas a seis unidades de Man), que é transferida para o complexo de Golgi para iniciar a segunda etapa do processamento, que envolve a adição de GlcNAc, fucose (Fuc), galactose (Gal) e ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico – NeuAc) por enzimas do tipo transferase, resultando em uma estrutura complexa (Figura 9). As reações catalisadas por enzimas no interior do complexo de Golgi podem não ser finalizadas e influenciam diretamente na heterogeneidade da estrutura a ser formada, originando diferentes

ramificações, sendo responsáveis pelas diferentes glicoformas observadas em glicoproteínas. Cada ramificação formada a partir do núcleo central do oligossacarídeo é comumente chamada de antena. De acordo com a composição de cada uma das antenas, o oligossacarídeo resultante é classificado como rico em manose ou complexo (BUTLER, 2008 e WALSH & JEFFERIS, 2006).

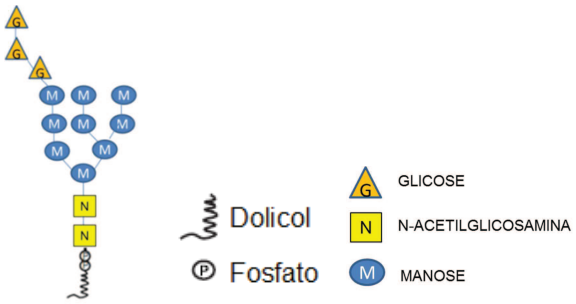

Figura 8: Oligossacarídeo precursor para o processamento da N-glicosilação composto de 14 monômeros (duas unidades de GlcNAc, nove unidades de Man e três unidades de Glc: DPP-$GlcNAc_2Man_9Glc_3$) (Adaptado de SCHWARZ & AEBI, 2011).

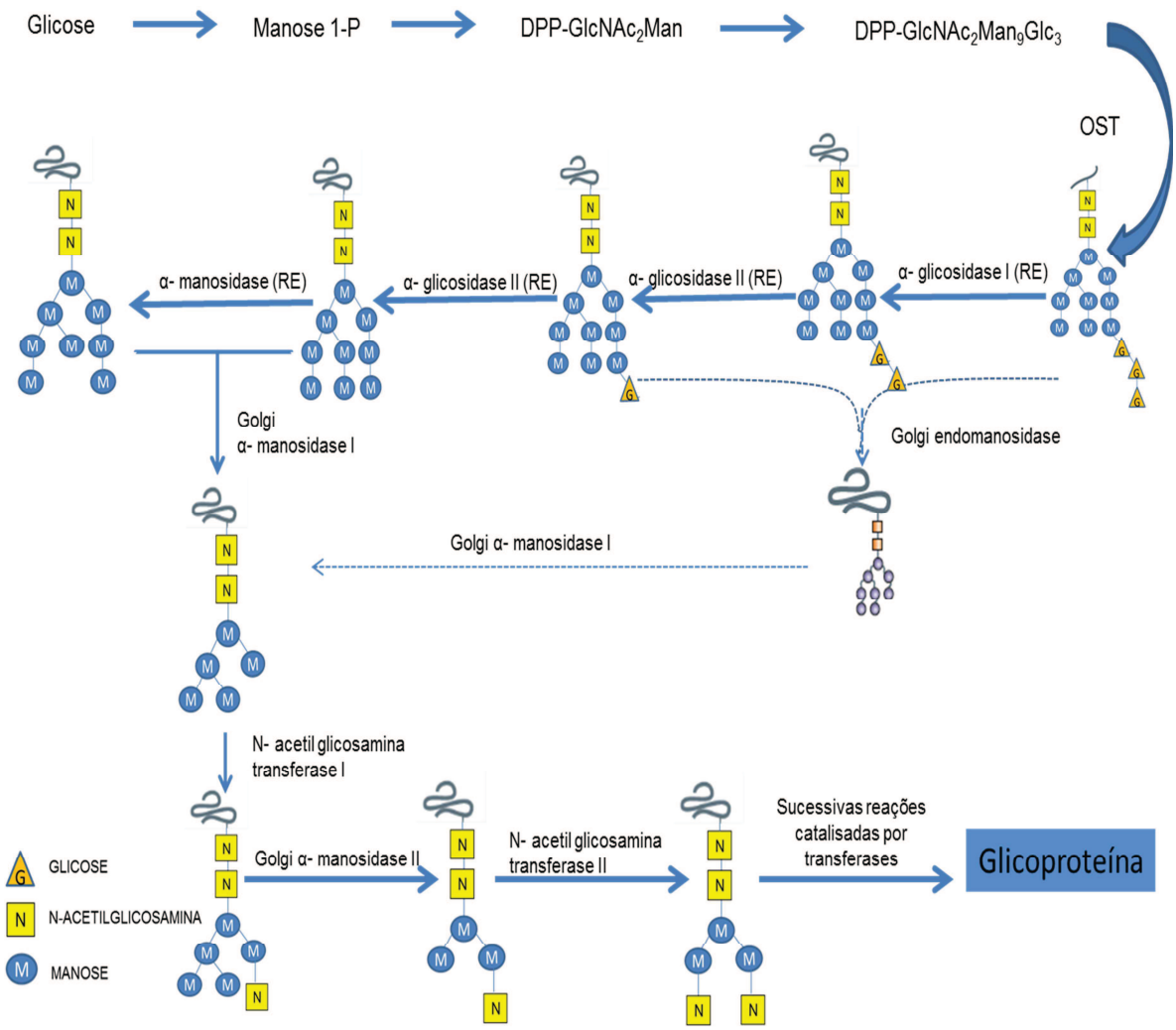

Figura 9: Processamento da N-glicosilação catalisado pela enzima OST (Adaptado de WALSH & JEFFERIS, 2006).

No caso da EPO-hr, os glicanos estão ligados em três asparaginas nas posições 24, 38 e 83, formando N-glicosilações, e em uma serina na posição 126 formando uma O-glicosilação. A N-glicosilação apresenta a maior implicação na estrutura e consequentemente na função de EPO-hr. Predomina estruturas tetraantenárias assim como tri e biantenárias em menor proporção (Figura 10). A O-glicosilação em EPO-hr é composta por GlcNAc, Gal e ácido siálico (BUTLER, 2008). Para uma boa atividade biológica da EPO-hr, é recomendado que a concentração de ácido siálico seja superior ou igual a 10 mol de ácido siálico/ mol de proteína (TAKEUCHI & KOBATA, 1991).

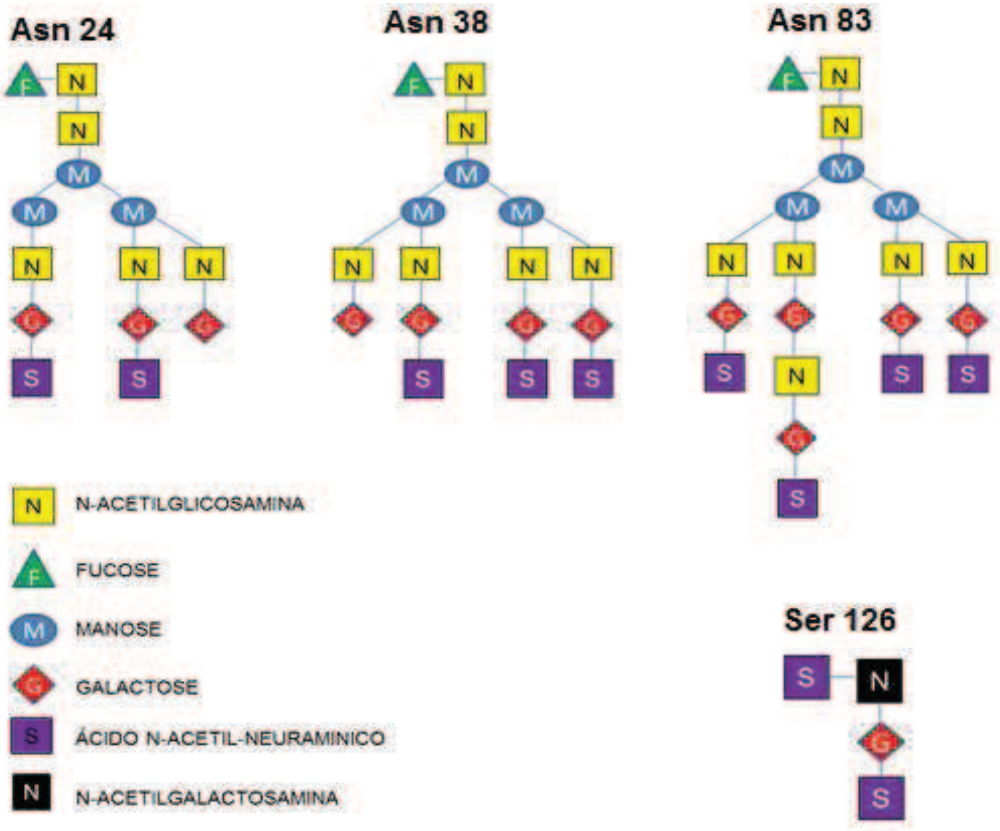

Figura 10: Glicanos de EPO-hr ligados em três asparaginas nas posições 24, 38 e 83 formando N-glicosilações e em uma serina na posição 126 formando uma O-glicosilação (Adaptado de TAKEUCHI & KOBATA, 1991).

Produtos de mutação sítio-dirigida da EPO-hr já são produzidos envolvendo adição de novos sítios de N-glicosilação. A α-darbepoetina (biofármaco de segunda geração) contém dois sítios a mais de N-glicosilação nas posições 30 e 88 a partir de cinco substituições de aminoácidos, aumentando a porção glicídica para 51%, massa molar para 37kDa, resíduos de ácido siálico para 22 e o tempo de meia-vida aumentado em três vezes (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

2.7 CONTROLE EM PROCESSO E CONTROLE DE QUALIDADE DE EPO-HR

Além do controle durante o processo produtivo, metodologias de controle de qualidade devem ser executadas tanto para a porção polipeptídica quanto para porção glicídica de uma glicoproteína. Dentre os ensaios utilizados em proteômica para o controle de qualidade, podem-se destacar a identificação e avaliação da homogeneidade por técnicas eletroforéticas, separação e análise do perfil peptídico e perfil de oligossacarídeos por espectrometria de massas (WILSON & WALKER, 2010).

Todas as operações envolvidas em um processo produtivo para obtenção de um biofármaco devem ser monitoradas pelo controle de qualidade e/ou controle em processo. Em muitas indústrias farmacêuticas, o controle em processo está ligado à produção, porém esse sistema pode originar conflitos de interesse entre a produção e o controle de qualidade, já que essa estruturação ainda não é bem definida (ALMEIDA, 2009).

Segundo Almeida (2009), o controle de qualidade difere do controle em processo na aceitação ou aprovação de um lote a partir das especificações pré-estabelecidas. O controle em processo visa garantir a qualidade do produto intermediário, já que as amostras são recolhidas para análise durante o processo produtivo, e dar suporte a qualquer tomada de decisão relacionada ao processo produtivo.

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada 17 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o controle em processo consiste de verificações realizadas durante a produção, de forma a monitorar e, quando necessário, ajustar o processo para garantir que o produto se mantenha conforme suas especificações, podendo abranger o controle do ambiente ou equipamentos (BRASIL, 2010).

O Laboratório de Controle em Processo e de Qualidade para EPO-hr deve seguir as recomendações estabelecidas em compêndios oficiais para que os parâmetros do processo produtivo sejam cuidadosamente ajustados, se necessário, controlados, garantindo a reprodutibilidade lote a lote (ALMEIDA, 2009).

Segundo Gilg *et al.* (1996), métodos cromatográficos (fase reversa e exclusão molecular), eletroforese e absorção UV/VIS podem ser utilizados na caracterização e controle de qualidade para verificar a identidade e/ ou pureza da EPO-hr, bem como métodos imunoquímicos e biológicos para verificar a identidade e potência de EPO-hr. Recentemente, a avaliação estrutural de glicoproteínas por espectrometria de massas tem avançado no âmbito da proteômica, tornando possível a identificação de modificações pós-traducionais e o mapeamento peptídico em um único experimento (AITKEN, 2010).

2.7.1 Aspectos regulatórios para a EPO-hr

Atualmente, não existe monografia oficial de matéria-prima ou forma farmacêutica de EPO-hr inscritas na Farmacopeia Brasileira 5ª edição. A Farmacopeia Americana tem apenas especificações gerais para produtos biológicos, não disponibilizando monografia geral para EPO-hr. Dessa forma, pode ser adotada monografia oficial, última edição, de algum compêndio internacional como, por exemplo, a Farmacopeia Americana e Farmacopeia Europeia (BRASIL, 2009). É preferencialmente adotada a Farmacopeia Europeia para produtos biológicos por apresentar protocolos mais completos para o controle de qualidade.

A Farmacopeia Europeia (F.E.) versão 7.0 preconiza alguns ensaios para a análise da qualidade de ingrediente farmacêutico ativo de EPO-hr, listados a seguir:

1. <u>Detecção de proteínas derivadas de células hospedeiras:</u>

Os processos biotecnológicos, principalmente os que utilizam a tecnologia recombinante, resultam na obtenção do biofármaco e também em resíduos com proteínas e outros oriundos das etapas de produção. Com intuito de remover ao máximo impurezas, os processos de purificação têm sido intensificados, por isso, a presença de proteínas de células hospedeiras deve ser reduzida a níveis preconizados pelas agências regulatórias. Métodos como eletroforese em gel de poliacrilamida e *Imunoblot* são utilizados para determinar os níveis destes contaminantes, porém sua sensibilidade é relativamente baixa quando comparada a

outros ensaios utilizando anticorpos específicos (KRATJE & ETCHEVERRIGARAY, 2008).

2. Detecção de DNA de célula hospedeira e vetor:

O controle do DNA residual é uma forma de aferir a eficiência e consistência das etapas de obtenção, métodos de purificação, assim como a qualidade do produto. A EPO-hr é expressa em células CHO e, com isso, o DNA residual da célula hospedeira pode representar uma impureza nas etapas de produção desta proteína. Os níveis de DNA devem ser quantificados utilizando métodos com sensibilidade adequada. O método de hibridização, para detecção de DNA da célula hospedeira, baseia-se na imobilização do DNA em uma membrana de nitrocelulose, sendo o DNA detectado por sondas marcadas por Digoxigenina (DIG) de modo semi-quantitativo comparado a uma curva padrão (KRATJE & ETCHEVERRIGARAY, 2008).

3. Identidade e perfil de isoformas:

a. Eletroforese capilar zonal:

Nessa técnica as diferentes isoformas de EPO-hr são separadas de acordo com a sua carga. O número de picos corresponde ao número de isoformas obtidas e a estimativa das áreas correspondentes a cada pico permite estabelecer o conteúdo percentual de cada uma delas, e com isso, pode-se determinar a qualidade da proteína em um tempo de análise curto, com possibilidade de automação (GILG *et al.*, 1996). Outra técnica bastante utilizada para estimar isoformas é a focalização isoelétrica. Este método envolve o uso de um gel que pode ser de poliacrilamida ou agarose, contendo uma mistura de anfólitos carreadores que, quando submetidos a um campo elétrico, serão harmonizados em ordem crescente de ponto isoelétrico do anodo para o catodo. Cada anfólito mantém o pH correspondente ao seu ponto isoelétrico (pI) e, deste modo, um gradiente de pH é formado no gel. Se uma amostra protéica for aplicada na superfície deste gel em gradiente de pH, a migração será influenciada pelo campo elétrico. Desta forma as proteínas são separadas de

acordo com sua carga. Se o número de grupamentos ácidos em uma proteína for superior ao número de básicos, ela será classificada como ácida e com pI em pH baixo. Se o número de grupamentos básicos for maior do que o número de grupamentos ácidos em uma proteína, esta será classificada como básica e com pI em pH alcalino (SILVA JÚNIOR, 2001). A técnica IEF em conjunto com a eletroforese unidimensional (SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) é denominada de eletroforese bidimensional que separa a proteína em duas dimensões: pI e massa molar (WALKER, 2010).

b. Eletroforese em gel de poliacrilamida:

SDS-PAGE é uma técnica amplamente utilizada para separação de proteínas pela sua mobilidade eletroforética, sendo dependente da sua massa molar. Para realização da técnica, as amostras devem ser tratadas com tampão desnaturante que normaliza a carga e a forma das proteínas, permitindo que sejam separadas em gel de poliacrilamida pela sua massa molar e não pela sua forma. Este tampão possui em sua composição 2-beta-mercaptoetanol, que tem a função de reduzir as pontes dissulfeto das proteínas, o que facilita a separação por tamanho. Outro ingrediente do tampão é o SDS, que é um detergente aniônico que se liga às proteínas, desnaturando-as e conferindo a mesma carga negativa, evitando que estas sejam separadas pela sua carga (SILVA JÚNIOR, 2001).

c. *Imunoblot*:

Esta técnica, confirmatória para a identidade da proteína, consiste na eletrotransferência das bandas protéicas do gel de poliacrilamida para uma membrana de PVDF (polivinildifluoreto) mediante corrente elétrica. Após afixação dessas bandas à membrana, é adicionada uma solução contendo um anticorpo primário que reconhece a proteína de interesse. Formado o complexo anticorpo-antígeno, em seguida um anticorpo secundário conjugado a uma enzima capaz de interagir com um substrato cromogênio é adicionado, formando um produto colorido e identificando assim a banda do antígeno de interesse (SILVA JÚNIOR, 2001).

d. Mapa de Peptídeos:

Baseia-se, primeiramente, na hidrólise química ou enzimática da amostra e posterior separação, por CLAE em fase reversa, dos peptídeos formados, obtendo-se um perfil altamente específico devido ao fato de que as enzimas hidrolisam as ligações peptídicas de forma específica. Com isso, para uma dada proteína os peptídeos formados são sempre os mesmos e os cromatogramas do hidrolisado de diversos lotes para uma mesma proteína devem ser sempre iguais. Estes cromatogramas são considerados como uma impressão digital da proteína. Diferenças nos cromatogramas, quando comparados com cromatogramas de lotes anteriores, mostram que a proteína pode ter sofrido um processo de modificação de sua estrutura molecular. Este método permite analisar a identidade da proteína quando comparado com o padrão. No caso da EPO, a protease utilizada e preconizada por compêndios oficiais é a tripsina. Como a tripsina tem uma grande especificidade de ação, hidrolisando peptídeos no lado carboxílico de resíduos de arginina e lisina, os fragmentos formados são sempre os mesmos (SILVA JÚNIOR, 2004).

e. Análise da sequência N-terminal:

O sequenciamento N-terminal é uma técnica que complementa a identificação feita pelo mapa peptídico. O fundamento desta técnica, também chamada de reação de Edman, consiste na reação do fenil-isotiocianato reage com o grupamento amino do N-terminal da proteína. Após a reação, o aminoácido N-terminal é liberado e sofre uma derivatização. Este derivado é identificado por CLAE. Ao final da reação, um novo aminoácido se torna o N-terminal e o ciclo é reiniciado. Em condições normais, pelo menos vinte ciclos podem ser realizados, identificando a sequência final de aminoácidos da proteína (KRATJE & ETCHEVERRIGARAY*;* 2008; CONCEIÇÃO, 2003).

4. <u>Determinação de proteínas através da absorção UV:</u>

Existem vários métodos para a determinação de proteínas totais, que são adequados para diferentes tipos de amostras. Para uma proteína pura ou com alto

grau de pureza é válido utilizar o método Lowry ou ainda o método por absorção no UV. O método Lowry, proposto por Wu, em 1922, baseia-se em uma mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (Reagente de Folin), que sofre redução ao reagir com proteínas, na presença de cobre (II), um catalisador. O composto formado tem absorção máxima em 750nm (WU, 1922). O método por absorção por UV baseia-se no fato de que as proteínas têm absorção na região de 280 nm e na região de 220 nm, sendo a primeira região devido a diversos aminoácidos como fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina, e a segunda devido à ligação peptídica. Contudo, na região de 280 nm, em pH neutro, somente os aminoácidos triptofano, tirosina e cisteína possuem uma absortividade molar alta (GILG *et al*., 1996). Este método está sujeito a muitos interferentes, sendo que, em amostras complexas, diversas substâncias podem absorver no UV. Entretanto, por ser um método de fácil execução e rápido é amplamente utilizado durante os procedimentos de purificação e separação de proteínas. Como o resultado de outras medidas, como mapeamento peptídico e pureza, depende do conteúdo protéico, é importante destacar que o método por absorção no UV é um dos métodos mais importantes. Idealmente, deve-se conhecer o coeficiente de extinção molar da EPO, uma vez que este é específico para cada proteína (WILSON & WALKER, 2010).

5. <u>Determinação de dímeros e substâncias de massa molar elevada:</u>

Este ensaio consiste na utilização de uma técnica cromatográfica de alta eficiência do tipo exclusão molecular, onde substâncias são separadas em função da sua forma e massa molar. Para as proteínas globulares, a eluição que ocorre em uma coluna de exclusão molecular que contém poros é a função inversa do logaritmo de suas massas molares, desde que a substância não interaja com a matriz cromatográfica por interações físico-químicas. Moléculas pequenas podem entrar nestes poros, mas não as grandes. O resultado é que as moléculas pequenas se distribuem tanto na solução aquosa dentro dos poros quanto entre eles, enquanto as grandes se localizam apenas na solução entre os poros. As moléculas grandes fluem mais rapidamente por esta coluna e emergem primeiro porque há um volume menor acessível a elas. Moléculas, cujo tamanho permite entrar ocasionalmente em um poro, fluirão pela coluna em uma posição intermediária e pequenas moléculas, que percorrem um caminho mais longo e tortuoso, sairão por último. Esse método

possibilita avaliar a concentração de agregados em amostras de EPO-hr (SILVA JÚNIOR, 2004).

6. Determinação de ácido siálico por espectrofotometria:

O método de determinação de ácido siálico por colorimetria, descrito na Farmacopéia Européia, é utilizado como um método de controle para quantificar o conteúdo de ácido siálico de EPO, já que a presença do mesmo desloca o pI para pH ácido e o tempo de meia vida da proteína no plasma varia de acordo com a estrutura do oligossacarídeo (JENKINS & CURLING,1994). Este método baseia-se na quantificação do conteúdo de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico), que forma um complexo colorido com o resorcinol, sendo medido a 620 nm (SVENNERHOLM 1957).

7. Atividade Biológica:

A atividade biológica tem o objetivo de medir a capacidade do produzir um efeito farmacológico definido, podendo ser realizados dois métodos. O primeiro utilizando camundongos policitêmicos e o segundo utilizando camundongos normocitêmicos. O segundo método, preferencialmente escolhido para avaliação da atividade biológica, já que causa menos estresse aos animais e não exposição do animal a radioisótopos, baseia-se na injeção do (bio)medicamento, no caso a EPO-hr, e posteriormente, na medida do estímulo de produção de reticulócitos. Esta medida é realizada em hemocitômetro a partir da coleta do sangue do animal (e tratamento da amostra coletada) após o intervalo de 96h (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que as metodologias preconizadas pela Farmacopeia Europeia para avaliação do padrão de glicosilação e sequenciamento peptídico não envolvem as utilizando metodologias mais robustas e precisas disponíveis hoje em dia. Técnicas de alta precisão como espectrometria de massas, devem ser adotadas durante o estabelecimento da manufatura do (bio)medicamento, para a avaliação dos lotes de consistência, e repetidas de tempos em tempos para lotes, com o intuito de verificar a reprodutibilidade do processo produtivo, já que alterações no grau de

glicosilação e na estrutura peptídica podem influenciar fortemente a qualidade do produto (GIMÉNEZ *et al.*, 2012; KRATJE & ETCHEVERRIGARAY, 2008 e DOBLHOFF-DIER, 1999).

2.7.2 Espectrometria de massas aplicada a biomoléculas

A espectrometria de massas (EM), desenvolvida por Joseph John Thomson em 1897 para análise de compostos químicos, é uma técnica analítica muito utilizada em diversos segmentos da química e, também, na caracterização estrutural de biomoléculas, com finalidade de determinar sua massa molar e a sua sequência peptídica. É baseada na ionização de moléculas em meio gasoso, ou seja, na formação de íons a partir de compostos neutros e na subsequente análise da decomposição dos íons formados mediante sua relação massa/carga. Para íons monocarregados, a relação massa/carga é a sua própria massa molar (AITKEN, 2010).

Um espectrômetro de massas é composto basicamente de uma fonte de ionização, um analisador sob vácuo, um detector, um sistema de injeção da amostra para a fonte de ionização mediante um sistema de injeção e processador de sinal a partir dos íons que chegam ao detector, conforme a figura 11, (SIMONE, 2008).

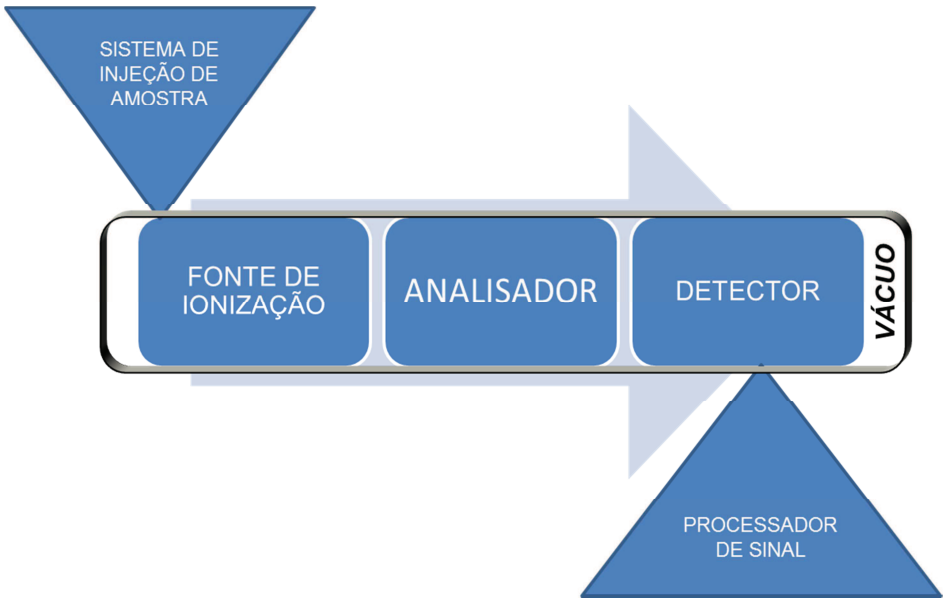

Figura 11: Componentes básicos que integram um espectrômetro de massas (Adaptado de SIMONE, 2008).

Mesmo considerada uma técnica antiga para moléculas orgânicas, somente em 1946 houve a possibilidade de avaliação de biomoléculas por *Time of flight* (TOF) utilizando como fonte de ionização *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* (MALDI). Esta técnica foi desenvolvida para contornar problemas de limitações relacionados ao uso das fontes de ionização mais antigas, como, por exemplo, eletrodessorção, já que biomoléculas não podem ser submetidas às mesmas condições das demais moléculas orgânicas (AITKEN, 2010).

Anos depois, em 2002, o uso de *Electrospray* (ESI) como fonte de ionização foi estabelecido por John Fenn especialmente para ionização de biomoléculas (AITKEN, 2010). Nesse método, há uma produção de íons por nebulização de uma solução de um analito, a qual é bombeada pelo capilar de aço inoxidável dentro de um campo elétrico, podendo variar entre 2000 e 4000V (Figura 12a). Esse *spray* formado passa por uma corrente de nitrogênio, onde as gotículas perdem o material líquido no qual foram solubilizadas ao ponto de concentrar as cargas na superfície da molécula (dessolvatação), a qual passa para a fase gasosa, até haver a ionização da amostra (Figura 12b).

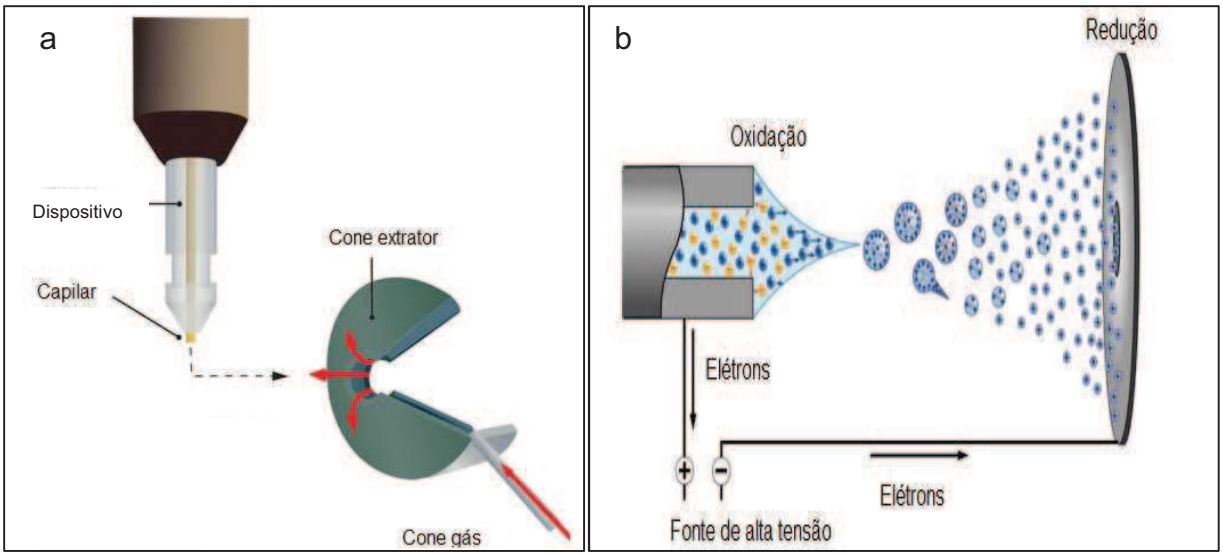

Figura 12: a) Dispositivo para formação de gotículas para ESI. b) Processo de dessolvatação (Fonte: Adaptado de WATERS Ltda, 2013 e SIMONE, 2008).

Os íons formados são direcionados para o analisador de massas devido um gradiente de potencial existente, conforme a figura 13 (AITKEN, 2010; SIMONE, 2008).

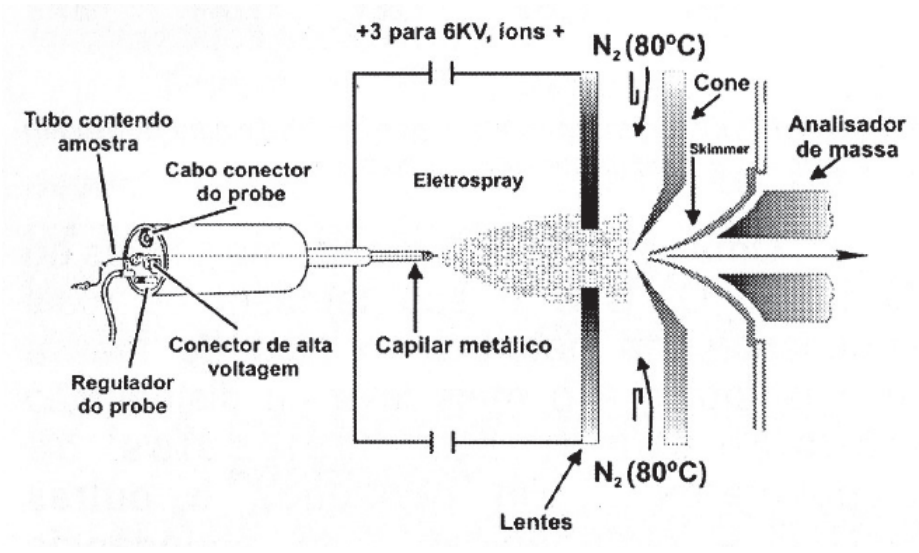

Figura 13: Fonte de ionização por ESI (Fonte: SIMONE, 2008).

