

AValiação E CARCATERIZAÇÃO DE ERITROPOETINA HUMAN RECOMBINANTE

A.C.M. MARINHO¹, C.M. CONCEIÇÃO², F.S.Q.da SILVA², M. A. P. GIMENES³

¹ BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ,

² INCQS/FIOCRUZ, Departamento de Química

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

E-mail para contato: acarolina@bio.fiocruz.br

RESUMO – 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 um lote (Lote A) de ingrediente farmacêutico ativo (IFA) de EPO-hr, mediante determinação 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 electrospray e analisadores quadrupolo e TOF (EM-ESI-QTOF). A concentração protéica obtida para o lote A foi de 1,1 mg/mL, massa molar por SDS-PAGE de 40 kDa. O resultado obtido para 2D-PAGE evidenciaram 6 isoformas majoritárias entre pI 4,5 e 6,5. Para o ensaio de pureza, foi encontrado o percentual médio de 99%. Pela técnica EM-ESI-QTOF foi possível identificar 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 diferentes metodologias visando o controle de qualidade e/ou controle em processo possibilitaram um maior entendimento das amostras de IFA de EPO-hr.

1. INTRODUÇÃO

A inserção da tecnologia do DNA recombinante, em 1970, com o surgimento das enzimas restrição possibilitou a 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. Assim, foi possível a obtenção das moléculas de interesse em larga escala como, por exemplo, a insulina, viabilizando sua comercialização (WALSH, 2003).

Diferentes sistemas de expressão são utilizados para a produção de (bio)medicamentos, sendo cerca de 90% 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 oligossacarídeos 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).

1.1A Eritropoetina Humana Recombinante EPO-hr

Na produção da eritropoetina humana recombinante (EPO-hr), uma glicoproteína com 165 aminoácidos, figura 1, cujo padrão de glicosilação é análogo à proteína endógena, são empregadas células CHO. A EPO-hr possui massa molar que pode variar entre 34 – 40 kDa devido à microheterogeneidade da porção oligossacarídica. 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). 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).

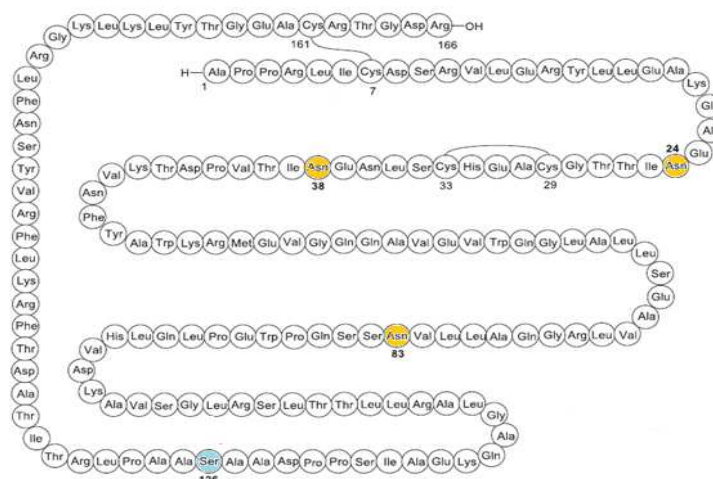


Figura 1: Sequência de aminoácidos de EPO-hr com os sítios de glicosilação identificados: N-glicosilação Asn 24; Asn 38 e Asn 83; O-glicosilação Ser 126 e as pontes dissulfeto (Adaptado de WANG *et al.*, 2013)

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).

Este trabalho tem o objetivo de avaliar e caracterizar um lote de Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) para Eritropoetina Humana Recombinante por técnicas químicas e físico-químicas. Tais técnicas são: espectrofotometria por absorção no ultravioleta (UV), eletroforese desnaturante em gel de poliácridamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletroforese bidimensional (2D-PAGE); cromatografia líquida de alta

eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e espectrometria de massas com fonte de ionização *electrospray* e analisadores quadrupolo-TOF (EM-ESI-QTOF).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes, padrões e amostra: Para análise de SDS-PAGE e 2D-PAGE foram utilizados reagentes do fabricante Merck exceto acrilamida (Sigma), bis-acrilamida (Sigma), Padrão de peso molecular (PPM) – *Silver Stain Standards, Low Range* (Bio Rad). Para análise por cromatografia em fase reversa foram utilizados reagentes Merck, e ácido trifluoracético - TFA (Tédia). Para espectrometria de massas foram utilizados os seguintes reagentes: Bicarbonato de sódio (Merck), RapiGest SF® (Waters), ditioneitol (Merck), iodocetamida (Sigma Aldrich), tripsina (Promega), TFA (Merck), Ácido Fórmico (Merck) e acetonitrila (Merck). O lote do Ingrediente Farmacêutico Ativo de EPO-hr (purificado do sobrenadante de um cultivo) foi fornecido por uma indústria farmacêutica produtora, codificado como Lote A. Como controle foi utilizado um lote material de referência de EPO-hr, contendo $243 \mu\text{g} \pm 3,6$ de alfa-EPO-hr e excipientes composto por: 60mg de trealose, 9mg de arginina, 0,3mg de tween 20, 13,5mg de NaCl e 10,6mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ com potência biológica declarada de 24393 UI.

Sistema espectrofotométrico: Foi utilizado um espectrofotômetro, modelo UV 1601-Shimadzu, com cubeta de quartzo 1cm.

Sistema cromatográfico: Sistema Dionex Ultimate® 3000 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).

Sistema de eletroforese: Mini protean III – Bio Rad, fonte eletroforética Amersham Bioscience modelo EPS 3501 XL, densitômetro Bio Rad modelo GS-800. Foi utilizado um sistema Protean IEF Cell, strips de 7 cm de comprimento, faixa de pH de 3,0 a 10,0, kit starter para eletroforese bidimensional (Bio-rad), densitômetro, GS-800 Bio-Rad, e *software* PD-Quest, Bio-Rad.

Concentração protéica por UV: Com o referido lote de IFA, em temperatura ambiente, foi retirada uma alíquota para uma cubeta de quartzo, procedendo a leitura da absorvância no espectrofotômetro Shimadzu utilizando como branco água obtida pelo sistema Milli-Q. Com base na leitura de Densidade Ótica (D.O.), foi calculada, a concentração de proteínas e a razão entre proteína e DNA

SDS-PAGE: Para verificar o peso molecular e a homogeneidade da amostra foi montado cassete para preparação do gel utilizando-se placas de vidro de 0,75mm e gel a 12% de acrilamida. A corrida eletroforética foi desenvolvida com corrente constante de 30mA e voltagem de 110V com volume de aplicação de 10 μL para o padrão de peso molecular e amostra. Após a finalização da corrida, o gel foi corado seguindo o protocolo estabelecido por Silva (2001) para coloração com Comassie e Blum, Bier e Gross (1987) para coloração com prata.

2D-PAGE: Aplicou-se 125 μ L da amostra na cuba do sistema Protean IEF Cell. Colocou-se em seguida sobre a linha do sistema strip de 7 cm de comprimento, faixa de pH de 3,0 a 10,0 (Bio-Rad). A focalização isoeletrica 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). A segunda dimensão foi feita com o gel à concentração de 12%. Após a corrida eletroforética, 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 isoeletrico de cada spot foram determinados utilizando funções específicas do programa.

CLAE-FR: De acordo com Conceição (2003), utilizou-se coluna analítica C18 Ace, solvente A: TFA 0,1% e solvente B: TFA 0,1% em acetonitrila: 1-propanol (3:1), fluxo: 1mL/min, gradiente: 0 – 5min: 2% B; 5 – 40min: 80% B; 40 – 50min: 80% B; 50 – 60min: 2% B; 60 – 70min: 2% B, volume de injeção: 100 μ L.

