

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

*AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE TROCA-IÔNICA  
NA PURIFICAÇÃO DE ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE*

**LUCIANA CARREIRAS NORTE**

RIO DE JANEIRO  
2007

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**LUCIANA CARREIRAS NORTE**

*Avaliação da Utilização de Membranas de Troca-Iônica  
na Purificação de Eritropoetina Humana Recombinante*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

**RIO DE JANEIRO**

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DE MANGUINHOS / CICT / FIOCRUZ – RJ**

Ficha Catalográfica na Fonte CICT/FIOCRUZ

Biblioteca de Manguinhos – Setor de Processamento Técnico de  
Monografias/Multimeios

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ - RJ

N863 Norte, Luciana Carreiras

Avaliação da utilização de membranas troca-iônica na purificação de eritropoetina humana recombinante / Luciana Carreiras Norte. – Rio de Janeiro, 2007.

xvii, 96 f. : il. ; 30 cm.

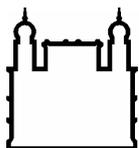
Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Tecnologia de Imunobiológicos, 2007.

Bibliografia: f. 87-96.

1. Biotecnologia. 2. Eritropoetina recombinante – isolamento e purificação.  
3. Biofármacos. 4. Cromatografia. 5. Troca iônica. I. Título.

CDD: 616.9364

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento de Controle de Qualidade, sob a orientação das Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Elezer Monte Blanco e Leda dos Reis Castilho.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**Luciana Carreiras Norte**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE TROCA-IÔNICA  
NA PURIFICAÇÃO DE ERITROPOETINA HUMANA RECOMBINANTE**

**ORIENTADORAS: Dra. Elezer Monte Blanco**  
**Profa. Dra. Leda dos Reis Castilho**

Aprovada em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**EXAMINADORES:**

**Dr. José Procópio Moreno Senna - Presidente**  
**Profa. Dra. Maria Alice Zarur Coelho**  
**Prof. Dr. Ricardo de Andrade Medronho**

Rio de Janeiro

*Aos meus referenciais,*

Meus pais, Luiz e Filomena,  
pelo apoio e confiança  
de que eu precisava.

Meu marido, André, pela paciência,  
e pelo companheirismo nesse trabalho.

Meus anjos, meus amores,  
e, acima de tudo, meus amigos:  
meus filhos; Luiza e Vitor.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), pelo apoio institucional para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

Ao Dr. Akira Homma e à toda Diretoria de Bio-Manguinhos pela oportunidade concedida, pois esse aprendizado e capacitação foi de fundamental relevância na minha especialização profissional.

À Dra. Maria da Luz Fernandes Leal, pelo apoio e incentivo, de grande importância para mim.

À Coordenação do Curso de Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, pela preocupação com seus mestrandos, especialmente à coordenadora do curso Dra. Sheila Farage, que sempre conduziu seu trabalho com responsabilidade, e à secretária, Zaíra Antunes, por todo carinho, dedicação e atenção.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação do Instituto Oswaldo Cruz que ofereceram o estímulo ideal para a minha dedicação, de fundamental importância na minha atualização profissional.

À todos os amigos da turma, MPTI/2005, com quem dividi grandes momentos. Foram dois anos inesquecíveis!

À Darcy Akemi Hokama e Ana Lúcia Palmigiani, (responsável pelo DEQUA e pelo LAFIQ), pelo apoio e oportunidade que me ofereceram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle Físico-Químico (LAFIQ), por toda colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À Cristine Maria de Lima e Izabel Cristina Crespo pelo apoio.

Em especial às amigas Ana Paula Leal, Maria Denise Neves e Virginia Finete, por todo subsídio computacional, experimental e os outros que, porventura, aparecessem..OBRIGADA!

Aos amigos do LECC, Maria Cândida Melado e em especial à Leandro Lobo, Romi Lamb Machado e Rodrigo Coelho.

Aos colegas Alejandro Portillo Vaquer, David Curbelo Rodríguez, Dr. Ernesto Chico, do Centro de Inmunología Molecular (Cuba).

Ao grande amigo Adriano Campos, quem me deu forças e coragem para iniciar essa brilhante jornada.

Aos colegas do laboratório do Profº Geraldo Rodrigues Armoa, pela utilização do espaço, para realização de uma das etapas desse importante trabalho.

Às exemplares e grandes profissionais, verdadeiras “mestras”, incentivadoras desse precioso trabalho que colabora para a melhoria da qualidade de saúde desse país e do mundo, com quem aprendi muito, grandes idealizadoras e acima de tudo grandes amigas: Dra. Márcia Terezinha Baroni e Dra. Maria da Glória Martins Teixeira. Obrigada!

Ao revisor: Dr. José Procópio Moreno Senna. Obrigada pela ilustre e brilhante presença em minha banca, pelas correções e sugestões na redação desta monografia, bem como por todo o tempo e paciência dispensados a este trabalho. Obrigada por tudo!

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar da análise desta tese.

Às minhas orientadoras, Dra. Elezer Monte Blanco e Dra. Leda dos Reis Castilho.

Aos meus familiares, amigos, marido e filhos que entenderam minha ausência temporária em muitos eventos.

Agradeço em especial à “Super-Kika” (Cleuza de Andrade Ribeiro), que se superou em todos os momentos, não só meu braço direito, mas meus dois braços e minhas duas pernas em casa. OBRIGADA!

Agradeço a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a execução deste trabalho, muito obrigada!

Não poderia deixar de agradecer a Deus, que está todo o tempo me carregando no colo, me dando forças e coragem para seguir em frente, superando todos os grandes desafios e obstáculos. OBRIGADA POR MAIS ESSE!!!

***“A única coisa que importa é colocar  
em prática, com sinceridade e  
seriedade, aquilo em que se acredita.”***  
*Dalai Lama*

## ÍNDICE

I. Introdução	1
I.1 Biotecnologia	1
I.2 Biofármacos	2
I.3 A eritropoetina	13
I.4 O Cultivo de Células Animais	20
I.5 O Processo de Purificação de Biofármacos	26
I.6 Processos Cromatográficos	28
I.7 Membranas Adsorativas	31
I.7.1 Membranas Adsorativas de Troca Iônica	37
I.8 Processos de Produção e Purificação de Eritropoetina	39
II. Objetivos	44
III. Materiais	45
III.1 Sobrenadante de Cultura Contendo Eritropoetina Humana Recombinante	45
III.2 Insumo Farmacêutico Ativo e EPO Semi-Pura	45
III.3 Membranas de Adsorção	45
III.4 Soluções Utilizadas nos Ensaio de Adsorção	47
III.5 Soluções Empregadas nos Ensaio Analíticos	49
IV. Métodos	51
IV.1 Ensaio Cromatográficos de Purificação da Eritropoetina	51
IV.2 Métodos Analíticos	52
IV.2.1 Determinação de Proteínas Totais pelo Método de Bradford	52
IV.2.2 Eletroforese SDS-PAGE	53
IV.2.3 Ensaio de HPLC de Fase Reversa	55
IV.2.4 Imunoensaio do Tipo <i>dot-blot</i>	55
V. Resultados e Discussão	57
V.1 Membrana D	57
V.2 Membrana Q	64
V. 3 Concentração das Etapas Cromatográficas das Membranas	71
V. 4 Análises de RP-HPLC	75
V. 5 Imunoensaio do tipo <i>dot-blot</i>	80
VI. Conclusões e Sugestões	83
Referências Bibliográficas	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AeDNV</b>	Do termo científico “ <i>Aedes aegypti densovirus</i> ”
<b>AIDS</b>	Do termo inglês “ <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> ” – Síndrome da Deficiência Imune Adquirida
<b>AIH</b>	Autorizações de Internação Hospitalar
<b>APS</b>	Persulfato de amônio
<b>BHK</b>	Do termo inglês “ <i>Baby Hamster Kidney</i> ” – Rim de hamster neonato
<b>BCIP/NBT</b>	Bromo-cloro-indolil-fosfato / NitroBlue Tetrazolium, Solução de substrato de fosfatase alcalina
<b>BSA</b>	Do termo inglês “ <i>Bovine Serum Albumin</i> ” – Albumina de soro bovino
<b>CD4-Ig</b>	Imunoglobulina CD4
<b>CD52</b>	Antígeno
<b>CHO</b>	Do termo inglês “ <i>Chinese hamster ovary cells</i> ” – Células de ovário de hamster chinês
<b>CIGB</b>	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
<b>CIM</b>	Centro de Inmunología Molecular
<b>CIPBR</b>	Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbônico
<b>CPFI</b>	Centro de Processamento Final
<b>CTV</b>	Centro Tecnológico de Vacinas
<b>DEAE</b>	Do termo inglês “ <i>Diethylaminoethyl</i> ” – dietilaminoetil
<b>DIAC-RIAC</b>	Do termo inglês “ <i>Direct Immunoaffinity chromatography and Reverse Immunoaffinity Chromatography</i> ” – Cromatografia por imunoafinidade direta e cromatografia por imunoafinidade reversa
<b>DNA</b>	Do termo inglês “ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ” – Ácido desoxirribonucleico
<b>DST</b>	Doença Sexualmente Transmissível
<b>DTT</b>	Di-tio-treitol

<b>ELISA</b>	Do termo inglês “ <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> ” - teste imunoenzimático que permite a detecção de proteínas especificamente
<b>EPO</b>	Eritropoetina humana recombinante
<b>EPO-R</b>	Do termo inglês “ <i>Erythropoietin Receptor</i> ” – receptor de EPO
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FDA</b>	Do termo inglês “ <i>Food and Drug Administration</i> ” – agência regulatória dos Estados Unidos
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FSH</b>	Do termo inglês “ <i>Follicle-Stimulating Hormone</i> ” – Hormônio de crescimento de folículo
<b>Fuc</b>	Fucose
<b>Gal</b>	Galactosamina
<b>G-CSF</b>	Do termo inglês “ <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> ” – Fator estimulante de colônias de granulócitos
<b>HSA</b>	Do termo inglês “ <i>Human Serum Albumin</i> ” – Albumina de soro humano
<b>HBsAg</b>	Do termo inglês “ <i>Hepatitis B Antigen</i> ” – Antígeno de hepatite B.
<b>HeLa</b>	Linhagem celular oriunda de tumor cervical humano
<b>HEWL</b>	Do termo inglês “ <i>Hen egg white lysozyme</i> ” – Lisozima da clara do ovo
<b>HIV1-gp120</b>	Do termo inglês “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ” – Vírus da imunodeficiência humana (glicoproteína 120)
<b>HSV-gB2</b>	Do termo inglês “ <i>herpes simplex virus glycoprotein B2</i> ” – Glicoproteína do vírus herpes (glicoproteína B2)
<b>IFA</b>	Ingrediente Ativo Farmacêutico
<b>INF</b>	Interferon
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IRC</b>	Insuficiência Renal Crônica
<b>MA100</b>	Membrana Adsorptiva modelo 100
<b>MA75</b>	Membrana Adsorptiva modelo 75
<b>MAb</b>	Do termo inglês “ <i>Monoclonal Antibody</i> ” – Anticorpo monoclonal
<b>MAb/CD20</b>	Anticorpo monoclonal que reconhece CD20
<b>MAb/HER2</b>	Anticorpo monoclonal que reconhece HER2

<b>MAb/miosina</b>	Anticorpo monoclonal que reconhece miosina
<b>MAb/n.d.</b>	Anticorpo monoclonal (epítopo não-disponível)
<b>Man</b>	Manose
<b>M-CSF</b>	Do termo inglês “ <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> ” – fator estimulante de colônias de macrófagos
<b>MDCK</b>	Do termo inglês “ <i>Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells</i> ” – Células epiteliais de rim canino
<b>MRC-5</b>	Linhagem celular oriunda de pulmão humano
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NacGlc</b>	N-Acetil-Glicosamina
<b>PAB</b>	Piso de Atenção Básica
<b>PBS</b>	Do termo inglês “ <i>Phosphate buffered saline</i> ” – Solução salina tamponada com fosfato
<b>PCT</b>	Do termo inglês “ <i>Patent Cooperation Treaty</i> ” – Tratado de cooperação de patentes
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PM</b>	Peso molecular (massa molar)
<b>rh-EPO</b>	Do termo inglês “ <i>Recombinant Human Erythropoietin</i> ” – Eritropoetina humana recombinante
<b>RP-HPLC</b>	Do termo inglês “ <i>Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i> ” – Cromatografia líquida de alto desempenho com coluna de fase reversa.
<b>rtPA</b>	Ativador de plasminogênio tecidual recombinante
<b>S</b>	Enxofre
<b>SDS-Page</b>	Do termo inglês “ <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ” – Eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio
<b>SN</b>	Sobrenadante
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>SV 40</b>	Do termo inglês “ <i>Simian Virus 40</i> ” – Vírus símio 40
<b>TEMED</b>	Do termo inglês “ <i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i> ” – Tetrametiletlenodiamina
<b>TP eq.</b>	Tampão de equilíbrio

<b>tPA</b>	Do termo inglês “ <i>Tissue Plasminogen Activator</i> ” – ativador de plasminogênio tecidual
<b>USP</b>	Do termo inglês “ <i>United States Patent</i> ” – Patente dos EUA
<b>VSV</b>	Do termo inglês “ <i>Vesicular Stomatitis Vírus</i> ” – Vírus da estomatite vesicular.
<b>WI-38</b>	Linhagem celular de fibroblastos de pulmão humano
<b>WIPO</b>	Do termo inglês “ <i>World Intellectual Property Organization</i> ” – Organização Mundial da Propriedade Intelectual