Os íons assim obtidos podem ser selecionados individualmente e analisados de acordo com sua relação massa/carga. Diferentes analisadores de massa podem ser utilizados como, por exemplo, quadrupolo (Q), armadilha iônica (*ion-trap*) e TOF, ou ainda, em espectrômetros mais avançados, um conjunto destes tipos de analisadores (SIMONE, 2008). O quadrupolo é composto de quatro cilindros metálicos paralelos, onde são aplicadas voltagem e radiofrequência, alternadamente, e funciona como um filtro iônico a partir da sua relação masssa/carga específica. O triplo quadrupolo permite a realização de análises sequenciais onde o primeiro e o terceiro quadrupolo funcionam como um filtro, enquanto o quadrupolo intermediário funciona como uma célula de colisão de baixa energia para obtenção de fragmentos menores (SIMONE, 2008). A armadilha de elétrons, outro analisador que pode ser utilizado em conjunto com o triplo quadrupolo, funciona como aprisionamento de íons dentro do eletrodo a partir de um valor determinando pela radiofrequência estabelecida. Sequencialmente, os íons são liberados seletivamente. Esta técnica aprimora os resultados quantitativos e é denominada *tandem* ou "espectrometria em múltiplos estágios" (MS/MS, do inglês *Mass Spectrometry*/*Mass Spectrometry*). O último analisador citado neste texto, TOF, separa os íons formados com base em suas diferentes velocidades quando acelerados por um potencial de voltagem, sendo as velocidades inversamente proporcionais a massa do íon (AITKEN, 2010; SIMONE, 2008). Recentemente, com a inclusão da separação de fragmentos por mobilidade iônica, onde é considerada

também a sua conformação, tornou a espectrometria de massas um método excelente para caracterização estrutural de biomoléculas. São utilizadas duas câmaras de colisão antes e pós-separação por mobilidade, onde a separação ocorre sob vácuo (DAMEN *et al.,* 2009).

Após a separação adequada de íons, torna-se necessária a conversão destes em um sinal compatível com um processador de dados. Esta conversão é realizada por um detector posicionado no final do analisador. Entre os detectores existentes pode-se citar: fotomultiplicador, placa de microcanais e o detector mais amplamente utilizado para análise de biomoléculas, o multiplicador de elétrons. Como o próprio nome diz, este tipo de detector multiplica um elétron sucessivamentes amplificando o sinal a ser processado por programas específicos. Ou seja, os íons são observados como elétrons e são interpretados por processadores e tratados por *softwares* que convertem estes dados em um formato mais adequado (AITKEN, 2010; SIMONE, 2008).

A técnica de espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) possibilita análises mais dinâmicas e rápidas, onde a substância que sai da coluna analítica com uma prévia separação é injetada direto no espectrômetro de massas, conferindo um sistema capaz de separar e identificar estruturas com acurácia (AITKEN, 2010).

A espectrometria de massas permite a determinação da massa molar de proteínas e peptídeos, como também a determinação da sequência primária, de modificações pós-traducionais e da homogeneidade da proteína oriunda da tecnologia DNA recombinante (AITKEN, 2010; SIMONE, 2008). Atualmente, esta técnica também é utilizada para monitoramento de sobrenadantes de culturas de células, para avaliação de apoptose precoce e estresse celular (SCHWAMB *et al*., 2013).

2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, há um grande número de proteínas recombinantes terapêuticas (biofármacos) disponíveis no mercado (bio)farmacêutico. Geralmente, proteínas recombinantes são utilizadas em terapia de reposição como a EPO-hr (SHARPLES, *et al.,* 2006). Sendo assim, para que estas proteínas sejam manufaturadas com qualidade apreciável faz-se necessário o uso de sistemas de expressão que permitam a sua produção de modo eficiente, ou seja, sistemas capazes de realizar corretamente as modificações pós-traducionais como, por exemplo, a linhagem celular CHO (ZHU, 2012). Dentro deste contexto, cada vez mais é exigida a utilização de metodologias analíticas para caracterização profunda e consequentemente comprovação da qualidade de biofármacos (GILG *et al*., 1996). Muitas metodologias analíticas podem ser utilizadas para caracterizar uma glicoproteína terapêutica, sendo necessário o emprego de diferentes métodos ou métodos mais avançados, principalmente para sequenciamento peptídico e caracterização das modificações pós-traducionais, como a glicosilação (OHTA *et al*., 2001). A escolha do método depende do nível de informação necessária sobre o biofármaco, como por exemplo, a estrutura peptídica e dos oligossacarídeos podem ser determinadas experimentalmente por espectrometria de massas. A determinação da massa molar e distribuição das isoformas podem ser determinadas mediante técnicas eletroforéticas como a eletroforese unidimensional, focalização isoelétrica e, ainda, eletroforese bimensional.

Capítulo 3
3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da presente dissertação consiste em caracterizar o Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) para Eritropoetina Humana Recombinante por técnicas químicas e físico-químicas.

Para atingir o objetivo geral, foram definidos os objetivos específicos que se seguem.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a concentração de proteínas pela técnica de espectrofotometria por absorção no ultravioleta (UV) para três lotes do Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) de EPO-hr;
- ✓ Caracterizar três lotes do Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) de EPO-hr por SDS-PAGE e por eletroforese bidimensional;
- ✓ Avaliar o percentual de pureza de três lotes do Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) de EPO-hr por HPLC-FR;
- ✓ Caracterizar e avaliar três lotes de Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) por espectrometria de massas com fonte de ionização *electrospray* e analisadores quadrupolo-TOF.

Capítulo 4
4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos apresentados foram realizados na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) - Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos de saúde/Setor de Imunobiológicos, Rio de Janeiro e na empresa Waters Technologies do Brasil LTDA, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento, situado em Barueri/ São Paulo.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Amostras

Foram utilizados três lotes do Ingrediente Farmacêutico Ativo de EPO-hr (purificado do sobrenadante de um cultivo) fornecido por uma indústria farmacêutica produtora. Tais lotes foram codificados da seguinte forma: A, B e C.

4.1.2 Reagentes e padrões

Como controle foi utilizado um lote material de referência de EPO-hr, produzido em parceria entre Cuba e Brasil, contendo 243 µg ± 3,6 de alfa-EPOhr e excipiente composto por: 60mg de trealose, 9mg de arginina, 0,3mg de tween 20, 13,5mg de NaCl e 10,6mg de $Na_2HPO_4.1H_2O$ com potência biológica declarada de 24393 UI.

Para as técnicas eletroforéticas: eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletroforese bidimensional foram utilizados reagentes da Merck, exceto acrilamida (Sigma Aldrich), bis-acrilamida (Sigma Aldrich) e o padrão de massa molar (*Silver Stain* SDS-PAGE *Standards*, *Low Range,* Bio Rad) composto pelas seguintes proteínas: miosina (200 kDa), β-galactosidase (115 kDa), albumina bovina (96 kDa), anidrase carbônica (37 kDa), Inibidor tríptico de soja (29 kDa), lisosima (20 kDa), *ReadyPrep 2-D Cleanup (*Bio-Rad); *ReadyPrep 2-D Starter (* Bio-Rad); Strips faixa de pH 3 –10 (Bio-Rad).

Para análise por cromatografia em fase reversa foram utilizados os reagentes acetonitrila grau HPLC (Merck), isopropanol (Merck), água obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore) e ácido trifluoracético - TFA (Merck).

Para análise por espectrometria de massas foram utilizados os seguintes reagentes: Bicarbonato de sódio (Merck), RapiGest SF® (Waters), ditiotreitol (Merck), iodocetamida (Sigma Aldrich), tripsina (Promega), TFA (Merck), Ácido Fórmico (Merck) e acetonitrila (Merck).

4.1.3. Equipamentos

4.1.3.1 Sistema espectrofotométrico

Foi utilizado um espectrofotômetro, modelo UV 1601 (Shimadzu, Japão), com cubeta de quartzo 1cm (Figura14).

Figura14: Espectrofotômetro, modelo UV 1601(Shimadzu, Japão)

4.1.3.2 Sistema cromatográfico

Foi utilizado um sistema cromatográfico modelo Ultimate 3000®, (Dionex, Alemanha) configurado com bomba de gradiente quaternário, degaseificador, forno para coluna, injetor automático, detector DAD (Detector de Arranjo de Diodos) e software Chromeleon® versão 6.8 b Coluna analítica C18 Ace (250 x 4,6mm) (Figura 15).

Figura15: Cromatografo líquido de alta peformance, modelo Ultimate® 3000, software Chromeleon® versão 6.8 b (Dionex, Alemanha)

4.1.3.3 Sistema de eletroforese para SDS-PAGE

Foi utilizado um sistema de eletroforese Mini protean III e densitômetro modelo GS-800, (Bio-Rad, Estados Unidos). Fonte eletroforética modelo EPS 3501 XL, (Amersham Biosciences, Reino Unido) (Figura 16).

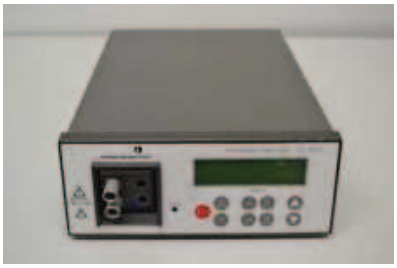

Figura 16: Fonte eletroforética, modelo EPS 3501 XL (Amersham Biosciences, Reino Unido).

4.1.3.4 Sistema de eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Foi utilizado um sistema Protean IEF Cell (Figura 17), strips de 7 cm de comprimento, faixa de pH de 3,0 a 10,0, modelo 163-2000, (Bio-rad, Estados Unidos) kit starter para eletroforese bidimensional (Bio-rad 163-2105), densitômetro, GS-800 Bio-Rad, e *software PD-Quest* Bio-Rad.

Figura 17: Sistema Protean IEF Cell, modelo 163-2000 (Bio-rad, Estados Unidos).

4.1.3.5 Sistema de espectrometria de massas

Foi utilizado um espectrômetro de massas por eletrospray, modelo Synapt ™ G2–S HDMS (Figura 18), com mobilidade iônica acoplado ao cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UPLC), modelo Acquity H-Class, (Waters, Reino Unido) e *software* Biopharmalynx para processamento dos resultados (Waters., Estados Unidos).

Figura 18: Espectrômetro de massas por eletrospray, modelo Synapt ™ G2–S HDMS com mobilidade iônica, (Waters, Reino Unido).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Dessalinização das amostras

Com uma seringa, aplicou-se lentamente 20 mL de água obtida pelo sistema Milli-Q na coluna Hitrap Desalting (Sephadex G25), em posição vertical, para equilíbrio, depois aplicou-se 1,5 mL do lote A e em seguida 2,0 mL de água obtida pelo sistema Milli-Q para eluição da EPO-hr. Procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 280 nm e 260 nm para obtenção do valor da concentração de proteínas e relação proteína/DNA, que deve ser maior que 0,3 mg/mL e a relação maior que 1,5. Transferiu-se uma alíquota da amostra referente a uma massa de 50 µg e secou-se por 2 horas em spead-vac a temperatura ambiente, sendo acondicionada a - 20℃ por 1 mês. Este procedimento foi repetido para os lotes B e C.

4.2.2 Determinação da concentração de proteínas pela técnica de espectrofotometria por absorção no ultravioleta (UV)

Com os referidos lotes de IFA em temperatura ambiente foram retiradas alíquotas para uma cubeta de quartzo, procedendo a leitura da absorbância no espectrofotômetro Shimadzu utilizando como branco água obtida pelo sistema Milli-Q. Com base nas leituras de Densidade Ótica (D.O.), foram calculadas, a concentração de proteínas e a razão entre proteína e DNA de acordo com as equações abaixo:

Concentração de proteínas (mg/mL) = Absorvância a 280nm x coeficiente de extinção molar a 280nm (1,345 ou 0,7435 cm^2 mg^{-1})

Razão entre 280 e 260nm = Absorvância da amostra a 280nm / Absorvância da amostra a 260nm

4.2.3 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para verificar a massa molar e a homogeneidade da amostra foi realizada a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, sigla em inglês) na presença de tensoativo aniônico, dodecil sulfato de sódio (SDS, sigla em inglês). Para tanto foi montado cassete para preparação do gel utilizando-se espaçador de 0,75mm e gel a 12% de acrilamida. A corrida eletroforética foi desenvolvida com corrente constante de 30 mA e voltagem de 110V com volume de aplicação de 10µL para o padrão de massa molar e amostra 1µg/µL previamente dessalinizada em coluna Hitrap. Após a finalização da corrida, o gel foi corado seguindo o protocolo estabelecido por Silva (2001) para coloração com Coomassie e Blum, Bier e Gross (1987) para coloração com prata e avaliado no densitômetro GS 800 (Bio-rad).

4.2.4 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Aplicou-se 125 µL das amostras na cuba do sistema Protean IEF Cell. Colocou-se em seguida sobre cada linha do sistema strips de 7 cm de comprimento, faixa de pH de 3,0 a 10,0 (Bio-rad 163-2000). A focalização isoelétrica ocorreu nas seguintes condições: 1ª Parte: 250V por 20 min, com subida linear; 2ª Parte: 4000V por 2h, com subida linear; 3ª Parte 4000V até atingir um total de 20000V/hora, com subida rápida. Terminada a primeira dimensão, os strips foram preparados para a segunda dimensão com o kit starter para eletroforese bidimensional (Bio-rad 163-2105). A segunda dimensão foi feita com o gel à concentração de 12%. Após a corrida eletroforérica, o gel foi corado pelo método da prata (BLUM *et al*., 1987).

O gel obtido foi então analisado utilizando um densitômetro, GS-800 *calibrated Densitometer* – Bio-Rad, e os dados foram obtidos com o auxílio do *software PD-Quest* Bio-Rad. Os valores de massa molar e o ponto isoelétrico de cada spot foram determinados utilizando funções específicas do programa.

4.2.5 Pureza por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

4.2.5.1 Preparo de fase móvel

Para o desenvolvimento desta metodologia foram preparadas duas soluções de acordo com Conceição (2003): fase móvel A (Ácido Trifluoracético 0,1% v/v em água obtida pelo sistema Milli-Q/MIllipore) e fase móvel B (Ácido Trifluoracético 1% v/v em acetonitrila: 1-propanol (3:1)).

4.2.5.2 Condições da corrida cromatográfica

A coluna analítica C18 Ace no cromatógrafo foi equilibrada com a fase móvel A seguindo as condições iniciais do método (Tabela 01), até estabilização da linha de base. O volume de injeção para amostra foi correspondente a 30µg de EPO-hr e controle foi de 100µL.

Tabela 01: Programa do Gradiente descrevendo as condições da corrida para o ensaio de pureza para cromatografia líquida em fase reversa.

Tempo (minutos)	Fluxo (mL/minutos)	% Fase móvel B
0 – 5	1	2
5 – 40	1	80
40 – 50	1	80
50 – 60	1	2
60 – 70	1	2

4.2.6 Mapeamento peptídico por espectrometria de massas por ESI-QTOF

A 50µL das amostras (lotes: A, B e C) e controle previamente dessalinizados, com concentração de 1µg/µL foram adicionados 10µL de bicarbonato de amônio

50mM pH 8,5, 25µL de solução RapiGest SF® 0,2% (um surfactante) e procedeu o aquecimento a 80ºC por 15 minutos. Após 15 minutos, centrifugou-se e adicionou-se 2,5µL de ditiotreitol 100 mM e aqueceu-se novamente a 60ºC por 30 minutos. Finalizado o tempo de aquecimento, foram adicionados 2,5µL de iodocetamida 300 mM e as amostras e controle foram mantidas ao abrigo da luz a temperatura ambiente por 30 minutos. Após o tempo de 30 minutos foram adicionados 20µL de solução de tripsina 0,05µg/µL e realizou-se a hidrólise enzimática a 37ºC *overnight.* Adicionou-se 10µL de TFA 5% e centrifugou-se a 14000 rpm a 6ºC por 30 minutos. Utilizou-se para o sistema UPLC (*Ultra performance liquid chromatography*) coluna ACQUITY ™ HSST3 (Waters), 2.1 x 100 mm, fluxo 300 uL/min, temperatura coluna 60˚C, solvente A: Ácido Fórmico 0,1% e solvente B: Ácido Fórmico 0,1% em acetonitrila e gradiente de acordo com o especificado na tabela 02. E para HDMS (Waters), Modo íon positivo, capilar: 2.8 kV, cone: 30V, Energia de colisão - baixa: Trap: 4 volts, transferência: 0 volts, Energia de colisão - elevada: Trap: 4 para 5 volts, rampa de transferência: 19 - 44 volts, *scan time*: 300 ms.

Os lotes de IFA (A, B e C) e o controle de EPO-hr foram submetidos à análise por espectrofotometria de massas após a redução e alquilação com ditiotreitol e iodocetamida, respectivamente, e hidrólise com tripsina. Para avaliar os peptídeos encontrados experimentalmente foi utilizado o programa Biopharmalynx® para obter os peptídeos teóricos de EPO-hr a partir da hidrólise com tripsina.

Tabela 02: Gradiente para mapeamento por espectrometria de massas por *electrospray* acoplada ao UPLC.

Tempo (minutos)	Fluxo (mL/minutos)	% Fase móvel A
0 – 6,06	0,3	95,0
6,06 – 10,06	0,3	60,0
10,06 – 14,06	0,3	15,0
14,06 – 16,06	0,3	95,0

Capítulo 5
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações físico-química e química do IFA para EPO-hr

5.1.1 Determinação da concentração de proteínas pela técnica de espectrofotometria por absorção no ultravioleta (UV)

A determinação da concentração de proteínas por UV é um método amplamente utilizado durante os procedimentos de purificação e separação de proteínas por ser um ensaio simples e de fácil execução. Todavia, deve-se conhecer o coeficiente de extinção molar da proteína, que para EPO-hr é igual a 1,345.

O desenvolvimento das metodologias de SDS-PAGE, 2D-PAGE, cromatografia líquida em fase reversa e espectrometria de massas dependem dos resultados obtidos de concentração proteica por absorção no UV. Sendo assim, este ensaio é de suma importância para o controle de qualidade da EPO-hr.

De acordo com a tabela 3, pode-se concluir que há uma grande variabilidade nas leituras para os comprimentos de onda 280nm e 260nm dos três lotes, respectivamente, quando observadas isoladamente. Entretanto, a relação 280/260nm apresentou estabilidade entre os lotes. Os resultados de concentração

foram 0,7133 mg/mL, 1,0476 mg/mL e 0,3789 mg/mL para os lotes A, B e C respectivamente.

Tabela 3: Resultado das leituras das absorbâncias dos lotes de IFA, da concentração e da relação proteína/DNA respectivamente.

Lote IFA	D.O. 280 nm	D.O. 260 nm	Concentração mg/mL	Relação 280/260nm
A	0,5303	0,2914	0,7133	1,82
B	0,7789	0,4233	1,0476	1,84
C	0,2817	0,1615	0,3789	1,74

5.1.2 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A técnica de SDS-PAGE foi empregada para verificar a homogeneidade protéica e estimar a massa molar das amostras. Os resultados obtidos para os três lotes de IFA evidenciam uma banda de forma difusa. Este formato difuso deve-se à micro-heterogeneidade da porção oligossacarídica da EPO. De acordo com RUSH *et al*. (1995), a micro-heterogeneidade da EPO está ligada ao número de repetições das unidades NAcGlc-Gal e à presença de ácido siálico no final de cada ramificação das cadeias de oligossacarídeos.

Analisando o gel de SDS-PAGE para o lote A (Figura 19), bandas de alta massa molar entre 45 e 66 kDa são evidenciadas. É possível, também, estimar a massa molar em 39,78 kDa ± 0,15 (39,13; 39,67 e 39,89 kDa respectivamente).

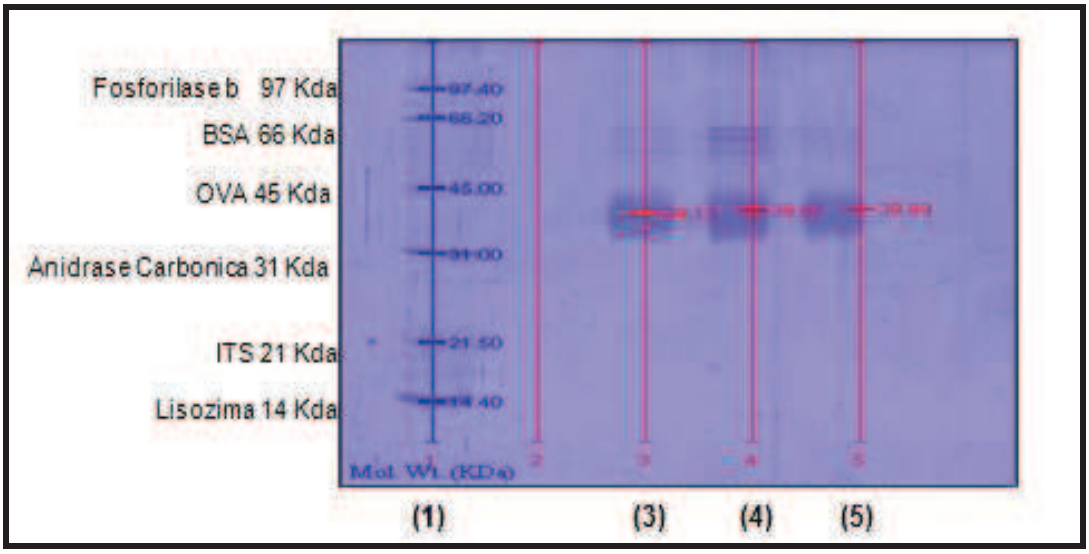

Figura 19: SDS-PAGE para amostra de IFA lote: A. 1ª raia: Padrão de baixa massa molar; 3ª a 5ª raias: amostra em triplicata. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% desenvolvida em sistema vertical Mini-Protean III, Bio-Rad, espaçador de gel: 0,75cm. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25 mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo: 40 minutos. Volume aplicação das amostras e padrão: 10µL.

Analisando a figura 20, correspondente ao lote B de IFA de EPO-hr, é possível estimar a massa molar em 40,09 kDa ± 0,78 (39,24; 40,77; 40,25 kDa respectivamente).

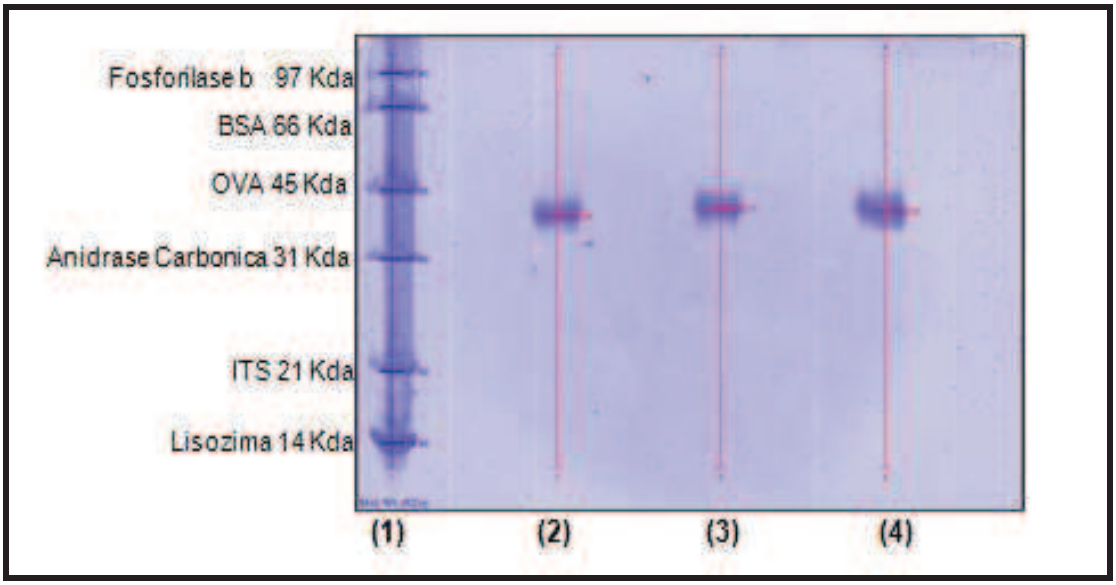

Figura 20: SDS-PAGE para amostra de IFA lote: B. 1ª raia: Padrão de baixa massa molar; 2ª a 4ª raias: amostra em triplicata. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% desenvolvida em sistema vertical Mini-Protean III, Bio-Rad, espaçador de gel: 0,75cm. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo: 40 minutos. Volume aplicação das amostras e padrão: 10µL.

A estimativa da massa molar para o lote C ficou em 39,32 kDa ± 0,23 (39,32; 39,09; 39,55 respectivamente) conforme mostrado na figura 21.

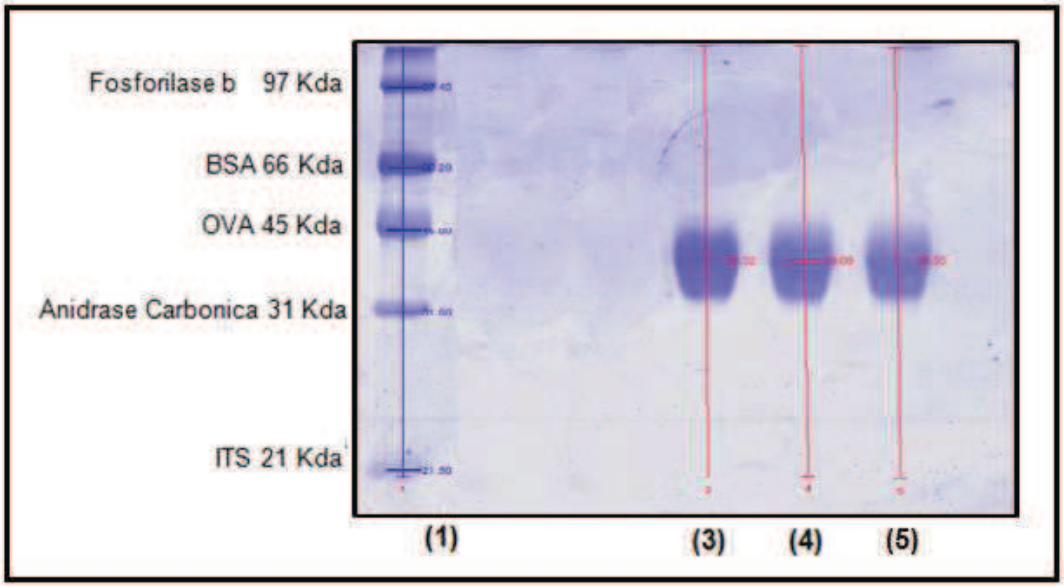

Figura 21: SDS-PAGE para amostra de IFA lote: C. 1ª raia: Padrão de baixa massa molar; 3ª a 5ª raias: amostra em triplicata. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% desenvolvida em sistema vertical Mini-Protean III, Bio-Rad, espaçador de gel: 0,75cm. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo: 40 minutos. Volume aplicação das amostras e padrão: 10µL.

Todos os resultados para estimar a massa molar de EPO-hr para os três lotes são coerentes com os dados disponíveis na literatura que pode variar de 34-40 kDa devido à variedade da composição glicídica. Sendo assim, as estimativas são satisfatórias.

5.1.3 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

A eletroforese bidimensional é uma ferramenta fundamental na área da proteômica, pois pode ser usada para visualizar um grande número de proteínas simultaneamente e suas diferentes isoformas (HAYNES *et al.*, 2000; LOW *et al.*, 2002).

A presença de isoformas é responsável pela manutenção do tempo de meia vida da proteína e estabilidade da EPO-hr. A Farmacopeia Europeia estabelece para EPO-hr o mínimo de seis bandas majoritárias e duas bandas minoritárias.

No entanto, a eletroforese bidimensional apresenta ainda algumas limitações como reprodutibilidade e resolução de proteínas pouco abundantes, hidrofóbicas e de alta massa molar (SANTONI *et al*., 1999; RABILLOUD *et al*., 1997; SCHUCK, *et al*., 2003; HEBERT, 1999).

No gel bidimensional correspondente ao lote A de IFA de EPO-hr é observada a presença de cinco regiões (Figura 22). A região 1 refere-se às seis isoformas de EPO-hr predominantes na faixa ácida com massa molar semelhante, em torno de 39 kDa e diferentes pontos isoelétricos, variando de 4,5 a 6,5. Na região 2, pode-se observar a presença de uma banda com massa molar menor do que o da EPO-hr e ponto isoelétrico na faixa de pH ácido. Acredita-se que, nesta região, esta banda esteja relacionada com algum produto de degradação, que ocasionou a diminuição de massa molar da EPO-hr e a perda de unidades de ácido siálico, fazendo com que o ponto isoelétrico migrasse para a faixa de pH ácido. Entretanto, esta informação deve ser avaliada com a realização de outras técnicas com maior precisão. A região 3 apresentou bandas eletroforéticas com massa molar superior às da região 1, também com uma grande distribuição de isoformas e intensidade menor dos *spots*. Esta região pode ser associada a proteínas oriundas do cultivo celular, aceitável em percentual baixo (menor que 0,5%), já que o gel de SDS-PAGE para este lote (Figura 21) apresentou também bandas de alta massa molar. Na região 4 apresentada pode-se observar a presença de proteínas na mesma região de massa molar das isoformas de EPO-hr, porém com focalização na faixa de pH básico, o que mais uma vez indica algum desvio no processo de purificação, principalmente na etapa de separação das isoformas ácidas das básicas ou ainda que houve perda de monômeros de ácido siálico, fazendo com que as proteínas focalizassem na região mais básica do gel. A região 5 apresenta bandas eletroforéticas com menor massa molar de menor intensidade, que focalizaram na faixa de pH básico.

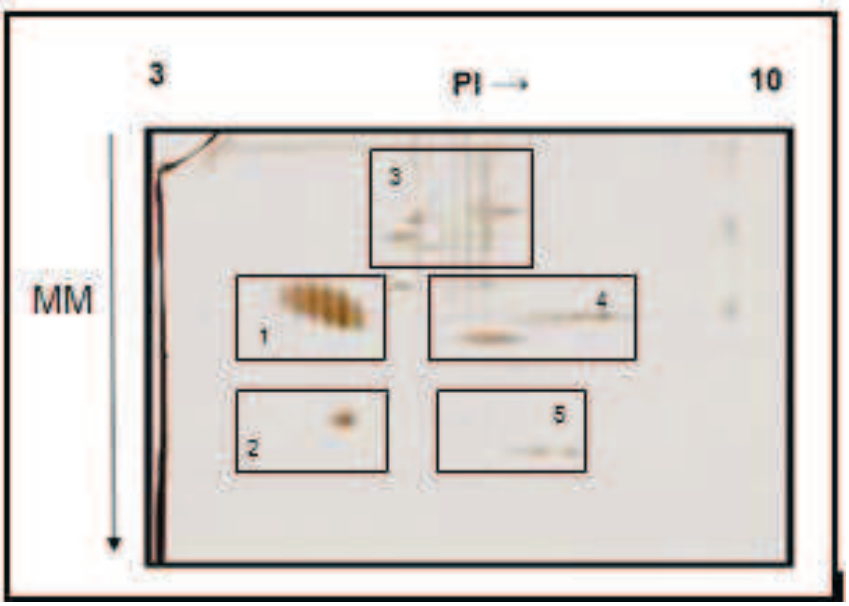

Figura 22: Eletroforese bidimensional para EPO lote: A. Volume aplicado: 125 µL de amostra e strip de 7 cm. Primeira dimensão: Mini-Protean II Cell; Strip 3 – 10; Segunda dimensão o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo: 240 minutos

No gel bidimensional referente ao lote B, na figura 23, pode-se observar uma única região (1) próxima à massa molar de 39 kDa apresentando seis bandas majoritárias e diferentes pontos isoelétricos, variando de 4,5 a 6.5. Pode-se inferir que a produção deste lote foi eficiente, já que não foi evidenciada a presença de bandas eletroforéticas em outra região do gel bidimensional.