EM-ESI-QTOF: A 50 μ L da amostra e controle previamente dessalinizados, com concentração de 1 μ g/ μ L foram adicionados 10 μ L de bicarbonato de amônio 50mM pH 8,5, 25 μ L de solução RapiGest SF® 0,2% (um surfactante) e procedeu o aquecimento a 80°C por 15 minutos. Após 15 minutos, centrifugou-se e adicionou-se 2,5 μ L de ditiotreitol 100 mM e aqueceu-se novamente a 60°C por 30 minutos. Finalizado o tempo de aquecimento, foram adicionados 2,5 μ L 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 20 μ L de solução de tripsina 0,05 μ g/ μ L e realizou-se a hidrólise enzimática a 37°C *overnight*. Adicionou-se 10 μ L de TFA 5% e centrifugou-se a 14000 rpm a 6°C por 30 minutos. Utilizou-se para o sistema UPLC (*Ultra performance liquid chromatography*) coluna ACQUITY™ HSS (Waters) T3, 2,1 x 100 mm, fluxo 300 μ L/min, temperatura coluna 60°C, solvente A: Ácido Fórmico 0,1% e solvente B: Ácido Fórmico 0,1% em acetonitrila e gradiente: 0 - 6,06: 95% B; 6,06 – 10,06: 60%B; 10,06 – 14,06: 15% B; 14,06 – 16,06: 95%B. 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. A amostra 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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Conforme mostrado na tabela 1, pode-se concluir que o resultado para a concentração proteica foi satisfatório, já que obteve-se concentração superior a 0,3mg/mL de acordo com a Farmacopeia Europeia 7ª edição. A relação 280/260nm apresentou valor superior a 1,5, o que evidencia que há maior conteúdo proteico que DNA. Os resultados de concentração foi igual a

1,0476 mg/mL. 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.

Tabela 1 – Resultado das leituras das absorvâncias 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	0,7789	0,4233	1,0476	1,84

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

Conforme mostra a Figura 1, o gel de SDS-PAGE para o lote A, foi possível estimar a massa molar em 40,09 kDa \pm 0,78 (39,24; 40,77; 40,25 kDa respectivamente) mediante a presença de uma única banda de EPO-hr de forma difusa. Esse formato difuso deve-se a micro heterogeneidade da porção oligossacarídeo da EPO. A micro heterogeneidade desse produto está ligada ao número de repetições das unidades lactosamina (NAcGlc-Gal), e a presença de ácido siálico no final de cada ramificação das cadeias de oligossacarídeos.

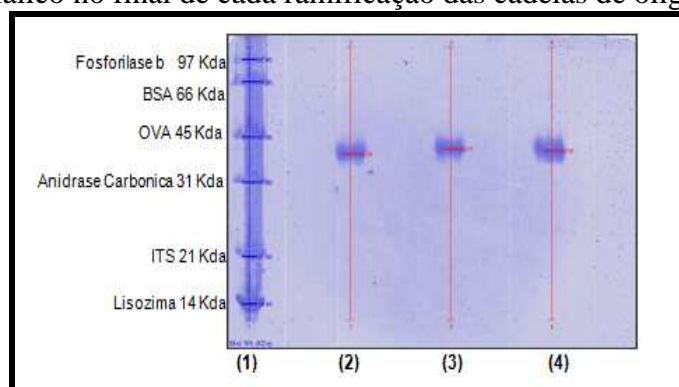


Figura 1 – SDS-PAGE para amostra de IFA lote: A. 1ª raia: Padrão de baixa massa molar; 2ª a 4ª raia: amostra em triplicata. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% desenvolvida em sistema vertical Mini-Protean III, Bio-Rad, espaçador de gel: 0,75cm. Corrida eletroforética realizada com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

O resultado de massa molar de EPO-hr para o referido lote é coerente com os dados disponíveis na literatura que pode variar de 34-40 kDa devido à variedade da composição glicídica. Sendo assim, a estimativa é satisfatória.

3.3 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

No gel bidimensional, conforme mostrado na Figura 2, pode-se observar uma única região (1) próxima a massa molar de 39 kDa apresentando seis bandas majoritárias e diferentes pontos isoeletricos, 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.