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produtos licenciados provenientes de células animais	5
Tabela 2: Biofármacos em comercialização e empresas produtoras	7
Tabela 3: Custos em reais dos medicamentos de dispensação em caráter excepcional	9
Tabela 4: Principais características e aplicações das diferentes linhagens celulares	22
Tabela 5: Sistemas de cultivo de células animais	24
Tabela 6: Modo de operação para o cultivo das células animais	25
Tabela 7: Técnicas empregadas nas etapas de recuperação e purificação de bioprodutos	28
Tabela 8: Propriedades protéicas exploradas na separação e suas técnicas cromatográficas	29
Tabela 9: Membranas de troca iônica disponíveis comercialmente	37
Tabela 10: Aplicações de membranas adsortivas de troca-iônica	38
Tabela 11: Artigos da literatura relacionados à purificação de eritropoetina	39
Tabela 12: Patentes relacionadas à purificação de eritropoetina	42
Tabela 13: Grupos funcionais dos trocadores aniônicos utilizados	46
Tabela 14: Especificação dos módulos de membranas adsortivas utilizados	46
Tabela 15: Descrição dos ensaios cromatográficos com a membrana D	47
Tabela 16: Descrição dos ensaios cromatográficos com a membrana Q	48
Tabela 17: Soluções utilizadas nos ensaios de eletroforese SDS-PAGE	49
Tabela 18: Detalhamento das etapas cromatográficas no ensaio com a membrana D	59
Tabela 19: Detalhamento das etapas cromatográficas no ensaio com a membrana Q	65
Tabela 20: Detalhamento das concentrações nas etapas do ensaio com membrana D	72
Tabela 21: Detalhamento das concentrações nas etapas do ensaio com membrana Q	73
Tabela 22: Percentagem de área (em mg de eritropoetina) nos ensaios com as membranas	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Custo anual por paciente das dez proteínas terapêuticas mais vendidas no mundo	10
Figura 2: Gastos do Ministério da Saúde com medicamentos excepcionais	12
<i>Figura 3: Esquema de atuação da eritropoetina</i>	13
<i>Figura 4: Estrutura primária da eritropoetina circulante</i>	15
<i>Figura 5: Estrutura tridimensional da eritropoetina</i>	15
<i>Figura 6: Detalhamento da estrutura dos glicanos ligados à molécula de eritropoetina</i>	17
<i>Figura 7: (A) Resina cromatográfica; (B) Membrana de adsorção</i>	34
Figura 8: Membrana adsortiva de troca-iônica em módulo MA75 (75 cm <sup>2</sup> )	36
Figura 9: Membranas adsortivas para processos em larga escala	36
Figura 10: Determinação da concentração (Bradford) das amostras - Sartobind D	58
Figura 10: Eluição da membrana D (D1/3). Eletroforese em gel de poliacrilamida	61
Figura 11: Eluição da membrana D (D2/3). Eletroforese em gel de poliacrilamida	62
Figura 12: Eluição da membrana D (D3/3). Eletroforese em gel de poliacrilamida	63
<i>Figura 13: Determinação da concentração (Bradford) das amostras - Sartobind Q</i>	66
Figura 15: Eluição da membrana Q (Q1/3). Eletroforese em gel de poliacrilamida	68
Figura 16: Eluição da membrana Q (Q2/3). Eletroforese em gel de poliacrilamida	69
Figura 17: Eluição da membrana Q (Q3/3). Eletroforese em gel de poliacrilamida	70
Figura 18: Concentração da Eritropoetina (mg) nas etapas cromatográficas - membrana D	72
Figura 19: Concentração da Eritropoetina (mg) nas etapas cromatográficas - membrana Q	73
Figura 20: Concentração da Eritropoetina (mg) nas etapas cromatográficas - membrana D	74
Figura 21: Concentração da Eritropoetina (mg) nas etapas cromatográficas - membrana Q	74
Figura 22: Análise por RP-HPLC de amostra de sobrenadante - membrana D	76
Figura 23: Análise por RP-HPLC de amostra de EPO comercial (Eritromax <sup>®</sup> )	76
Figura 24: Análise por RP-HPLC de amostra de EPO semi-pura	77
Figura 25: Análise por RP-HPLC de amostra 10, eluída da membrana D com NaCl 0,3 M	77
Figura 26: Análise por RP-HPLC de amostra 11, eluída da membrana D com NaCl 0,4M.	78
Figura 14: Análise por RP-HPLC de amostra 12, eluída da membrana D com NaCl 0,5M.	78
Figura 15: Análise por RP-HPLC de amostra 13, eluída da membrana D com NaCl 1,0M.	79
Figura 26: Análise por imunoenensaio <i>dot-blot</i>	81
Figura 27: Percentagem de Eritropoetina – Membrana D	84
Figura 28: Percentagem de Eritropoetina – Membrana Q	85

## RESUMO

Nesta avaliação, realizaram-se ensaios cromatográficos de purificação de eritropoetina humana recombinante, a partir do sobrenadante de cultura de células de mamíferos da linhagem CHO (células de ovário de hamster chinês), produtoras deste biofármaco. Compararam-se as membranas comerciais de troca iônica Sartobind (MA) Q e D, com o objetivo de avaliar a sua aplicabilidade a processos de purificação de EPO.

Ambas as membranas apresentaram-se capazes de adsorver EPO nas condições avaliadas. EPO foi detectada nas amostras de eluído de ambas as membranas, tendo-se verificado que o imunoenensaio do tipo *dot-blot* foi aquele que forneceu as informações mais conclusivas. Já nas análises de eletroforese, verificou-se um perfil difuso das bandas do eluído das membranas, o que foi creditado à heterogeneidade glicídica da EPO, como anteriormente demonstrado na literatura.

## **ABSTRACT**

In the present work, the purification of recombinant human erythropoietin (rhEPO) from CHO (Chinese hamster ovary) cell culture supernatant was investigated using anion-exchange chromatography. Commercial membrane adsorbers (Sartobind D and Q) were compared, with the aim of evaluating their applicability to EPO purification processes.

Both membranes were able to adsorb EPO under the conditions evaluated in this work. EPO was detected in the eluate of both membranes. The immunoassay dot-blot was the most interesting analytical tool, giving the most conclusive results. Electrophoretic analyses showed a diffuse band, probably due to glycan heterogeneity in the EPO molecules, as previously reported in the literature.

# I. Introdução

---

## I.1 Biotecnologia

Entre 1950 e 1980, ocorreu um expressivo desenvolvimento de conhecimentos relacionados à cinética de crescimento celular e à de reações catalisadas por enzimas; aos fenômenos de transporte que têm relevância em bioprocessos e à recuperação, separação e purificação de bioprodutos.

Com isso, nos últimos anos, ocorreu um relevante (e rápido) desenvolvimento na área da Biotecnologia, que se baseia em processos tecnológicos que permitem a utilização de material biológico (plantas e animais) para a obtenção de produtos de interesse para o homem. Este desenvolvimento teve, como consequência, o aparecimento de novos processos industriais (Menezes et al., 1992).

Tais avanços, especificamente no campo da Engenharia Bioquímica, propiciaram, entre outros resultados, a otimização de meios de cultivo, o desenvolvimento de biorreatores, o aumento nas taxas de transferência de oxigênio bem como o uso de ferramentas de modelagem e de simulação para o aprimoramento de bioprocessos.

Os processos biotecnológicos têm atualmente uma vasta aplicação em setores tais como agricultura (adubos, pesticidas, plantas transgênicas,...), alimentação (pães, queijos, proteínas de organismos unicelulares...), química (butanol, acetona, enzimas...), energia (etanol e biogás), eletrônica (biosensores), meio-ambiente (recuperação de petróleo e tratamento de rejeitos) e saúde (hormônios, vacinas, biomedicamentos, antibióticos...). Portanto, os processos biotecnológicos vêm sendo largamente empregados para a produção de uma vasta gama de produtos com diferentes valores comerciais.

## I.2 Biofármacos

Os avanços no conhecimento da base molecular das doenças, ao longo do século XX, permitiram identificar um grande número de polipeptídeos de potencial terapêutico. Entretanto, devido às baixas concentrações em que se encontram em organismos sadios, tornava-se, na maioria dos casos, inviável obtê-los com base na extração direta a partir de tecidos ou de doadores.

Todavia, o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, na década de 1970, forneceu as ferramentas necessárias para que se pudessem produzir proteínas humanas, utilizando outras células como hospedeiras. Tornava-se possível, portanto, produzir proteínas terapêuticas com alta pureza e em largas quantidades. Entretanto, como a maioria das proteínas de uso terapêutico apresenta estrutura complexa e se mostra, geralmente, glicosilada, ainda se enfrentava o desafio de para produzir as proteínas com conformação e padrão de glicosilação adequados.

Ora, em glicoproteínas, as cadeias de carboidratos, muitas vezes subestimadas, são relativamente longas e se localizam na parte externa da molécula. Esta grande proporção de carboidratos, associada à sua localização periférica, influencia fortemente as propriedades bioquímicas e físico-químicas das glicoproteínas. Por exemplo: quando cadeias de carboidratos são removidas de uma glicoproteína, sua massa molar é reduzida e a molécula torna-se menos hidrofílica, ocasionando queda de sua solubilidade e formação de homólogos, devido à superexpressão intracelular (Singh et al.,1999).

Inicialmente, tentou-se produzir essas proteínas em bactérias e leveduras. Contudo, os resultados demonstraram que algumas possuíam estruturas muito complexas que dificultavam sua produção por meio destes microorganismos (Damm, 1998). Assim, iniciou-se a produção em células animais cultivadas *in vitro*, tendo-se obtido resultados extremamente satisfatórios, por exemplo através do uso de células da linhagem CHO (*Chinese hamster ovary cells*). No entanto, uma desvantagem observada foi a baixa produtividade obtida em cultivos com células animais.

Com relação às proteínas recombinantes de uso terapêutico, conhecidas como biofármacos, cumpre notar que se tornaram realidade na indústria biofarmacêutica, com a aprovação:

- I) Em 1985, da insulina recombinante;
- II) Em 1986, do hormônio de crescimento humano recombinante e
- III) Em 1998, do ativador de plasminogênio tecidual (tPA) (Damm).

Os dois primeiros, por se tratarem de proteínas mais simples, tiveram sua produção baseada em microorganismos, enquanto o tPA consistiu no primeiro biofármaco produzido por células animais a ser aprovado para uso humano.

Atualmente, muitas proteínas recombinantes para o tratamento de diversas doenças já tiveram sua comercialização autorizada pelas agências regulatórias e outras se encontram em estágio de desenvolvimento e testes clínicos.

Além disso, vários produtos, obtidos através de cultivo de células animais, para uso terapêutico e diagnóstico, foram licenciados. Outros, encontram-se em testes clínicos ou em fases finais de aprovação (Walsh, 2003). A Tabela 1 demonstra diversos exemplos de biofármacos obtidos através do cultivo de células animais, já licenciados para comercialização. Já a Tabela 2 mostra as empresas fabricantes de alguns dos biofármacos atualmente disponíveis comercialmente.

Alguns exemplos de biofármacos importantes -e disponíveis comercialmente- são os fatores sanguíneos VIII e IX, usados no tratamento de hemofílicos; a eritropoetina humana recombinante(usada no tratamento de anemia) e anticorpos monoclonais (MAbs), empregados no combate a vários tipos de câncer (Castilho e Medronho, 2002). Há também outros anticorpos monoclonais em pesquisa, focalizando, por exemplo, o tratamento da AIDS (Castilho, 2001; Kunert et al, 2000).

De todas as células utilizadas para a produção de biofármacos, as células CHO constituem o sistema de expressão mais empregado nos cultivos celulares (Andersen e Krummen, 2002; Cavalcanti, 2003). Sua predominância torna-se clara na Tabela 1.

A linhagem celular CHO.K1 foi isolada de clones de ovário de hamster chinês por Puck e colaboradores em 1957. Esta linhagem celular apresenta como vantagens a capacidade de secretar, no meio de cultivo extracelular, as proteínas recombinantes expressas. Além disso, as células CHO apresentam semelhança de suas enzimas de glicosilação com as enzimas das linhagens celulares humanas, ponto importante para a produção de biofármacos, uma vez que as proteínas recombinantes apresentam padrão de glicosilação semelhante ao das proteínas nativas. Adicionalmente, apresenta propícia na literatura especializada o conhecimento de sua fisiologia, das condições adequadas de cultivo da segurança dessas células (Altamirano, 2000). Por fim, são células estáveis e podem-se multiplicar tanto em suspensão quanto aderidas a um suporte, produzindo eficientemente proteínas heterólogas (Doyle & Griffiths, 1998).