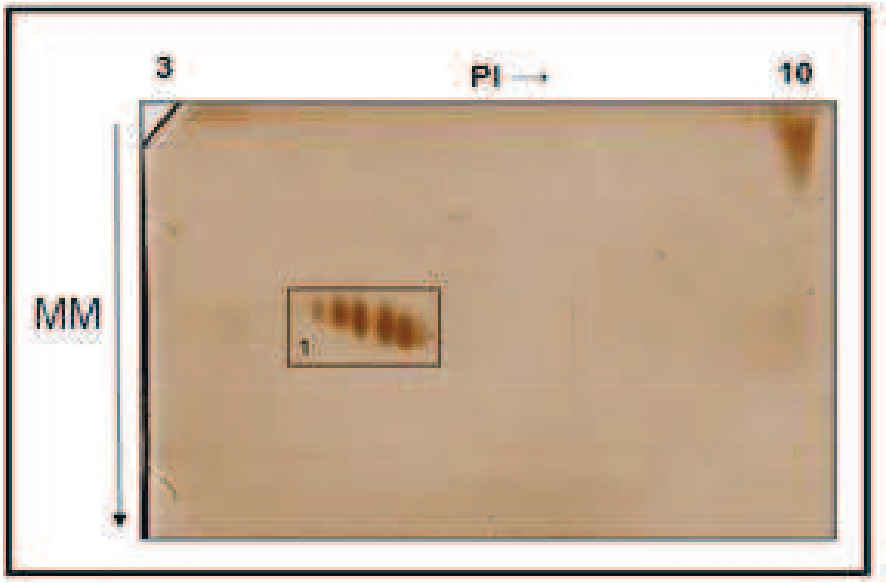

Figura 23: Eletroforese bidimensional para EPO lote: B. Volume aplicado: 125 µL de amostra e strip de 7 cm. Primeira dimensão: Mini-Protean II Cell; Strip 3 – 10; Segunda dimensão o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo total: 240 minutos.

No gel bidimensional correspondente ao lote C de IFA de EPO-hr, na figura 24, é observada a presença de cinco regiões. Igualmente ao lote A (Figura 25) há regiões com uma enorme variabilidade de proteínas com alta e baixa massa molar. A região 1 refere-se às seis isoformas de EPO-hr predominantes na faixa ácida com massa molar semelhante, em torno de 39 kDa, confirmado, também, pelo SDS-PAGE e diferentes pontos isoelétricos, variando de 4,5 a 6,5. Na região 2 pode-se observar a presença de uma banda com massa molar menor do que o da EPO-hr e ponto isoelétrico na faixa de pH ácido com baixa intensidade. A região 3 apresentou bandas eletroforéticas com massa molar superior a região 1, também com uma grande distribuição de isoformas e mesma intensidade dos *spots*. Diferente do resultado obtido para o lote A referente ao ensaio de SDS-PAGE, o terceiro lote (C) não apresentou bandas de alta massa molar e sim uma única banda difusa correspondente a 39 kDa. A ausência de bandas eletroforéticas detectáveis na região de alta massa molar pode ser explicada pelo método de coloração utilizado (*Coomassie*), que é um método de baixa sensibilidade. Entretanto, este método de coloração é preconizado pela Farmacopeia Europeia 7ª edição para o ensaio de SDS-PAGE. Talvez utilizando outro método de coloração como, por exemplo, nitrato de prata, as bandas eletroforéticas de alta massa molar pudessem ser detectadas, já que é um método mais sensível quando comparado ao *Coomassie*. Na região 4 apresentada pode-se observar a presença de proteínas na mesma região de massa molar das isoformas de EPO-hr e em maior número, quando comparada à mesma região no gel do lote A, com focalização na faixa de pH básico, indicando mais uma vez que a produção para este lote não foi eficiente. A região 5 apresenta bandas eletroforéticas com menor massa molar de menor intensidade, com focalização na faixa de pH básico.

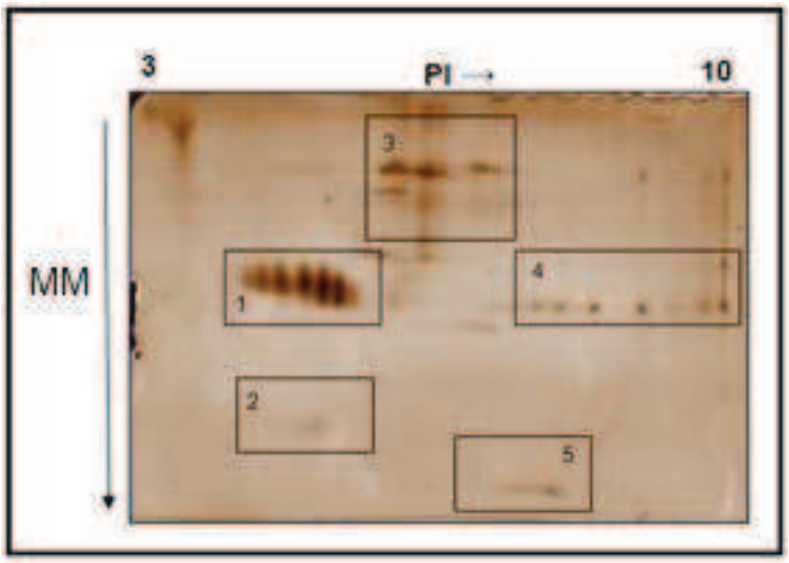

Figura 24: Eletroforese bidimensional para EPO lote: C. Volume aplicado: 125 µL de amostra e strip de 7 cm. Primeira dimensão: Mini-Protean II Cell; Strip 3 – 10; Segunda dimensão o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo total: 240 minutos.

5.1.4 Pureza por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

A CLAE-FR.é uma ferramenta amplamente utilizada na área analítica na separação de proteínas para determinação do percentual de pureza como também no mapeamento peptídico a partir de clivagens enzimáticas.

Como algumas bandas eletroforéticas foram detectadas nos ensaios de SDS-PAGE e 2D-PAGE não compatíveis com a EPO-hr, foram utilizados, neste trabalho, dois modificadores orgânicos (acetonitrila (ACN) e 1-propanol) com intuito de favorecer a separação de proteínas hidrofóbicas e a resolução entre proteínas, uma vez que a adição de modificadores orgânicos tem a finalidade de atuar de maneira diferenciada sobre cada proteína, fazendo com que cada proteína varie seu tempo de retenção (K').

Segundo Conceição (2003), esta metodologia pode ser empregada para o controle de qualidade do produto final da EPO-hr contendo soro albumina humana como excipiente na formulação, já que este o efeito hidrofóbico na EPO-hr é mais acentuado quando comparado à albumina.

Dessa forma, com o objetivo de calcular o percentual de pureza observando o perfil cromatográfico do lote A, apresentado na figura 25, pode-se verificar que o tempo retenção foi de 32,565, 32,983 e 33,027 minutos (Tabela 4) respectivamente para as injeções em triplicata (em preto). O tempo de retenção das amostras foi comparado ao tempo de retenção do controle (em roxo) que foi de 32,439 minutos (valor encontrado para a média em triplicata). O ensaio com branco, fase móvel A (em azul) foi demonstrado para verificar relação entre o que seria sinal cromatográfico e ruído da linha de base. Assim, com base nesta relação sinal/ ruído pode-se calcular que o percentual de pureza foi superior a 97% para os três lotes, conforme mostra na tabela 5.

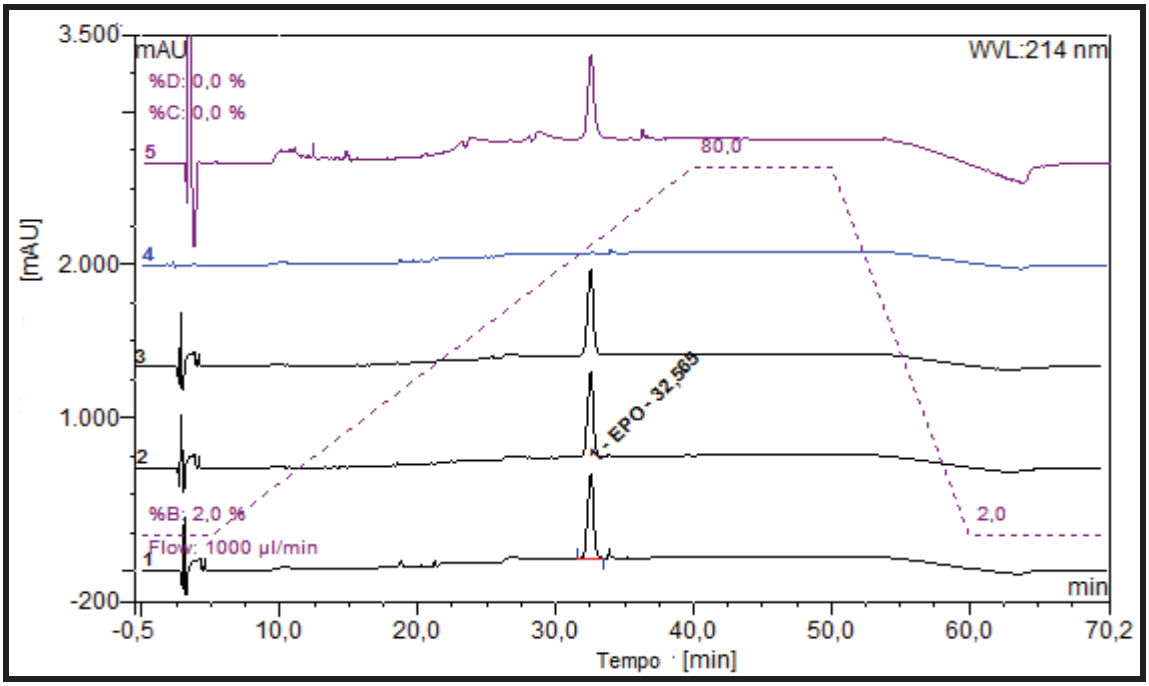

Figura 25: Perfil cromatográfico em fase reversa. **Em roxo:** Controle, e**m azul:** Fase móvel A (branco), **em preto:** lote A de IFA de EPO-hr em triplicata, **linha tracejada**: gradiente. **Condições:** Volume de Injeção: 100µL, Fase móvel A: 0,1% TFA; Fase móvel B: 0,1% TFA em ACN: 1-propanol (3:1); Coluna: C18 Ace; Fluxo: 1,0 mL/min; Comprimento de onda: 214nm.

De acordo com a figura 26 é possível observar o perfil cromatográfico para o lote B (em preto), branco (em azul) e controle (em roxo), o qual mostrou-se similar ao lote A com resolução satisfatória. O tempo de retenção encontrado para as injeções em triplicata foram 32,815, 37,792 e 32,710 minutos, respectivamente, conforme mostrado, também, na tabela 4.

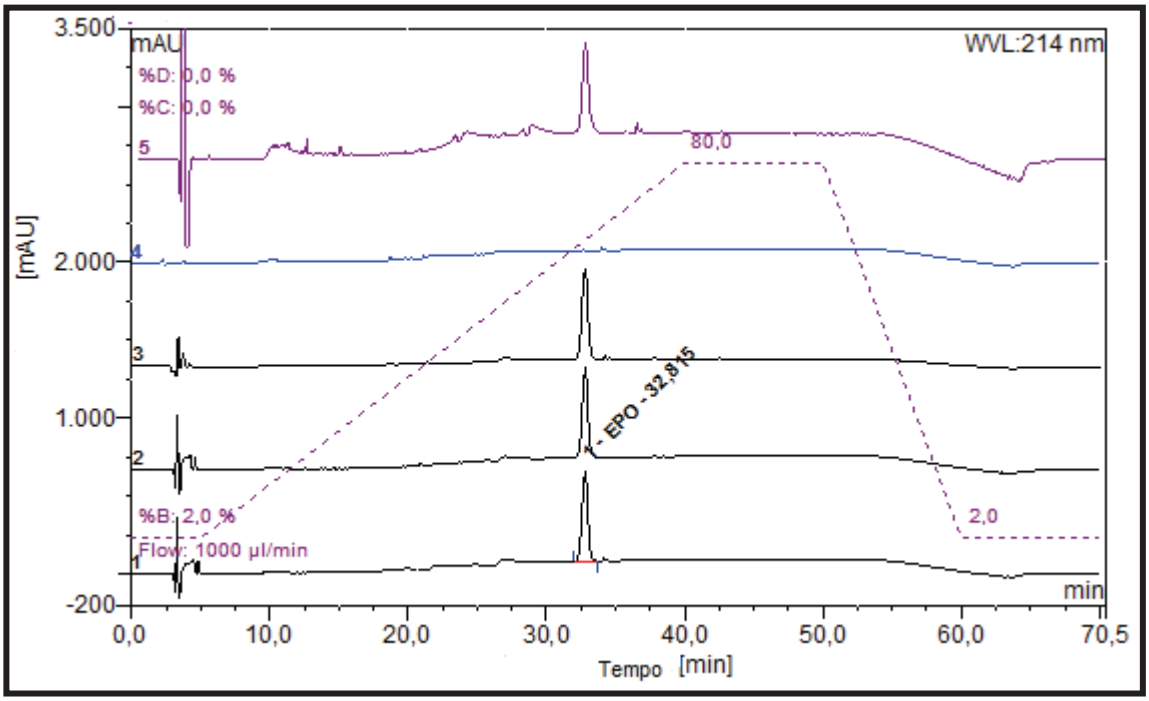

Figura 26: Perfil cromatográfico em fase reversa. **Em roxo:** Controle, **em rosa**: Fase móvel A (branco), **em preto:** lote B de IFA de EPO-hr em triplicata, **linha tracejada**: gradiente. **Condições:** Volume de Injeção: 100µL, Fase móvel A: 0,1% TFA; Fase móvel B: 0,1% TFA em ACN: 1-propanol (3:1); Coluna: C18 Ace; Fluxo: 1,0 mL/min; Comprimento de onda: 214nm.

O tempo de retenção para o lote C (Figura 27) foi de 32,998, 32,560 e 32,778 minutos para as injeções cromatográficas em triplicata (em preto). O perfil cromatográfico foi semelhante aos lotes A e B, com boa resolução para o pico de EPO-hr.

É possível observar, também, que, diferentemente das amostras, o perfil cromatográfico para o controle apresentou picos mais acentuados entre 10 e 30 minutos. Entretanto, o uso do controle neste ensaio tem por objetivo comparar o tempo de retenção entre amostras e controle exclusivamente.

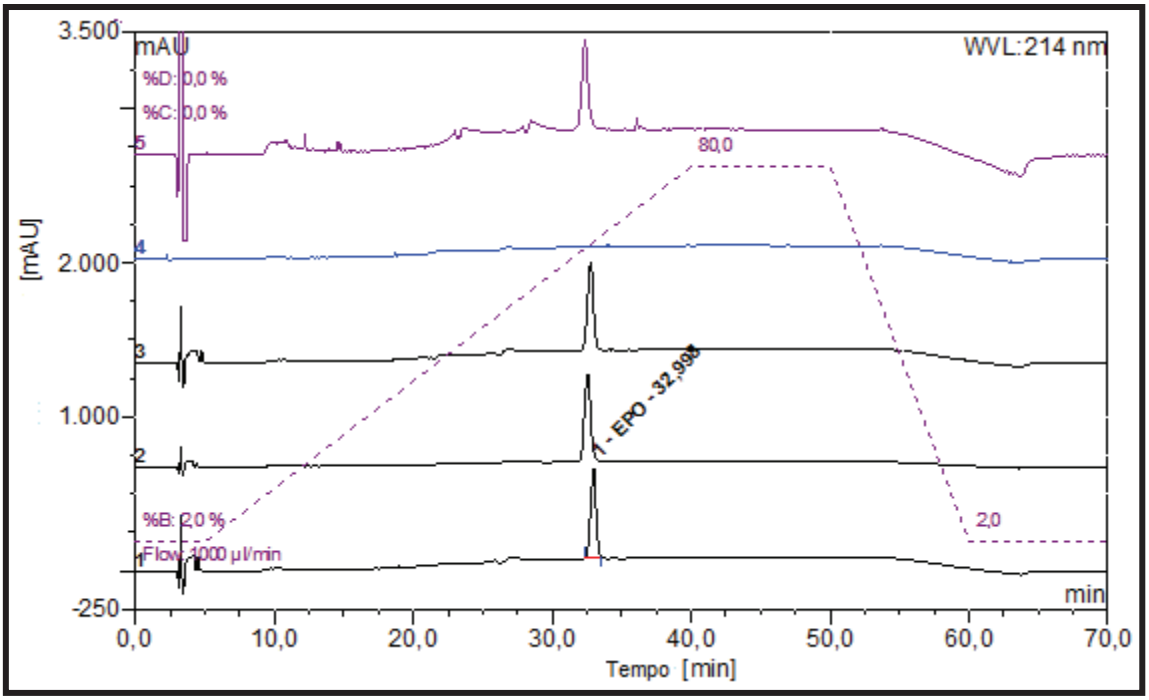

Figura 27: Perfil cromatográfico em fase reversa. **Em roxo:** Controle, **em rosa**: Fase móvel A (branco), **em preto:** lote C de IFA de EPO-hr em triplicata, **linha tracejada**: gradiente. **Condições:** Volume de Injeção: 100µL, Fase móvel A: 0,1% TFA; Fase móvel B: 0,1% TFA em ACN: 1-propanol (3:1); Coluna: C18 Ace; Fluxo: 1,0 mL/min; Comprimento de onda: 214nm.

De acordo com a tabela 4, pode-se observar que o desvio padrão relativo para os tempos de retenção da amostra (lotes A, B e C) e controle foram satisfatórios, já que apresentaram percentual DPR menor que 5%, valor este de acordo com a *International Conference on Harmonisation* - ICH (2005). Adicionalmente, não foi observado nenhum valor aberrante segundo o teste de Grubbs, onde o valor tabelado para triplicata não deve ser maior que 1,155 (ICH, 2005).

O lote B apresentou maior percentual de pureza (média = 98,56%). Os lotes A e C apresentaram percentuais de pureza semelhante (média= 97,11% e 97,96% respectivamente). Estes percentuais de pureza podem ser correlacionados com os resultados adquiridos para os ensaios de SDS-PAGE e 2D-PAGE, já que os lotes A e C apresentaram diversas bandas eletroforéticas não compatíveis a da EPO-hr , diferente do verificado para o lote B. Tanto para o lote A e C, picos cromatográficos foram detectados nos tempos de retenção 5, 10 e 34 minutos aproximadamente, além do pico correspondente a EPO-hr. Para o lote B foi detectado somente o pico relativo ao tempo de retenção de 5 minutos além do pico correspondente à EPO-hr.

Tabela 4: Resultados estatísticos relacionados ao tempo de retenção para os lotes A, B, C e controle encontrados para o ensaio de CLAE-FR.

	Lote A	Lote B	Lote C	Controle
Tempo de Retenção 1 (Tr) min.	32,565	32,815	32,998	32,402
Tempo de Retenção 2 (Tr) min.	32,983	32,792	32,560	32,417
Tempo de Retenção 3 (Tr) min.	33,027	32,710	32,775	32,498
Média (minutos)	32,858	32,772	32,778	32,439
Desvio padrão	0,255	0,055	0,219	0,052
Desvio Padrão Relativo DPR (%)	0,776	0,168	0,668	0,159
Grubbs 1	1,150	0,773	1,006	0,716
Grubbs 2	0,489	0,356	0,994	0,426
Grubbs 3	0,661	1,129	0,012	1,142

Tabela 5: Resultados estatísticos de percentual de pureza para os lotes A, B, C encontrados para o ensaio de CLAE-FR.

	Lote A	Lote B	Lote C
Pureza 1 (%)	97,21	98,27	97,21
Pureza 2 (%)	97,03	99,26	97,84
Pureza 3 (%)	97,09	98,15	98,82
Média (%)	97,11	98,56	97,96
Desvio padrão	0,09	0,61	0,81
Desvio Padrão Relativo (%)	0,09	0,62	0,83
Grubbs 1	1,091	0,476	0,920
Grubbs 2	0,873	1,149	0,144
Grubbs 3	0,218	0,673	1,064

5.1.5 Espectrometria de massas por *electrospray* para EPO-hr

Segundo Simone (2008), o sequenciamento proteico mediante a química degradativa de Edman (preconizado pela F.E.) é o método mais amplamente utilizado para este fim. Entretanto, muitas proteínas como a EPO-hr sofrem modificações químicas após o processo de tradução e estas modificações não podem ser determinadas pela química de Edman, pois, na maioria das vezes, esta

técnica pode bloquear o grupamento N-terminal ou, ainda, os aminoácidos modificados podem retornar ao seu estado original. Sendo assim, a espectrometria de massas (EM) é o método mais adequado para este tipo de análise, sendo possível avaliar e determinar, também, a sequência de aminoácidos e as modificações pós-traducionais.

Para iniciar a análise de sequenciamento, foram obtidos os peptídeos virtuais pelo programa Biopharmalynx® a partir da hidrólise teórica da EPO-hr com a enzima tripsina. Os peptídeos teóricos estão descritos na tabela 6 da seguinte forma: Fragmento (codificação estabelecida pelo programa); Modificação (tipos de modificações pós-traducionais que podem estar envolvidas); Início e fim do peptídeo; Massa molar em Dalton; Sequência de aminoácidos. As cisteínas ligadas por pontes de dissulfeto, as asparaginas com sítio de N-glicosilação e a serina com sítio de O-glicosilação estão destacadas em vermelho, azul e verde respectivamente.

Tabela 6: Peptídeos obtidos pelo programa Biopharmalynx® a partir da hidrólise de EPO-hr com a enzima tripsina. Fragmento (codificação estabelecida pelo programa); Modificação (tipos de modificações pós-traducionais que podem estar envolvidas); Início e fim do peptídeo; Massa Molecular em Dalton e Sequência de aminoácidos. As cisteinas envolvidas nas pontes de dissulfeto, as asparaginas com sítio de N-glicosilação e a serina com sítio de O-glicosilação estão destacadas em vermelho, azul e verde respectivamente.

Fragmento	Modificação esperada	Início	Fim	Massa (Da)	Sequência
1:T1		1	4	439,2543	APPR
1:T2*	Carbamidometilação C(1)	5	10	762,3695	LICDSR
1:T3		11	14	515,3067	VLER
1:T4		15	20	735,4167	YLLEAK
1:T5*	Carbamidometilação C(2) N-glicosilação (1,2)	21	45	2802,2437	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK
1:T6		46	52	926,465	VNFYAWK
1:T7		53	53	174,1117	R
1:T8		54	76	2525,3311	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR
1:T9*	N-glicosilação (3)	77	97	2358,2332	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK
1:T10		98	103	601,3547	AVSGLR
1:T11		104	110	802,4912	SLTTLLR
1:T12		111	116	586,3438	ALGAQK
1:T13*	O-glicosilação	117	131	1464,7572	EAISPPDAASAAPLR
1:T14		132	139	923,4712	TITADTFR
1:T15		140	140	146,1055	K
1:T16		141	143	434,2641	LFR
1:T17		144	150	897,4708	VYSNFLR
1:T18		151	152	203,127	GK
1:T19		153	154	259,1896	LK
1:T20*	Carbamidometilação C(1)	155	162	968,4386	LYTGEACR
1:T21		163	166	447,2078	TGDR

5.1.5.1 Espectro m/z total para o controle e amostras (lotes A, B e C)

a) Espectro m/z para o controle

O espectro m/z para o controle foi obtido em modo positivo (Figura 28) e os fragmentos identificados encontram-se na tabela 7.

De acordo com a Figura 31 é possível observar uma distribuição no início do espectro característica de contaminação por polietileno glicol (PEG) devido à diferença de relação massa/carga correspondente a 44 ($C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$) entre os

sinais. Esta mesma distribuição é evidenciada nas amostras (lotes A, B e C), mesmo após a utilização de dispositivos de filtração centrífuga (Amicon®) utilizados com intuito de eliminar possíveis interferentes. Esta contaminação pode ser atribuída ao armazenamento do controle e das amostras em tubos de plástico. Entretanto, outros sinais com relação massa/carga entre 2000 e 11000 foram encontrados e correlacionados com a EPO-hr.

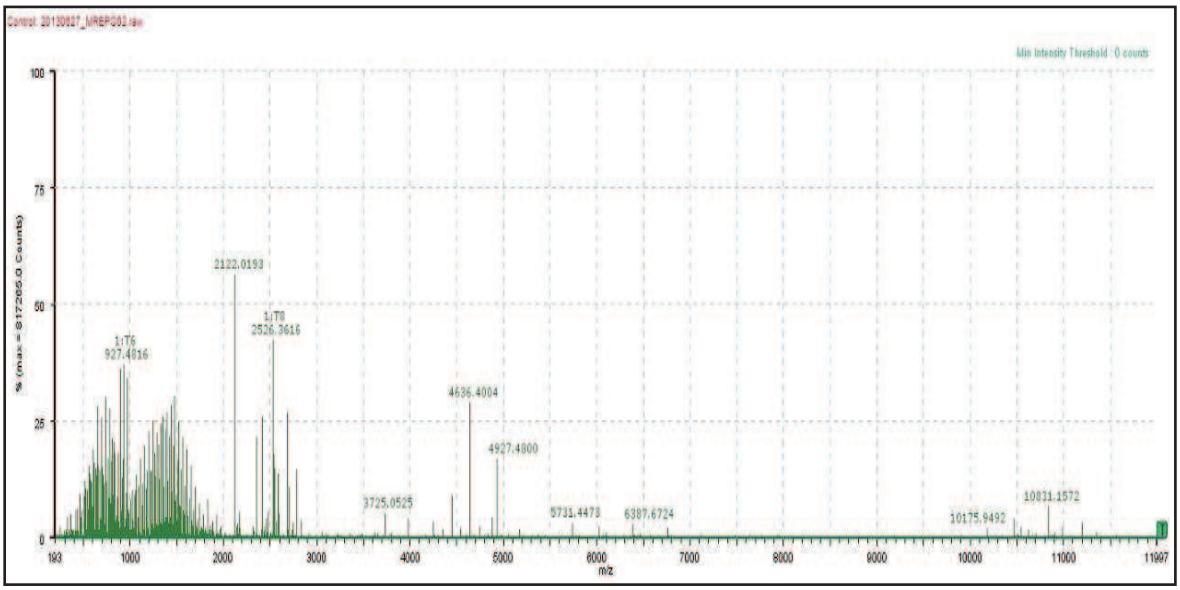

Figura 28: Espectro m/z referente ao controle de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

A tabela 7 descreve os fragmentos correlacionados a EPO-hr a partir dos sinais extraídos do espectro m/z referente ao controle. Cada sinal foi avaliado separadamente mediante a interpretação dos espectros de fragmentação para confirmação dos peptídeos (item 5.1.5.2). A confirmação do peptídeo depende das séries (y ou a) que foram evidenciadas. Quanto maior for a lista b/y maior será o indicativo de presença do fragmento. Pode-se observar também que as massas em Da foram calculdas para cada fragmentos a partir da relação m/z e seu estado de carga. A exatidão da massa (Erro) foi calculada mediante a expressão abaixo. Quanto mais distribuído estiver o sinal, maior será o erro.

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(\text{massa medida} - \text{massa teórica}) * 10^6}{\text{massa teórica}}$$

Tabela 7: Fragmentos encontrados para o controle de EPO-hr por espectrometria de massas ESI- QTOF.

Número do fragmento	Modificação esperada	Massa do peptídeo calculado (Da)	Tr (min)	m/z	Estado carga	Massa (Da)	Intensidade (Counts)	% b/y	Lista b/y	Erro Massa (ppm)
1:T2	Carbamidometilação C(1)	762.3694	1.3	763.3786	1	762.3707	2427.0	20.0	y2,y4, y5	1.7
1: T3		515.3068	0.7	516.3165	1	515.3086	12674.0	-	y4	3.5
1:T4		735.4167	2.0	736.4340	1	735.4261	146445.0	90.0	b2 – b5; y1 – y6	12.8
1:T5	N-glicosilação (1,2) Carbamidometilação C(2)	5730.2847	3.3	1911.1521	3	5730.4326	21852.0	-	y25	25.8
1:T6		926.4650	2.7	464.2403	2	926.4647	3591.0	94.0	y1-y7	-0.3
1:T8		2525.3311	5.8	1263.6846	2	2525.3533	403099.0	72.7	b5 – b22; y1 – y21;y23	8.8
1:T9	N-glicosilação (3)	4533.0317	2.2	1512.0325	3	4533.0737	1051.0	-	y21	9.3
1:T10		601.3547	1.0	602.3701	1	601.3622	69975.0	50.0	b2-b5; y1	12.5
1:T11		802.4913	2.7	803.5078	1	802.4998	134345.0	50.0	b2; y1-y7	10.6
1:T12		586.3439	0.7	587.3572	1	586.3493	44856.0	70.0	b3-b4; y1 – y6	9.2
1:T13	O-glicosilação	1667.8367	2.2	834.9280	2	1667.8401	35984.0	64.3	b3 – b5; b9; b12; y4– y8	2
1:T14		923,4713	2.0	924.4837	1	923.4758	75259.0	35.7	y8,y7, y5-y2	7.1
1:T16		434.2641	1.2	435.2730	1	434.2651	5683.0	25	y1;y3	2.3
1:T17		897.4708	2.4	898.4874	1	897.4795	180699.0	58.3	b2; y1-y6	9.7
1:T20	Carbamidometilação C(1)	968.4386	1.2	969.4550	1	968.4471	273022.00	78.6	b2-b5; b7* y2-y5;y7*	8.8

De acordo com o espectro m/z obtido para o controle (Figura 28) e a tabela 7, os fragmentos 1:T1, 1:T7, 1:T15, 1:T18, 1:T19 e 1:T21 correspondentes aos peptídeos ou aminoácido APPR, R, K, GK, LK e TGDR, respectivamente, não foram identificados no controle. A justificativa para não identificação do fragmento 1:T1 deve-se à presença de duas prolinas neste peptídeo. A prolina por causa da sua estrutura cíclica não fragmenta facilmente, necessitando aplicação de maior energia de colisão. A não identificação dos fragmentos 1:T7, 1:T15, 1:T18, 1:T19 e 1:T21 deve-se ao tamanho do peptídeo ser relativamente pequeno, sendo difícil sua identificação. Para avaliação destes fragmentos é necessário o uso de enzimas que possuam outros sítios de clivagem diferente da tripsina. Os fragmentos 1:T3, 1:T5 e 1:T9 não puderam ser confirmados, já que somente o íon precursor foi correlacionado aos sinais encontrados no espectro total de massas.

Observando detalhadamente a tabela 7, é possível identificar que as modificações pós-traducionais (carbamidometilação, oxidação de metionina, O-glicosilação) foram confirmadas mediante a interpretação dos espectros de fragmentação MS^E (item 5.1.5.2) com percentual b/y entre 16.7% e 94.0%. Este percentual esta relacionado à presença da série b e y. Apesar da presença do peptídeo intacto protonado (y25) correspondente à massa total da N-glicosilação nas asparaginas 23, 38 (5730,24326 Da), não é possível inferir qualquer informação a mais sobre esta modificação, já que não foi identificado o restante da série y. O mesmo acontece para a N-glicosilação na asparagina 83, onde somente foi identificado o y21 correspondente a 4533.0737 Da. A presença da N-glicosilação é apenas um indicativo, pois peptídeos com massa maior que 2500 Da, raramente sofrem fragmentação, pois a energia vibracional induzida por colisão é distribuída através de um maior número de ligações. Para confirmação do fragmento 1:T3 deverá ser repetido este experimento, já que somente o íon precursor foi identificado. Os tempos de retenção (Tr) dos fragmentos variaram entre 0.7 e 5.8 minutos. A relação massa/carga (m/z) foi extraída do espectro e foram correlacionadas com os estados de carga para obtenção das massas experimentais em Dalton de cada fragmento.

b) Espectro m/z para a amostra (lote A)

O espectro m/z referente ao lote A é demonstrado na figura 29, podendo ser observada a mesma distribuição referente à contaminação com PEG na região de baixa relação massa/carga.