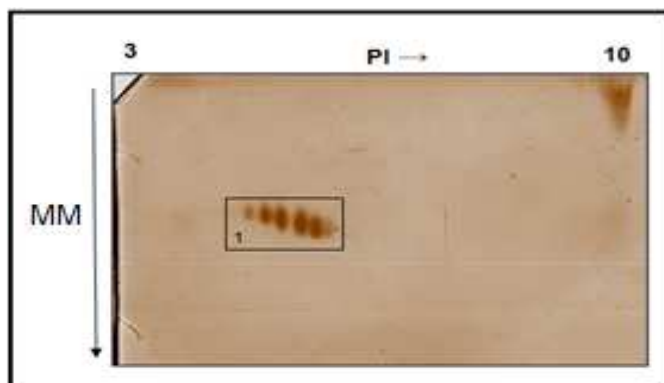


Figura 2 – Eletroforese bidimensional para EPO lote: B. Volume aplicado: 125 µL de amostra e strip de 7 cm. Primeira dimensão: Mini-Protean II Cell; Strip 3 – 10; Segunda dimensão o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%. Corrida eletroforética realizada com corrente constante de 25mA e voltagem de 110 – 150V. Tempo total: 240 minutos.

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

Conforme mostrado na Figura 3 é possível observar o perfil cromatográfico para a amostra (em preto), branco (em azul) e controle (em roxo), com resolução satisfatória. O tempo de retenção encontrado para as injeções em triplicata foram 32,815, 37,792 e 32,710 minutos e os percentuais de pureza foram 98,27, 99,26 e 98,15% respectivamente.

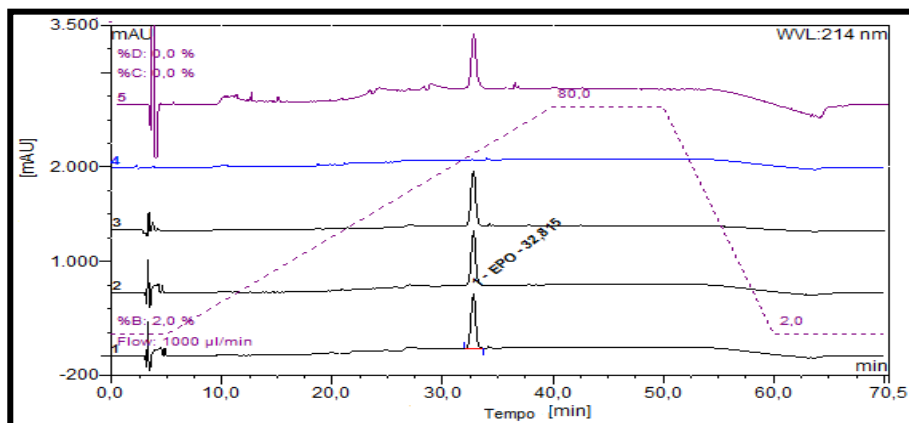


Figura 3 – Perfil cromatográfico em fase reversa. **Em roxo:** Controle, **em rosa:** Fase móvel A (branco), **em preto:** Amostra de IFA de EPO-hr em triplicata, **linha tracejada:** gradiente. **Condições:** Volume de Injeção: 100µL, Fase móvel A: 0,1% TFA; Fase móvel B: 0,1% TFA em ACN: 1-propanol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

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

Na Figura 4, pode ser observado o espectro de massas total (íons precursores) para a amostra. NA região de baixa massa é possível observar a distribuição referente a contaminação com polietilenoglicol (PEG), devido à diferença de relação massa/carga correspondente a 44 ($C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$) entre os sinais, referente ao material utilizado no preparo da amostra.

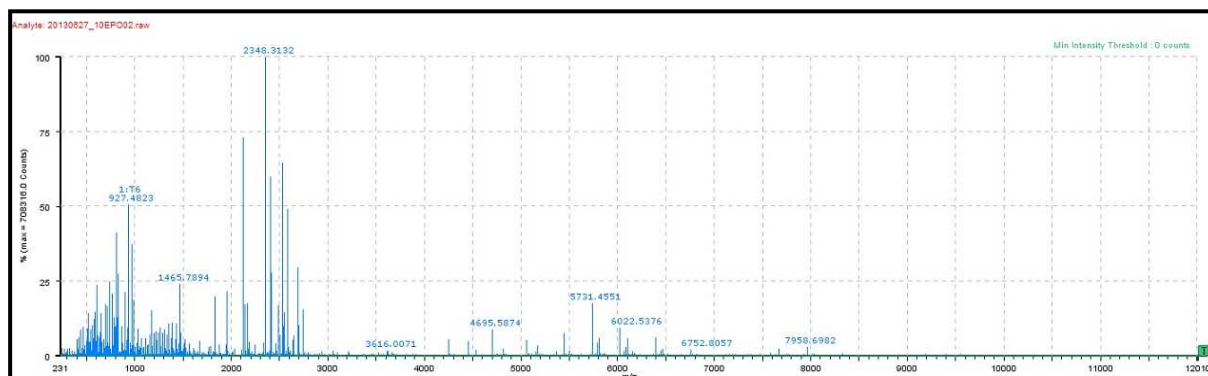


Figura 4 – Espectro total de massas referente ao lote IFA de EPO-hr. Equipamento: Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