**Tabela 1: Produtos licenciados provenientes de células animais**

<b>Produto</b>	<b>Proteína ou MAb/ Antígeno</b>	<b>Indicação</b>	<b>Células</b>	<b>Ano de Aprovação e País</b>
Activase	t-PA	Infarte agudo do miocárdio	CHO	1987, vários
Avonex	$\beta$ -interferon	Esclerose múltipla	CHO	1986, EUA
Bene Fix	Fator sanguíneo IX	Hemofilia B	CHO	1997, EUA
Campath/ Alemtuzumab	MAb humanizado/ CD52	Lucemia linfática crônica	CHO	2001, EUA
Cerezyme	glucocerebrosidase	Doença de Gaucher	CHO	1994, EUA, Áustria, Nova Zelândia
Enbrel/ Etanercept	Proteína de fusão	Artrite reumatóide	CHO	1998, EUA
Epogen/ Procrit	EPO	Anemia	CHO	1989, vários
Epogin/ Recormon	EPO	Anemia	CHO	1990, Japão, Europa
GenHevac B Pasteur	HBsAg	Hepatite B	CHO	1989, França
Gonal-F	FSH	Infertilidade feminina	CHO	1995, Suécia, Finlândia, EUA
Granocyte	G-CSF	Anemia, Neutropenia	CHO	1991, Japão, Europa
HB Gamma	HBsAg	Hepatite	CHO	1990, Japão
Herceptin/ Trastuzumab <sup>a</sup>	MAb/HER2	Câncer de mama	CHO	1998, EUA
Infliximab/ Remicade <sup>a,b</sup>	MAb/TNF $\alpha$	Doença de Crohn	---	1998, EUA
Kogenate <sup>b</sup>	Fator sanguíneo VIII	Hemofilia A	BHK	1993, vários
MAbs para diagnóstico <i>in vitro</i>	Cerca de 100 diferentes	Vários	várias	1980, vários
Myoscint <sup>c</sup>	MAb/miosina	Agente de imagem cardíaca	---	1989, Europa, EUA

**Tabela 1 (continuação):**

<b>Produto</b>	<b>Proteína ou MAb/ Antígeno</b>	<b>Indicação</b>	<b>Células</b>	<b>Ano de Aprovação e País</b>
Novo Seven	Fator sanguíneo VIIa	Hemofilia A e B	BHK	1996, Suíça, Europa, EUA
Panorex <sup>a</sup>	MAb/---	Câncer colorretal	---	1995, Alemanha
Prosta Scint <sup>c</sup>	MAb/PSMA	Câncer de próstata	---	1996, EUA
Pulmozyme	DNAseI	Fibrose cística	CHO	1993, Suécia, EUA, Suíça
Puregon	FSH	Infertilidade feminina	---	1996, Dinamarca
Recombinate	Fator sanguíneo VIII	Hemofilia A	CHO	1992, vários
Refacto <sup>b</sup>	Fator sanguíneo VIII	Hemofilia A	CHO	2000, EUA
ReoPro <sup>a,b</sup>	MAb/Platelet IIb/IIIa	Complicações cardíacas	Mieloma de rato	1994, EUA
Rituxan	MAb/CD20	Linfoma do tipo non-Hodgkin	CHO	1997, EUA
Simulect/ Basiliximab	MAb/IL2R $\alpha$	Rejeição aguda ao transplante de rim	Mieloma de rato	1998, EUA
TNKase/ Tenecteplase	tPA	Infarte agudo do miocárdio	CHO	2000, EUA
Verluma <sup>c</sup>	MAb/---	Câncer de pulmão	Hibridoma	1996, EUA
Wellferon	Interferon $\alpha$ -N1	Hepatite C	Linfoblastóide humano	1999, EUA

Fonte: Castilho e Medronho, 2002.

---: informação não disponibilizada;

CHO: linhagem de células de hamster isolada em 1957 por Puck *et al.*;

BHK: linhagem de células de hamster isolada em 1963 por Stoker *et al.*;

<sup>a</sup> anticorpo monoclonal de uso terapêutico;

<sup>b</sup> produzido por processo contínuo de cultivo em perfusão;

<sup>c</sup> anticorpo monoclonal para diagnóstico *in vivo*.

***Tabela 2: Biofármacos em comercialização e empresas produtoras***

---

<b><i>Produto</i></b>	<b><i>Empresa</i></b>
Abbott Prism HBsAg	Abbott Laboratories
Actimunne	Intermune
Advate	Baxter Healthcare Corp.
Albumina Humana	OCTAPHARMA Pharmazeutika Austria
Anti-Human Globulin Solidscreen II	Biotest AG, Germany
Aralast	Baxter Healthcare Corp.
Auszyme Monoclonal	Abbott Laboratories
Avonex	Biogen
Benefix	Genetics Institute
Cerezyme	Genzyme
Epogen	Amgen
Kogenate FS, Helixate FS	Bayer Corp.
Intron-A	Schering Plough
Neupogen	Amgen
Octagam	OCTAPHARMA Pharmazeutika Austria
Procrit	Amgen / J&J
Proleukin	Chiron
Roferon-A	Roche
Tubersol	Sanofi Pasteur Limited
Vivaglobin	ZLB Behring

---

Fonte: [www.fiocruz.br/](http://www.fiocruz.br/), acessado em 22/01/2007.

No Brasil, o setor de biofármacos ainda é muito incipiente. Felizmente - e de forma pioneira - Bio-Manguinhos / FIOCRUZ iniciou, em 2003, a transferência de tecnologia visando à produção de dois biofármacos: eritropoetina (EPO), usada no tratamento da anemia associada à insuficiência renal crônica, AIDS ou quimioterapia, e interferon- $\alpha$ , indicado no tratamento de hepatites virais e alguns tipos de câncer. A produção destes biofármacos será totalmente nacionalizada em 2009, gerando uma economia de cerca de R\$ 40 milhões anuais para o País.

Entretanto, biofármacos são medicamentos caros e, por essa razão, os principais encontram-se incluídos na relação de “Medicamentos Excepcionais” do Ministério da Saúde. Como pode ser observado na Figura 1, o custo anual, por paciente, no caso das dez proteínas terapêuticas mais vendidas no mundo, varia entre US\$ 10000 e US\$ 53000. Como os medicamentos excepcionais caracterizam-se pelo alto custo, os mesmos devem ser, por lei, fornecidos pelo Estado (governos federal e estaduais) aos pacientes.

Em 2005, os medicamentos excepcionais representaram, cerca de 23,8% dos gastos do Ministério da Saúde. Os gastos ministeriais incluem, além daqueles, os medicamentos constantes:

- a) Dos Programas Estratégicos (AIDS e imunobiológicos);
- b) Da assistência farmacêutica básica;
- c) Do tratamento de coagulopatias e
- d) Da atenção hospitalar (em caso de internação e, uso de medicamentos oncológicos) (Tabela 3).

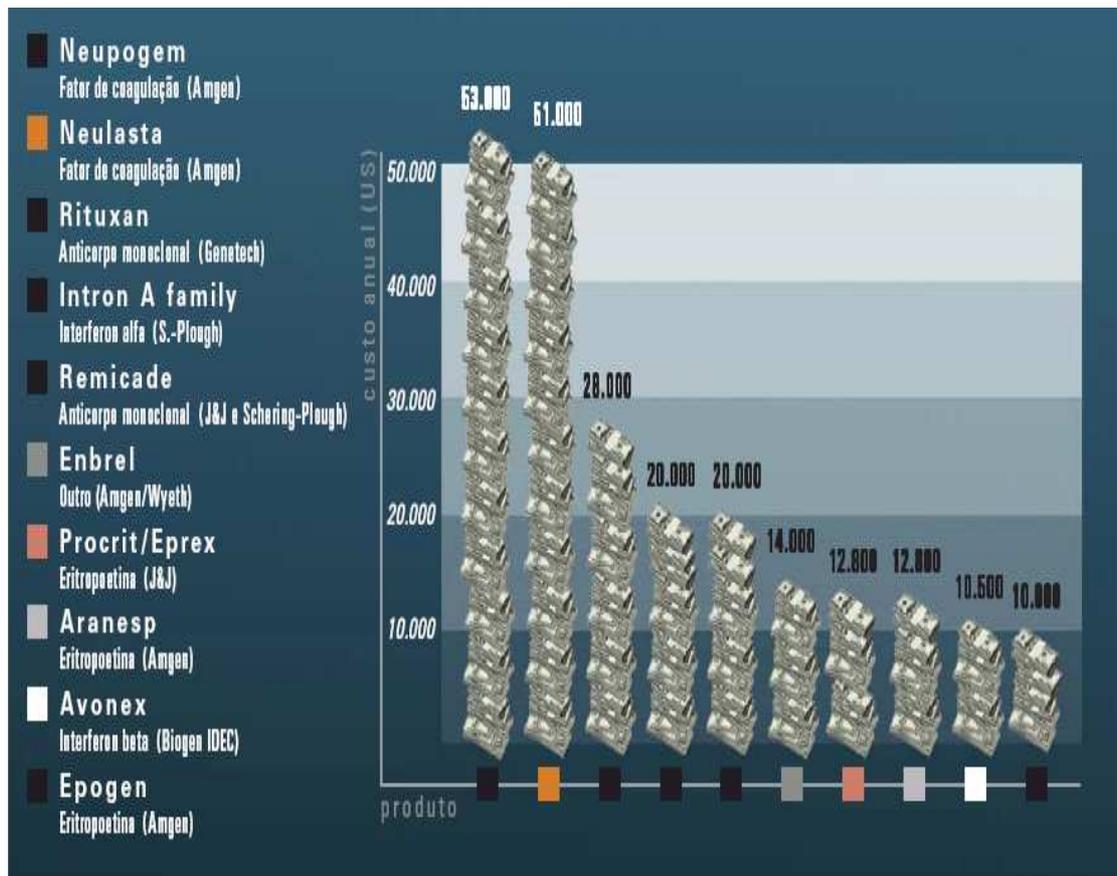
**Tabela 3: Custos em reais dos medicamentos de dispensação em caráter excepcional**

<i>Categoria</i>	<i>Valor gasto pelo governo federal (R\$)</i>			
	<i>2002</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>
Medicamentos de dispensação excepcional (alto custo), mediante repasse de teto financeiro aos Estados	489.533.000	519.789.868	871.799.950	1.027.436.000
Medicamentos para atender os Programas Estratégicos, incluindo DST/AIDS e Imunobiológicos	997.179.443	1.379.077.507	1.538.130.000	1.792.320.000
Incentivo financeiro a municípios habilitados relativo ao piso de atenção básica (PAB) para a assistência farmacêutica básica (R\$ 1,65/habitante/ano)	166.399.378	173.920.923	192.971.930	281.000.000
Atenção aos portadores de coagulopatias	273.140.592	112.445.058	208.000.000	223.000.000
Medicamentos cobertos na atenção hospitalar (AIH + Oncológicos)	560.896.153	703.523.016	882.000.000	1.000.000.000
<b>Total Anual</b>	<b>2.487.148.566</b>	<b>2.888.756.372</b>	<b>3.692.901.780</b>	<b>4.323.756.000</b>

Fonte: Messeder, 2005.

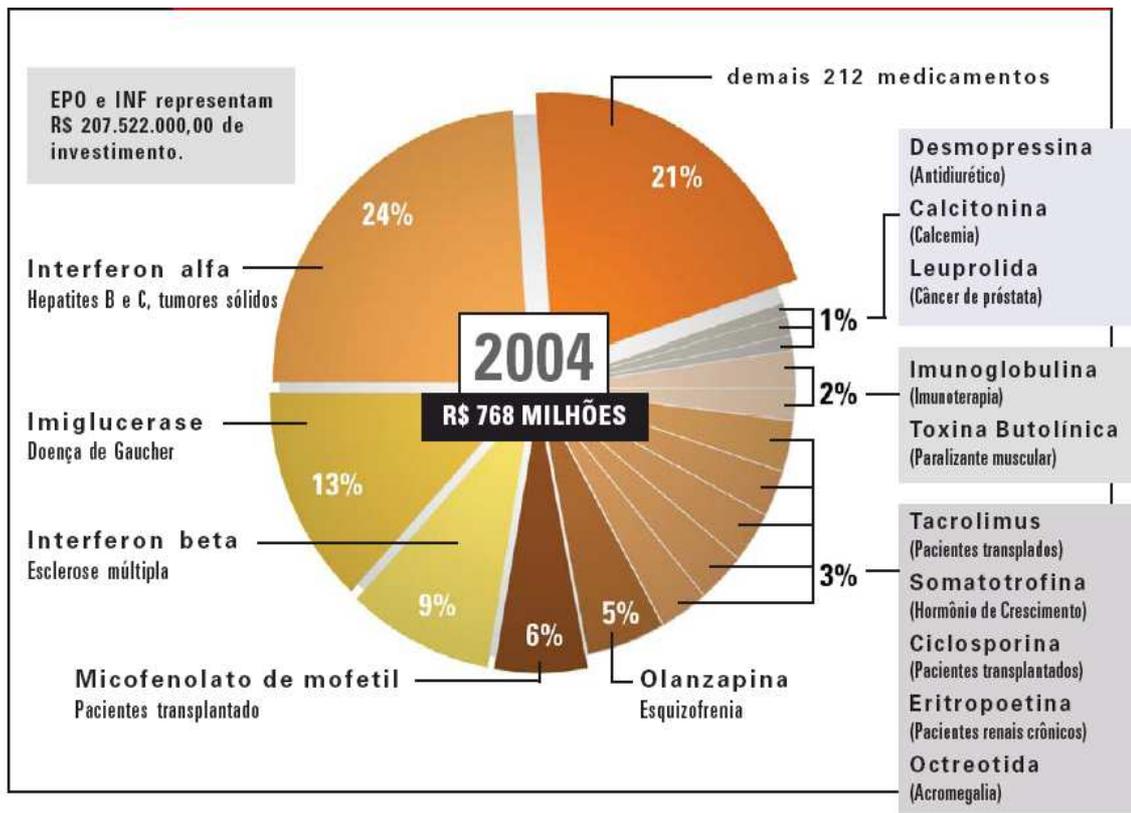
Apenas 14 medicamentos da lista de 226 medicamentos excepcionais representaram, em 2004, um gasto de mais de R\$ 600 milhões aos cofres públicos (Figura 2). Assim, a iniciativa de nacionalizar a produção de biofármacos tem, por objetivo, democratizar o acesso a estes modernos medicamentos de origem biotecnológica. Assim, até 2009, Bio-Manguinhos espera poder produzir mais de 7,5 milhões de frascos de eritropoetina humana recombinante e interferon humano recombinante anualmente. Além disso, as instalações (CIPBR) que estão sendo construídas para esta finalidade poderão ser utilizadas também na produção de outras proteínas terapêuticas.

Desta forma, Bio-Manguinhos / FIOCRUZ mantém-se sintonizado com uma tendência mundial de crescimento da área de biofármacos recombinantes. Nos Estados Unidos, por exemplo, o setor biofarmacêutico cresce 20% ao ano com mais de 370 produtos em fase de testes pré-clínicos e clínicos.