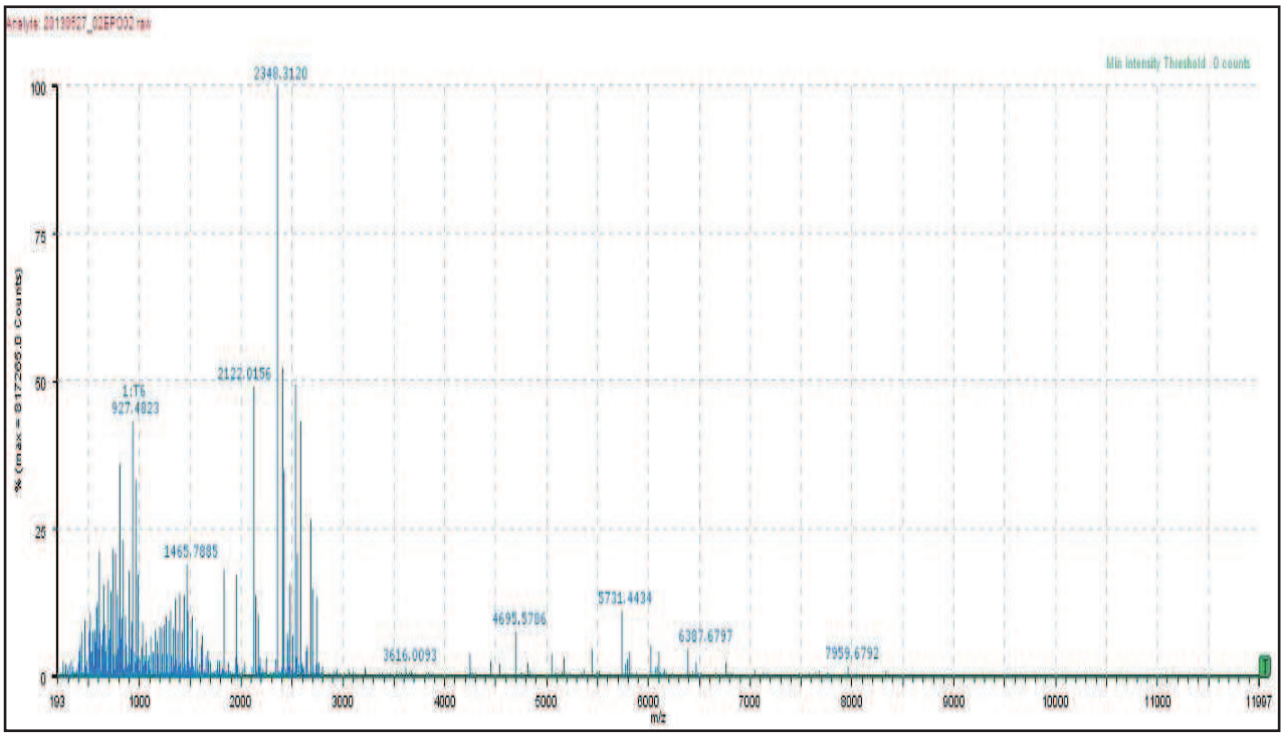

Figura 29: Espectro total de massas referente ao lote A de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Cada sinal identificado no espectro (Figura 29) referente à amostra de EPO-hr, lote A, foi destacado na tabela 8 para melhor interpretação dos resultados. De acordo com o espectro m/z obtido para a amostra correspondente ao lote A e a tabela 8, os fragmentos 1:T1, 1:T7, 1T:10, 1:T15, 1:T18, 1:T19 e 1:T21 correspondente aos peptídeos ou aminoácido APPR, R, AVSGLR, K, GK, LK e TGDR respectivamente não foram observados na amostra. Conforme explicado para o controle a justificativa para não identificação do fragmento 1:T1 deve-se a estrutura cíclica da prolina presente neste peptídeo. A não identificação dos fragmentos 1:T7, 1:T15, 1:T18, 1:T19 e 1:T21 deve ser decorrente do tamanho do peptídeo ser relativamente pequeno, sendo difícil sua identificação. Torna-se necessário o uso de enzimas que possuam outros sítios de clivagem diferente da tripsina. Os fragmentos 1:T3, 1:T4, 1:T5 e 1:T9 não puderam ser confirmados, já que somente o íon precursor foi correlacionado aos sinais encontrados no espectro total de massas.

Tabela 8: Fragmentos encontrados no lote A por espectrometria de massas por ESI- QTOF.

Número do fragmento	Modificação esperada	Massa do peptídeo calculado (Da)	Tr (min)	m/z	Estado carga	Massa (Da)	Intensidade (Counts)	% b/y	Lista b/y	Erro Massa (ppm)
1:T2	Carbamidometilação C(1)	762.3694	1.3	763.3786	1	762.3707	2427.0	20.0	y4, y5, y6	1.7
1:T3		515.3068	0.7	516.3177	1	515.3108	29379.0	-	y4	7.8
1:T4		735.4167	3.3	736.4341	1	735.4262	7200.0	-	y6	12.9
1:T5	N-glicosilação (1,2) Carbamidometilação C(2)	5730.2847	3.3	1911.1558	3	5730.4434	65351.0	-	y25	27.7
1:T6		926.4650	2.7	464.2413	2	926.4667	3476.0	90	y1-y6	1.8
1:T8		2525.3311	5.8	1263.6846	2	2525.3533	403099.0	72.7	b5 – b22; y2 – y21	8.8
1:T9	N-glicosilação (3)	4533.0317	2.2	1512.0315	3	4533.0708	9564.0	-	y21	8.6
1:T11		802.4913	2.6	803.5072	1	802.4993	13036.0	58.3	b2, b3, b5; y1-y6;y7	10.6
1:T12		586.3439	2.8	587.3502	1	586.3423	1249.0	10	b2-b5; y1-y6	-2.7
1:T13	O-glicosilação	1667.8367	2.3	834.9323	2	1667.8486	17440.0	7.1	y10; y11;y15	-0.2
1:T14		923,4713	2.0	924.4837	1	923.4758	75259.0	35.7	y8, y7; y5-y2	7.1
1:T16		434.2641	1.2	435.2760	1	434.2681	26820.0	75	b2; y1-y3	9.2
1:T17		897.4708	2.4	898.4866	1	897.4787	129332.0	50.0	b2; y1-y6	8.8
1:T20	Carbamidometilação C(1)	968.4386	1.2	969.4550	1	968.4471	273022.00	78.6	b2- b5; b7* y2- y7	8.8

c) Espectro m/z para a amostra (lote B)

O espectro de massas total referente ao lote B é demonstrado na figura 30 e os fragmentos relacionados à EPO-hr foram identificados na tabela 9.

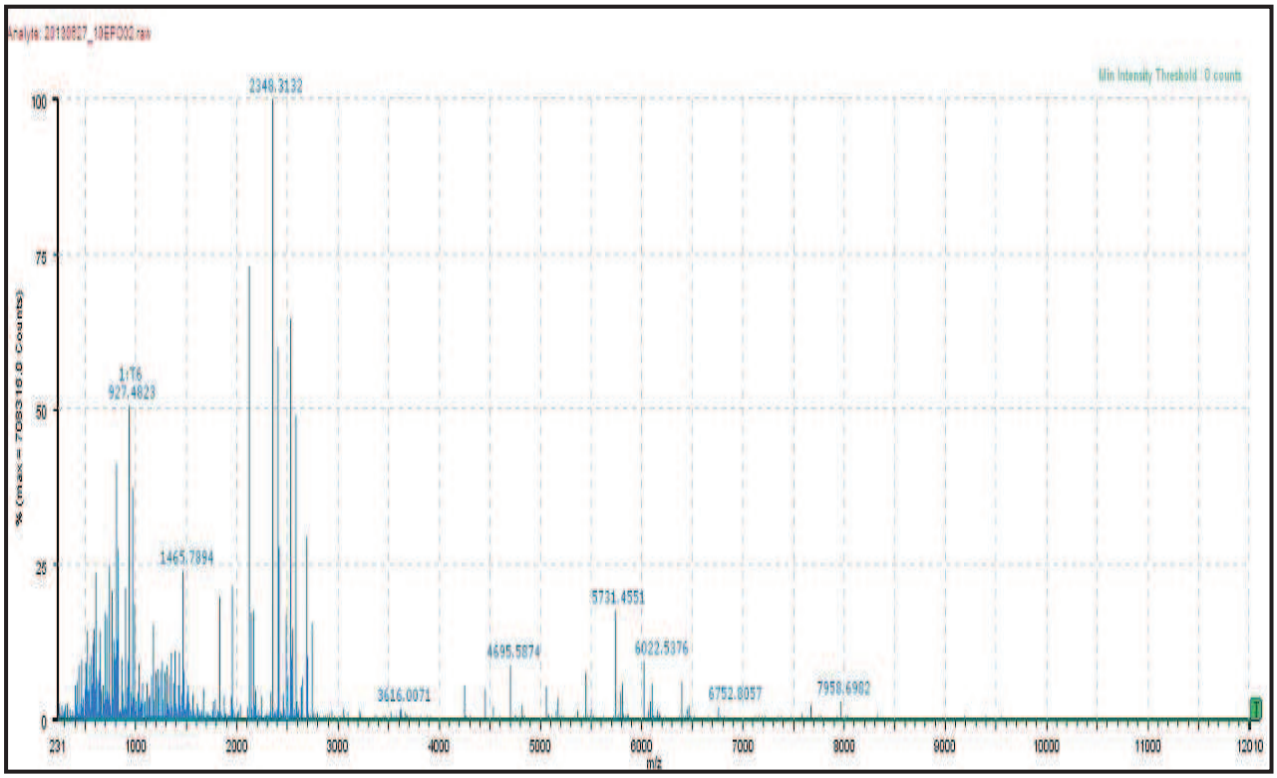

Figura 30: Espectro total de massas referente ao lote B de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Similar ao lote A e controle, também pode ser observada a distribuição no espectro referente a PEG. Os fragmentos 1:T1, 1:T7, 1T:10, 1:T15, 1:T18, 1:T19 e 1:T21 correspondentes aos peptídeos ou aminoácidos APPR, R, AVSGLR, K, GK, LK e TGDR, respectivamente, não foram identificados na amostra (lote B). Os fragmentos 1:T6 e 1:T13 foram confirmados com percentuais b/y maiores que os encontrados no lote A conforme tabela 9. Os fragmentos 1:T3, 1:T4, 1:T5 e 1:T9 não puderam ser confirmados, já que somente o íon precursor foi correlacionado aos sinais encontrados no espectro total de massas conforme visto no lote A.

Tabela 9: Fragmentos encontrados no lote B para espectrometria de massas por ESI- QTOF.

Número do fragmento	Modificação esperada	Massa do peptídeo calculado (Da)	Tr (min)	m/z	Estado carga	Massa (Da)	Intensidade (Counts)	% b/y	Lista b/y	Erro Massa (ppm)
1:T2	Carbamidometilação C(1)	762.3694	1.3	763.3792	1	762.3712	1099.0	20.0	y4; y5	2.4
1:T3		515.3068	0.7	516.3200	1	515.3121	34862.0	-	y4	10.3
1:T4		735.4167	3.1	736.4340	1	735.4261	22191.0	-	y6	12.8
1:T5	N-glicosilação (1,2) Carbamidometilação C(2)	5730.2847	3.3	1911.1521	3	5730.4326	21852.0	-	y25	25.8
1:T6		926.4650	2.7	464.2403	2	926.4647	3591.0	16.7	y5;y6;y7	-0.3
1:T8		2525.3311	5.6	1271.6785	2	2541.3411	103834.0	34.1	b8-b14; b17; b18; b21	6.0
1:T9	N-glicosilação (3)	4533.0317	2.2	1512.0333	3	4533.0762	8924.0	-	y21	9.8
1:T11		802.4913	2.6	803.5081	1	802.5002	139622.0	50	b2; y1-y5;y7	11.1
1:T12		586.3439	0.7	587.3597	1	586.3518	77733.0	90	b2-b5;y2-y6	13.5
1:T13	O-glicosilação	1667.8367	2.2	834.9280	2	1667.8401	35984.0	64.3	b3 – b5; b9; b12; y4 – y8;y11,y12,y14	2
1:T14		923.4713	2.0	924.4854	1	923.4775	76065.0	50.0	y1 – y6	6.7
1:T16		434.2641	1.2	435.2773	1	434.2694	29027.0	75	b2;y1-y3	0.9
1:T17		897.4708	2.4	898.4878	1	897.4799	131141.0	58.3	b2;y1-y6	10.1
1:T20	Carbamidometilação C(1)	968.4386	1.2	969.4553	1	968.4474	264720.0	71.4	b3 – b7; y2 – y5; y7	9.1

c) Espectro m/z para a amostra (lote C)

O espectro de massas total referente ao lote C é demonstrado na figura 31 e os fragmentos relacionados à EPO-hr foram identificados na tabela 10.

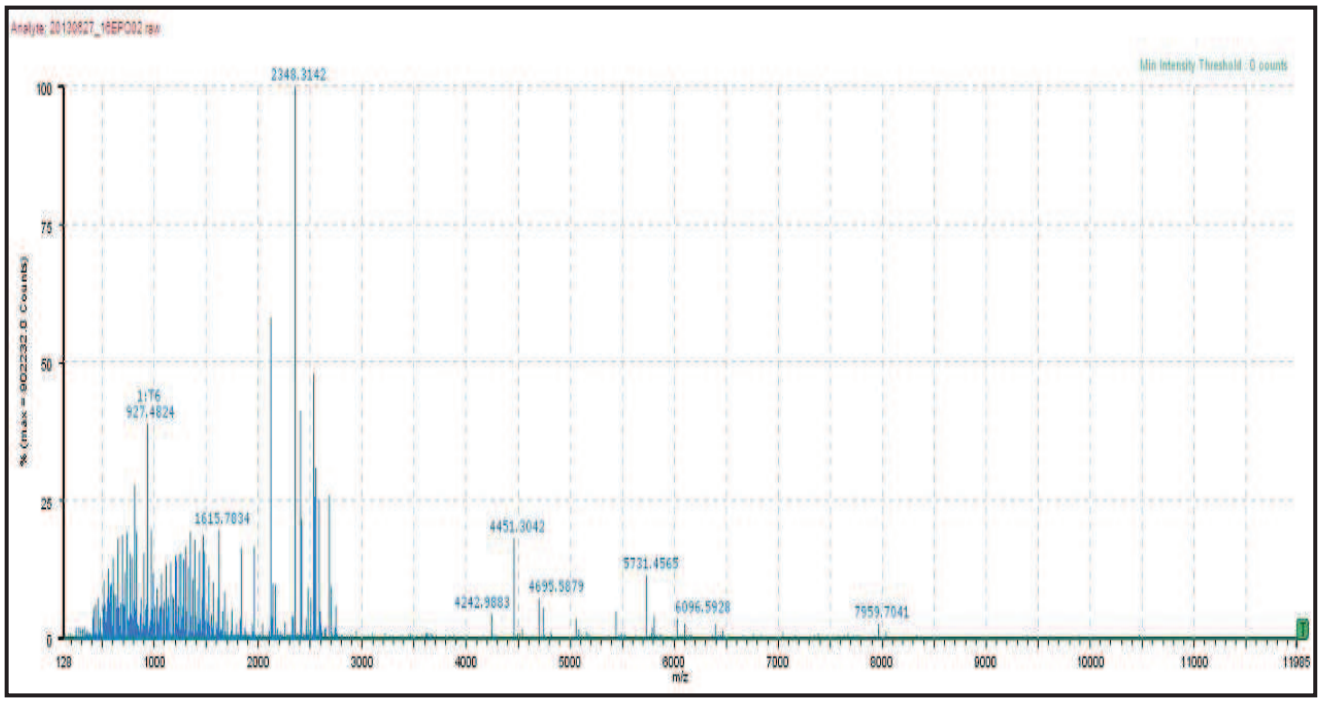

Figura 31: Espectro total de massas referente ao lote C de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Similar ao lote A, B e controle, também pode ser observada a distribuição no espectro referente a PEG. Os fragmentos 1:T1, 1:T7, 1:T15, 1:T18, 1:T19, 1:T20 e 1:T21 correspondentes aos peptídeos ou aminoácidos APPR, R, K, GK, LK, LYTGEACR e TGDR, respectivamente, não foram observados na amostra (lote C). Diferentemente dos lotes A e B, o fragmento 1:T10 correspondente ao peptídeo AVSGLR foi identificado com 70% de probabilidade. O fragmento 1:T6 foi confirmado com percentual igual a 91,7 de b/y maior que o encontrado no lote B. Não há indicio do fragmento 1:T5, pois não foi encontrado nem o íon precursor no espectro de fragmentação relativo a esta amostra, somente o sinal m/z compatível co o teórico.

Tabela 10: Fragmentos encontrados no lote C para espectrometria de massas por ESI- QTOF.

Número do fragmento	Modificação esperada	Massa do peptídeo calculado (Da)	Tr (min)	m/z	Estado carga	Massa (Da)	Intensidade (Counts)	% b/y	Lista b/y	Erro (ppm)
1:T3		515.3068	0.7	516.3108	1	515.3108	29379.0	-	y4	7.8
1:T4		735.4167	3.3	736.4341	1	735.4262	7200.0	-	y6	12.9
1:T5	N-glicosilação (1,2) Carbamidometilação C(2)	5730.2847	3.3	1911.1558	3	5730.4434	65351.0	-	y25	27.7
1:T6		926.4650	2.9	927.4825	1	926.4746	188373.0	91.7	b2-b6;y1-y6	10.4
1:T8		2525.3311	5.8	1263.6863	2	2525.3567	218724.0	63.6	b2-b17; y1-y13	10.1
1:T9	N-glicosilação (3)	4533.0317	2.2	1512.0315	3	4533.0708	9564.0	-	y21	8.6
1:T10		601.3547	1.0	602.3715	1	601.3636	70858.0	70.0	b2-b5;y1,y3,y4	14.8
1:T11		802.4913	2.6	803.5072	1	802.4993	138036.0	66.7	b2,b3,b5;y1-y5	10
1:T12		586.3439	0.7	587.3596	1	586.3517	70494.0	90.0	b2-b5;y1-y5	13.3
1:T13	O-glicosilação	1464.7572	2.3	733.3997	2	1464.7834	96454.0	50.0	b2-b5,b9,b11,b12; y3,y7-y12	17.9
1:T14		923.4713	2.0	924.4841	1	923.4762	65044.0	50.0	b2;y1-y6	5.3
1:T16		434.2641	1.2	435.2760	1	434.2681	26820.0	75.0	b2;y1,y2,y3	9.2
1:T17		897.4708	2.4	898.4866	1	897.4787	129332.0	50.0	b2;y1-y5	8.8

5.1.5.2 Sequenciamento peptídico mediante interpretação dos espectros de fragmentação MS^E

Com o objetivo de gerar dados sobre a sequência primária, foram analisados os espectros de fragmentação MS^E (todos os íons são selecionados e enviados para a câmara de colisão e analisados). Este espectro de massas gera fragmentos que são identificados em a, b e c quando a carga positiva é mantida pelo fragmento do lado N-terminal e são bastante instáveis e x, y e z quando a carga positiva é mantida pelo fragmento do lado do C-terminal. A diferença de massa entre íons consecutivos dentro de uma série permite identificar e determinar os aminoácidos consecutivos e desta forma deduzir a sequencia peptídica com exceção dos isômeros leucina e isoleucina e dos isóbaros glutamina e lisina. É normal encontrar em um espectro de massas MS^E séries incompletas de íons devido à complexidade da amostra.

Com base na diferença de massa/carga entre os íons da série y é possível determinar os peptídeos das amostras e controle de acordo com as massas monoisotópicas dos aminoácidos, descritas na tabela 11.

A confirmação da presença de alguns aminoácidos pode ser esclarecida mediante a perda neutra de amônia (NH_3) quando os íons fragmento (y e b) apresentarem os resíduos de aminoácidos R, K, Q e N (arginina, lisina, glutamina e asparagina respectivamente) e perda de água (H_2O) quando os íons fragmento (y e b) apresentarem os resíduos de aminoácidos S, T e E (serina, treonina e glutamato respectivamente). No caso do glutamato, tal fato será mais notório caso esse aminoácido esteja na posição do N-terminal do fragmento.

Tabela 11: Massas monoisotópicas de aminoácidos e seus respectivos códigos em 1 letra.

Aminoácido	Código (1 letra)	Massa monoisotópica
Glicina	G	57,02147
Alanina	A	71,03712
Serina	S	87,03203
Prolina	P	97,05277
Valina	V	99,06842
Treonina	T	101,04768
Cisteina	C	103,00919
Isoleucina	I	113,08407
Leucina	L	113,08407
Asparagina	N	114,04293
Aspartato	D	115,02695
Glutamina	Q	128,05858
Lisina	K	128,09497
Glutamato	E	129,04260
Metionina	M	131,04049
Histidina	H	137,058891
Fenilalanina	F	147,06842
Arginina	R	156,10112
Tirosina	Y	163,06333
Triptofano	W	186,07932

5.1.5.2.1 Sequenciamento peptídico para o lote A

Foram preditos os fragmentos 1:T2, 1:T6, 1:T8, 1:T11, 1:T12, 1:T13, 1:T14, 1:T16, 1:T17 e 1:T20 baseados nos espectros de fragmentos MS^E.

De acordo com a figura 32, é possível observar os espectros de fragmentação MS^E (controle e lote A de IFA de EPO-hr) do fragmento 1:T2 referente ao peptídeo LICDSR. A série em vermelho representa os fragmentos y (evidentes: y5, y4 e y2 para o controle e y5, y4 para a amostra), o fragmento y6, destacado em verde,

corresponde ao íon precursor. O fragmento y2 foi identificado somente no controle conforme mostrado na tabela 12.

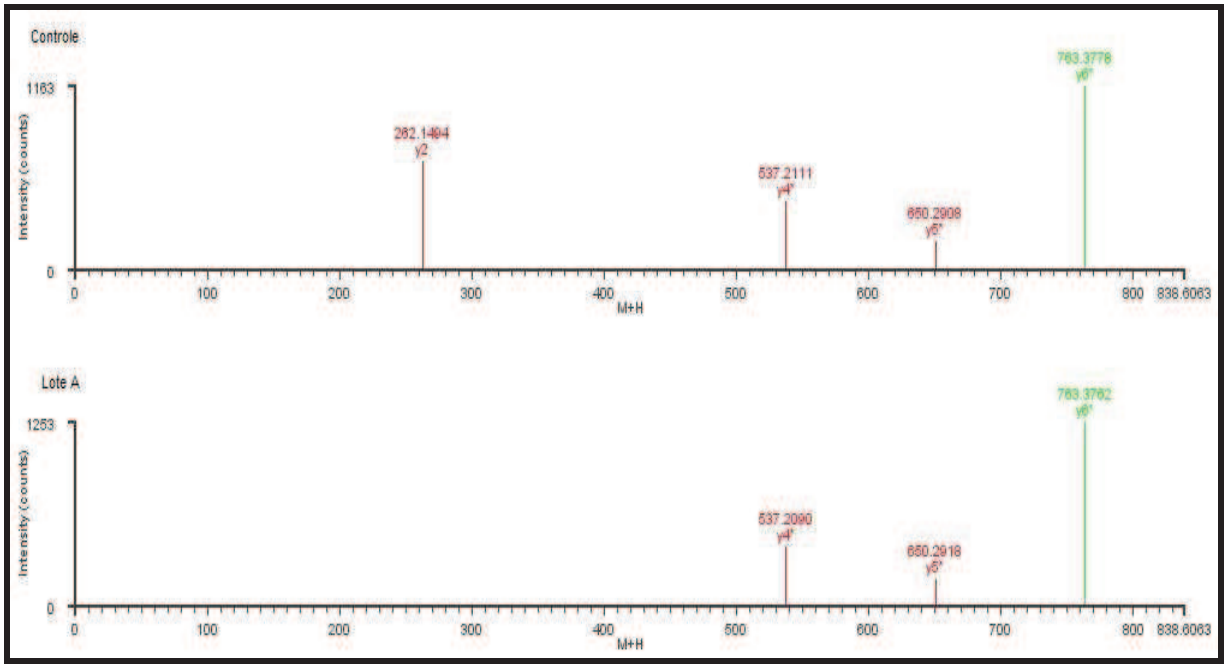

Figura 32: Espectro de massas MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T2, peptídeo: LICDSR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI-QTOF

Tabela 12: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T2, peptídeo LICDSR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H Controle
y6	LICDSR	763,3786	763,3778
y5	ICDSR	650,2918	650,2908
y4	CDSR	537,2090	537,2111
y3	DSR	-	-
y2	SR	-	262,1494
y1	R	-	-

Devido à redução e alquilação com o uso de ditiotreitol e iodocetamida respectivamente a modificação carbamidometilação (massa correspondente a 57,13

Da) é identificada na cisteína (C) após o cálculo da diferença entre a relação m/z 537,2090 e o peptídeo (CDRS =480,0692).

Na figura 33, é possível observar os espectros de fragmentação MS^E (controle e lote A de IFA de EPO-hr) do fragmento 1:T3 referente ao peptídeo VLER. No controle é possível observar, somente, o íon precursor (em vermelho) correspondente à massa de 516,3156 Da. Na amostra (lote A) é possível identificar também o íon precursor (em vermelho) com massa correspondente a 516,3177 Da e em verde seria o íon precursor com perda de NH_3 (-17Da) com massa correspondente a 499,2870 Da.

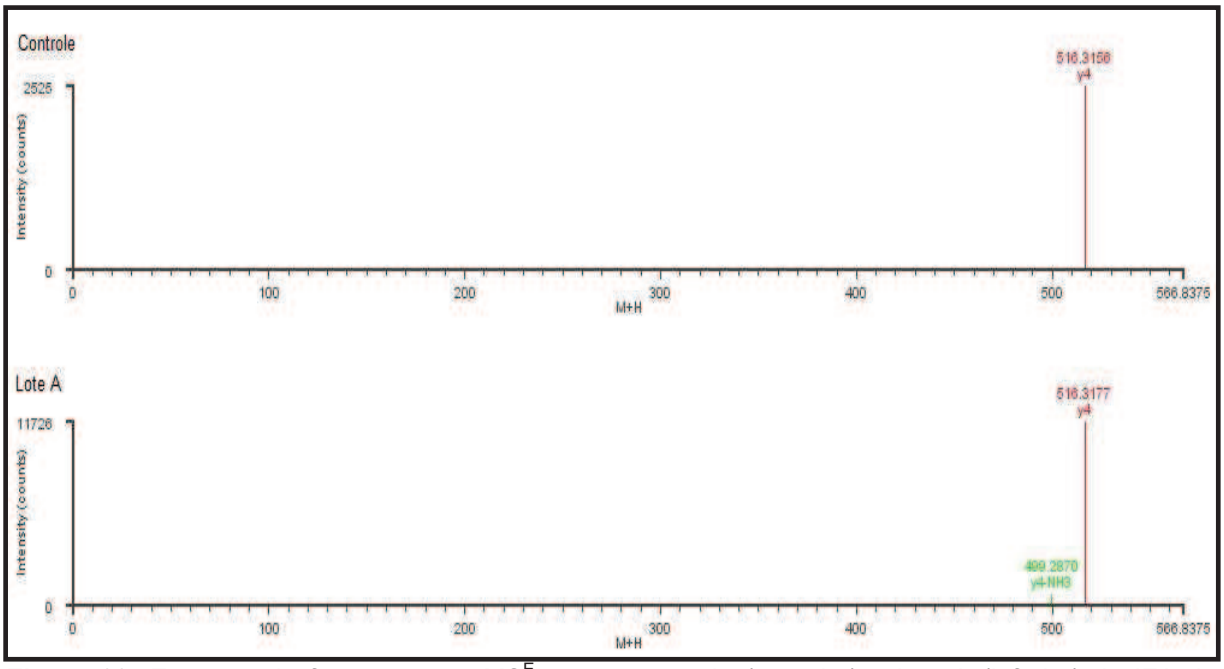

Figura 33: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T3, peptídeo: VLER. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

A presença do y4 (499,2870), em verde, no espectro de fragmentação 1:T3, na amostra, com perda neutra de NH_3 (-17) é devido à presença do resíduo de aminoácido de arginina no fragmento. Caso esta série (em verde) fosse identificada isoladamente sugere-se que o espectro obtido é um falso positivo. Como, na amostra, também foi identificado o y4 (516,3177) sem perda de NH_3 há indício da presença do peptídeo VLER, o que seria confirmado pela presença do restante da série (y3, y2, y1). O mesmo pode ser relacionado ao controle, onde foi detectado somente o íon protonado (y4=516,3156). A identificação somente do íon precursor y4 no controle e amostra pode ser justificada pela baixa energia de colisão utilizada,

devendo ser realizado experimentos com alta energia para verificar se outros fragmentos da série são identificados.

O fragmento 1:T4, peptídeo YLLEAK, demonstrado na figura 34, foi confirmado no controle devido à presença de todas as séries y. Esta confirmação também é mais evidente devido à presença do íon imônio de lisina (147,1102). Os íons imônios de aminoácidos podem ser classificados como fragmentos resultantes de clivagens múltiplas da cadeia peptídica, aparecendo na faixa de massas baixas no espectro. Apesar dos íons imônios serem raramente observados para todos os aminoácidos, quando ocorrem fornecem informações a respeito da composição de aminoácidos sem a necessidade de efetuar cálculos entre as séries encontradas conforme mostra a tabela 13. É possível, também, observar no controle a presença da série instável b (b4, b3 e b2). Na amostra, também foi identificado o y6 (736,4319) sem perda de NH_3, em verde, no espectro de fragmentação 1:T3, na amostra, com perda neutra de NH_3 (-17) devido à presença do resíduo de aminoácido de lisina no fragmento. Entretanto, a série completa não foi observado na amostra, não podendo inferir a presença do peptídeo em questão.

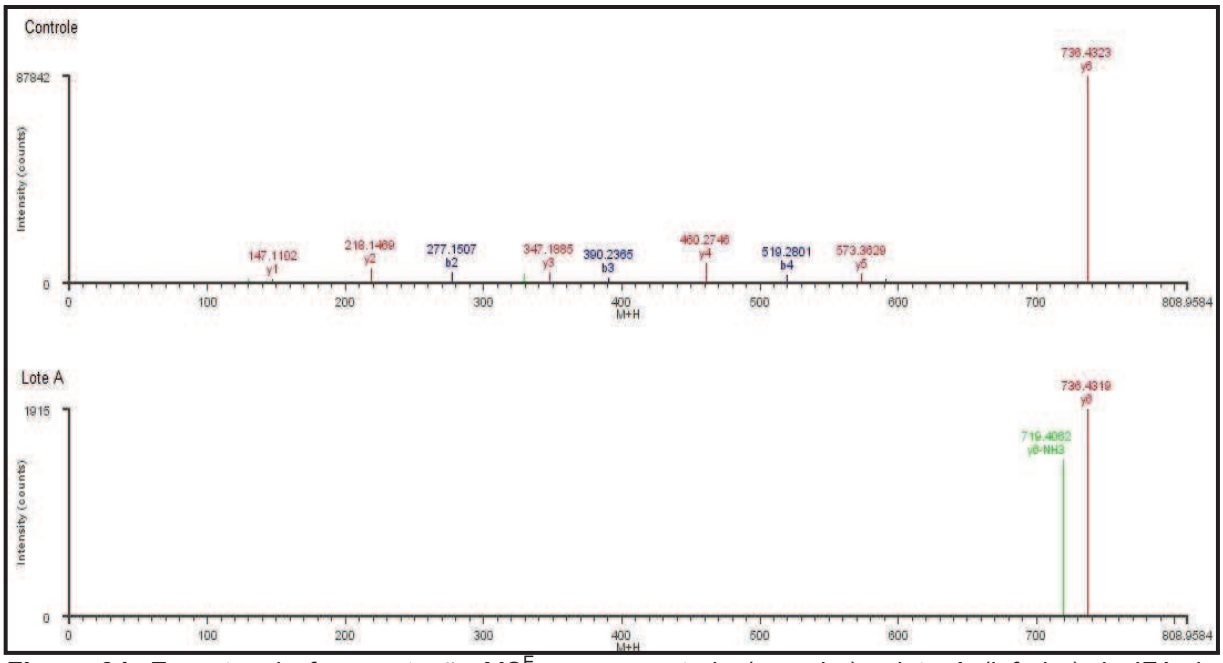

Figura 34: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T4, peptídeo: YLLEAK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 13: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T4, peptídeo YLLEAK identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H Controle
y6	YLLEAK	736,4319	736,4323
y5	LLEAK	-	573,3629
y4	LEAK	-	460,2746
y3	EAK	-	347,1885
y2	AK	-	218,1469
y1	K	-	147,1102

Há indício da presença do peptídeo EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK (1:T5), já que somente o íon precursor (y25) foi encontrado no espectro de fragmentação conforme mostrado na tabela 8. Entretanto, esta informação deve ser confirmada com experimentos utilizando outras enzimas que não a tripsina. Vale ressaltar que a massa encontrada no espectro correspondente a 5730,4434 Da equivale ao peptídeo mais a modificação pós-traducional envolvida.