Os peptídeos ou aminoácidos APPR, R, AVSGLR, K, GK, LK e TGDR, não foram identificados os íons precursoros na amostra com base no espectro total. A não identificação destes fragmentos deve-se ao seu tamanho, relativamente pequeno para sua detecção. Os fragmentos VLER, YLLEAK, EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK e GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK não puderam ser confirmados, com base no espectro de fragmentos, já que somente o íon precursor foi correlacionado aos sinais encontrados no espectro total de massas conforme visto no lote A.

Na Figura 5, pode ser observado o espectro de fragmentos relacionados ao peptídeo EAISPPDAASAAPLR, onde as séries “y” e “a” identificadas para o para o controle (superior) e amostra (inferior) foram demonstradas com suas respectivas massas protonadas.

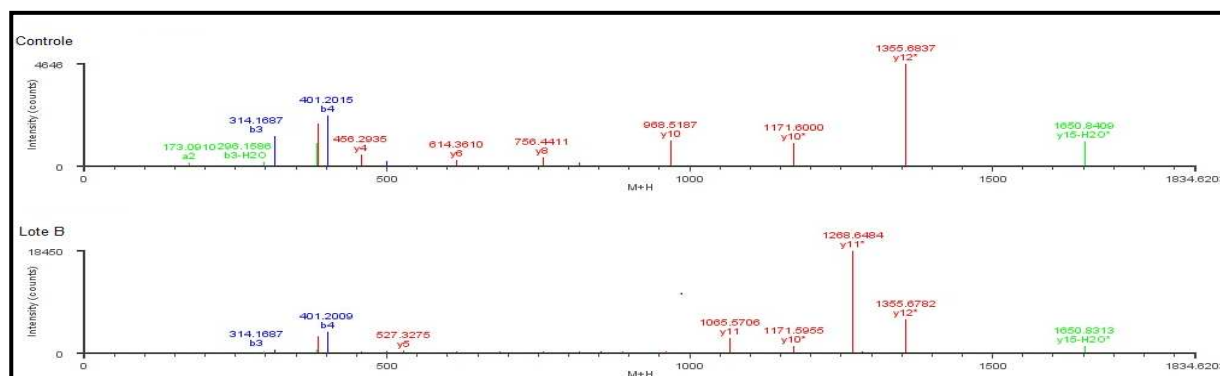


Figura 5 – Espectro de fragmentos MS^E para o controle (superior) e amostra (inferior) de IFA de EPO-hr, peptídeo: EAISPPDAASAAPLR. Espectrômetro de massas Waters Synapt G2 HDMS – tipo: ESI- QTOF

As séries y12, y11, y8, y7, y6, y5 e y4, para o peptídeo EAISPPDAASAAPLR, 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). A diferença de massa entre o íon y12 e o íon y11 é de 87,0298 Da, sugere que o sítio O-glicosilação esta posicionado no resíduo de serina na posição 6 e não na posição 12. Pode-se, ainda, 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 5.

4. CONCLUSÕES

As técnicas adotadas neste trabalho (SDS-PAGE, CLAE-FR, 2D-PAGE, UV e EM) contribuíram significativamente para melhor avaliação e caracterização do lote 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 40,09 kDa para a amostra, percentual de pureza superior a 99% por CLAE-FR, 6 isoformas majoritárias por 2D-PAGE, 1,1 mg/mL de conteúdo protéico e 10 peptídeos dos 21 teóricos calculados pelo Biopharmalynx® foram confirmados por EM.

5. REFERÊNCIAS

BUTLER, M. Modificações pós-tradução 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.

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

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

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.

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.

MIRE-SLUIJS, 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.

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

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.