**Figura 1: Custo anual por paciente das dez proteínas terapêuticas mais vendidas no mundo**

Fonte: [www.fiocruz.br/ccs/revista/n08\\_dez05/pdfs/pags24-27biofarmacos.pdf](http://www.fiocruz.br/ccs/revista/n08_dez05/pdfs/pags24-27biofarmacos.pdf)



**Figura 2: Gastos do Ministério da Saúde com medicamentos excepcionais**

Fonte: ([www.fiocruz.br/ccs/revista/n08\\_dez05/pdfs/pags24-27biofarmacos.pdf](http://www.fiocruz.br/ccs/revista/n08_dez05/pdfs/pags24-27biofarmacos.pdf))

### I.3 A eritropoetina

A eritropoetina é o principal hormônio atuante na regulação e manutenção dos níveis fisiológicos de glóbulos vermelhos circulantes, estando envolvida na maturação de células eritróides progenitoras de eritrócitos. Ela estimula a diferenciação de células tronco da medula óssea nos estágios iniciais da eritropoese (Figura 3) e acelera a proliferação e maturação de células terminalmente diferenciadas em eritrócitos. Na vida fetal, esta proteína é produzida no fígado, porém, em adultos, a mesma é sintetizada nos rins (Walsh,1999).

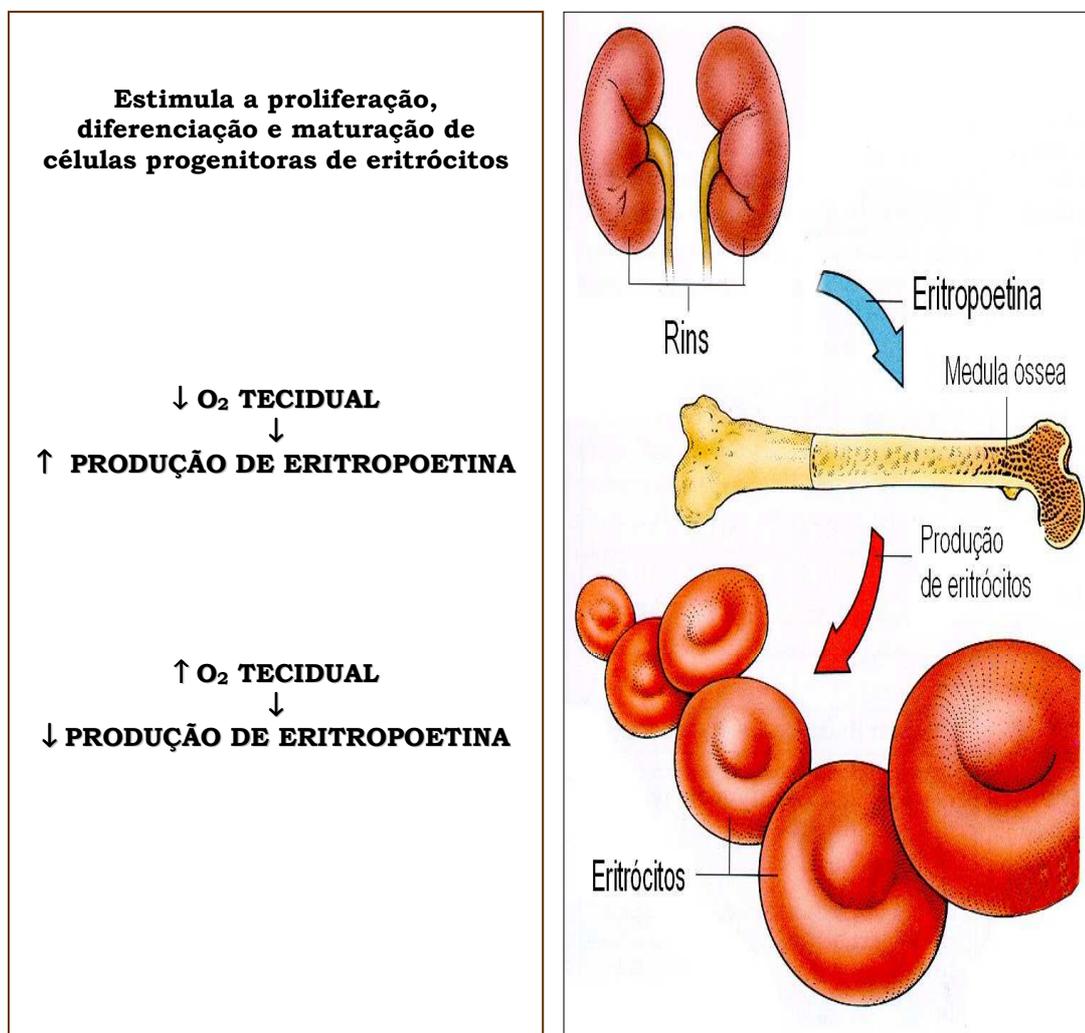
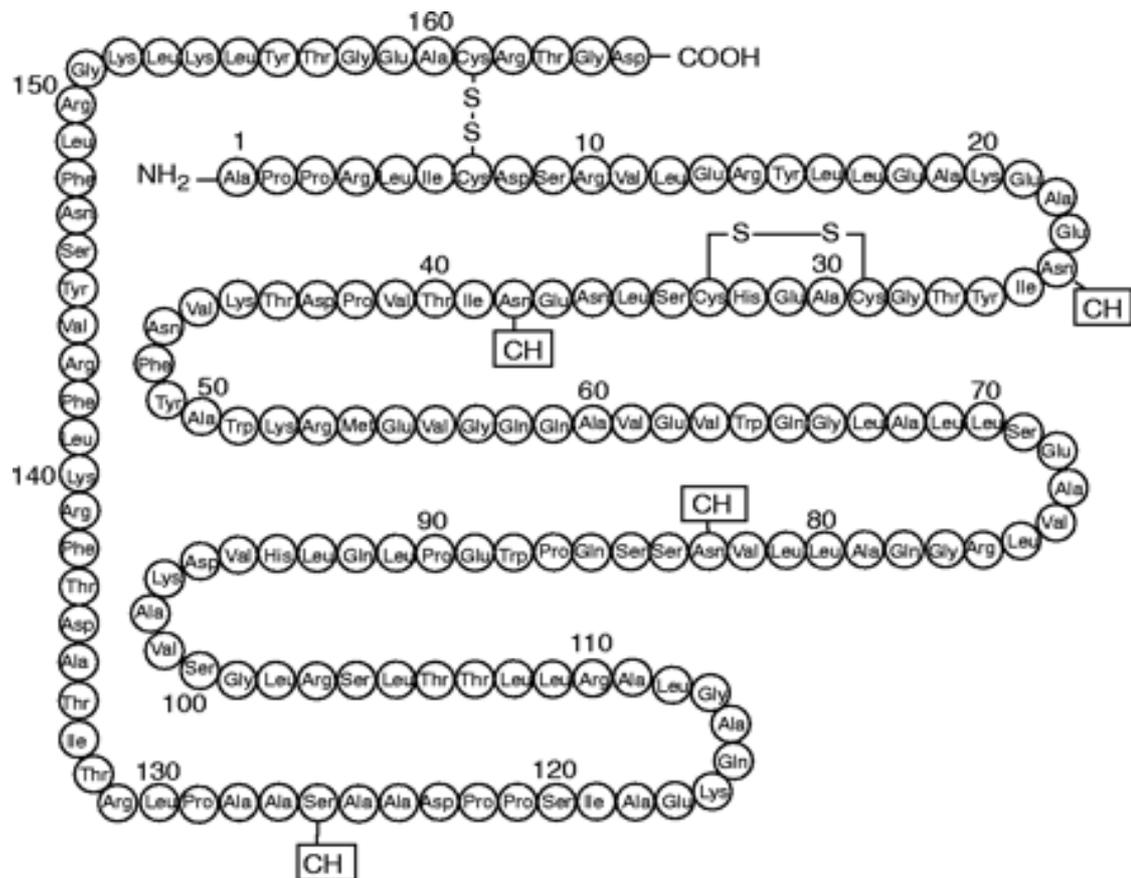


Figura 3: Esquema de atuação da eritropoetina (adaptado de Renner, 2001)

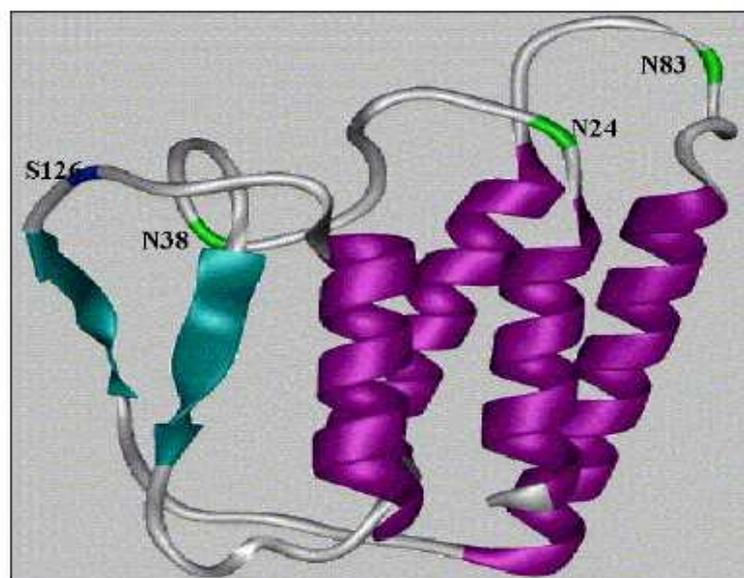
O gene da EPO humana foi isolado e caracterizado em 1985 (Lin et al.,1985; Jacobs et al.,1985). Contém 4 íntrons (1562 pares de base) e 5 éxons (582 pares de bases), e codifica um peptídeo sinal de 27 aminoácidos para a secreção protéica e uma proteína madura com 165 aminoácidos, apresentando duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições Cis<sup>7-161</sup> e Cis<sup>29-33</sup>. Sua estrutura terciária é globular, caracterizada por 4 hélices  $\alpha$  (A, B, C e D) e 2 folhas  $\beta$  anti-paralelas. A proteína contém cadeias de açúcares ligados em três sítios de glicosilação, (Asn<sup>24</sup>, Asn<sup>38</sup> e Asn<sup>83</sup>), que podem possuir até 14 moléculas de ácido siálico na extremidade de suas cadeias, e um sítio de O-glicosilação (Ser<sup>126</sup>) (Figuras 4 e 5).

As moléculas de ácido siálico são necessárias para que o hormônio atinja seus sítios alvo, uma vez que a sua ausência expõe moléculas de galactose das cadeias de açúcares, propiciando seu reconhecimento por receptores hepáticos levando à metabolização e à excreção das moléculas. A massa molar está na faixa de 35 kDa, com cerca de 40% decorrente da presença dos açúcares componentes de sua estrutura glicosilada.



**Figura 4: Estrutura primária da eritropoetina circulante, com 165 aminoácidos**

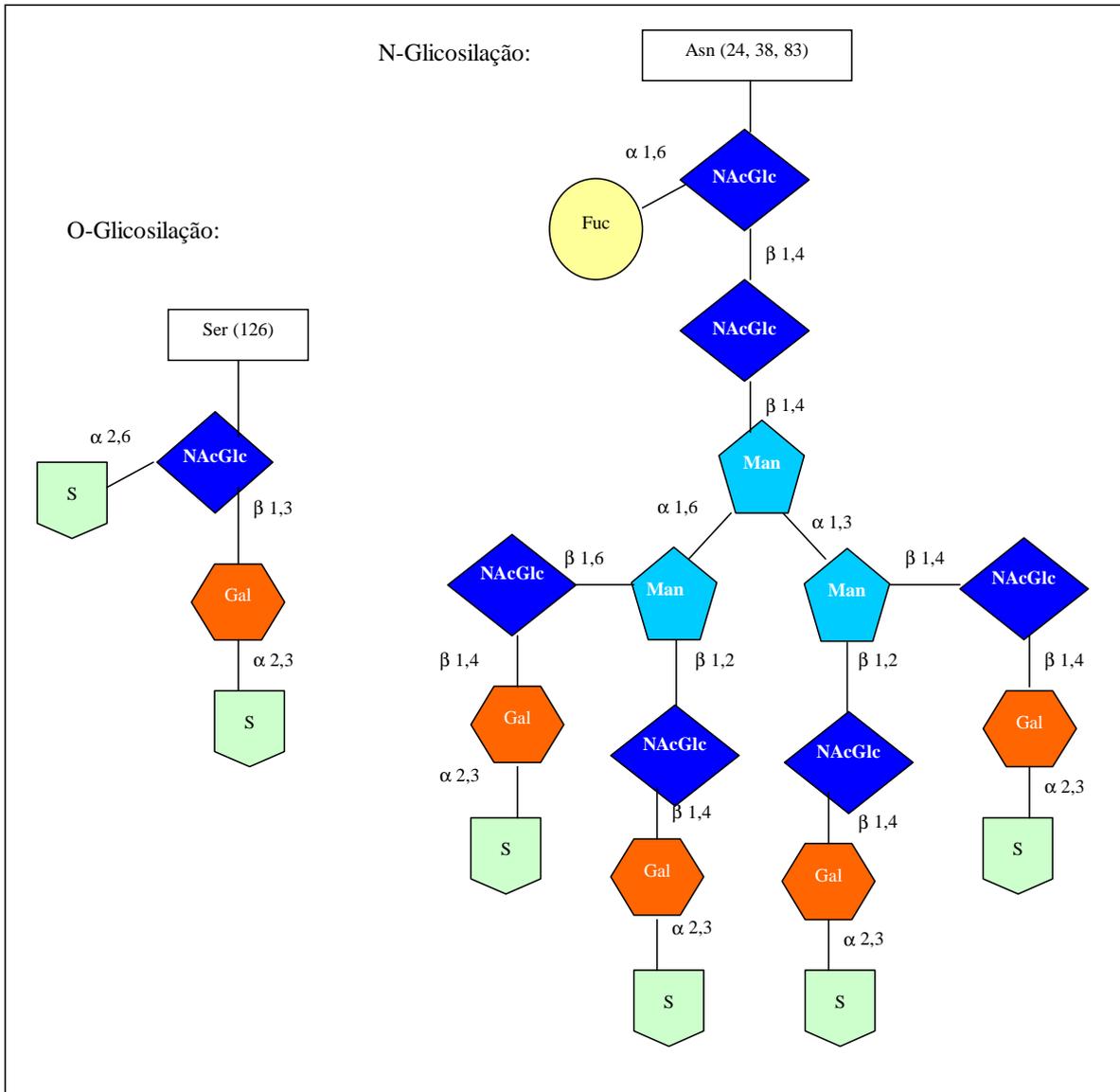
Duas pontes dissulfeto estão presentes unindo as cisteínas 29 e 33 e as cisteínas 6 e 161. Sítios de N-glicosilação estão presentes nas asparaginas 24, 38, e 83, e um sítio de O-glicosilação está presente na serina 126.