De acordo com espectro de fragmentos obtido para 1:T6 correspondente ao peptídeo VNFYAWK (Figura 35), é possível verificar a presença da série completa (y6, y5, y4, y3, y2,y1) para amostra (lote A) e controle. Com base na relação m/z de cada série demonstrada na tabela 14 é possível correlacionar a diferença de cada série a um aminoácido da tabela 11 e assim predizer o peptídeo VNFYAWK.

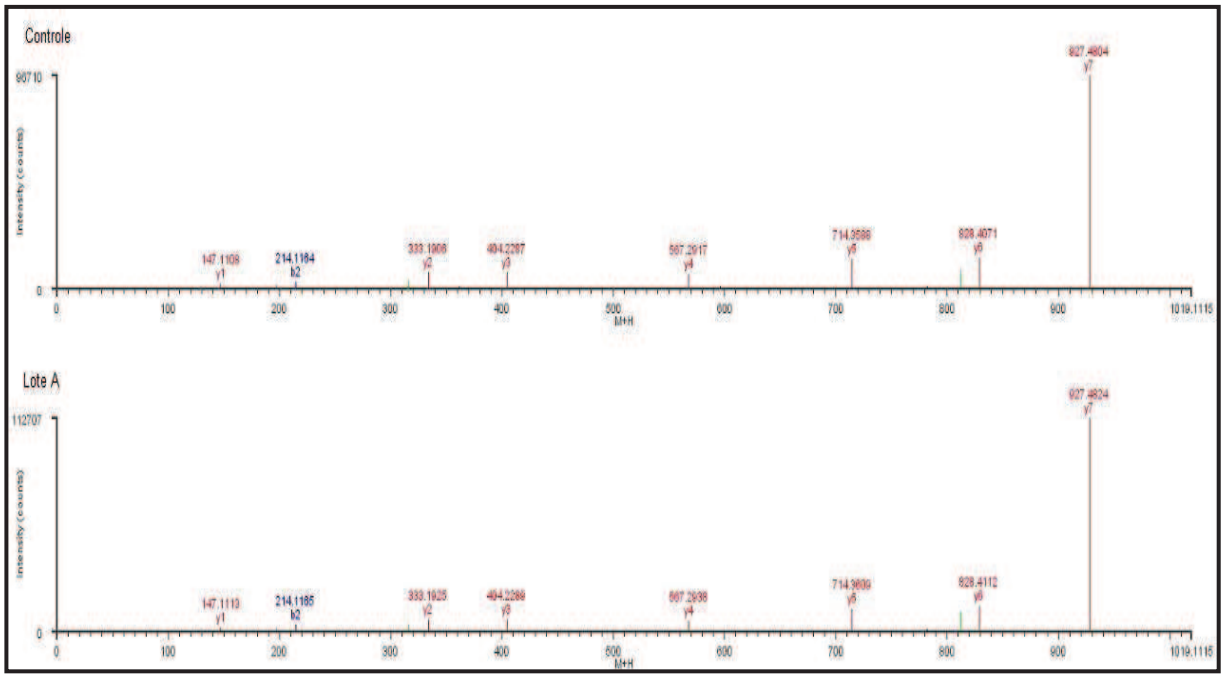

Figura 35: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T6, peptídeo: VNFYAWK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 14: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T6, peptídeo VNFYAWK identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H Controle
y7	VNFYAWK	927,4824	927,4804
y6	NFYAWK	828,4112	828,4071
y5	FYAWK	714,3609	714,3588
y4	YAWK	567,2938	567,2917
y3	AWK	404,2289	404,2287
y2	WK	333,1925	333,1906
y1	K	147,1113	147,1108

Na figura 36 é possível observar os espectros de fragmentos MS^E (controle e lote A de IFA de EPO-hr) do fragmento 1:T8 referente ao peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. A série em vermelho representa os fragmentos y e em azul os fragmentos b (b10, b9, b8 e b7), onde tanto a intensidade e

disposição dos fragmentos são similares para o controle e amostra. A série completa não esta disponível na figura 36 devido à necessidade do aumento da escala para visualização dos íons de menor intensidade. Entretanto, a relação m/z de toda a série esta disponível para efeito de cálculo na tabela 15 e, consequentemente, pode-se confirmar o peptídeo.

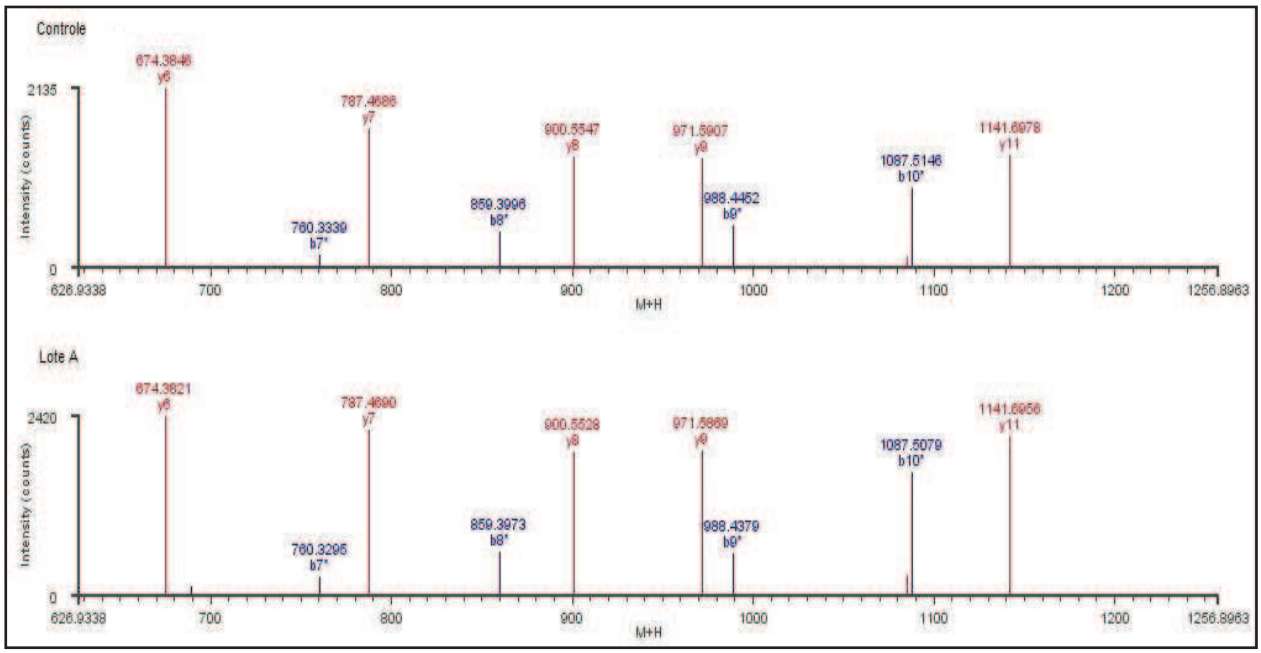

Figura 36: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T8, peptídeo: MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 15: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T8, peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H controle
y23	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	2526,3661
y22	EVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	-
y21	VGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	2266,2559	2266,2593
y20	GQQAVEVWQGLALLSEAVLR	2167,1875	2167,1909
y19	QQAVEVWQGLALLSEAVLR	2110,1660	2110,1694
y18	QAVEVWQGLALLSEAVLR	1982,1074	1982,1108
y17	AVEVWQGLALLSEAVLR	1854,0488	1854,0523
y16	VEVWQGLALLSEAVLR	1783,0117	1783,0151
y15	EVWQGLALLSEAVLR	1683,9334	1683,9467
y14	VWQGLALLSEAVLR	1554,9008	1554,9041
y13	WQGLALLSEAVLR	1455,8324	1455,8357
y12	QGLALLSEAVLR	1269,7531	1269,7563
y11	GLALLSEAVLR	1141,6956	1141,6978
y10	LALLSEAVLR	1084,6730	1084,6763
y9	ALLSEAVLR	971,5869	971,5907
y8	LLSEAVLR	900,5528	900,5547
y7	LSEAVLR	787,4690	787,4686
y6	SEAVLR	674,3821	674,3846
y5	EAVLR	587,3517	587,3524
y4	AVLR	458,3091	458,3099
y3	VLR	387,2720	387,2787
y2	LR	288,2033	288,2011
y1	R	-	175,1168

O peptídeo GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK, fragmento 1:T9, e o peptídeo AVSGLR, fragmento 1:T4, não puderam ser confirmados da mesma forma que os fragmentos 1:T3 e 1:T5, pois somente o íon precursor foi identificado e não a série completa, conforme mostrado na tabela 8.

De acordo com a figura 37, referente ao espectro de fragmentos para o peptídeo SLTTLLR (1:T11), é possível evidenciar a mesma série para o controle e amostra (lote A) com o íon imônio da arginina (175,1168 Da) presente na faixa mais baixa de ambos espectros. A série y7 com perda de água (-18) foi observada no espectro devido à presença dos resíduos de aminoácidos correspondente a serina e treonina no peptídeo.

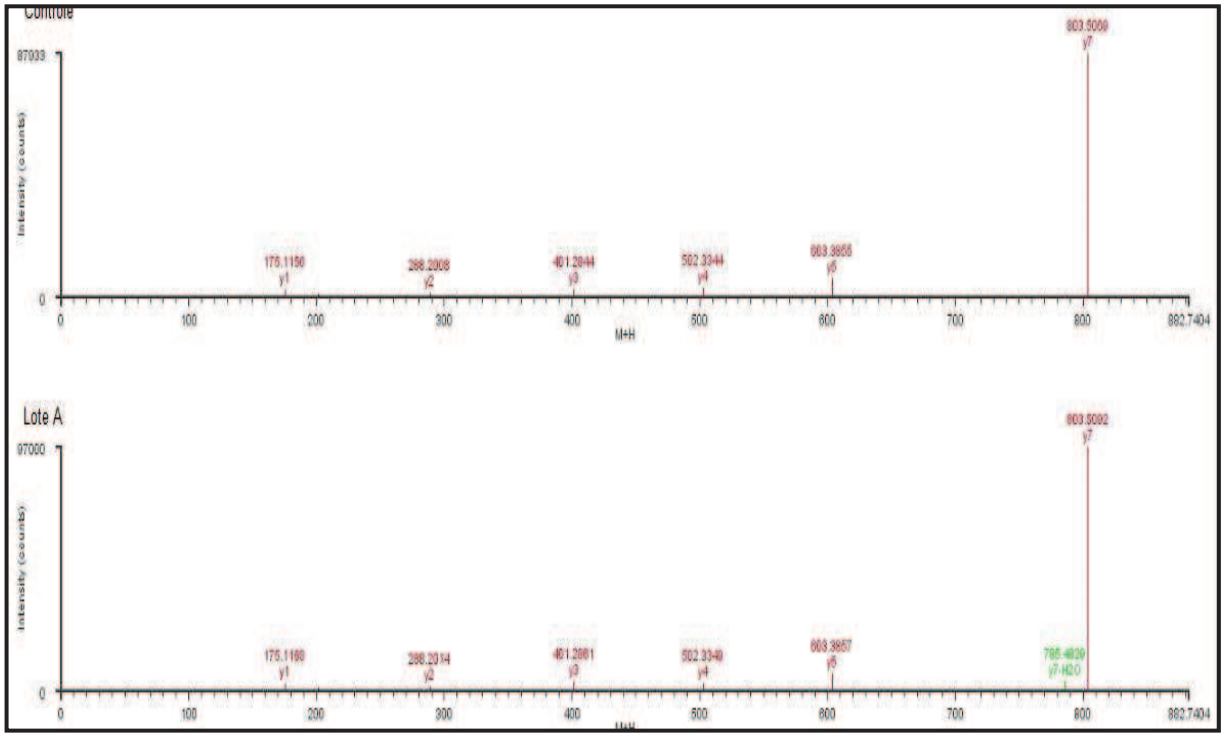

Figura 37: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T11, peptídeo: SLTTLLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As relações massa/carga de ambos espectros estão destacados na tabela 16, sendo possível confirmar a sequencia mediante a diferença das séries e comparadas às massas monoisotópicas da tabela 11.

Tabela 16: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T11, peptídeo SLTTLLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H controle
y7	SLTTLLR	803,5092	803,5069
y6	LTTLLR	-	-
y5	TTLLR	603,3857	603,3855
y4	TLLR	502,3349	502,3344
y3	LLR	401,2861	401,2844
y2	LR	288,2014	288,2008
y1	R	175,1168	175,1156

A série y detectada para o peptídeo ALGAQK (1:T12) está demonstrada na figura 38, onde é possível confirmar a presença da série completa (y1,y2, y3, y4, y5, y6) tanto para a amostra (lote A) quanto para o controle. É possível também verificar a presença do íon imônio de lisina correspondente à massa de 147,1105, não mostrada na figura 38 devido à alta intensidade do íon precursor. Foram observadas as séries y4 e y6 com perda de NH_3 (-17), em verde, devido à presença lisina e glutamina no fragmento.

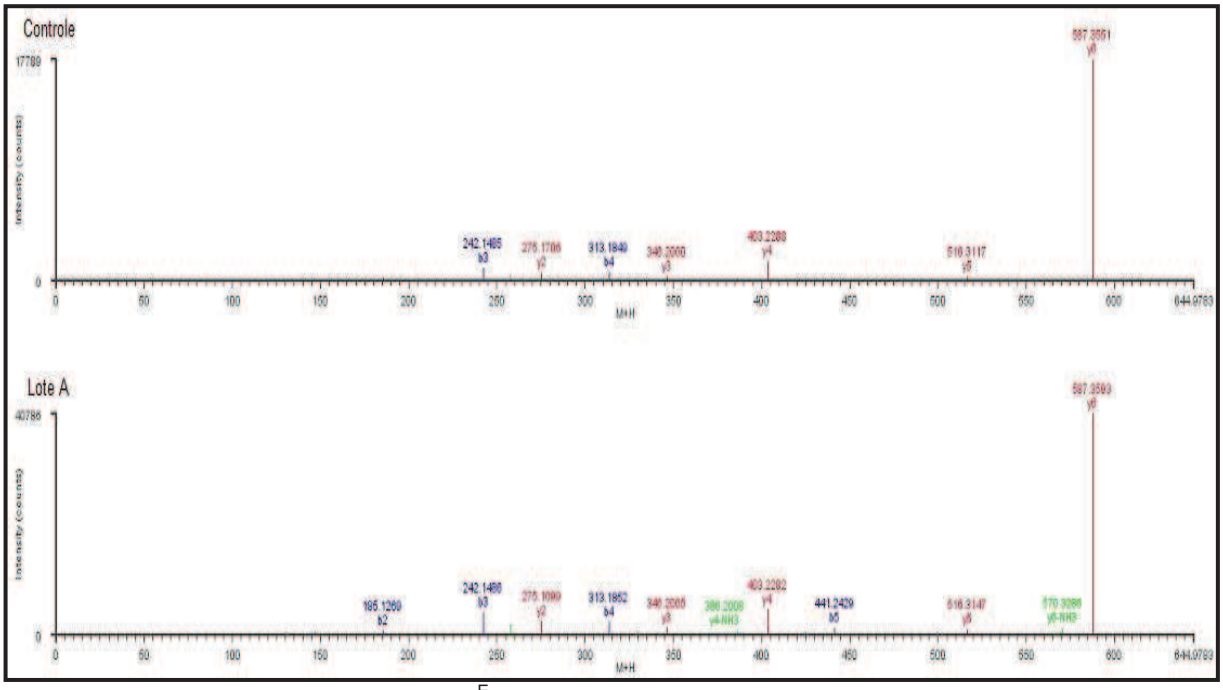

Figura 38: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T12, peptídeo: ALGAQK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF.

Na tabela 17 são destacadas as massas encontradas referente a cada série para amostra e controle, fragmento 1T:12.

Tabela 17: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T12, peptídeo ALGAQK identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H controle
y6	ALGAQK	587,3593	587,3517
y5	LGAQK	516,3147	516,3146
y4	GAQK	403,2282	403,2305
y3	AQK	346,2065	346,2090
y2	QK	275,1699	275,1719
y1	K	147,1105	147,1133

Na figura 39, foi evidenciada a série y identificada para o fragmento 1T:13 correspondente ao peptídeo EAISPPDAASAAPLR para o controle (superior) e lote A (inferior) e as y15 e b3 com perda de água (-18) característico da presença de serina e glutamato no fragmento.

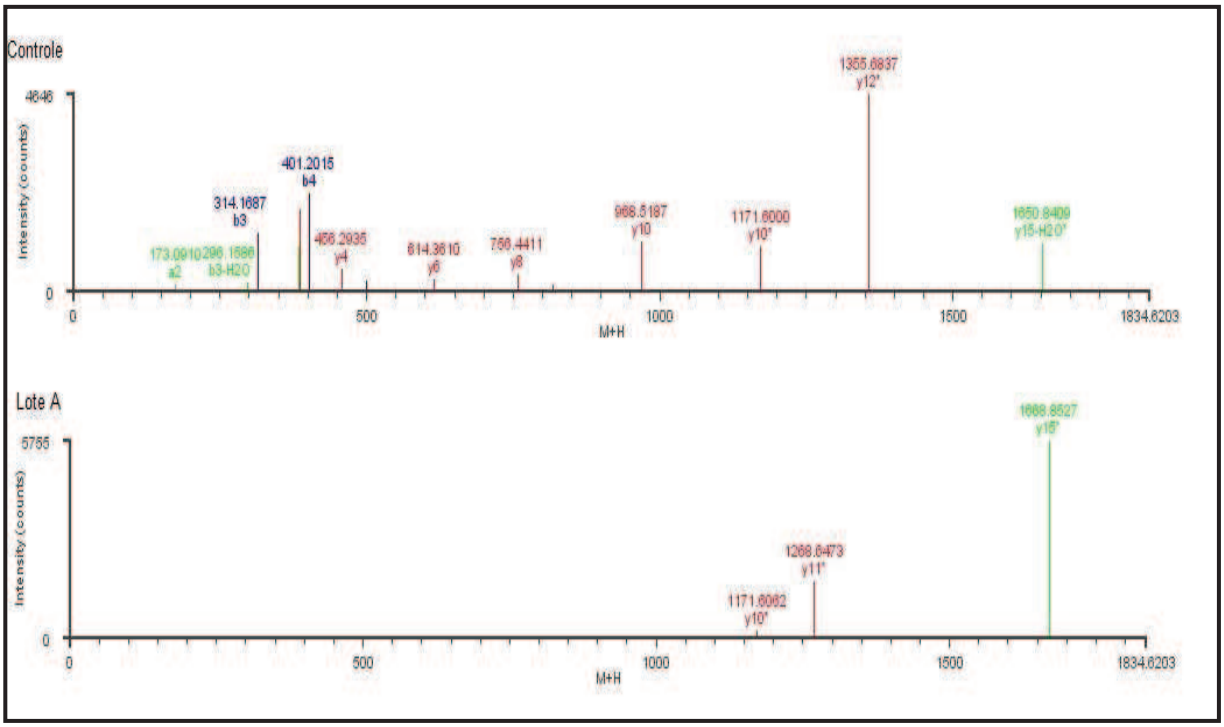

Figura 39: Espectro de massas MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T13, peptídeo: EAISPPDAASAAPLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As séries identificadas para o peptídeo EAISPPDAASAAPLR com as respectivas massa/carga (m/z) foram dispostas na tabela 18. As séries y12, y11, y10, y8, y7, y6, y5 e y4 foram identificadas para o controle. Somente as séries y15, y11 e y10 foram encontradas na amostra com, somente, 7,1% de b/y.

Tabela 18: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T13, peptídeo EAISPPDAASAAPLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H controle
y15	EAISPPDAASAAPLR	1668,8527	-
y14	AISPPDAASAAPLR	-	-
y13	ISPPDAASAAPLR	-	-
y12	SPPDAASAAPLR	-	1355,6387
y11	PPDAASAAPLR	1268,6473	1268,6067
y10	PDAASAAPLR	1171,6062	1171,6000
y9	DAASAAPLR	-	-
y8	AASAAPLR	-	756,4411
y7	ASAAPLR	-	6853998
y6	SAAPLR	-	614,3610
y5	AAPLR	-	527,3281
y4	APLR	-	456,2935
y3	PLR	-	-
y2	LR	-	-
y1	R	-	

O espectro de massas para o fragmento 1:T14 (controle e lote A) correspondente ao peptídeo TITADTFR é mostrado na figura 40. A série y2 foi identificada no lote A, porém esta série não esta evidente devido à intensidade do íon precursor (y8).

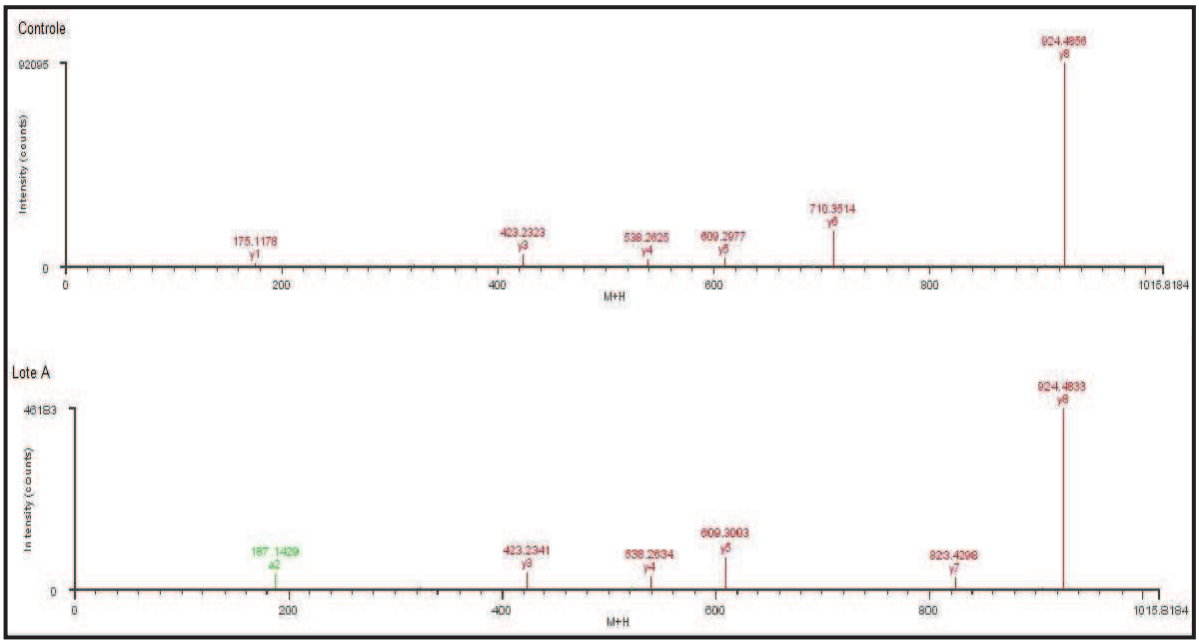

Figura 40: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T14, peptídeo: TITADTFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As séries identificadas para o controle e amostra foram descritas na tabela 19. É possível verificar que somente as séries y6 e y1 não foram identificadas na amostra.

Tabela 19: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T14, peptídeo TITADTFR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H controle
y8	TITADTFR	924,4833	924,4856
y7	ITADTFR	823,4298	-
y6	TADTFR	-	710,3514
y5	ADTFR	609,3003	609,3013
y4	DTFR	538,2634	538,2644
y3	TFR	423,2341	423,2335
y2	FR	322,1849	322,1848
y1	R	-	175,1178

O espectro de massas para o fragmento 1:T16 correspondente ao peptídeo LFR é mostrado na figura 41, onde é possível observar a série completa (y1, y2 e y3) para a amostra e para o controle sendo o y1 referente ao íon amônio da arginina.

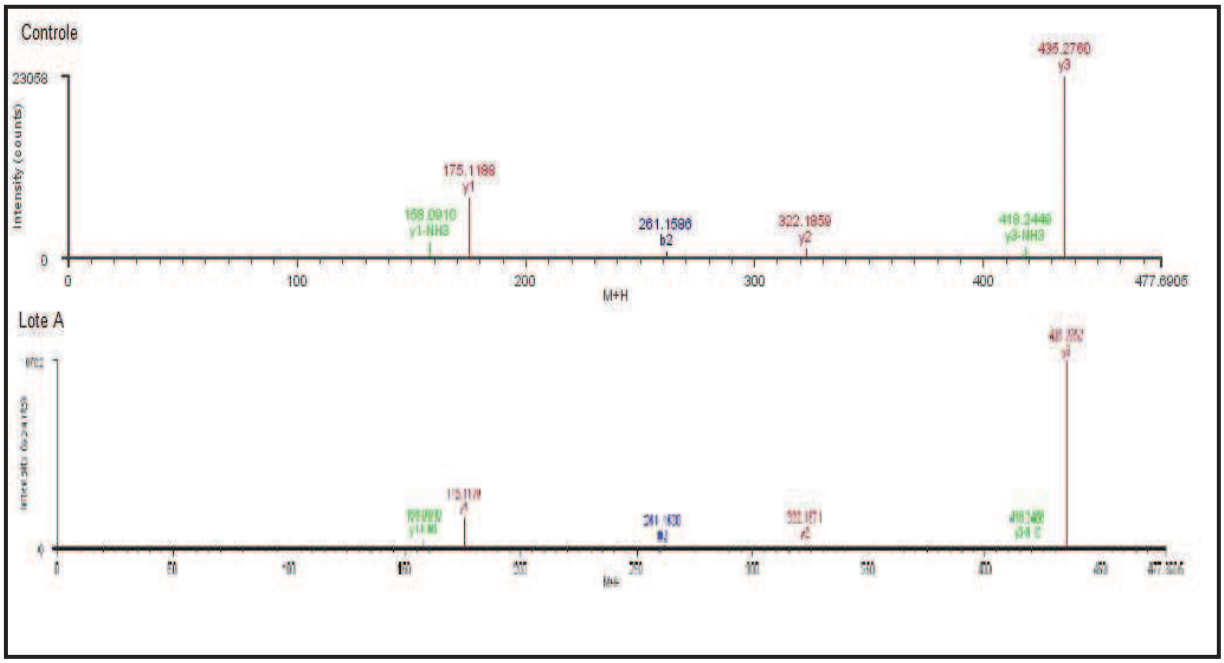

Figura 41: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T16, peptídeo: LFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI-QTOF

As massas correspondentes a cada série estão descritas na tabela 20, sendo possível confirmar a presença deste peptídeo tanto na amostra quanto no controle.

Tabela 20: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T16, peptídeo LFR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H controle
y3	LFR	435,2752	435,2760
y2	FR	322,1871	322,1859
y1	R	175,1179	175,1188

O espectro de massas para o fragmento 1:T17 (controle e lote A) correspondente ao peptídeo VYSNFLR é mostrado na figura 42. É possível verificar que as mesmas séries são encontradas na amostra e controle, com exceção da série y7 correspondente ao íon precursor.

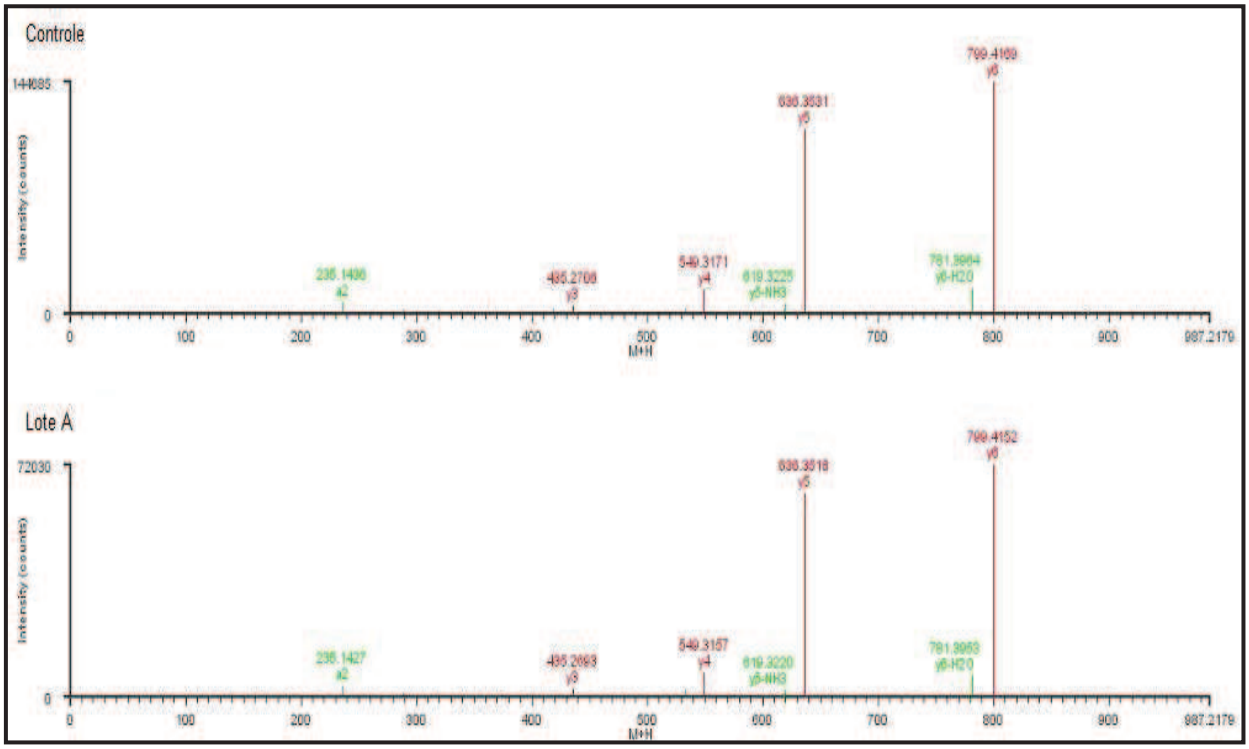

Figura 42: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T17, peptídeo: VYSNFLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

A relação massa/carga para cada série correspondente ao peptídeo VYSNFLR está descrita na tabela 21, onde foram identificadas as séries y6, y5, y4,

y4, y3 e y2. O íon y1 não esta evidenciado no espectro devido a alta intensidade do y6.

Tabela 21: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T17, peptídeo VYSNFLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H controle
y7	VYSNFLR	-	-
y6	YSNFLR	799,4152	799,4169
y5	SNFLR	636,3518	636,3531
y4	NFLR	549,3157	549,3171
y3	FLR	435,2693	435,2706
y2	LR	288,2009	288,2007
y1	R	175,1167	175,1159-

Na figura 43, é mostrado o espectro de massas MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr correspondente ao fragmento 1:T20, peptídeo: LYTGEACR. Em verde o fragmento a2 (primeiro) e fragmentos y com perda de água (H_2O). Esta perda de água deve-se à energia gerada no momento de aquisição deste fragmento. Não foi identificado o íon imônio referente à arginina na região baixa de massa.

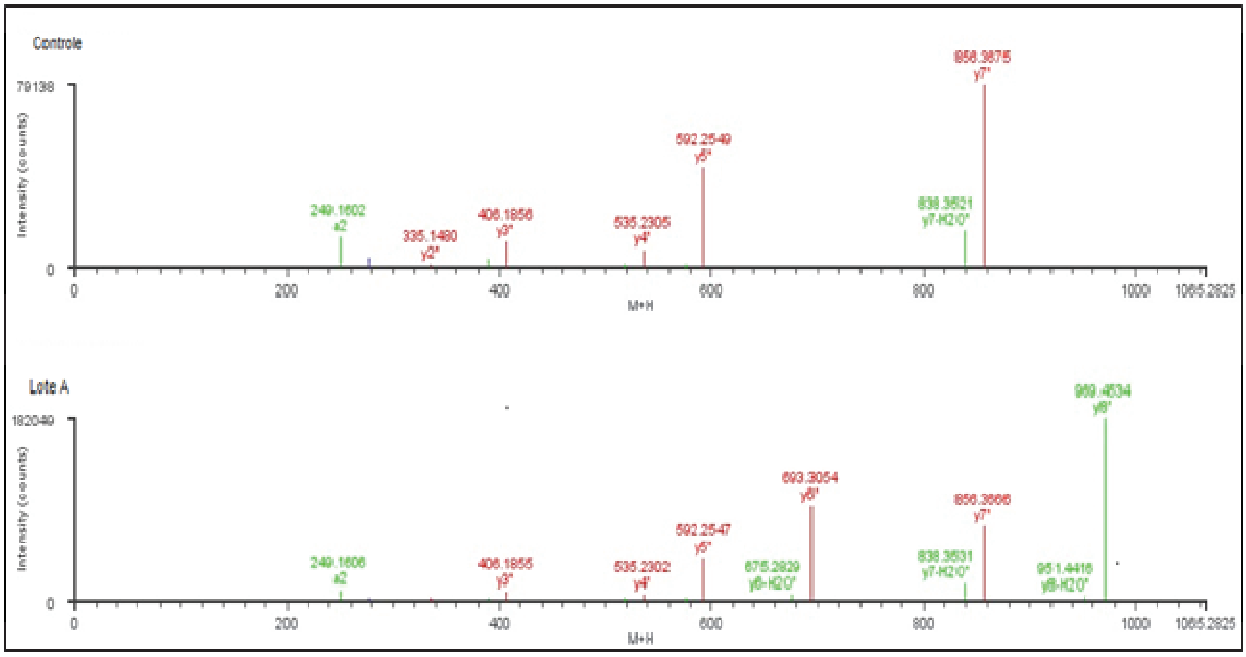

Figura 43: Espectro de massas MS^E para o controle (superior) e lote A (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T20, peptídeo: LYTGEACR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

O fragmento 1:T20, correspondente ao peptídeo LYTGEACR, foi também predito pelas massas encontradas no espectro com base na diferença de massa entre as séries conforme mostrado na tabela 22.

Tabela 22: Série encontrada para o lote A de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T20, peptídeo LYTGEACR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote A	M+H controle
y8	LYTGEACR	-	-
y7	YTGEACR	856,3666	856,3675
y6	TGEACR	693,3054	-
y5	GEACR	592,2547	592,2549
y4	EACR	534,2302	535,2305
y3	ACR	406,1855	406,1856
y2	CR	335,1480	335,1480
y1	R	-	-

5.1.5.2.2 Sequenciamento peptídico para o lote B

Foram preditos os fragmentos 1:T2, 1:T6, 1:T8, 1:T11, 1:T12, 1:T13, 1:T14, 1:T16, 1:T17 e 1:T20 baseados nos espectros de fragmentos MS^E.

De acordo com a figura 44 referente ao espectro de fragmentos para o primeiro peptídeo LICDSR (1:T2) identificado, é possível observar a série em vermelho que representa os fragmentos y e seus respectivos valores de m/z na tabela 23.

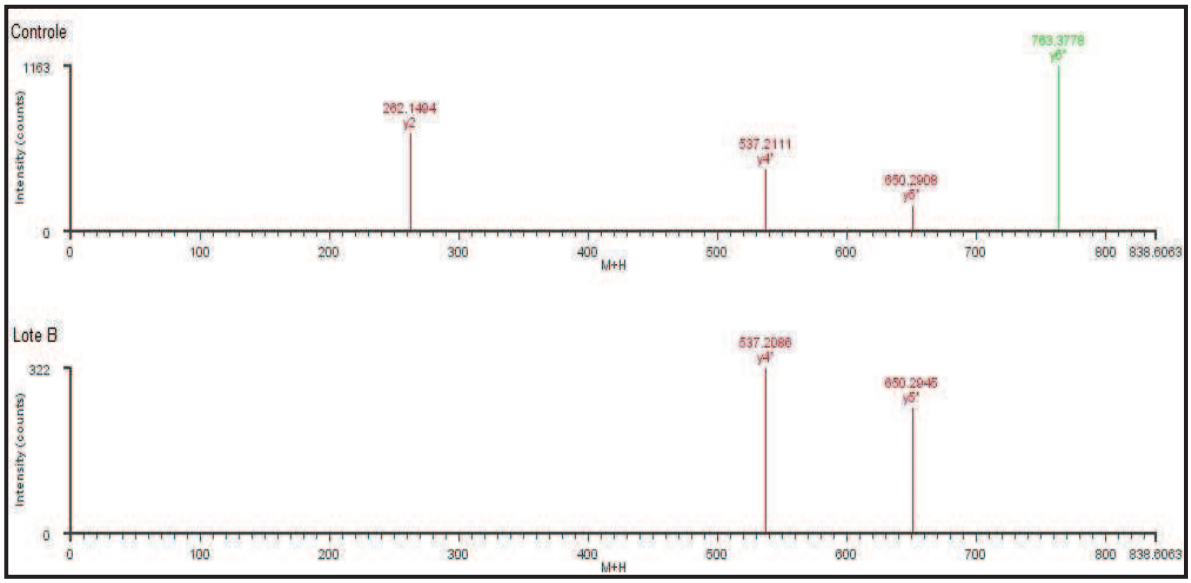

Figura 44: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T2, peptídeo: LICDSR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 23: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T2, peptídeo LICDSR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H Controle
y6	LICDSR	-	763,3778
y5	ICDSR	650,2945	650,2908
y4	CDSR	537,2086	537,2111
y3	DSR	-	-
y2	SR	-	262,1494
y1	R	-	-

Observando a tabela 23, é possível verificar também a massa correspondente da modificação carbamidometilação corresponde a 57,14 Da após o calculo da diferença entre a relação m/z 537,2086 e o peptídeo (CDRS =480,0692).

Na figura 45, é possível observar os espectros de massas MS^E (controle e lote B de IFA de EPO-hr) do fragmento 1:T3 referente ao peptídeo VLER. No controle é possível observar, somente, o íon precursor (em vermelho) correspondente a massa de 516,3156 Da. Na amostra (lote B) é possível identificar também o íon precursor (em vermelho) com massa correspondente a 516,3173 Da e em verde seria o íon precursor com perda de NH_3 (-17Da) com massa correspondente a 499,2877 Da, A observação do sinal em verde com perda de NH_3 é comum em espectros de massas conforme mencionado anteriormente quando há presença de arginina no fragmento. Entretanto, sua confirmação permanece prejudicada, já que a série completa não foi evidenciada.

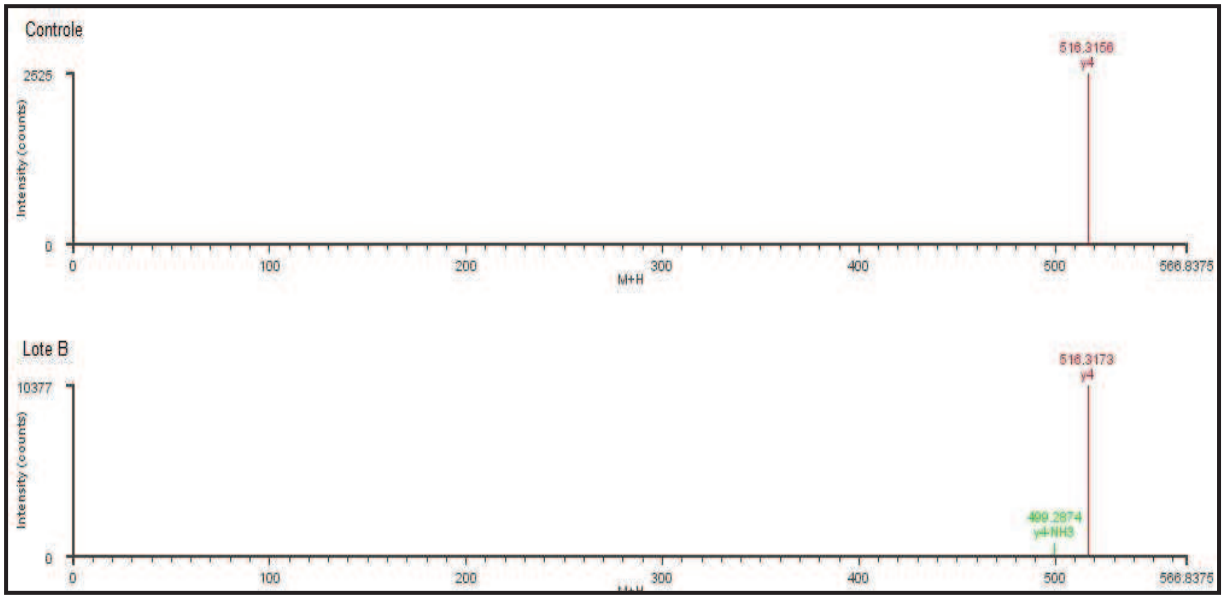

Figura 45: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T3, peptídeo: VLER. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI-QTOF

Conforme mencionado para o lote A, a identificação somente do íon precursor pode ser justificada pela energia de colisão utilizada, devendo ser realizado experimentos com alta energia para verificar se outros fragmentos da série são identificados.

O espectro correspondente ao fragmento 1:T4, peptídeo YLLEAK, demonstrado na figura 46 evidencia o íon precursor com valor de 736,4344 para a amostra (y6) e o y6 com perda de NH_3 similar, também, ao lote A. O fragmento 1:T4 não pode ser confirmado na amostra pois não observada a série completa.

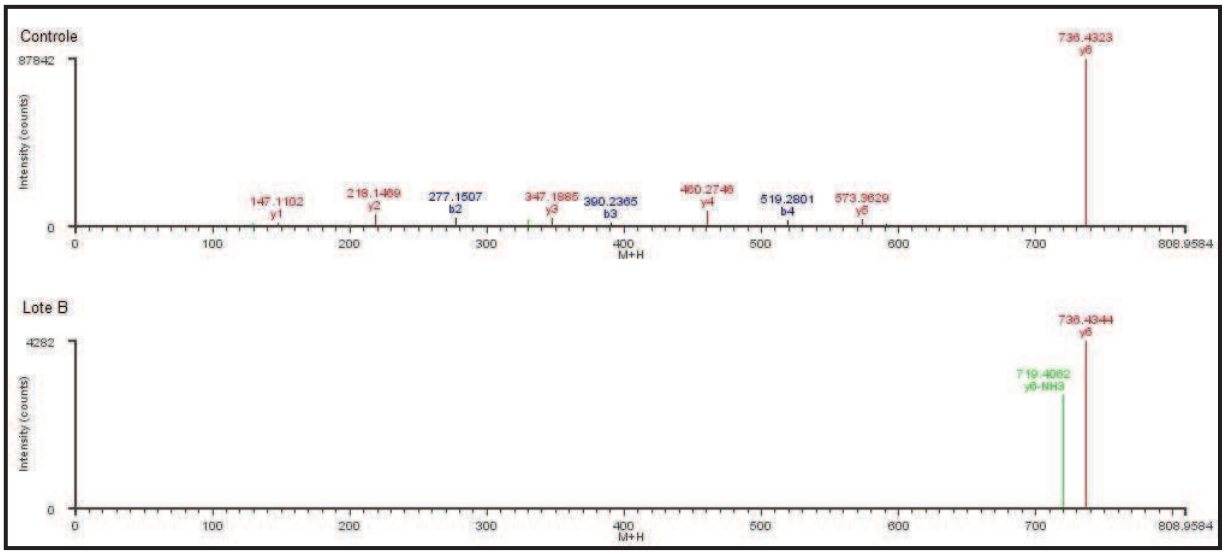

Figura 46: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T4, peptídeo: YLLEAK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Similar ao lote A, há indício da presença do peptídeo EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK (1:T5), já que somente o íon precursor (y25) foi encontrado no espectro de fragmentação conforme mostrado na tabela 9, devendo ser confirmado a partir de desenvolvimento de métodos com auxílio de glicosidases.

O fragmento 1:T6 correspondente ao peptídeo VNFYAWK que foi identificado para o controle e amostra (lote B), figura 47, porém a série y é diferenciada para cada um conforme mostra a tabela 24.

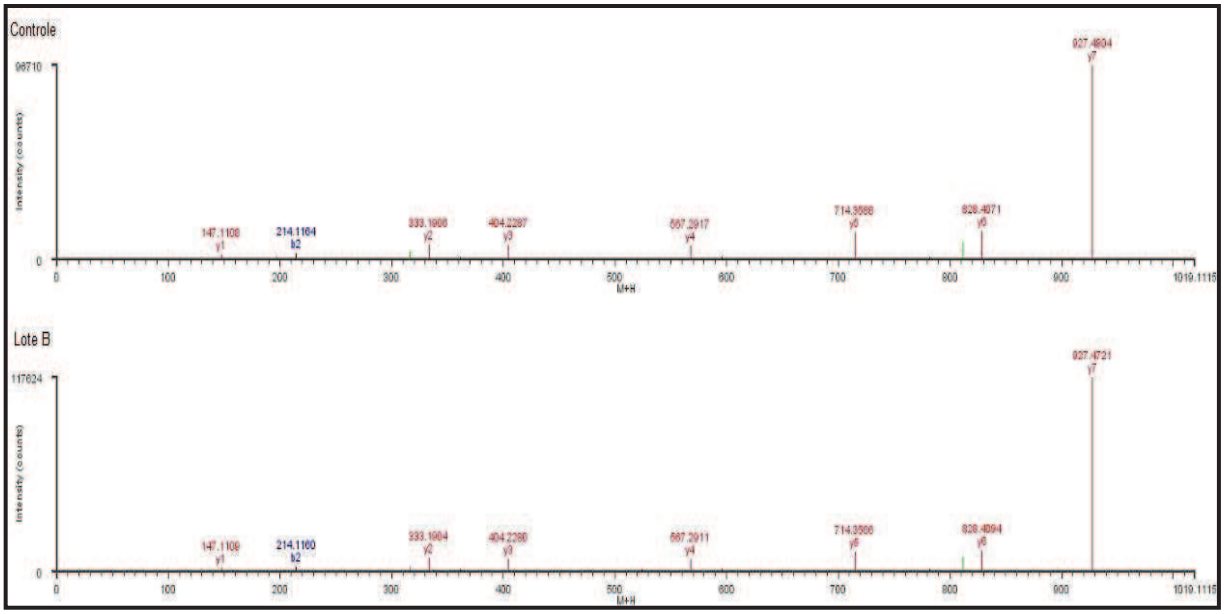

Figura 47: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T6, peptídeo: VNFYAWK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 24: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T6, peptídeo VNFYAWK identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H Controle
y7	VNFYAWK	927,4721	927,4804
y6	NFYAWK	828,4094	828,4071
y5	FYAWK	714,3586	714,3588
y4	YAWK	567,2911	567,2917
y3	AWK	404,2280	404,2287
y2	WK	333,1904	333,1906
y1	K	147,1109	147,1108

Na figura 48, é possível observar os espectros de massas MS^E (controle e lote B de IFA de EPO-hr) do fragmento 1:T8 referente ao peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. A série em vermelho corresponde aos fragmentos y

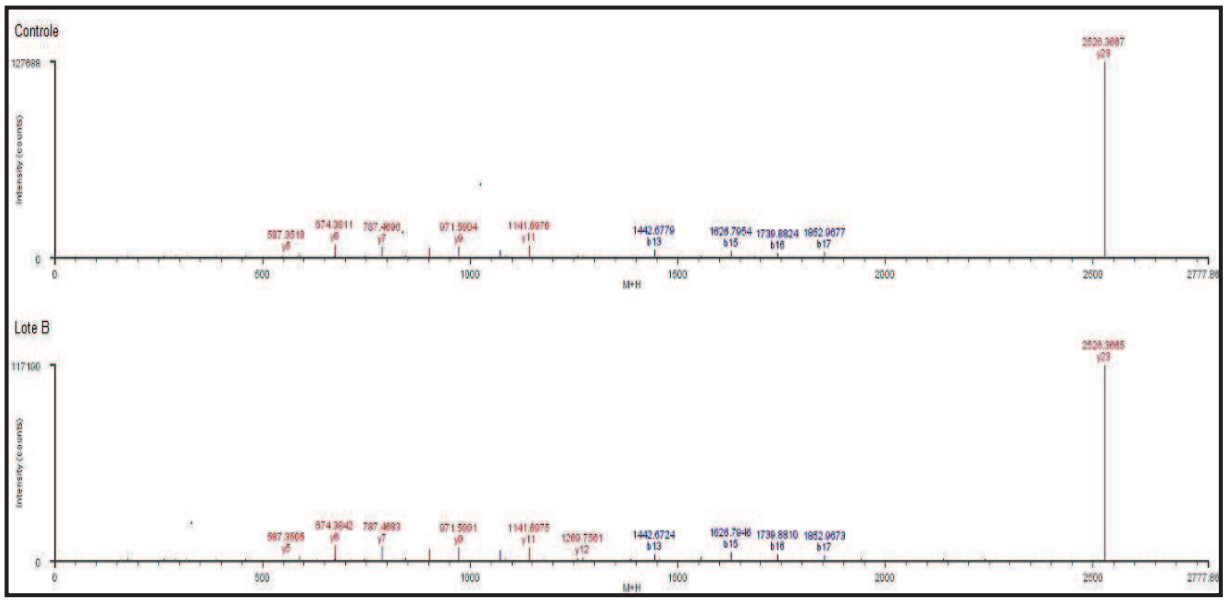

Figura 48: Espectro de fragmentação MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T8, peptídeo: MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As massas correspondentes para cada série y foram destacadas na tabela 25.

Tabela 25: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T8, peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H controle
y23	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	2526,3665	2526,3661
y22	EVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	-
y21	VGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	2266,2593
y20	GQQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	2167,1909
y19	QQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	2110,1694
y18	QAVEVWQGLALLSEAVLR	-	1982,1108
y17	AVEVWQGLALLSEAVLR	-	1854,0523
y16	VEVWQGLALLSEAVLR	-	1783,0151
y15	EVWQGLALLSEAVLR	1683,9453	1683,9467
y14	VWQGLALLSEAVLR	-	1554,9041
y13	WQGLALLSEAVLR	1455,8268	1455,8357
y12	QGLALLSEAVLR	1268,7561	1269,7563
y11	GLALLSEAVLR	1141,6975	1141,6978
y10	LALLSEAVLR	1084,6761	1084,6763
y9	ALLSEAVLR	971,5891	971,5907
y8	LLSEAVLR	900,5501	900,5547
y7	LSEAVLR	787,4683	787,4686
y6	SEAVLR	674,3842	674,3846
y5	EAVLR	587,3505	587,3524
y4	AVLR	458,3068	458,3099
y3	VLR	387,2703	387,2787
y2	LR	288,2015	288,2011
y1	R	175,1166	175,1168

Para o fragmento 1:T9 correspondente ao peptídeo GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK foi identificado somente o íon precursor y21para amostra (lote B) com m/z igual a 1512,0333, estado de carga igual a três obtendo assim massa igual a 4533,0762 Da, conforme evidenciado na tabela 09.

De acordo com figura 49, referente ao espectro de fragmentos para o peptídeo SLTTLLR (1:T11) é possível observar o íon imônio da arginina (175,1163 Da) presente na faixa mais baixa de ambos espectros. A série y1 a y5 parece estar mais intensa devido à ausência do íon precursor normalizando assim os sinais das séries da amostra.

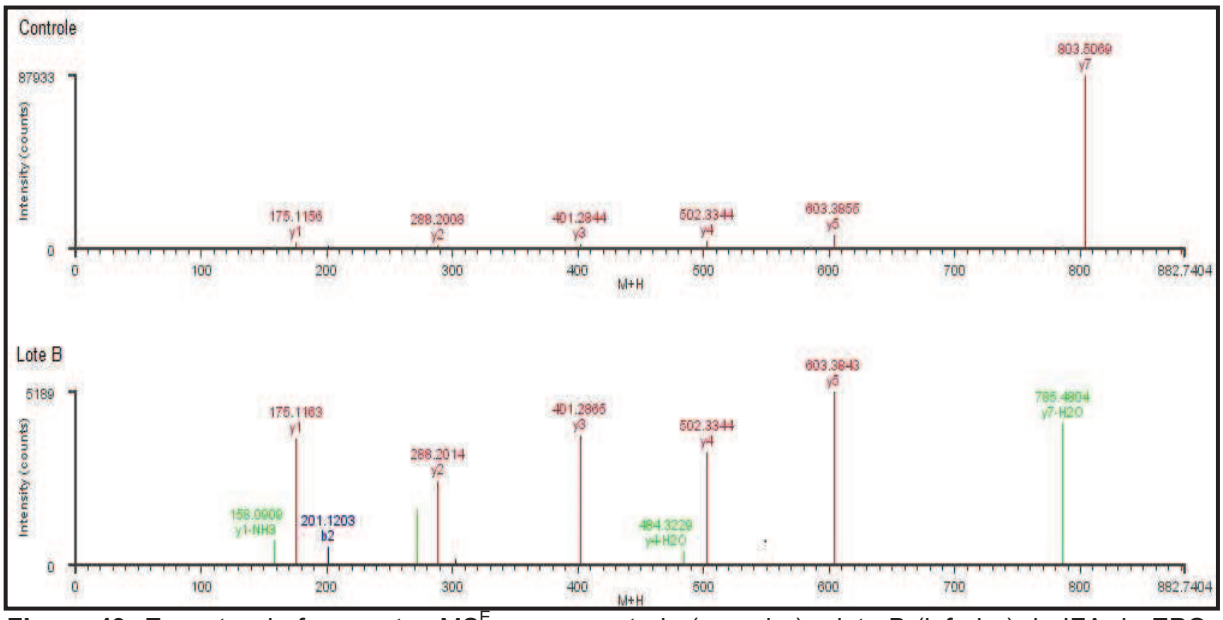

Figura 49: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T11, peptídeo: SLTTLLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As relações massa/carga de ambos espectros (controle e amostra) estão destacadas na tabela 26, sendo possível confirmar a sequência mediante a diferença das massas monoisotópicas.

Tabela 26: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T11, peptídeo SLTTLLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H controle
y7	SLTTLLR	803,5081	803,5069
y6	LTTLLR	-	-
y5	TTLLR	603,3843	603,3855
y4	TLLR	502,3344	502,3344
y3	LLR	401,2865	401,2844
y2	LR	288,2014	288,2008
y1	R	175,1163	175,1156

A série y detectada para o peptídeo ALGAQK (1:T12) está demonstrada na figura 50, onde é possível confirmar a presença da série completa (y1,y2, y3, y4, y5, y6) tanto para a amostra (lote B) quanto para o controle. É possível também verificar a presença do íon imônio de lisina correspondente a massa de 147,1109, não evidenciada no espectro devido a alta intensidade do y6, porém descrita na tabela 27.

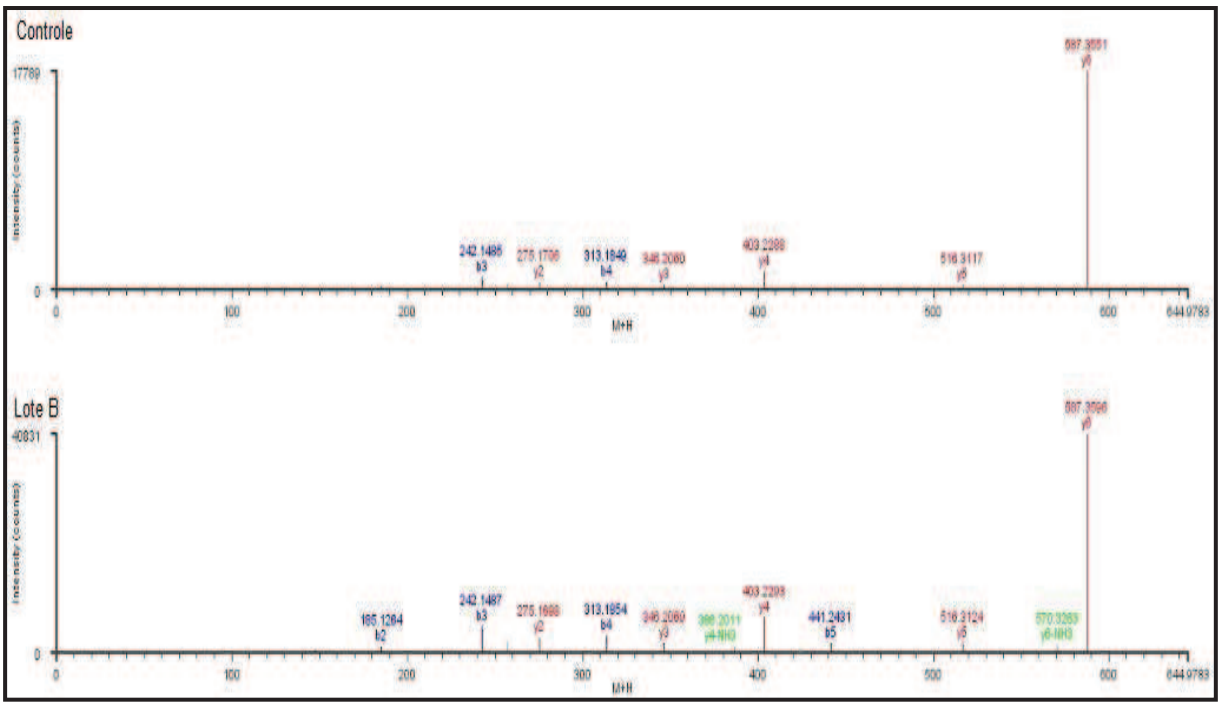

Figura 50: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T12, peptídeo: ALGAQK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 27: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T12, peptídeo ALGAQK identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H controle
y6	ALGAQK	587,3596	587,3551
y5	LGAQK	516,3124	516,3117
y4	GAQK	403,2293	403,2288
y3	AQK	346,2069	346,2060
y2	QK	275,1698	275,1706
y1	K	147,1109	147,1133

Na figura 51, podem ser evidenciadas as séries y e a identificadas para o fragmento 1T:13 correspondente ao peptídeo EAISPPDAASAAPLR para o controle (superior) e lote B (inferior).

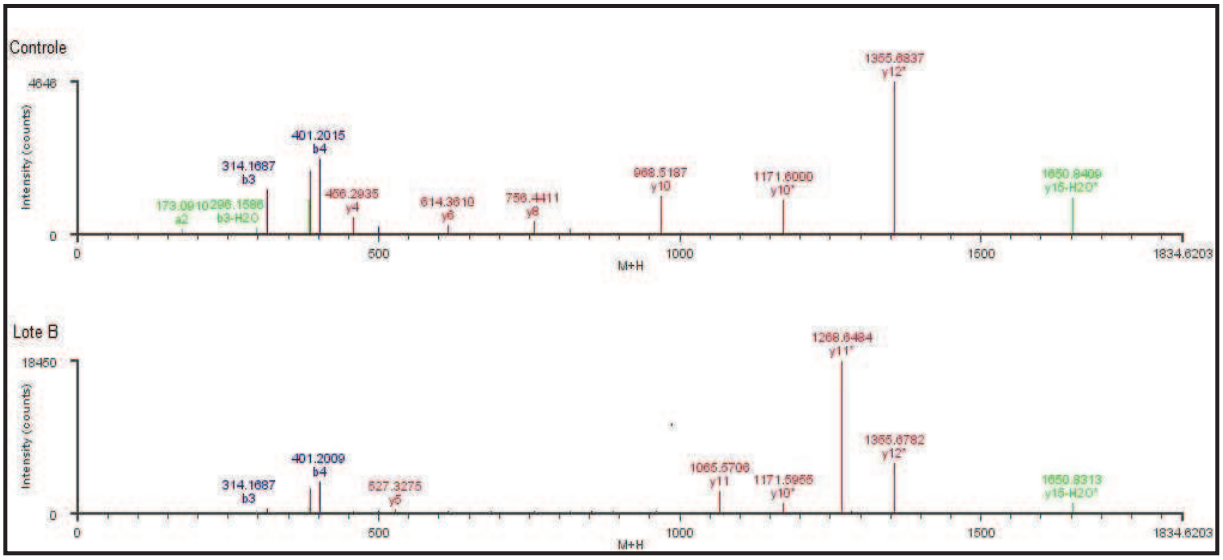

Figura 51: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T13, peptídeo: EAISPPDAASAAPLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As séries identificadas para o peptídeo EAISPPDAASAAPLR com as respectivas massa/carga (m/z) foram dispostas na tabela 28. As séries y12, y11, y8, y7, y6, y5 e y4 foram identificadas tanto para o controle e amostra. Somente a séries y14 foi encontrada na amostra. Algumas séries não são visualizadas na amostra devido a intensidade do y11* (com detecção de modificação).

Tabela 28: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T13, peptídeo EAISPPDAASAAPLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H controle
y15	EAISPPDAASAAPLR	-	-
y14	AISPPDAASAAPLR	1465,7885	-
y13	ISPPDAASAAPLR		-
y12	SPPDAASAAPLR	1355,6782	1355,6387
y11	PPDAASAAPLR	1268,6484	1268,6067
y10	PDAASAAPLR	1171,5955	1171,6000
y9	DAASAAPLR	-	-
y8	AASAAPLR	756,4383	756,4411
y7	ASAAPLR	685,4017	6853998
y6	SAAPLR	614,3617	614,3610
y5	AAPLR	527,3275	527,3281
y4	APLR	456,2925	456,2935
y3	PLR	-	-
y2	LR	-	-
y1	R		

A diferença de massa entre o íon y12 e o íon y11 é de 87,0298 Da, o que sugere que o sítio O-glicosilação esta posicionado no resíduo de serina na posição 6 e não na posição 12. E ainda pode-se inferir que este sítio de O-glicosilação contém o fragmento HexNAc (N-acetilgalactosamina), pois há um incremento de massa de 203Da entre o íon y11* (m/z 1268,6484) e íon do y11 (m/z 1065,5708) mostrado na figura 51.

O espectro de massas para o fragmento 1:T14 (controle e lote B) correspondente ao peptídeo TITADTFR é mostrado na figura 52. A série y2 foi identificada no lote B, porém esta série não está evidente devido à intensidade do íon precursor (y8).

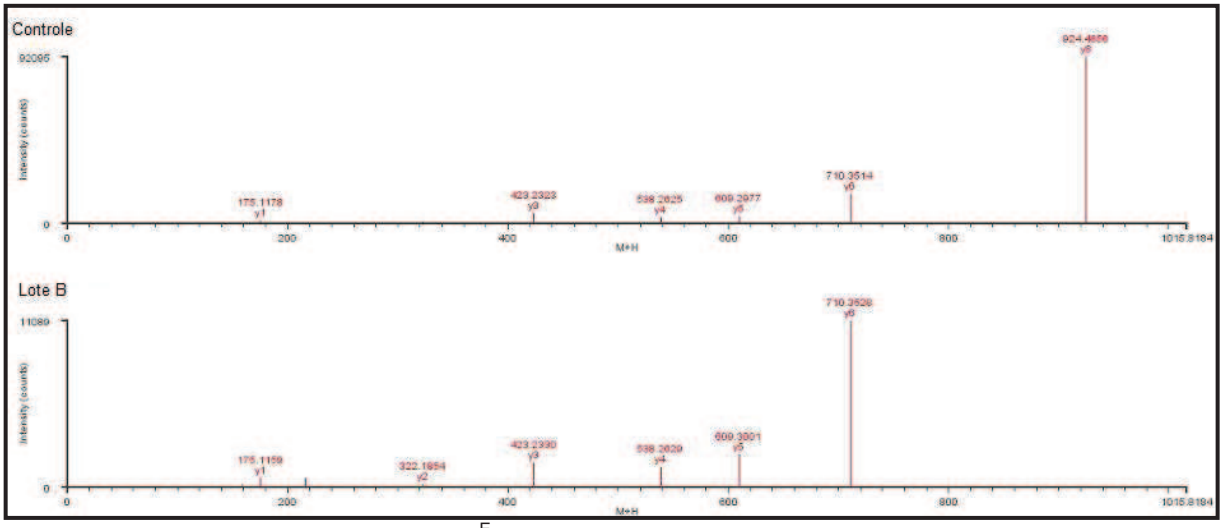

Figura 52: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T14, peptídeo: TITADTFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As séries identificadas para o controle e amostra foram descritas na tabela 29. É possível verificar que a série y8 e y7 não foram identificadas na amostra.