**Figura 5: Estrutura tridimensional da eritropoetina (Protein Data Bank, 2003)**

Assim como ocorre em proteínas glicosiladas em geral, a EPO é encontrada como uma mistura de isoformas, relacionadas à fração variável de carboidratos presente na proteína. Estudos revelaram que essa heterogeneidade está associada à ausência (ou presença) de resíduos de ácido siálico com variado grau de acetilação (Figura 6). E é esse grau de sialilação das cadeias polissacarídicas que influenciará fortemente a mobilidade eletroforética e o ponto isoelétrico (pI) da molécula (Gokana *et al.*, 1997).

Embora a eritropoetina não glicosilada tenha atividade *in vitro*, ela não apresenta nenhuma atividade *in vivo*, devido à baixa vida média da proteína não-glicosilada na circulação humana. Conseqüentemente, a eritropoetina recombinante para uso terapêutico deve ser fabricada em células de mamíferos, que proporcionam um padrão de glicosilação semelhante ao da glicoproteína humana nativa.



**Figura 6: Detalhamento da estrutura dos glicanos ligados à molécula de eritropoetina (Kratje, 2004)**

Na década de 1980, o gene da eritropoetina humana foi clonado e expresso tanto em células de ovário de hamster Chinês (CHO) quanto em células de rim de hamster neonato (BHK). A molécula recombinante apresenta estrutura peptídica idêntica ao hormônio natural, com composição de carboidratos heterogênea. A atividade biológica da eritropoetina humana recombinante corretamente glicosilada é equivalente à do hormônio natural (Dordal, 1985; Lin, 1985).

A eritropoetina humana recombinante tem seu uso mais freqüente em pessoas com insuficiência renal crônica, ou seja, em pacientes com uma perda lenta e progressiva das funções dos rins, apresentando uma redução drástica na capacidade de produzir hormônios e de eliminar substâncias tóxicas produzidas pelo organismo. Esse mau funcionamento dos rins, ocasionado por algumas patologias, leva a uma séria implicação na saúde do paciente (Gokana et al, 1997).

Ora, para realizar qualquer atividade, o corpo humano necessita de energia. Quando as células recebem menos oxigênio, há menos produção de energia que o normal. Através da respiração, o oxigênio chega aos pulmões e, de lá, vai para o sangue, através do qual é transportado para todo o sistema sanguíneo. Quem faz o transporte do oxigênio no sangue são os glóbulos vermelhos (também denominados eritrócitos ou hemácias). Quando há baixo nível de glóbulos vermelhos no sangue, as pessoas têm anemia e, nesse caso, o oxigênio não chega ao seu destino. Por isso, pessoas anêmicas sofrem para fazer provas de esforço ou estão sempre cansadas.

O corpo, quando detecta baixa quantidade de oxigênio, aumenta a produção de eritropoetina nos rins. Esta é transportada pelo sangue até a medula óssea e aciona o mecanismo de produção de hemácias - mais hemácias, mais oxigênio na corrente sanguínea.

Em conseqüência, sendo a eritropoetina um hormônio produzido nos rins, o mau funcionamento deste órgão ocasionará uma produção insuficiente dessa proteína e, o organismo não será capaz de transportar oxigênio suficiente para seu funcionamento.

Assim, a aprovação do uso da eritropoetina humana recombinante - com finalidade terapêutica em humanos – deu-se em 1989, inicialmente para o tratamento de anemia associada à doença crônica dos rins. Por fortalecer a produção de eritrócitos, o tratamento com eritropoetina melhora o bem-estar do paciente e reduz (ou elimina) a necessidade de transfusão de sangue. Posteriormente, foram aprovadas outras aplicações não-renais para a eritropoetina humana recombinante, como tratamento da anemia causada pela quimioterapia e prematuridade, redução de transfusão de sangue após uma cirurgia e prevenção de anemia após transplante de medula óssea (Walsh, 1999).

Alguns tratamentos de quimioterapia e radioterapia contra o câncer, além de tratamentos com medicamentos anti-retrovirais contra a AIDS, acabam por diminuir o número de eritrócitos presentes no organismo, situação que ocasiona anemia. Esse problema é observado, por exemplo, em cerca de 75% dos pacientes com câncer, provocando cansaço, fraqueza e depressão, diminuindo sua qualidade de vida. Também há evidências de que a anemia pode diminuir a eficácia do tratamento das pessoas acometidas de câncer. Lappin, 2002 e Ferrario, 2004 relataram que, de acordo com estudos da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e da Sociedade Americana de Hematologia, realizados em 2002, pacientes com câncer, apresentando anemia, tiveram a prescrição de eritropoetina humana recombinante. Seus tratamentos tornaram-se mais eficazes e satisfatórios.

Assim, atualmente, a eritropoetina humana recombinante é aprovada para uso no tratamento de anemia associada a doenças crônicas (dos rins, câncer e AIDS), em crianças prematuras anêmicas e para reduzir necessidades de transfusão associadas a algumas situações cirúrgicas (Browne et al, 1986; Lin et al, 1985 e Egrie et al, 1985). Todos estes usos tornam a EPO recombinante o biofármaco de maior volume de vendas no mundo.

É importante ressaltar que, na última década, técnicas de glicoengenharia foram utilizadas para promover mudanças no carboidrato associado à proteína para alterar as propriedades farmacocinéticas da EPO recombinante. Isto resultou no desenvolvimento da darbepoetina- $\alpha$ , uma proteína hiperglicosilada análoga à eritropoetina, porém com duas cadeias adicionais de glicanos ligadas à região N-terminal da proteína, aumentando o tempo de meia-vida e também a atividade *in vivo*, quando comparada à eritropoetina humana recombinante convencional. Esse aumento de meia vida possibilita a administração de menos doses nos pacientes, o que é altamente desejável, por se tratar de um medicamento injetável. O aumento no número de glicanos ligados à molécula de darbepoetina- $\alpha$  possibilitou, também, um aumento da estabilidade, da solubilidade, da atividade biológica *in vivo* e de uma redução da imunogenicidade (Elliott et al., 2003).

#### I.4 O Cultivo de Células Animais

Uma das áreas da Biotecnologia que tem apresentado crescimento significativo nas últimas décadas consiste nos bioprocessos baseados no cultivo de células animais. Apesar desse cultivo *in vitro* ter sido desenvolvido em escala laboratorial nos últimos 100 anos, apenas nos últimos 50 se iniciou a sua implantação em maior escala, devido ao desenvolvimento de vacinas virais humanas, como a vacina contra a poliomielite (Kretzmer, 2002). Principalmente desde a década de 1970, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, aumentou o interesse nos cultivos de células animais em decorrência do desenvolvimento da produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico (Butler, 2005). As principais características e aplicações das diferentes linhagens celulares utilizadas se encontram na Tabela 4.

De forma geral, conforme se verifica mostrado nas Tabelas 5 e 6, existem inúmeros sistemas de cultivo - tanto para os realizados em suspensão, quanto para culturas de células aderentes -, variando desde garrafas rotatórias (*roller bottles*), biorreatores de leitos fixos e fluidizados, biorreatores do tipo *air-lifts* e tanques agitados (e aerados) de volumes que podem atingir 20 m<sup>3</sup> (Griffiths, 1988; Adams, 2005; Kretzmer, 2002).

Quanto ao modo de operação de cultivos celulares, algumas observações devem ser realizadas:

- 1) Em cultivo celular pode ser conduzido em modo batelada, atingindo mais de  $10^6$  células/mL em um período de 3 a 4 dias, nele ocorre a síntese e a secreção do produto. Os fatores limitantes ao crescimento e produção celular estão relacionados ao acúmulo de metabólitos tóxicos, tais como a amônia e lactato, ou pela falta de nutrientes, tais como glicose e glutamina;
- 2) Essas limitações podem ser minimizadas através da operação de cultivos celulares em modo batelada alimentada, em que ocorre alimentação de meio após a inoculação, sob condições de volume crescente, ou em modo perfusão, com constante fornecimento de nutrientes e remoção de meio cultivado, havendo retenção das células no biorreator, trabalhando-se sob volume constante e obtendo-se concentrações celulares superiores a  $10^7$  células/mL (Butler e Jenkins, 1989; Biblia e Robinson 1995; Cruz et al., 2000; Xie e Wang, 1997);
- 3) A perfusão permite diminuir o tempo de residência e aumentar produtividade do processo, possibilitando, também, a remoção de produtos tóxicos ou inibitórios do meio (Fernandes et al., 2003).
- 4) Pela baixa velocidade específica de crescimento, o modo contínuo simples raramente é empregado no cultivo de células animais, estando restrito a estudos de fisiologia celular.

**Tabela 4: Principais características e aplicações das diferentes linhagens celulares**

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Características</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Referências</b>
HeLa	Carcinoma cervical humano, morfologia epitelial	Estudos virais	Gey et al., 1952
MDCK	Rim de cachorro “cocker spaniel”; morfologia epitelial	Viroses animais, vacinas, adeno e reo-viroses	Madin & Darby, 1958
WI-38	Células do pulmão de feto humano, morfologia fibroblástica, células dependentes de ancoragem	Vacinas virais (rinoviroses)	Hayflick & Moorhead, 1961
GH3	Tumor da glândula pituitária do rato	Produz hormônio de crescimento e prolactina	Tashjian et al., 1968
MRC-5	Pulmão de fetos humanos, morfologia fibroblástica	Estudos virais, susceptibilidade similar à WI-38	Jacobs et al., 1970
Hibridoma	Células híbridas estáveis com características de mielomas imortais e fusão de células do plasma diferenciadas	Produção de anticorpos monoclonais	Köhler & Milstein, 1975

**Tabela 4 (continuação):**

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Características</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Referências</b>
COS1/ COS7	Células de rim de macaco verde africano, morfologia fibroblástica	Produção de vírus recombinantes SV 40	Gluzman, 1981
J558L	Mieloma de camundongo	Produção de anticorpo recombinante – CD4-Ig	Halpern & Coffman, 1972; Lundblad et al., 1972; Oi et al., 1983
BHK 21	Células de rim de hamster sírio, morfologia fibroblástica	Produção de interferon- $\alpha$ , vacinas virais e proteínas terapêuticas	Pay et al, 1985; Radlett et al., 1985
CHO	Células de ovário de hamster chinês, morfologia epitelial	Produção de proteínas recombinantes	Urlaub et al., 1986
Vero	Células de rim de macaco verde africano, morfologia fibroblástica, dependente de ancoragem	Vacinas virais, como poliomielite e vírus hemorrágicos	Simizu & Terasima, 1988

Fonte: Adaptado de Griffiths, 1999.

**Tabela 5: Sistemas de cultivo de células animais**

<b>Sistema de Cultivo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Fatores determinantes na escolha do sistema de cultivo</b>
<b>Garrafas roller</b>	<p>Cultivo celular bem estabelecido e de sucesso, empregado na produção de células e produtos.</p> <p>Primeiro sistema de aumento de escala para células dependentes de ancoragem. A contaminação de uma garrafa não significa a perda de todo o lote, diferente de um processo unitário, onde contaminaria todo o lote (Panina, 1985).</p>	<p>Dependendo da linhagem celular e das utilidades para incubação empregadas pode ocorrer crescimento não-uniforme.</p>
<b>Frascos agitados do tipo spinner</b>	<p>Primeiro passo para o escalonamento de processo, quando o cultivo de células ocorre em suspensão ou em células dependentes de ancoragem usando microcarregadores.</p> <p>Tamanhos variam de poucos mililitros até 20 L, mas para maior praticidade de uso, segurança e razões físico-químicas, são recomendados 10 L como um tamanho máximo (Griffiths, 1990).</p>	<p>Pode ocorrer limitação no fornecimento de oxigênio quando a concentração celular e o volume de trabalho aumentam.</p>
<b>Biorreatores do tipo air-lift</b>	<p>Ar ou oxigênio é bombeado para dentro do biorreator na parte inferior, mantendo as células em suspensão sem a necessidade de agitadores. A altura de fermentadores tipo "air-lift" é muito superior ao seu diâmetro. A adição de detergente não-iônico é recomendável para prevenir espuma, especialmente em meios com alta concentração de proteínas (Handa et al, 1987).</p>	<p>Geralmente não ultrapassam um volume útil de 2000 L.</p>
<b>Biorreatores do tipo tanque agitado</b>	<p>Tanques de aço inox com agitação mecânica e aeração, geralmente por aspersão de gases. Sistemas homogêneos com monitoramento e controle do processo avançados.</p>	<p>Geralmente não ultrapassam um volume útil de 20000 L.</p>

Fonte: Adaptado de Griffiths, 1999.

**Tabela 6: Modo de operação para o cultivo das células animais**

<b>Modo de operação</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Fatores determinantes na escolha do sistema de cultivo</b>
<b>Cultivo em Batelada e Batelada Alimentada</b>	A duração do cultivo em batelada depende da densidade de inoculação, da linhagem celular e das características de crescimento celular. Após cada corrida, o reator tem que ser limpo e esterilizado para a próxima corrida (Reuveny, 1986).	Batelada: Concentração de produto normalmente atinge 100 a 200 mg / L.
	No modo de batelada alimentada, o meio de cultivo é alimentado continuamente ou intermitentemente, não havendo retirada de meio (volume crescente). A densidade celular é relativamente baixa (geralmente inferior a $5,0 \times 10^6$ células/mL).	Batelada-Alimentada: Concentração de produto normalmente atinge 100 a 500 mg / L (Reuveny & Lazar, 1989).
<b>Perfusão</b>	Alimentação contínua de meio fresco, e remoção contínua de meio cultivado, à mesma taxa. As células são retidas (ou recicladas) ao biorreator em decorrência do uso de um equipamento de separação celular interna ou externamente ao biorreator.	Alto rendimento por unidade de tempo e volume do reator, alta densidade celular (maior do que $10^7$ /mL), concentração de produto podendo atingir 1000 mg/L (Velez et al, 1987).