Tabela 29: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T14, peptídeo TITADTFR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H controle
y8	TITADTFR	-	924,4856
y7	ITADTFR	-	-
y6	TADTFR	710,3528	710,3514
y5	ADTFR	609,3001	609,3013
y4	DTFR	538,2629	538,2644
y3	TFR	423,2330	423,2335
y2	FR	322,1854	322,1848
y1	R	175,1159	175,1178

O espectro de massas correspondente ao peptídeo LFR para o fragmento 1:T16 (lote B) pode ser visualizado na figura 53, onde é possível observar a série completa para a amostra e para o controle(y1, y2 e y3), sendo o y1 referente ao íon imônio da arginina.

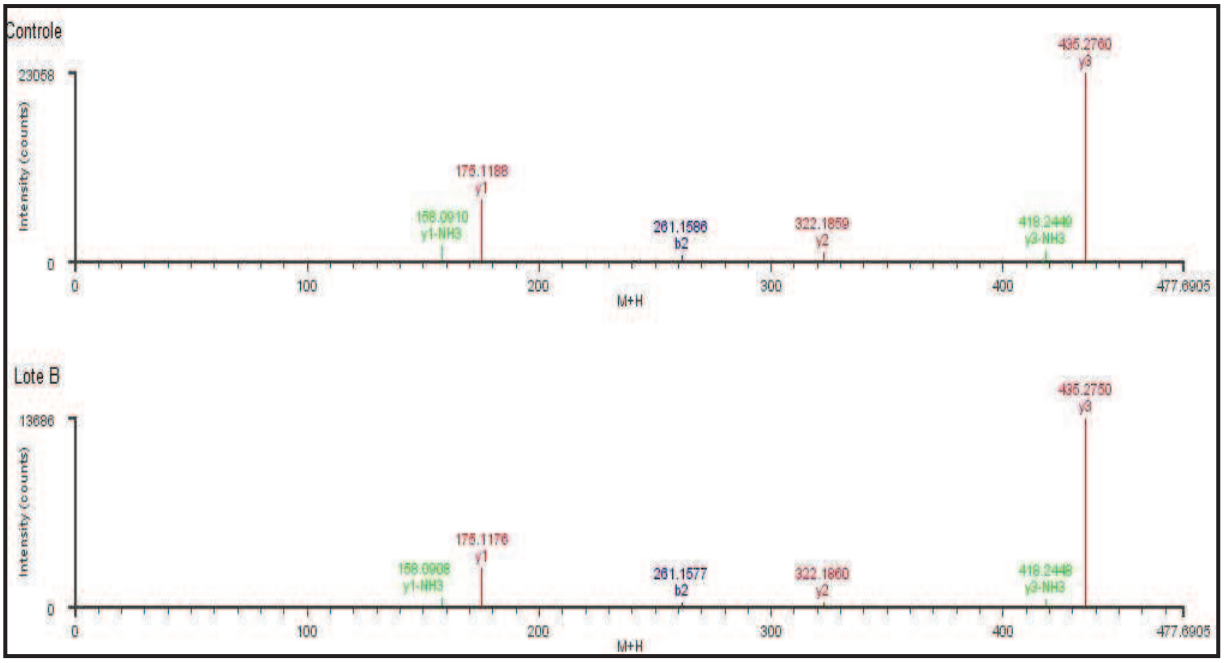

Figura 53: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T16, peptídeo: LFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI-QTOF

A relação massa/carga para cada série correspondente ao peptídeo FLR está descrita na tabela 30, onde as séries completas para amostra e controle foram identificadas.

Tabela 30: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T16, peptídeo LFR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H controle
y3	LFR	435,2750	435,2760
y2	FR	322,1860	322,1859
y1	R	175,1176	175,1188

O espectro de massas para o fragmento 1:T17 (controle e lote B) correspondente ao peptídeo VYSNFLR é mostrado na figura 54. É possível verificar que as mesmas séries são encontradas na amostra e no controle.

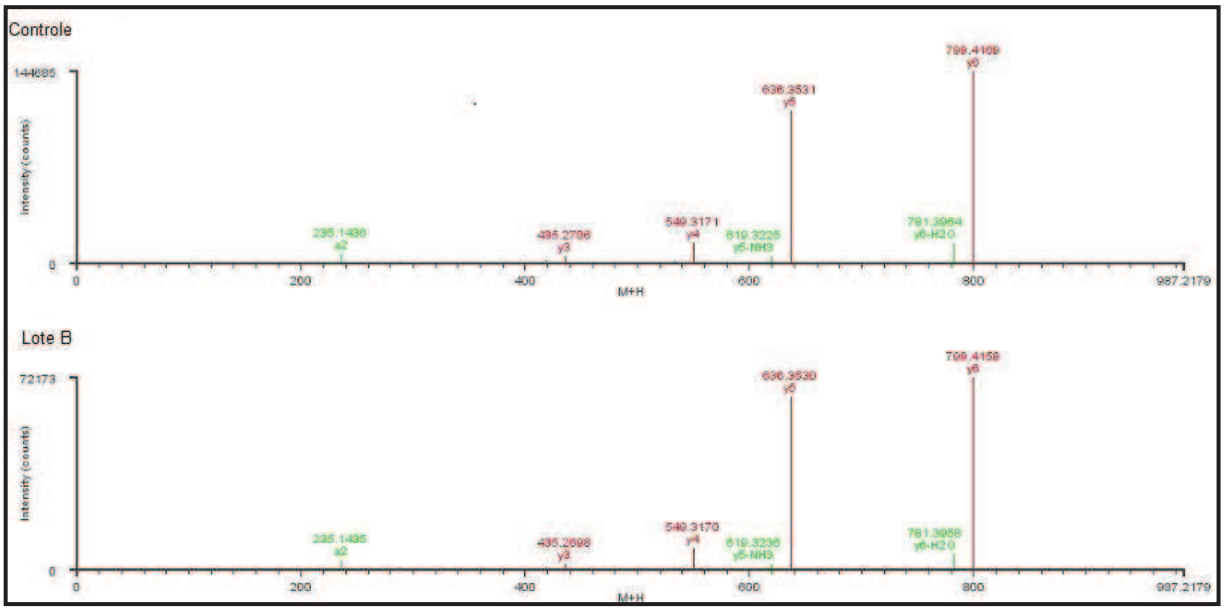

Figura 54: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T17, peptídeo: VYSNFLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

A relação massa/carga para cada série correspondente ao peptídeo VYSNFLR esta descrita na tabela 31, onde foram identificados as séries y6, y5, y4, y4, y3 e y2. A série y7 correspondente ao íon precursor não foi identificada para o controle e para a amostra.

Tabela 31: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T17, peptídeo VYSNFLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H controle
y7	VYSNFLR	-	-
y6	YSNFLR	799,4158	799,4169
y5	SNFLR	636,3530	636,3531
y4	NFLR	549,3170	549,3171
y3	FLR	435,2698	435,2706
y2	LR	288,2008	288,2007
y1	R	-	175,1159-

Na figura 55, é mostrado o espectro de massas MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr correspondente ao fragmento 1:T20, peptídeo: LYTGEACR. Em verde o fragmento a2 (primeiro) e fragmentos y com perda de água (H_2O). Esta perda de água deve-se a energia gerada no momento de aquisição deste fragmento.

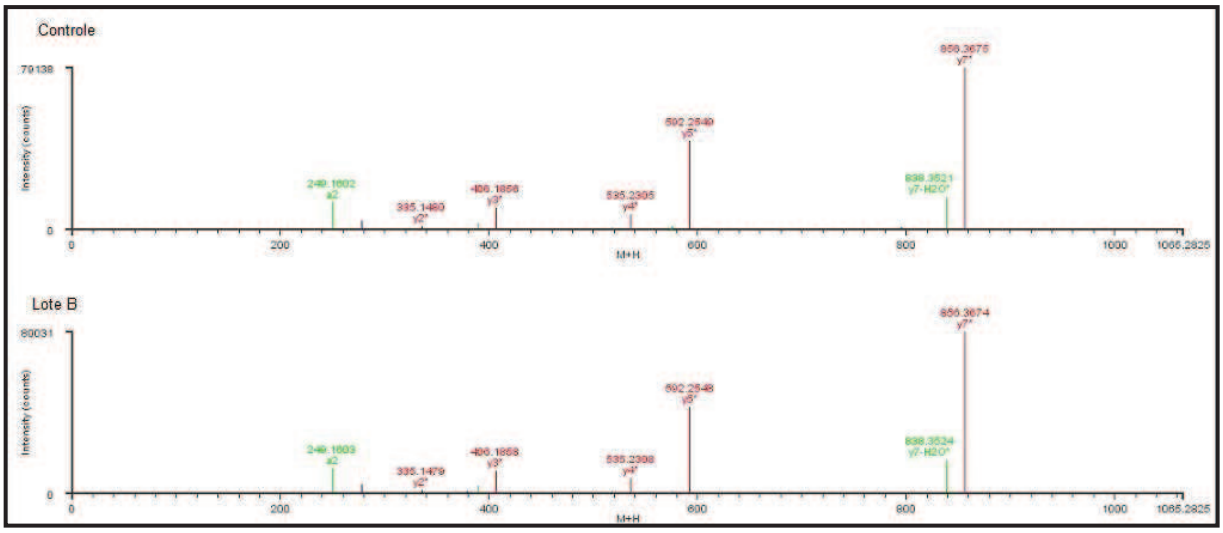

Figura 55: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote B (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T20, peptídeo: LYTGEACR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

O fragmento 1:T20, correspondente ao peptídeo LYTGEACR, foi também predito de forma semelhante ao cálculo realizado para os fragmentos já preditos com base na diferença de massa entre a série e a massa monoisotópica dos

aminoácidos. É possível também inferir a ponte dissulfeto devido o incremento de massa correspondente a carbamidometilação de aproximadamente 57Da no y2 conforme pode ser visto na tabela 32.

Tabela 32: Série encontrada para o lote B de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T20, peptídeo LYTGEACR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote B	M+H controle
y8	LYTGEACR	-	-
y7	YTGEACR	856,3674	856,3675
y6	TGEACR	-	
y5	GEACR	592,2548	592,2549
y4	EACR	535,2308	535,2305
y3	ACR	406,1858	406,1856
y2	CR	335,1479	335,1480
y1	R	-	-

5.1.5.2.3 Sequenciamento peptídico para o lote C

Foram preditos os fragmentos 1:T6, 1:T8, 1:T10, 1:T11, 1:T12, 1:T13, 1:T14, 1:T16 e 1:T17 baseados nos espectros de fragmentos MS^E.

De acordo com a figura 56, é possível observar os espectros de massas MS^E (controle e lote C de IFA de EPO-hr) do fragmento 1:T3 referente ao peptídeo VLER. Na amostra (lote C) é possível identificar também, similar aos lotes A e B, o íon precursor (em vermelho) com massa correspondente a 516,3169Da para a amostra e em verde seria o íon precursor com perda de NH_3 (-17Da) com massa correspondente a 499,2867 Da.

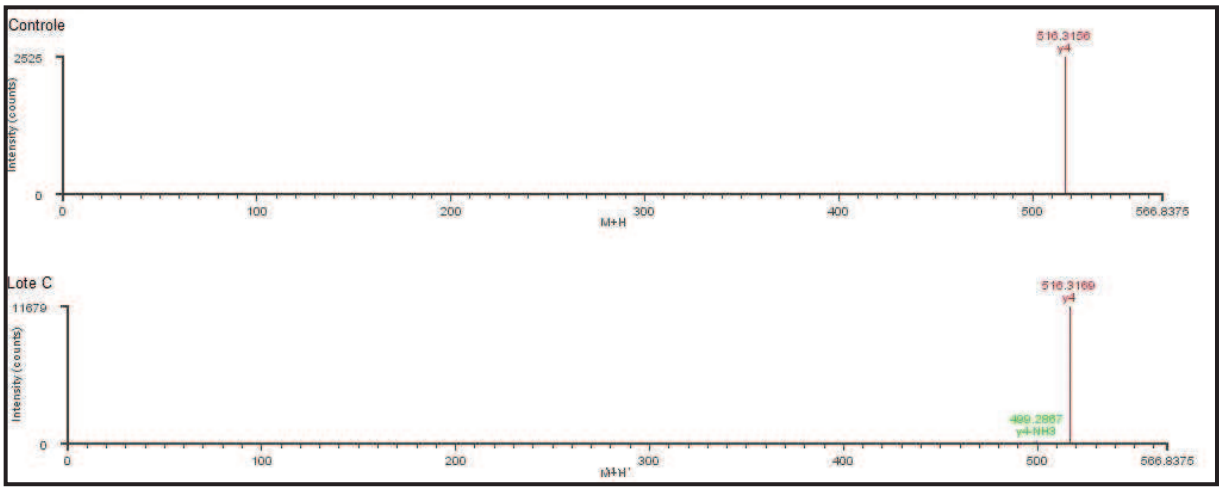

Figura 56: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T3, peptídeo: VLER. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI-QTOF

O fragmento 1:T4 referente ao peptídeo YLLEAK (lote C), figura 57, apresentou também somente o íon precursor, igualmente aos lotes A e B.

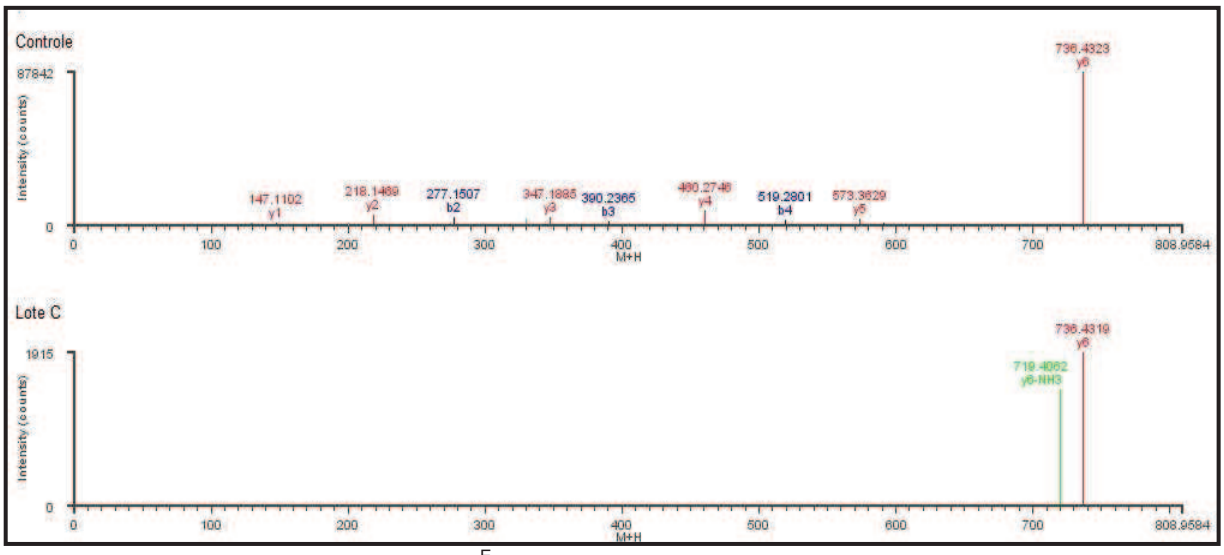

Figura 57: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T4, peptídeo: YLLEAK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Similar aos lotes A e B há indício da presença do peptídeo EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK (1:T5), no lote C, já que somente o íon precursor (y25) foi encontrado no espectro de fragmentação.

O fragmento 1:T6 correspondente ao peptídeo VNFYAWK foi identificado para o controle e amostra (lote C), figura 58, porém a série y é diferenciada para cada um, conforme mostra a tabela 33.

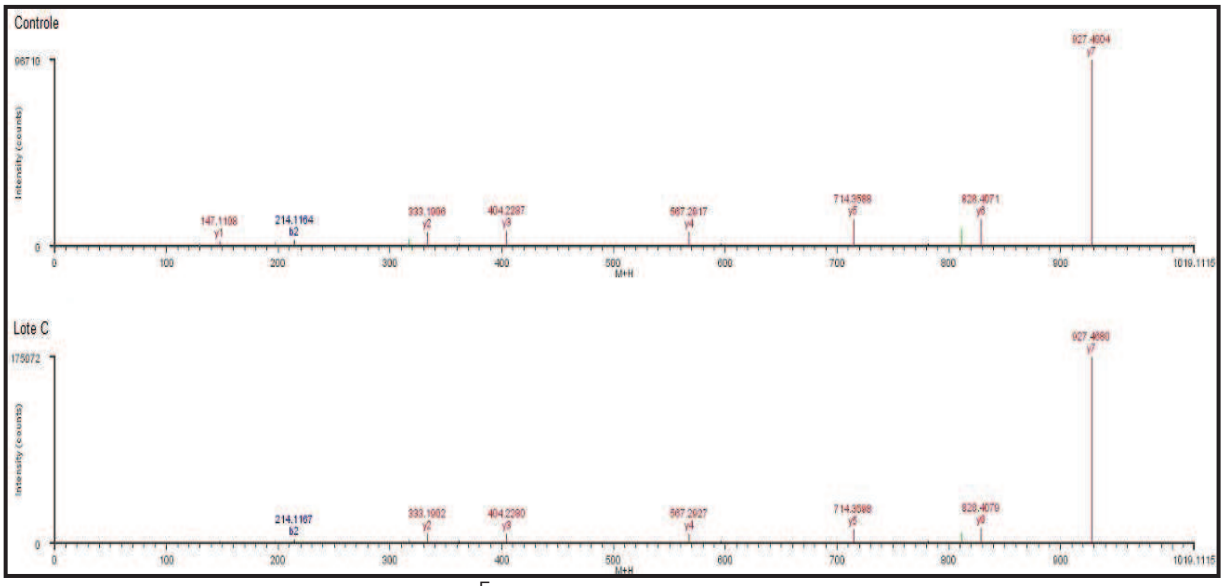

Figura 58: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T6, peptídeo: VNFYAWK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 33: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr e controle de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T6, peptídeo VNFYAWK identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H Controle
y7	VNFYAWK	927,4680	927,4804
y6	NFYAWK	828,4079	828,4071
y5	FYAWK	714,3598	714,3588
y4	YAWK	567,2927	567,2917
y3	AWK	404,2280	404,2287
y2	WK	333,1902	333,1906
y1	K	147,1110	147,1108

Na figura 59, é possível observar os espectros de massas MS^E (controle e lote C de IFA de EPO-hr) do fragmento 1:T8 referente ao peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. A série em vermelho representa os fragmentos y (y11, y9, y8, y7, y6 e y5) e em azul os fragmentos b onde tanto a intensidade e disposição dos fragmentos são similares para o controle e amostra.

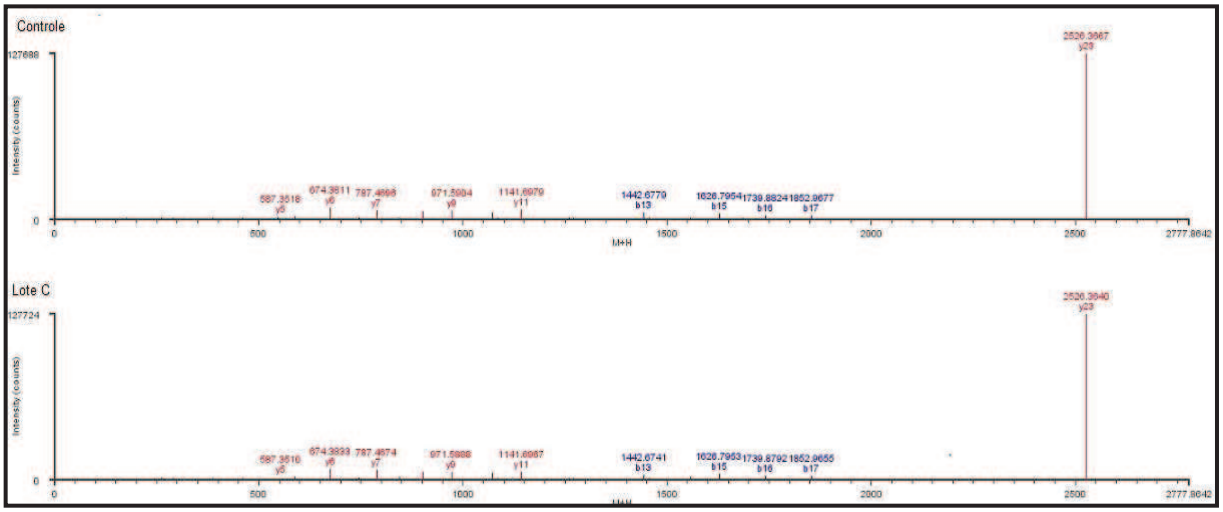

Figura 59: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T8, peptídeo: MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As massas correspondentes para cada série y foram destacadas na tabela 34.

Tabela 34: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T8, peptídeo MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H controle
y23	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	2526,3640	2526,3661
y22	EVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	-
y21	VGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	2266,2593
y20	GQQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	2167,1909
y19	QQAVEVWQGLALLSEAVLR	-	2110,1694
y18	QAVEVWQGLALLSEAVLR	-	1982,1108
y17	AVEVWQGLALLSEAVLR	-	1854,0523
y16	VEVWQGLALLSEAVLR	-	1783,0151
y15	EVWQGLALLSEAVLR	-	1683,9467
y14	VWQGLALLSEAVLR	-	1554,9041
y13	WQGLALLSEAVLR	1455,8317	1455,8357
y12	QGLALLSEAVLR	1269,7565	1269,7563
y11	GLALLSEAVLR	1141,6967	1141,6978
y10	LALLSEAVLR	1084,6727	1084,6763
y9	ALLSEAVLR	971,5888	971,5907
y8	LLSEAVLR	900,5501	900,5547
y7	LSEAVLR	787,4674	787,4686
y6	SEAVLR	674,3833	674,3846
y5	EAVLR	587,3510	587,3524
y4	AVLR	458,3082	458,3099
y3	VLR	387,2699	387,2787
y2	LR	288,2013	288,2011
y1	R	175,1165	175,1168

O fragmento 1:T10 correspondente ao peptídeo AVSGLR foi identificado somente no lote C. A série y referente a este peptídeo por ser observada na figura 60.

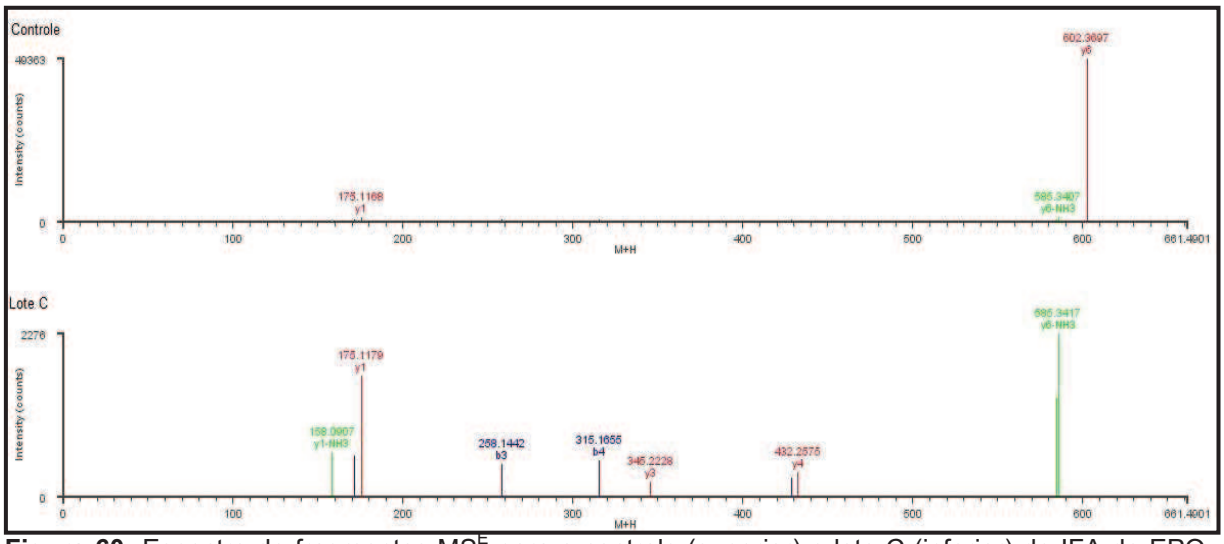

Figura 60: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T10, peptídeo: AVSGLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 35: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T10, peptídeo AVSGLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H Controle
y6	AVSGLR	-	602,3697
y5	VSGLR	-	-
y4	SGLR	432,2575	-
y3	GLR	345,2228	-
y2	LR	-	-
y1	R	175,1179	175,1168

O espectro de fragmentos para o peptídeo SLTTLLR (1:T11) está demonstrado na figura 61, sendo possível observar o íon imônio da arginina (175,1168 Da) presente na faixa mais baixa de ambos espectros.

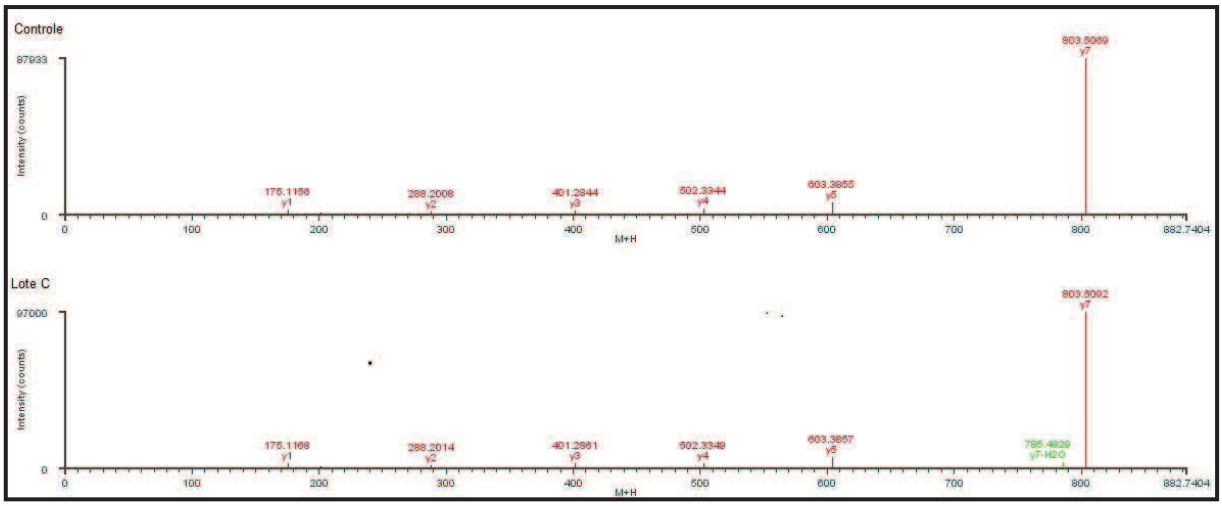

Figura 61: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T11, peptídeo: SLTTLLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As relações massa/carga de ambos espectros (controle e amostra) estão destacadas na tabela 36, sendo possível confirmar a sequencia mediante a diferença das massas monoisotópicas.

Tabela 36: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T11, peptídeo SLTTLLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H controle
y7	SLTTLLR	803,5092	803,5069
y6	LTTLLR	-	-
y5	TTLLR	603,3857	603,3855
y4	TLLR	502,3349	502,3344
y3	LLR	401,2861	401,2844
y2	LR	288,2014	288,2008
y1	R	175,1168	175,1156

A série y detectada para o peptídeo ALGAQK (1:T12) está demonstrada na figura 62 e tabela 37, onde é possível confirmar a presença da série completa no lote C, igualmente aos lotes A e B.

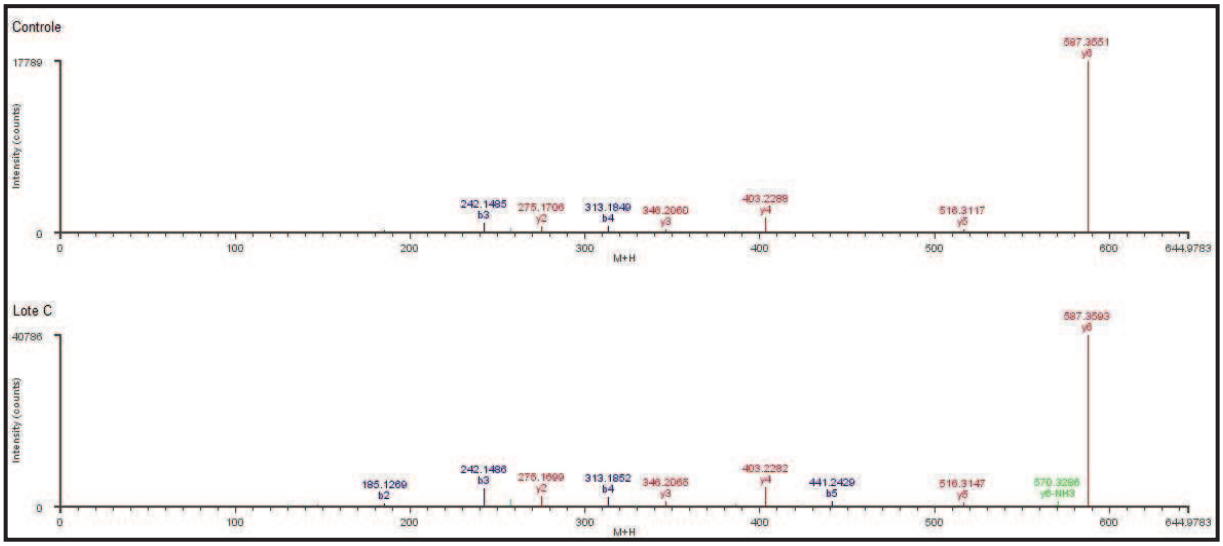

Figura 62: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T12, peptídeo: ALGAQK. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Tabela 37: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T12, peptídeo ALGAQK identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H controle
y6	ALGAQK	587,3593	587,3551
y5	LGAQK	516,3147	516,3117
y4	GAQK	403,2282	403,2288
y3	AQK	346,2065	346,2060
y2	QK	275,1699	275,1706
y1	K	147,1105	147,1133

Na figura 63 pode ser evidenciada as séries y e a identificadas para o fragmento 1T:13 correspondente ao peptídeo EAISPPDAASAAPLR para o controle (superior) e lote C (inferior).