Fonte: Adaptado de Griffiths, 1999.

## I.5 O Processo de Purificação de Biofármacos

Biofármacos devem ser submetidos a etapas de separação e de purificação (*downstream processing*), a fim de se obter, ao final do processo, a biomolécula de interesse nos níveis de concentração e de pureza requeridos pelas agências regulatórias para proteínas terapêuticas de uso humano. Podendo representar até 90% dos custos de produção do produto de interesse, o conjunto de etapas de purificação de proteínas constitui parte crítica e onerosa do processo biotecnológico, (Chisty, 1998). A fração do custo das referidas etapas, está fortemente relacionada ao número de estágios envolvidos, já que o tempo de processamento cresce contrapondo-se ao seu rendimento, que decresce com o aumento do número de estágios.

Os custos de produção de um biofármaco eram considerados secundários, tendo em vista seu elevado valor agregado, levando-se em conta que a empresa detentora da patente dominava sozinha o mercado. Com a expiração de algumas patentes - como a da eritropoetina humana recombinante em 2004 - o aumento da concorrência levou os fabricantes a alterarem suas estratégias, buscando técnicas de cultivo e de purificação para atingir maior produtividade, maior rendimento e menor custo. O fato se justifica: a eritropoetina humana recombinante deve ser administrada aos pacientes com pureza superior a 99%, a fim de evitar reações adversas. Portanto, a purificação torna-se uma etapa crítica no processo de produção deste biofármaco. Por isso, geralmente são empregados processos com múltiplos estágios, complexos e dispendiosos (Mellado, 2005).

No processamento “downstream” de bioprodutos, por exemplo, o primeiro passo consiste em recuperar a molécula de interesse em uma solução isenta de células e fragmentos celulares, a partir da qual a mesma possa ser purificada.

Já no caso de proteínas recombinantes produzidas por células animais (como é o caso da eritropoetina humana recombinante), as células secretam para o meio de cultivo (o sobrenadante) a proteína. Assim, o primeiro passo do processo de recuperação e de purificação é uma etapa de separação sólido-líquido que visa remover as células e obter uma solução clarificada com o produto que foi secretado. A partir desta solução, prosseguem-se as etapas de purificação propriamente ditas.

Para tal, a estratégia, geralmente empregada, baseia-se em três fases: captura, purificação intermediária e polimento. Na primeira, o objetivo é isolar, concentrar e estabilizar a proteína. Na fase intermediária, remove-se a maioria das impurezas como outras proteínas e ácidos nucleicos. Finalmente, no polimento, atinge-se a pureza desejada através da remoção de traços de impurezas e da separação de isoformas (Amersham Pharmacia Biotech, 2002).

Em resumo, as várias técnicas de separação e de purificação, comumente empregadas no processamento *downstream* de proteínas, podem ser observadas na Tabela 7. Incluem-se nessa tabela também as técnicas de rompimento celular, utilizadas no caso de produtos intracelulares para a obtenção do bioproduto, dissolvido em uma solução a ser clarificada. No caso de proteínas recombinantes produzidas por células animais, que são extracelulares.

**Tabela 7: Técnicas empregadas nas etapas de recuperação e purificação de bioprodutos**

<b>Etapas do processo</b>	<b>Técnicas</b>
Separação de células e fragmentos celulares	Filtração convencional; centrifugação; filtração com membranas; sedimentação gravitacional.
Rompimento de células	Homogeneização; moagem em moinho de bolas; rompimento químico ou enzimático com alta pressão.
Purificação de baixa resolução	Precipitação; ultrafiltração; extração líquido-líquido.
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica, de afinidade, de fase reversa e de exclusão molecular.
Tratamentos finais	Cristalização; liofilização; secagem.

Fonte: Adaptado de Kilikian e Pessoa Jr., 2001.

O processo de purificação a ser adotado depende do uso final da molécula alvo, de suas características físico-químicas e também das impurezas presentes no material de partida (Ladisch, 2001).

## I.6 Processos Cromatográficos

Na purificação de biofármacos, as técnicas de cromatografia são muito utilizadas, pois apresentam alta resolução, significantes níveis de purificação, de concentração e de recuperação, devido à alta especificidade entre o ligante e a proteína de interesse. A cromatografia separa, então, os componentes de uma mistura, presentes em uma fase móvel, de acordo com os diversos graus de interação com uma fase estacionária através da qual a fase móvel permeia, permitindo a separação das frações na saída do leito de fase sólida (Ciola, 1998). A fase móvel pode ser um líquido ou um gás, porém - no caso da cromatografia de proteínas - utilizam-se, exclusivamente, fases móveis líquidas.

Pelas diferentes propriedades das proteínas, as técnicas cromatográficas se diversificam para propiciar a separação de misturas protéicas, tal como explicitado na Tabela 8. Geralmente, recomenda-se o uso de uma combinação de técnicas que empreguem diferentes princípios de separação, de modo que, a cada estágio do processo, sejam removidos contaminantes com propriedades diversas: As físico-químicas e as biológicas (das moléculas em estudo) indicam quais tipos de cromatografia serão utilizados.

***Tabela 8: Propriedades protéicas exploradas na separação e suas técnicas cromatográficas***

<b>Princípio de Separação</b>	<b>Técnica</b>
Diferenças de hidrofobicidade superficial de proteínas em uma mistura.	Interação Hidrofóbica e Fase Reversa
Interações bioespecíficas (ex: antígeno / anticorpo) ou pseudo-bioespecíficas (ex: íons metálicos / histidina) entre proteína em solução e ligante na fase sólida.	Afinidade
Diferença de tamanho das proteínas e capacidade das mesmas de penetrar ou não nos poros da fase sólida, alongando ou não seu caminho através do leito de fase sólida.	Exclusão Molecular ou Filtração em Gel
Diferenças de carga elétrica superficial de proteínas em uma mistura.	Troca Iônica

Nos tipos de cromatografia (interação hidrofóbica e fase reversa), explora-se a diferença entre as características hidrofóbicas das proteínas, isto é, as tendências de grupos alifáticos ou de outras estruturas apolares se associarem quando estão presentes em meio aquoso. A interação hidrofóbica pode ser aumentada adicionando-se soluções salinas à solução. Fatores como a temperatura, pH, concentração do sal, tipo da matriz usada na coluna cromatográfica são fatores que influenciam diretamente o desempenho cromatográfico da amostra (Hahn, 2003).

Na cromatografia de afinidade, por sua vez, não são levadas em consideração as propriedades exploradas nos outros tipos de cromatografia, como as diferenças nas propriedades físicas, solubilidade, hidrofobicidade, ponto isoelétrico ou peso molecular. Neste tipo de cromatografia, o fator importante na separação da proteína de interesse, as funcionais e biológicas detectadas na fase estacionária e na proteína de interesse.

Por utilizar ligantes biológicos, a cromatografia de afinidade geralmente apresenta uma maior resolução e promove maiores fatores de purificação e de concentração. No entanto, os ligantes utilizados são mais onerosos, razão pela qual geralmente a referida técnica é utilizada, após uma redução prévia de contaminantes, em combinação com outras técnicas de purificação e vários tipos de cromatografia comercialmente mais acessíveis (Hage, 2002).

Já na cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como filtração em gel, as moléculas que possuem tamanho maior que o poro da matriz, não serão capazes de penetrar os poros, permeando exclusivamente através do espaço intersticial entre as partículas da matriz cromatográfica. Por isto, atingirão mais rapidamente a saída do leito, sendo coletadas em primeiro lugar. As demais proteínas, de menor massa molar, terão um tempo de residência no leito cromatográfico tanto maior quanto menores elas forem, uma vez que serão capazes de permear uma maior quantidade de poros da matriz, sendo coletadas em maiores unidades de tempo (Dondos, 2006).

A cromatografia de troca iônica, finalmente, constitui um processo de separação baseado na interação eletrostática que componentes de uma amostra apresentam com os grupos iônicos presentes na matriz cromatográfica. Esta fase estacionária, eletricamente carregada, porém a capacidade de reter solutos que estão na fase móvel e apresentam cargas de sinais opostos. Para ocorrer a adsorção dos íons da fase móvel na estacionária, controlam-se fatores como pH e força iônica, que determinam tanto a carga líquida das proteínas em solução quanto o nível de ionização dos grupamentos da fase estacionária.

Dependendo do grupo trocador, ligado covalentemente à matriz, os iônicos são classificados em aniônicos e catiônicos. Aqueles trocam ânions e apresentam, portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz, enquanto estes, inversamente, trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz.

Após serem a ela adsorvidos, os solutos podem ser subsequentemente eluídos por elevação da força iônica do meio, que altera a sua carga líquida, ou por deslocamento com outros íons que tenham carga de mesmo sinal que a proteína adsorvida, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem esse tipo de cromatografia (Kilikian e Pessoa Jr., 2001).

## 1.7 Membranas Adsorativas

Até a década de 1990, as matrizes usadas como suportes cromatográficos eram resinas, geralmente geliformes, empacotadas em colunas de leito fixo. Entretanto, neste caso, são observadas severas limitações difusionais, uma vez que a difusão das proteínas nos diminutos poros das resinas é muito lenta. Assim, a dependência da difusão intrapartícula para o transporte das moléculas até os sítios de adsorção torna necessária a operação a baixas vazões e aumenta o tempo de processo (Ghosh, 2002).

Além disso, do ponto de vista da Engenharia, analisando-se os sistemas cromatográficos tradicionais, percebe-se que esses sistemas sofrem de uma severa limitação quando se deseja utilizá-los em escala comercial. Esta limitação está associada à compressibilidade intrínseca dos leitos tradicionais de gel de agarose que, sob condições típicas de operação, são empacotados de forma tal que comprometem seriamente a vazão através do sistema. A fim de contornar-se esta limitação, foram desenvolvidos suportes de sílica que possuem grande rigidez estrutural. Estes sistemas produzem, entretanto, grandes quedas de pressão de operação (Brandt et al., 1988).

Assim, outros problemas associados a colunas cromatográficas são o eventual aprisionamento de ar em seu interior, o risco de secagem do leito e a difusão intra-partícula (Malakian et al., 1993).

Adicionalmente, segundo a lei de Darcy (Darcy, 1856), a vazão  $Q$  que permeia um meio poroso, confinado em uma coluna, é diretamente proporcional ao quadrado do diâmetro  $D$  da coluna e inversamente proporcional à altura  $L$  do leito, a uma dada queda de pressão  $\Delta P$  (equação 1):

$$Q = \pi k \Delta P D^2 / (4 \mu L) \quad (1)$$

Onde:

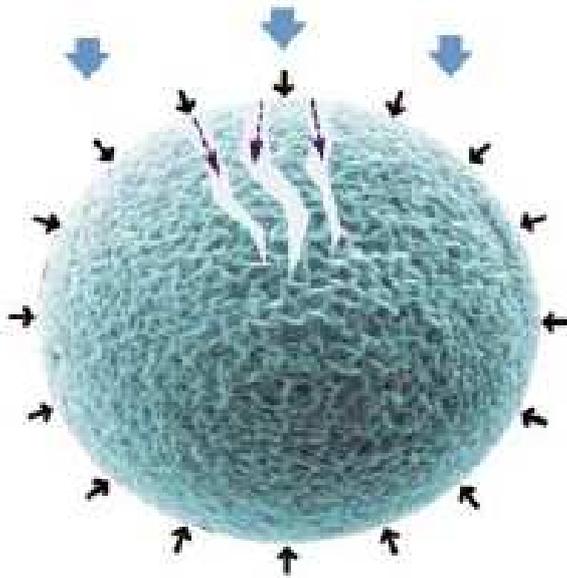
$k$  = permeabilidade do leito

$\mu$  = viscosidade dinâmica do líquido

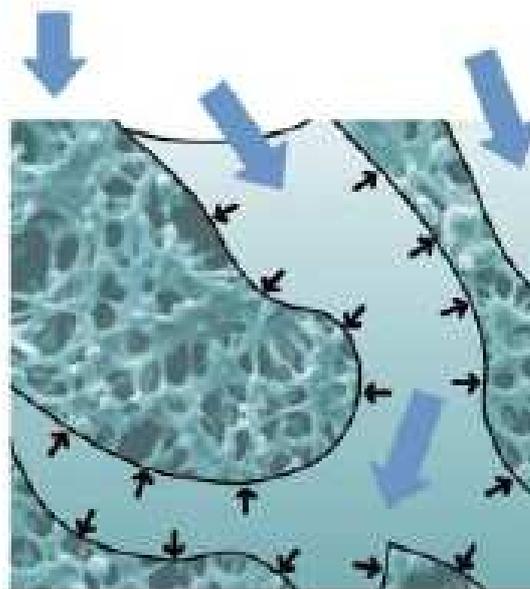
Desta forma, para maximizar-se a vazão a uma dada  $\Delta P$ , seria necessário, idealmente, um grande diâmetro de coluna a menor altura possível do leito. Conclui-se que, este formato de coluna pode ser associado a membranas.

Assim, o uso de membranas de microfiltração, como suporte para ligantes cromatográficos, vem sendo estudado de forma crescente desde a década de 1990 (Klein, 2000), uma vez que o seu emprego permite a operação com grandes vazões a quedas de pressão relativamente baixas, o que possibilita o processamento de grandes volumes de meio em tempos reduzidos (Thömmes e Kula, 1995; Charcosset, 1998; Castilho et al., 2002b).