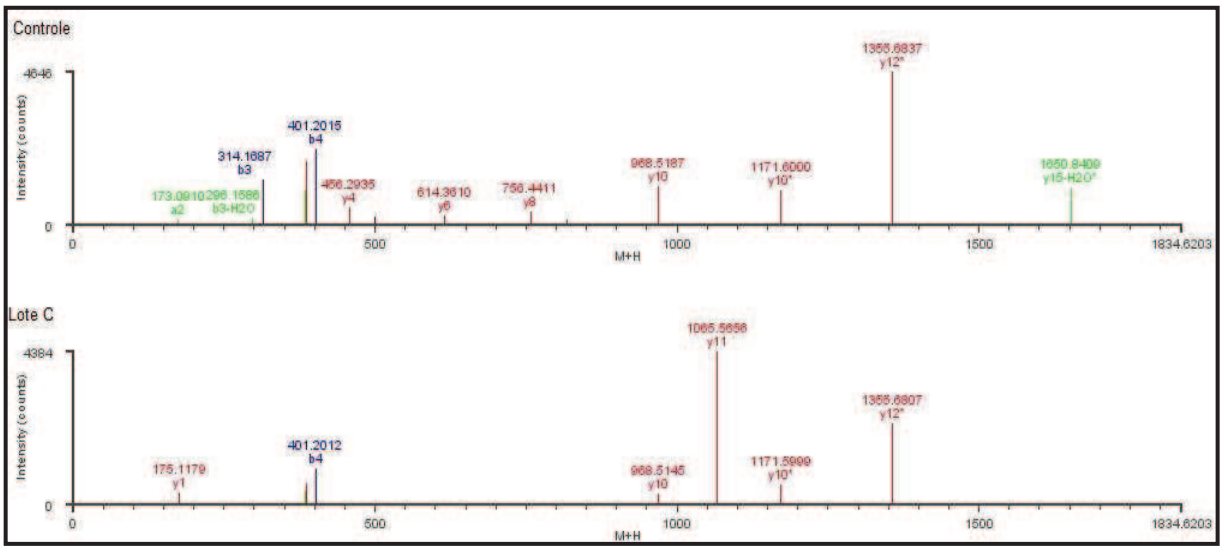

Figura 63: Espectro de fragmentos MSE para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T13, peptídeo: EAISPPDAASAAPLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As séries identificadas para o peptídeo EAISPPDAASAAPLR com as respectivas massa/carga (m/z) foram dispostas na tabela 38. A série y11 só foi identificada com o sinal sem modificação possível.

Tabela 38: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T13, peptídeo EAISPPDAASAAPLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H controle
y15	EAISPPDAASAAPLR	-	-
y14	AISPPDAASAAPLR	1465,7885	-
y13	ISPPDAASAAPLR	-	-
y12	SPPDAASAAPLR	1355,6707	1355,6387
y11	PPDAASAAPLR	1065,5656*	1268,6067
y10	PDAASAAPLR	1171,5999	1171,6000
y9	DAASAAPLR	-	-
y8	AASAAPLR	-	756,4411
y7	ASAAPLR	-	6853998
y6	SAAPLR	-	614,3610
y5	AAPLR	-	527,3281
y4	APLR	-	456,2935
y3	PLR	385,2547	-
y2	LR	-	-
y1	R	175,1179	

Pode-se inferir, igualmente ao lote B, que o sítio de O-glicosilação contém HexNAc, pois há um incremento de massa de 203Da entre o íon y10*(m/z 1171,5999) e y10 (m/z 968,5145) mostrado na figura 63.

O espectro de massas para o fragmento 1:T14 (controle e lote C) correspondente ao peptídeo TITADTFR é mostrado na figura 64. A série y2 foi identificada no lote C, porém esta série não esta evidente devido a intensidade do íon precursor (y8).

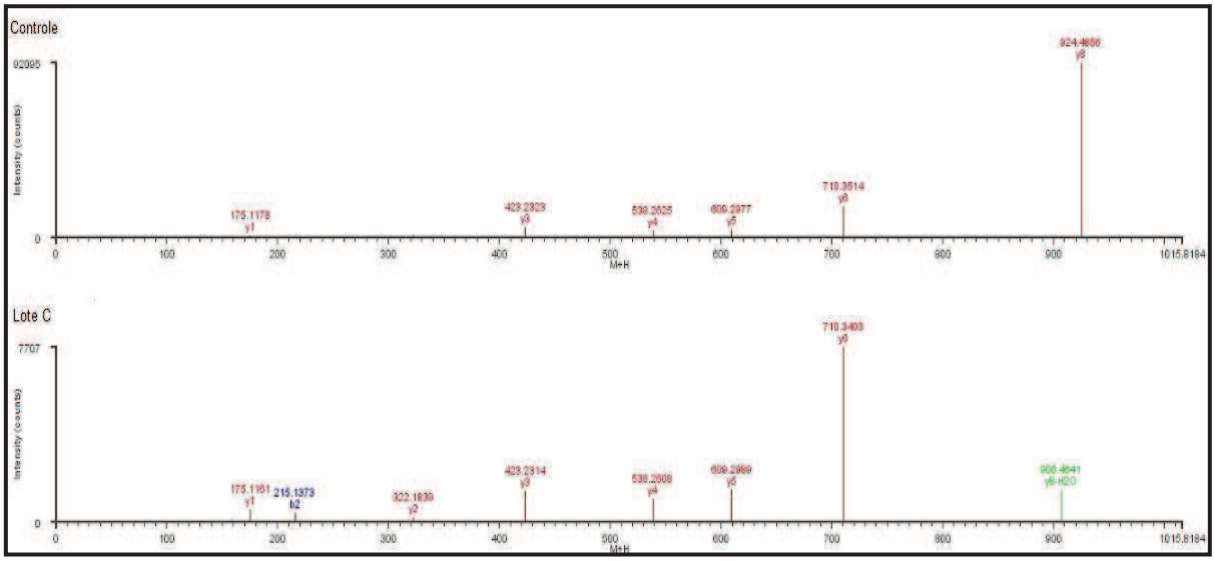

Figura 64: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T14, peptídeo: TITADTFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As séries identificadas para o controle e amostra foram descritas na tabela 38. É possível verificar que somente a série y6 não foi identificada no controle.

Tabela 39: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T14, peptídeo TITADTFR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H controle
y8	TITADTFR	-	924,4856
y7	ITADTFR	-	823,4321
y6	TADTFR	710,3493	-
y5	ADTFR	609,2889	609,3013
y4	DTFR	538,2608	538,2644
y3	TFR	423,2314	423,2335
y2	FR	322,1839	322,1848
y1	R	175,1161	175,1178

O espectro de massas correspondente ao peptídeo LFR para o fragmento 1:T16 (lote C) pode ser visualizado na figura 65, onde é possível observar a série completa para a amostra e para o controle (y1, y2 e y3), sendo o y1 referente ao íon imônio da arginina.

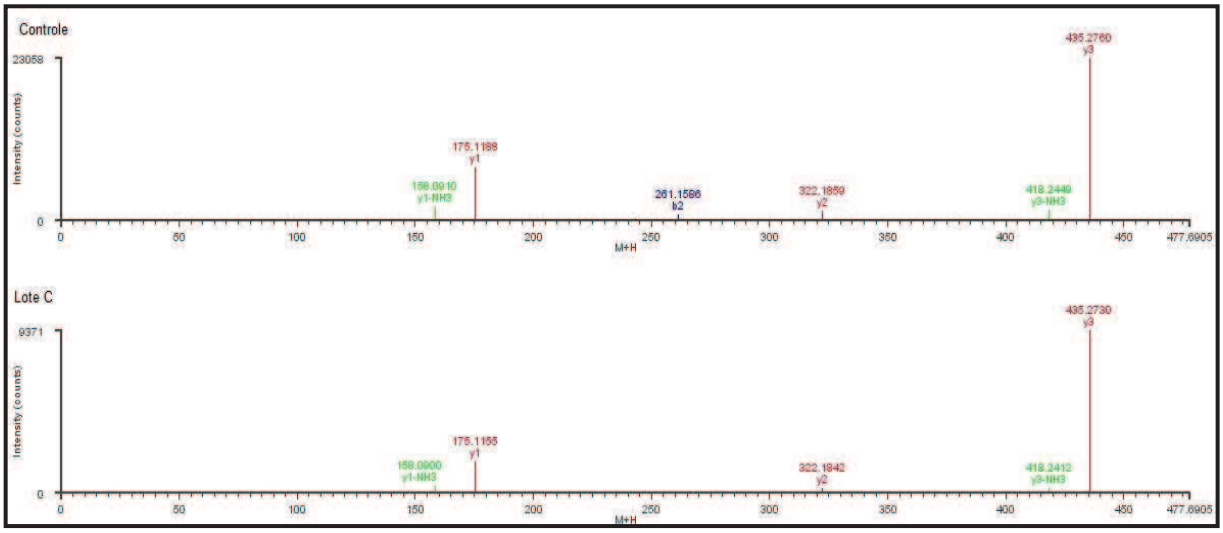

Figura 65: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T16, peptídeo: LFR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI-QTOF

A relação massa/carga para cada série correspondente ao peptídeo FLR esta descrita na tabela 40, onde as séries completas para amostra e controle foram identificadas.

Tabela 40: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T16, peptídeo LFR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H controle
y3	LFR	435,2730	435,2760
y2	FR	322,1842	322,1859
y1	R	175,1155	175,1188

O espectro de massas para o fragmento 1:T17 (controle e lote C) correspondente ao peptídeo VYSNFLR é mostrado na figura 66. É possível verificar que as mesmas séries são encontradas na amostra e controle.

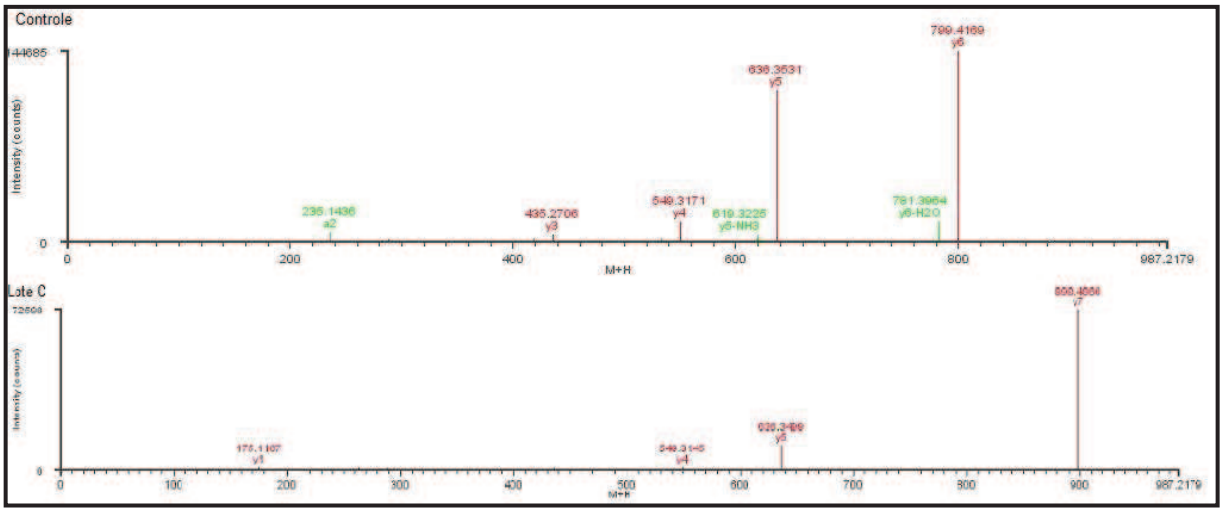

Figura 66: Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e lote C (inferior) de IFA de EPO-hr, fragmento 1:T17, peptídeo: VYSNFLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

A relação massa/carga para cada série correspondente ao peptídeo VYSNFLR esta descrita na tabela 41, onde foram identificadas as séries y6, y5, y4, y4, y3 e y2. A série y7 correspondente ao íon precursor foi identificada para a amostra.

Tabela 41: Série encontrada para o lote C de IFA de EPO-hr, correspondente ao fragmento 1:T17, peptídeo VYSNFLR identificado e a relação massa/carga experimental.

Série	Peptídeo	M+H lote C	M+H controle
y7	VYSNFLR	898,4866	-
y6	YSNFLR	-	799,4169
y5	SNFLR	636,3499	636,3531
y4	NFLR	549,3145	549,3171
y3	FLR	435,2698	435,2706
y2	LR	288,1996	288,2007
y1	R	175,1167	175,1159-

5.2 Considerações Finais

A caracterização de proteínas requer exaustivo uso de diferentes técnicas da proteômica para melhor avaliação protéica. As técnicas adotas neste trabalho (UV, SDS-PAGE, HPLC-FR, 2D-PAGE e EM) contribuíram significativamente para melhor avaliação e caracterização dos lotes de IFA de EPO-hr.

Neste trabalho foi possível estimar mediante a técnica de SDS-PAGE a massa molar de IFA de EPO-hr, sem grande variabilidade, em 39,78, 40,09 e 39,32 KDa para os três lotes (A, B e C respectivamente). Em todos os lotes foram obtidos percentuais de pureza superiores a 97% por HPLC-FR e 6 isoformas majoritárias por 2D-PAGE, conforme resumido na Tabela 42.

Pela técnica EM, foram confirmados 10, 10 e 9 peptídeos dos 21 téoricos calculados pelo Biopharmalynx® para os lotes A, B e C, respectivamente. Segundo Simone (2008), a confirmação de apenas 4 a 6 peptídeos já é o suficiente para a identificação da proteína em estudo.

Diferentemente dos resultados obtidos pelas técnicas já citadas, a concentração protéica por absorção no UV não apresentou consistência nos resultados para os três lotes, variando entre 0,4 e 1,1 mg/mL, apesar da relação proteína/DNA (280/260nm) estar próxima de 1,8 para os três lotes.

Tabela 42: Resultados obtidos para os três lotes de IFA de EPO-hr por diferentes técnicas de caracterização de proteínas.

Lote	Concentração (mg/mL)	Massa molar (KDa)	Pureza (%)	Número isoformas	Número de peptídeos identificados
A	0,7133	39,78	97,11	6	10
B	1,0476	40,09	98,56	6	10
C	0,3789	39,32	97,96	6	9
Técnica	**UV**	**SDS-PAGE**	**HPLC-FR**	**2D-PAGE**	**EM**

Capítulo 6
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

Os resultados obtidos com as metodologias empregadas neste trabalho, visando o controle de qualidade e/ ou controle em processo, possibilitaram um maior entendimento das amostras de IFA de EPO-hr. Pode-se concluir que:

- ✓ As absorvâncias obtidas para os três lotes de IFA (A, B e C) em 280 e 260 nm apresentaram bastante variação e as concentrações proteicas por absorção no UV foram 0,7133 mg/mL, 1,0476 mg/mL e 0,3789 mg/mL, respectivamente . Entretanto, a relação 280/260nm permaneceu estável com valores de 1,82, 1,84 e 1,74 respectivamente para os três lotes.
- ✓ Os resultados obtidos para SDS-PAGE mostraram uma banda difusa, compatível com a massa molar de EPO-hr de 39,78, 40,09 e 39,32 kDa para os lotes A, B e C, respectivamente. Esta banda difusa deve-se à micro-heterogeneidade da porção glicídica de EPO-hr.
- ✓ Para o lote A foram identificadas por SDS-PAGE bandas eletroforéticas de alta massa molar (entre 45 e 66 kDa).
- ✓ Os resultados obtidos para 2D-PAGE evidenciaram 6 isoformas majoritárias entre o pI 4,5 e 6,5 com massa molar correspondente a EPO-hr para os três lotes de EPO-hr.
- ✓ Foram observadas bandas eletroforéticas de alta e baixa massa molar e bandas que focalizaram na faixa de pH básico mediante o ensaio de 2D-

PAGE, exceto para o lote B, em que foram evidenciadas somente as 6 isoformas majoritárias.

- ✓ Para o ensaio de pureza por CLAE-FR foram encontrados percentuais médios de 97,11, 98,56 e 97,96 % para os lotes A, B e C, respectivamente.
- ✓ Com os resultados de espectrometria de massas por ESI-QTOF foi possível predizer a sequência de aminoácidos para o controle e amostras.
- ✓ Não foram identificados os fragmentos 1:T1 - 1:T7 - 1:T15 - 1: T18 - 1: T19 e 1:T21 no controle por espectrometria de massas por ESI-QTOF.
- ✓ Não foram identificados os fragmentos 1:T1 - 1:T7 - 1:T15 - 1:T18 – 1:T19 e 1: T21 nos lotes A , B e C por espectrometria de massas por ESI-QTOF.
- ✓ Pode-se inferir que os fragmentos 1:T7; 1:T15, 1:T18 e 1: T19 não foram identificados para as amostras e controle por serem fragmentos relativamente pequenos, sendo mais adequado o uso de outra protease para clivagem em sítios diferentes da tripsina.
- ✓ Foi possível identificar a posição das pontes dissulfeto para as amostras e para o controle pela diferença das massas monoisotópicas, onde se constatou que ocorreu um padrão de repetição.
- ✓ Foi possível identificar para os lotes B e C de IFA a posição do sítio de O-glicosilação na serina 126 devido à diferença de massa entre o y12 e o y11 ser apenas 87,0298 Da, correspondente ao resíduo de serina. Foi possível, também, inferir que este sítio de O-glicosilação contém o fragmento HexNAc, pois há um incremento de massa de 203Da entre o íon y detectado com modificação e sem modificação.
- ✓ Não foram identificados os sítios de N-glicosilação, pois os fragmentos obtidos com protease (tripsina) possuem alta massa molar, dificultando sua caracterização.

6.2. Sugestões

As sugestões a seguir serão adotadas para dar continuidade a este trabalho.

- ✓ Utilizar outras proteases (glutamyl endopeptidase/ glu-C) para identificar peptídeos perdidos.
- ✓ Utilizar glicosidases (PNgase F e sialidase) e colunas cromatográficas específicas (Glican-Waters) para sequenciar os sítios de N-glicosilação.
- ✓ Investigar os *spots* evidenciados na técnica 2D-PAGE que, a princípio, não foram correlacionados com a EPO-hr.
- ✓ Elaborar um protocolo de preparo de amostras para EM com intuito de eliminar possíveis interferentes, como o PEG.
- ✓ Realizar avaliação de proteína intacta por EM, possibilitando estimar a massa molar da EPO-hr.
- ✓ Utilizar a mobilidade iônica por EM para avaliar a conformação da proteína.

Capítulo 7

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. F. W.; **Estudo de um laboratório analítico destinado ao controle em processo do biofármaco interferon alfa 2b humano recombinante** [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituo de Tecnologia em Imunobiológicos; 2009.

ANDRADE, S. M.; **Avaliação de metodologias de controle de qualidade de biomedicamentos de tecnologia DNA recombinante de uso humano** [monografia]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2007.

AITKEN, A. Mass spectrometric techniques. In: WILSON, K.; WALKER, Principles and techniques of Biochemistry and molecular biology; 7ª edição; p.195-211, 2010

ARAKAWA, T.; TSUMOTO, K.; KITA, Y. CHANG, B.; EJIMA, D. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. **Amino acids**, V. 33, p. 587-605, 2007.

BANDARANAYAKE, A.D.; ALMO S.C. Recent advances in mammalian protein production. **FEBS Letters**, p. 1-8, nov. 2013.

BHOPALE, G. M.; NANDA R. K. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. **Current Science**, v. 89, n. 4, p. 614-622, ago. 2005.

BLUM H., BEIER H. GROSS H. J. The best silver stain. **Electrophoresis**, Weinheim, V. 8, p. 93-99, 1987.

BOLLATI-FOGOLÍN, M.; COMINI, M. A. Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais. In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P.,

CASTILHO, L. R.; **Tecnologia De Cultivo De Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Rio de Janeiro; Ed. Roca; p. 60-63, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria n. 142, de 6 de outubro de 1993. Inclui na Tabela de Valor de Procedimentos do SIA/SUS os medicamentos considerados excepcionais. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de outubro de 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. [on line] Saúde reforça parcerias para produção de medicamentos e no Mais Médicos Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br /index.php/cidadao/acoes-e-programas/mais-medicos/noticias-mais-medicos/9139-saude-reforca-parcerias-para-producao-de-medicamentos-e-no-mais-medicos> Acesso em: 29 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Da excepcionalidade às linhas de cuidado: o componente especializado da assistência farmacêutica. Brasília. **Série B. Textos Básicos de Saúde,** 1ª edição, p.37-54, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 17, de 16 de abril de 2010. Diário Oficial d a União, Poder Executivo, 19 de abril de 2010. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 20 de abril de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 37, de 06 de julho de 2090. Diário Oficial da União, Poder Executivo, 08 de julho de 2009.

BUTLER, M. Modificações pós-traducão em proteínas recombinantes. In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L. R.; **Tecnologia De Cultivo De Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Rio de Janeiro; Ed. Roca; p. 122-135, 2008.

BUD, R. Janus-faced biotechnology: an historical perspective. **TIBTECH**. V.7, p. 230-233, 1989.

CANDEIAS, J. A. N.; A engenharia genética. **Revista de Saúde Pública**. V. 25; p. 3-10; 1991

CARIAS, C. M., VIEIRA, F. S., GIORDANO, C. V., ZUCCHI, P.; Medicamentos de dispensação excepcional: histórico e gastos do Ministério da Saúde do Brasil**.** **Revista de Saúde Pública**. V. 45; p. 233-40; 2011.

CARINHAS, N.; OLIVEIRA, R.; ALVES, P.; M.; CARRONDO, M. J.T.; TEIXEIRA, A. P. Systems biotechnology of animal cells: the road to prediction. **Trends in Biotechnology**,V. 30, n. 7, p. 377-385, jul. 2012.

CHICO, E. *et al.* Biorreatores para células animais. In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L. R.; **Tecnologia De Cultivo De Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Rio de Janeiro; Ed. Roca; p. 218-220, 2008.

CONCEIÇÃO, C. M. **Isolamento e Caracterização Físico - Química e Química Parcial de Eritropoetina Humana Recombinante de Formulações Terapêuticas**, 2003. 175 f. [Dissertação] (Mestrado em Bioquímica) Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

CROMMELIN, D.J.A.; STORM, G.; VERRIJK, R.; LEEDE, L. de; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, V**.** 266, p.3–16, 2003.

DAMEN, C.W.N.; CHEN, W.; CHAKRABORTY, A.B.; OOSTERHOUT, M.V.; MAZZEO, J.R.; GEBLER, J.C. SCHELLENS, J.H.M.; ROSING, H.; BEJINEN, J.H. Electrospray Ionization Quadrupole Ion-Mobility Time-of-Flight Mass Spectrometry as a Tool to Distinguish the Lot-to-Lot Heterogeneity in N Glycosylation Profile of the Therapeutic Monoclonal Antibody Trastuzumab, **Journal of the American Society for Mass Spectrometry.** V. 20, n. 11, p. 2021-2033, nov. 2009.

DRANITSARI, G.; AMIR, E.; DORWARD, K. Biosimilars of Biological Drug Therapies Regulatory, Clinical and Commercial Considerations. **Drugs,** V. 71 (12), p. 1527-1536, 2011.

DOBLHOFF-DIER, O.; BLIEM, R. Quality control and assurance from the development to the production of biopharmaceuticals. **Tibtech,** V. 17, p. 266-270, jul. 1999.

ELLIOTT, S.; PHAM, E.; MACDOUGALL, I. C. Erythropoietins: A common mechanism of action. **Experimental Hematology,** V.36, p.1573–1584, 2008.

European Pharmacopeia 7.0 Erytrhopoietin concentrated solution. França: European Directorate for the quality of medicines & Healthcare, V., p. 1946-1951, jul. 2010.

FIFARMA (*Federación Latinoamericana de la Industria Farmacéutica*). **Documento oficial de posición de la Federación Latinoamericana de la Industria Farmacéutica**. México: FIFARMA; p.7, 2006. Disponível em: http://www.caeme.org.ar/documents/Documento%20FIFARMA%20Biofarmacos.pdf, Acesso em: 20 de abril de 2011.

FRIED, W. Erythropoeitin. **Annual Review of Nutrition**. V.15, p.353-377, 1995.

GILG, D., RIEDL, B., ZIER, A., ZIMMERMANN, M. F., Analytical methods for the characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using

erythropoietin as an example. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**; v.71; p. 383-394; 1996.

GIMÉNEZ, E.; HERNAN, R.R.; BENAVENTE, F.; BARBOSA, J.; NEBOT, V. S. Analysis of recombinant human erythropoietin glycopeptides by capillary electrophoresis electrospray–time of flight-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta,** V. 709, p. 81– 90, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. Células sanguíneas, imunidade e coagulação sanguínea: hemácias, anemia e policitemia. Rio de Janeiro, 11ª edição, Ed. Elsevier, p. 421-423, 2006.

HAYNES, P. A.; YATES, J. R. Proteoma profilingppitfalls and progress. **Yeast**, Davis, V. 17, p. 81-87, 2000.

HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, V. 20, p. 660-663, 1999.

ICH Q2 (R1) International Conference on Harmonisation, **Validation of analytical procedures: text and methodology.** Genebra, Novembro de 2005.

JELKMANN, W. Erythropoietin: back to basics. **Blood journal,** V. 115, n. 115, p. 4151-4152, maio 2010.

JELKMANN, W.; METZEN, E. Erythropoietin in the control of red cell production. **Annals of anatomy**, V. 178, p.391-403, 1996.

JENKINS, N.; CURLING, E.M. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. **Enzyme Microbial Technology.** V.16, p. 354-364 ; 1994.

JIANG, X. G.; APOSTOL, I.; LUO, Q.; LEWIS, J.; KEENER III, R.; LUO, S.; JERUMS, M.; ZHANG, X.; WYPYCH, J., HUANG, G. Quantification of protein posttranslational modifications using stable isotope and mass spectrometry I: Principles and applications **Analytical Biochemistry**, V. 421, p. 506–516, 2012.

JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. **Trends in Biotechnology**, V. 31, n. 8, p. 479-492, Ago. 2013.

KRATJE, R.; ETCHEVERRIGARAY, M. Controle de Qualidade de Produtos Biotecnológicos. In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L. R.; **Tecnologia De Cultivo De Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**, Rio de Janeiro; Ed. Roca; p. 321-339, 2008.

KWON, Deug-Nam; SONG, Hyuk; PARK, Jong-Yi; LEE, So-Young; CHO, Seong-Keon; KANG, Sung-Jo, JANG, Joung Soon; SEO, Han Geuk; KIM, Jin-Hoi, Dynamic control of oligosaccharide modification in the mammary gland: linking recombinant human erythropoietin. **Transgenic Research**, v.55, p. 37-55, 2006.

LOW, T. Y.; SEOW, T. K. CHUNG, M.C.M. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, V.2, p. 1229-1239, 2002.

WU, H. A new colorimetric method for the determination of plasma proteins. ***Journal Biologica Chemistry***. V.*51*, p. 33-39, 1922.

MELLADO, M. C. M.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia De Cultivo De Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica: Proteínas Recombinantes Terapêuticas.** Rio de Janeiro; Ed. Roca; p. 384-400, 2008.

MIRE-SLUIS, A. R.; GERRARD, T.; DAS, R. G.; PADILLA, A.; THORPE, R.; Biological Assays: Their Role in the Development and Quality Control of Recombinant Biological Medicinal Products. **Biologicals***,* v.24, p.351–362, 1996.

NASCIMENTO, M. C. do; ABREU, C. L. C.; COSTA, R. N.; MOURA. W. C. de; DELGADO, I. F. A eritropoietina humana recombinante: uma breve revisão com ênfase no processo de controle da qualidade, **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 43-55, jan./jun. 2013.

NOH, S. M.; SATHYAMURTHY, M.; LEE, G.M. Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. **Current Opinion in Chemical Engineering,** V. 2, p. 391–397, 2013.

OHTA, M.; KAWASAKI, N.; HYUGA, S.; HYUGA, M.; HAYAKAWA T. Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** Tokyo, V. 910, p. 1–11, 2001.

PEREIRA JUNIOR., N.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M.A. Séries em biotecnologia. **Tecnologia de Bioprocessos.** Rio de Janeiro, V.1, p. 7-17, 2008.

PAREKH, R. B. Effects of glycosylation on protein function. **Current Opinion in Structural Biology,** V.1, p. 750-754,1991.

RABILLOUD, T. *et al.* Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Weinheim, V. 18, p. 307-316, 1997.

RADER, R. A. What is a biopharmaceutical?-Part 1: (bio)technology-based definitions. **BioExecutive International,** p.60-66, mar. 2005.

RAPLEY, R. Recombinant DNA and genetic analysis. In: WILSON, K.; WALKER, Principles and techniques of Biochemistry and molecular biology; 7ª edição; p.195-211, 2010.

RUSH, Robert S.; DERBY, Patricia L.; SMITH, Duncan M.; MERRY, Catherine; ROGERS, Gary; ROHDE, Michael F.; KATTA, Viswanatham; Microheterogeneity of Erythropoietin Carbohydrate Structure. **Analytical Chemistry** . V. 67, p. 1442- 1452, 1995.

SAAVEDRA, I.; QUIÑONES, L. Intercambiabilidad de medicamentos de origen biológico (biofármacos): Consideraciones acerca de la aprobación de formulaciones biosimilares (biogenéricos) en Chile. **Revista Médica de Chile**, V. 134, p. 1583-1588, 2006.

SANTONI, V. *et al.* Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. **Electrophoresis**, Weinheim, V. 20, p. 705-711, 1999.

SCHUCK, S. Resistance of cell membranes to different detergents. **Proceedings of the Academy of Sciences U.S.A.,** Washington, V.100, n. 10, p. 5795-5800, 2003.

SCHWAMB, S.; MUNTEANU, B.; MEYER, B.; HOPF, C.; HAFNER, M.; WIEDEMANN, P. Monitoring CHO cell cultures: Cell stress and early apoptosis assessment by mass spectrometry. **Journal of Biotechnology**, V. 168, p. 452– 461, 2013.

SCHWARZ, F. AEBI M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. **Current Opinion in Structural Biology.** V. 21, n. 5, p. 576-582, out. 2011.

SHERIDAN, C.; Commercial interest grows in glycan analysis; **Nature Biotechnology.** V.25, p.145 – 146; 2007.

SHARPLES, E. J.; THIEMERMANN, C.; YAQOOB, M. M. Novel applications of recombinant erythropoietin. **Current Opinion in Pharmacology**. V.6, p.184–189, 2006.

SILVA JUNIOR, J.G.; **Cromatografia de proteínas – guia teórico-prático**. 1ª edição, Rio de Janeiro: Interciência; 2004.

SILVA JUNIOR, J.G.; **Eletroforese de proteínas – guia teórico-prático**. 1ª edição, Rio de Janeiro: Interciência; 2001.

SIMONE, S.G. **A arte de purificação e caracterização de proteínas**: Espectrometria de massas de macromoléculas biológicas. Fortaleza, Ed. RDS, p. 97-140, 2008.

SPIVAK, J. L.; Recombinant erythropoietin. **Annual Review of Medicine**, v.44, p.243-253, 1993.

SVENNERHOLM L. Quantitative estimation of sialic acid. II. A colorimetric resorcinol-hydrocloric acid method. **Biochimica Biophysica Acta**, V.24, p. 604-611, 1957.

SWIECH, K.; CASTRO, V. P.; COVAS, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expression and Purification**, V. 84, p. 147–153, 2012.

TAKEUCHI, M. KOBATA, A.; Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. **Glycobiology**. V.1, n. 4, p. 337-346, set. 1991.

WALSH, G.; **Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and applications**; Chichester; Ed. Wiley; 2007.

WALSH, G; JEFFERIS, R.; Post-translational modifications in the context of therapeutic protein. **Nature biotechnology,** v.24, p. 1241-1252, 2006.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals Drug. **Discovery Today,** V. 15, n. 17/18, p.773-780, set. 2010.

WALSH, G. Biopharmaceuticals, **Biochemistry and Biotechnology**. 2ed. England. Wiley, p. 551, 2003.

WANG, P.; DONG, S.; SHIEH, J. PEGUERO, E.; HENDRICKSON, R.; MOORE, M.A.S.; DANISHEFSKY, S.J. Erythropoietin Derived by Chemical Synthesis. **Science**, V. 342, n. 6164, p. 1357-1360, dez. 2013.

WATERS Ltda. Common Ionization How Do We Make Ions? Disponível em: http://www.waters.com/waters/pt_BR/CommonIonization/nav.htm?cid=10073251&locale=pt_BR. Acesso em: 11 dez. 2013.

WILSON, K.; WALKER, J.**Principles and techniques of Biochemistry and molecular biology**; 7ª edição; p.360-396, 2010.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, 2004.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production, **Biotechnology Advances**, V.30, p. 1158–1170, 2012.