Em função da maior dimensão dos poros dessas membranas, as resistências difusionais são eliminadas e, nelas, a separação adsortiva de proteínas pode ser realizada em até um décimo do tempo da cromatografia convencional (Demmer et al., 2003). Elimina-se, portanto, no transporte dos solutos ao sítio de adsorção, a etapa de difusão nos poros, muito lenta (Figura 7). Some-se a isto, o fato de que, o emprego de membranas de adsorção oferece diversas outras vantagens em relação ao emprego de materiais cromatográficos convencionais, tais como facilidade tanto no manuseio em várias formas de módulo quanto no aumento de escala (Ulber et al., 2003; Demmer et al., 2003). Adicionalmente por combinarem a elevada seletividade dos ligantes cromatográficos com os altos fluxos e altas produtividades dos processos com membranas - o uso de membranas de adsorção apresenta relevante potencial na redução do número de estágios de purificação que compõem o processamento *downstream*.



(A)

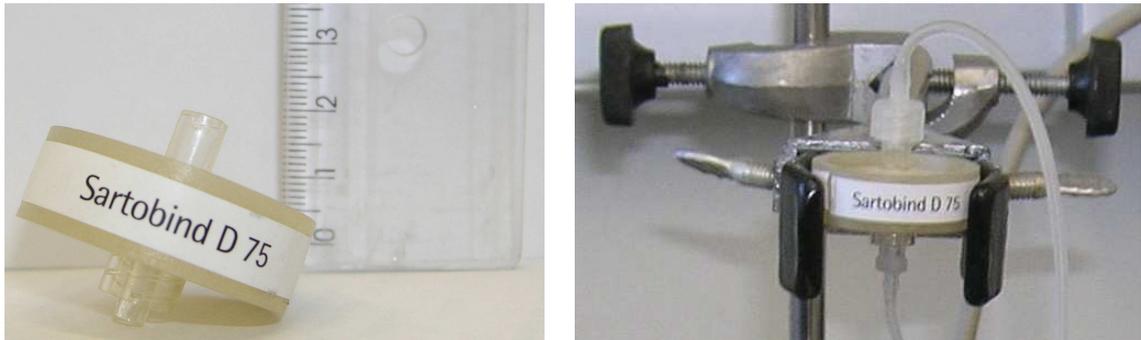


(B)

**Figura 7: (A) Resina cromatográfica; (B) Membrana de adsorção**

Na primeira figura (7A), em adição ao transporte dos solutos por convecção (setas azuis) e difusão no filme (setas pretas), que são processos lentos, é necessária uma etapa (lenta) de difusão nos poros (setas tracejadas), uma vez que estes são muito pequenos, com diâmetros da ordem de 30 a 50 nm (adaptado de Frühholz, 2006). Já na segunda (7B), as membranas adsortivas microporosas, foram desenvolvidas a fim de evitar a desvantagem da limitação difusional dos géis da cromatografia convencional melhora-se a cinética cromatográfica e a velocidade de purificação da proteína.

Membranas adsortivas estão disponíveis comercialmente em diferentes escalas. Na Figura 8, por exemplo, pode-se observar um módulo de membrana Sartobind MA75, que contém 75 cm<sup>2</sup> de área nominal, com 15 camadas de membranas microporosas empacotadas no módulo, totalizando um leito de 4 mm de altura e 2,1 mL de volume (do leito de membranas). Este módulo pode ser utilizado para desenvolvimento, sendo facilmente operado acoplado a uma seringa ou conectado a uma bomba peristáltica ou sistema automatizado de cromatografia (por exemplo, Akta ou FPLC). Para uso industrial, estão disponíveis módulos da empresa Sartorius com áreas nominais na faixa de 0,1 a 8 m<sup>2</sup> (Figura 9).



**Figura 8: Membrana adsortiva de troca iônica em módulo MA75 (75 cm<sup>2</sup>)**



**Figura 9: Membranas adsortivas para processos em larga escala**  
Fonte:([www.sartorius.com](http://www.sartorius.com), acessado em 15/07/2006)

## I.7.1 Membranas Adsorativas de Troca Iônica

Comercialmente, encontram-se disponíveis membranas contendo ligantes de troca iônica (Q, S, D e C) comercializadas pelas empresas Pall Corp. (EUA) e Sartorius (Alemanha) (Tabela 9).

**Tabela 9: Membranas de troca-iônica disponíveis comercialmente**

<b>Empresa</b>	<b>Polímero</b>	<b>Nome da membrana</b>	<b>Tipo de cromatografia</b>
Pall Corp.	Poliétersulfona modificada	Mustang S®	Troca catiônica (Ácido sulfônico)
Pall Corp.	Poliétersulfona modificada	Mustang Q®	Troca aniônica (Amônia quaternária)
Sartorius	Celulose regenerada	Sartobind S®	Troca catiônica (Ácido sulfônico)
Sartorius	Celulose regenerada	Sartobind C®	Troca catiônica (Ácido carboxílico)
Sartorius	Celulose regenerada	Sartobind Q®	Troca aniônica (Amônia quaternária)
Sartorius	Celulose regenerada	Sartobind D®	Troca aniônica (DEAE)

O emprego de membranas adsorativas de troca iônica tem crescido bastante e inúmeras aplicações encontram-se relatadas na literatura. A Tabela 10 mostra aplicações de membranas adsorativas nela descritas.

Demmer et al. (2003) estudaram a purificação de lisozima empregando membranas Sartobind S. Os autores mostraram ser possível um escalonamento de até 100 m<sup>2</sup>, facilmente obtido pela combinação de módulos em paralelo e em série para aumentar sua capacidade de purificação.

Gebauer et al. (1997), por sua vez, combinaram passos de troca aniônica e troca catiônica com membranas Sartobind Q e S, respectivamente. Conseguiram purificar soro albumina humana (HSA) a partir do plasma. O nível de pureza alcançado foi de 98% após as duas etapas de purificação nas membranas de troca iônica.

Specht et al. (2004), por fim, compararam as quatro membranas Q, D, S e C para a captura de parvovírus (*Aedes aegypti densovirus*, AeDNV), o qual apresenta tamanho aproximado de 20 nm, e obtiveram resultados promissores.

**Tabela 10: Aplicações de membranas adsortivas de troca-iônica**

<b>Membrana</b>	<b>Bioproduto purificado</b>	<b>Referência</b>
<b>S</b> Sartobind S	Tireoglobulina (Sigma)	Rao, 2001
<b>S</b> Sartobind S	Lisozima de clara de ovo (HEWL) e albumina de soro bovina (BSA)	Gebauer et al., 1997
<b>S</b> Sartobind S	Lisozima de clara de ovo (HEWL)	Demmer e Nussbaumer, 1999
<b>Q, D, S e C</b> Membranas Sartobind	Vírus AeDNV (parvovirus)	Specht et al., 2004
<b>Q e D</b> Membranas Sartobind	Ceruloplasmina, eritropoetina e imunoglobulinas	Kishino e Miyazaki, 1997
<b>Q e S</b> Membranas Sartobind	Penicilina acilase	Suck et al., 2005

## I.8 Processos de Produção e Purificação de Eritropoetina

Diversos artigos, visando à purificação de eritropoetina, foram encontrados na literatura (Tabela 11). A maioria deles utiliza passos de cromatografia de troca iônica com resinas empacotadas em colunas. Apenas o artigo de Mellado et al. (2007) utiliza membranas adsorptivas contendo ligantes de afinidade.

**Tabela 11: Artigos da literatura relacionados à purificação de eritropoetina**

Adsorvente	Aspectos relevantes do trabalho	Referência
Troca aniônica em resina DEAE-Sephacel, HPLC em coluna LC-304 e afinidade com concavalina A	O procedimento descrito atingiu pureza maior que 99% por três passos de cromatografia, com fator de purificação de 890 vezes e 90% de rendimento global.	Quelle et al., 1989
Troca aniônica em resina DEAE (2 etapas), precipitação com etanol, troca catiônica em resina SP, filtração em gel, adsorção em hidroxiapatita	Propôs-se um processo em 7 etapas, que forneceu EPO com alta pureza, rendimento global de 21% e fator de purificação de 930 vezes.	Miyake et al., 1977
Metodologia incluindo resinas de afinidade, fase reversa e hidroxiapatita	A purificação de EPO, a partir de urina, utilizou 5 passos: CM Affi-Gel Blue, cromatofocalização, lectina de germe de trigo ou hidroxiapatita, RP-HPLC, eletroforese preparativa (SDS-PAGE). A recuperação final foi de 25%.	Krystal et al., 1986

**Tabela 11 (continuação):**

<b>Adsorvente</b>	<b>Aspectos relevantes do trabalho</b>	<b>Referência</b>
Coluna <i>Wheat-germ lectin Sepharose</i> e RP-HPLC	Descreve-se uma purificação simplificada pela combinação de técnicas convencionais com RP-HPLC.	Yanagi et al, 1987
Imunoafinidade e DEAE-Sephacel	Amostras de rh-EPO foram purificadas por imunoafinidade. Observaram-se 16 isoformas com pl variando entre 3 e 7.	Gokana et al., 1997
Diferentes membranas adsorptivas de afinidade	Os testes utilizaram membranas Sartobind contendo os ligantes concanavalina A, IDA-Cu <sup>+2</sup> , lectina de germe de trigo, azul de Cibacron e um anticorpo anti-EPO. Os últimos três apresentaram resultados promissores.	Mellado et al., 2007

Na área de biofármacos, muitas informações são registradas apenas em patentes, não em artigos científicos. Assim, a Tabela 12 apresenta uma compilação de patentes relacionadas à purificação de eritropoetina.

A partir dessa tabela, verifica-se a necessidade de múltiplos estágios de purificação para a obtenção de EPO em alto grau de pureza. Entretanto, verifica-se que, na maioria dos trabalhos abaixo citados, é incluída uma etapa de cromatografia de troca aniônica, utilizando resinas D (DEAE) ou Q.

Ambas as membranas são trocadores aniônicos contendo ligantes carregados positivamente, muito empregados em processos de purificação de EPO, observado nos artigos e patentes. Devido à importância da glicosilação e do grau de sialilação (presença de ácidos siálicos terminais na estrutura tetraantenária dos glicanos) para a atividade biológica da EPO, as isoformas de maior interesse, que devem ser purificadas, são as que apresentam ponto isoelétrico (pI) entre 2,5 e 5. Estas isoformas proteicas, quando em tampões neutros ou levemente alcalinos, apresentam carga superficial líquida negativa.

**Tabela 12: Patentes relacionadas à purificação de eritropoetina**

<b>Autor da patente, título e número</b>	<b>Aspectos relevantes</b>
Chiba et al. (1984), Process for producing erythropoietin,  USP 4465624	Purificação de EPO urinária por cromatografia de imunoafinidade em resina contendo anticorpo anti-EPO, assim como através de um processo em seis etapas: cromatografia de troca iônica com resina DEAE, cromatografia de interação hidrofóbica (com ligantes fenila), adsorção em hidroxiapatita, filtração em gel, cromatografia de troca iônica com resina SP e nova filtração em gel.
Lee-Huang et al. (1986), Reverse immunoaffinity chromatography purification method,  USP 4568488	Uso de cromatografia de imunoafinidade com anti-EPO, seguida de imunoafinidade com anti-IgG para a remoção de contaminantes traço. Os autores também citam um método alternativo de purificação de EPO, que consiste dos seguintes passos: cromatografia de afinidade com concanavalina A, cromatografia de afinidade com lectina de germe de trigo, cromatografia em hidroxiapatita e filtração em gel.
Zanette et al. (1996), Process for the purification of glycoproteins like erythropoietin,  WO001996032413A1 e PCT/EP96/01509	Processo de purificação de eritropoetina utilizando uma matriz cromatográfica contendo dihidroxiboronato, em combinação (ou não) com um passo de cromatografia de troca aniônica (resina Q ou D).

**Tabela 12 (continuação):**

<b>Autor da patente, título e número</b>	<b>Aspectos relevantes</b>
Carcagno et al. (2000), Methods of purifying recombinant human erythropoietin from cell culture supernatants,  WO200000278697A1 e PCT/US99/26241	Purificação de eritropoetina por precipitação diferencial, assim como passos de cromatografia de interação hidrofóbica em resina contendo ligantes fenila, troca aniônica em resina Q, troca catiônica em resina SP e de exclusão molecular.
Alliger et al. (2003), Chromatographic purification of recombinant human eritropoietin,  WO 03/045996 A1, USP 20060099674 e PCT/EPO2/13299	Purificação de eritropoetina produzida por células animais respeitando os seguintes passos: centrifugação, cromatografia de troca aniônica em resina Q, fase reversa, nova troca aniônica em resina Q, filtração em gel.
Zeng et al. (2005), Cell culture process,  USP 20050069979	Purificação de EPO pela seguinte seqüência de procedimentos: centrifugação, cromatografia de troca aniônica em resina Q, ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de fase reversa, outra cromatografia em resina Q, ultrafiltração, nanofiltração e cromatografia de exclusão molecular.

## II. Objetivos

---

O presente trabalho objetiva avaliar o desempenho de membranas adsortivas contendo ligantes D e Q para a purificação parcial de EPO.

### III. Materiais

---

#### III.1 Sobrenadante de cultura contendo eritropoetina humana recombinante

O sobrenadante de cultura de células de mamíferos da linhagem CHO (*Chinese hamster ovary*), produtoras de eritropoetina humana recombinante, empregado nos ensaios cromatográficos foi gentilmente cedido pelo Centro de Imunología Molecular (Havana, Cuba). Lote: EPO-TA, SN-EPO, 3319 / TA0507. PCS 0529. Recebido 500 mL em 13/08/05.

#### III.2 Ingrediente Farmacêutico Ativo e EPO semi-pura

Ingrediente ou Insumo farmacêutico ativo, IFA, é substância ativa destinada ao emprego em medicamentos (Anvisa, 2005), consistindo do produto intermediário concentrado usado nas formulações. A concentração foi estimada em 0,554 mg/mL.

EPO semi-pura é a fração eluída de uma etapa intermediária do processo industrial de eritropoetina, que apresenta grau de pureza igual a 90% (Mellado et al., 2007).

Ambas as formas de EPO foram usadas, neste trabalho, como padrões nos métodos analíticos, tendo sido também gentilmente cedidas pelo Centro de Imunología Molecular (Havana, Cuba).

#### III.3 Membranas de Adsorção

As membranas comerciais de celulose regenerada foram gentilmente cedidas pela Sartorius AG (Göttingen, Alemanha) e contêm ligantes de troca aniônica (Tabela 13).

Foram utilizados módulos do tipo Sartobind-MA75, os quais contêm 75 cm<sup>2</sup> de área nominal de membrana e possuem as especificações indicadas na Tabela 14.

**Tabela 13: Grupos funcionais dos trocadores aniônicos utilizados neste trabalho**

Trocadores Aniônicos	Tipo	Grupo Funcional
Q – Amônia Quaternária	Forte	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$
D – Dietilaminoetil	Fraco	$-O-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$

**Tabela 14: Especificação dos módulos de membranas adsortivas utilizados**

Especificação técnica do fabricante	Sartobind MA 75
Material	Celulose regenerada
Área nominal de adsorção (cm <sup>2</sup> )	75
Nº de camadas de membranas	15
Altura do leito de membranas (mm)	4,0
Volume do leito de membranas (mL)	2,1
Diâmetro das membranas (mm)	25
Material externo do módulo	Poli(sulfona)
Volume morto do módulo (mL)	1,3
Pressão máxima de operação (MPa)	0,6

Fonte: [http://www.sartorius.com/fileadmin/sartorius\\_pdf/biotech\\_generic\\_process/Broch\\_Sartobind\\_SL-1513-e.pdf](http://www.sartorius.com/fileadmin/sartorius_pdf/biotech_generic_process/Broch_Sartobind_SL-1513-e.pdf)

### III.4 Soluções utilizadas nos ensaios de adsorção

Nos ensaios de adsorção, as etapas cromatográficas correspondentes a equilíbrio, aplicação de amostra, lavagem, eluição e regeneração foram conduzidas aplicando-se as soluções e os volumes indicados nas Tabelas 15 e 16, para as membranas D e Q, respectivamente.

A escolha dos tampões de equilíbrio e eluição, utilizados nos ensaios com as membranas, tomou por base os trabalhos de Hu et al. (2004), no caso da membrana D, e de Broudy et al. (1998), para a membrana Q. As soluções de regeneração e armazenamento estão de acordo com as instruções do fabricante.

**Tabela 15: Descrição dos ensaios cromatográficos com a membrana D**

<b>Etapa</b>	<b>Amostra coletada</b>	<b>Tampão</b>	<b>Volume aplicado (mL)</b>
Equilíbrio	1	Tampão tris-HCl, 10 mM, pH 7	20
Aplicação da Amostra	2	Sobrenadante de células CHO	50
	3	Sobrenadante de células CHO	50
Lavagem	4	Tampão de equilíbrio	20
	5	Tampão de equilíbrio	20
	6	Tampão de equilíbrio	20
	7	Tampão de equilíbrio	20
Eluição	8	Tampão de equilíbrio com 0,1 M NaCl	20
	9	Tampão de equilíbrio com 0,2 M NaCl	20
	10	Tampão de equilíbrio com 0,3 M NaCl	20
	11	Tampão de equilíbrio com 0,4 M NaCl	20
	12	Tampão de equilíbrio com 0,5 M NaCl	20
	13	Tampão de equilíbrio com 1,0 M NaCl	20
Lavagem	14	Tampão de equilíbrio	20
Regeneração	15	Solução de NaOH 0,2 N	20
Lavagem	16	Tampão de equilíbrio	20
Armazenamento	17	Etanol 20% (v/v)	20

**Tabela 16: Descrição dos ensaios cromatográficos com a membrana Q**

<b>Etapa</b>	<b>Amostra coletada</b>	<b>Tampão</b>	<b>Volume aplicado (mL)</b>
Equilíbrio	1	Tampão tris-HCl, 20 mM, pH 8	50
Aplicação da Amostra	2	Sobrenadante de células CHO	40
	3	Sobrenadante de células CHO	40
Lavagem	4	Tampão de equilíbrio	20
	5	Tampão de equilíbrio	20
	6	Tampão de equilíbrio	20
	7	Tampão de equilíbrio	20
Eluição	8	Tampão de equilíbrio com 0,1 M NaCl	20
	9	Tampão de equilíbrio com 0,2 M NaCl	20
	10	Tampão de equilíbrio com 0,3 M NaCl	20
	11	Tampão de equilíbrio com 0,4 M NaCl	20
	12	Tampão de equilíbrio com 0,5 M NaCl	20
	13	Tampão de equilíbrio com 1,0 M NaCl	20
	14	Tampão de equilíbrio com 2,0 M NaCl	20
Lavagem	15	Tampão de equilíbrio	20
Regeneração	16	Solução de NaOH 0,2 N	20
Lavagem	17	Tampão de equilíbrio	20
Armazenamento	18	Etanol 20% (v/v)	20

### III.5 Soluções empregadas nos ensaios analíticos

As soluções utilizadas tanto para preparo e coloração do gel preparativo desnaturante de poliacrilamida a 12% quanto para os ensaios de eletroforese SDS-PAGE encontram-se descritas na Tabela 17.

**Tabela 17: Soluções utilizadas nos ensaios de eletroforese SDS-PAGE**

Gel Separador Volume final de 10 mL	3,35 mL H <sub>2</sub> O 2,50 mL Tris (1,5M), pH=8,8 100µL SDS 10% 4,0 mL Acrilamida/Bis (30%) 50µL APS-Persulfato de amônia (10%) 5µL TEMED
Gel Concentrador Volume final de 10 mL	6,10 mL H <sub>2</sub> O 2,50 mL Tris (0,5M), pH=6,8 100µL SDS 10% 1,33 mL Acrilamida/Bis (30%) 50µL APS-Persulfato de amônia (10%) 10µL TEMED
Solução Corante de Coomassie Blue	50% Metanol 10% Ácido Acético 0,05% de Coomassie Blue R-250 (solução estoque de 1,0%)
Solução Descorante de Coomassie Blue	45% Metanol 10% Ácido Acético
Solução Descorante de Coomassie Blue para incubação <i>overnight</i>	Ácido Acético 7%
Tampão de Corrida para Eletroforese (10X concentrado)	30,3g Trisbase, pH=8,3 144,0g glicina 10,0 g SDS Dissolver em 1L de H <sub>2</sub> O deionizada. Diluir 10X para uso e estocar a -4°C
Tampão para aplicação de amostra	0,05 M Tris-HCl pH 6,8 3% SDS 5% β-mercaptoetanol 0,01% Azul de bromofenol 8,7% Glicerol
Solução estoque de 30% acrilamida/bis-acrilamida	29,2% Acrilamida 0,8% Bis-acrilamida A solução é filtrada a vácuo em membrana 0,2µm.

O reagente de Bradford, para a determinação da concentração de proteínas totais, foi preparado seguindo-se as seguintes etapas:

- 1) Dissolvem-se 0,1 g de Comassie blue G-250 em 50 mL de etanol 95% (47,73 mL de etanol 99,5% + 2,26 mL de água), tendo-se o cuidado de cobrir o becker com papel alumínio para evitar que o Comassie blue reagisse com a luz;
- 2) A essa solução, sob agitação, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85%;
- 3) Agitou-se a referida solução por mais 2 horas e completou-se o volume a 1 L, com água ultrapura;
- 4) A seguir, agitou-se novamente o preparado por, no mínimo, 6 horas e filtrou-se o reagente em frasco coberto com alumínio, deixando-o em repouso na geladeira por no mínimo, 24 horas antes de seu uso.

## IV. Métodos

---

### IV.1 Ensaios Cromatográficos de Purificação da Eritropoetina

Como sugerido pelo fabricante para ensaios de adsorção em pequena escala, uma seringa foi utilizada para a aplicação de soluções aos módulos Sartobind MA75, de acordo com as Tabelas 15 e 16. Em cada ensaio, foi aplicado sobrenadante de cultura celular, armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , a módulos de membrana Sartobind D-MA75 ou Sartobind Q-MA75.

A membrana D foi equilibrada com tampão Tris-HCl, 10mM e pH 7,0, seguido da aplicação de 100 mL de sobrenadante (em duas etapas de 50 mL). Depois da lavagem com tampão de equilíbrio, eluiu-se a eritropoetina através da adição de NaCl ao tampão de equilíbrio, em seis degraus crescentes de concentração do sal (0,1M; 0,2M; 0,3M; 0,4M; 0,5M e 1,0M), simulando um gradiente crescente de concentração salina. As membranas foram lavadas com tampão de equilíbrio, regeneradas com NaOH 0,2N, lavadas novamente com tampão de equilíbrio e armazenadas em etanol a 20%.

A membrana Q foi equilibrada com tampão Tris-HCl, 20mM e pH 8,0, seguido da aplicação de 80 mL de sobrenadante (em duas etapas de 40 mL). Depois da lavagem com tampão de equilíbrio, eluiu-se a eritropoetina através da adição de NaCl ao tampão de equilíbrio, em sete degraus crescentes de concentração do sal (0,1M; 0,2M; 0,3M; 0,4M; 0,5M; 1,0M e 2,0M), simulando um gradiente crescente de concentração salina. As membranas foram lavadas com tampão de equilíbrio, regeneradas com NaOH 0,2N, lavadas novamente com tampão de equilíbrio e armazenadas em etanol a 20%.

Todas as amostras referentes a cada etapa dos experimentos foram coletadas em tubos e congeladas em *freezer* para posterior realização dos ensaios analíticos.

## IV.2 Métodos Analíticos

### IV.2.1 Determinação de Proteínas Totais / Método de Bradford

O método de dosagem de proteínas totais utilizado foi aquele proposto por Bradford (Bradford, 1976). Trata-se de uma técnica de determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250.

Este método ancora-se na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molar e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

O método de Bradford é mais rápido e sensível que o método de Lowry e tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios. Entretanto, apesar destas vantagens e de estar sujeito a um número bem menor de interferentes que o método de Lowry, apresenta algumas desvantagens tais como:

- 1) A variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade ou baixa massa molar das mesmas e
- 2) A variabilidade de resultados quando muda a procedência do corante BG-250, devido ao seu grau de pureza, sendo recomendável a padronização das condições de reação para cada lote de corante adquirido (Zaia, 1998). Pôde ser observada, também, uma falta de linearidade na lei de Beer-Lambert, devido a uma variação do pH quando da adição da amostra ao reagente BG-250.

O preparo da solução de Bradford está detalhado abaixo no item III. Como padrão, foi utilizada soroalbumina bovina (BSA) 0,1 mg/mL (0,01 g BSA em 100 mL H<sub>2</sub>O pura).

As alíquotas dos ensaios de adsorção (20 µL) de amostra foram adicionadas, utilizando-se microplacas de 96 poços, a 200 µL de reagente de Bradford. Após incubação por 10 minutos, foi lida na absorbância de 595 nm leitor de placa de ELISA (Biotek-Power Wave XS).

#### IV.2.2 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese, conhecida como SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*), constitui uma técnica que pode ser usada para análise de proteínas, pois são moléculas anfotéricas, cuja carga é determinada pelo pH do meio no qual estão suspensas. Em uma solução com pH acima do ponto isoelétrico, a proteína negativamente carregada migra para o anodo do campo elétrico; abaixo desse ponto, a proteína é positivamente carregada e migra para o catodo (Bruce et al., 2002).

Nessa técnica, desnatura-se a proteína, convertendo-a numa estrutura linear e conferindo-lhe densidade de carga uniforme, de forma a poderem ser separadas por eletroforese em função somente de sua massa molar. O SDS apresenta uma alta carga negativa e uma cauda hidrofóbica que interage com as cadeias das proteínas. A quantidade de moléculas de SDS que se liga às proteínas é proporcional ao número de aminoácidos que constituem as mesmas, pois se liga na razão de uma molécula por ligação peptídica.

Quando as proteínas desnaturadas são colocadas em um campo elétrico, todas elas se moverão para o pólo positivo. Se isto ocorre em um gel de poliacrilamida, ao qual é aplicada corrente elétrica, as proteínas de menor tamanho se deslocam a velocidades mais rápidas, permitindo a separação das bandas de proteínas por tamanho (Azevedo, 2003).

Neste trabalho, a eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada para avaliar a presença de EPO nas frações eluídas dos ensaios cromatográficos. Utilizou-se uma cuba de eletroforese vertical. Nos géis, foram aplicadas amostras de padrão de massa molar (PM), de sobrenadante (SN), de ingrediente farmacêutico ativo (IFA) e das amostras dos ensaios de adsorção. As soluções empregadas foram detalhadas no item III.

Os géis foram preparados seguindo-se o protocolo descrito por Ausubel (1989), utilizando-se pente e espaçadores de 0,75 mm em gel de 12% de acrilamida em cuba de eletroforese Mini-Protean 3 (BioRad, Hercules, EUA). O preparo das amostras foi realizado:

- a) Adicionando-se 8  $\mu$ L de amostra a 2  $\mu$ L de tampão de corrida 5X;
- b) Em seguida, aquecendo-se por 3 minutos a 95°C, de acordo com Laemmli (1970);
- c) Aplicou-se corrente de 200 mA e
- d) Após a corrida, os géis foram fixados e corados com prata, seguindo o método de Morrissey.

O procedimento de Morrissey para corar o gel consistiu de fixá-lo em metanol 50% com ácido acético 10% por 15 minutos, lavá-lo duas vezes com metanol 5% e ácido acético 7% por 15 minutos cada. Após essa etapa, o gel foi lavado com solução de glutaraldeído 10% para detectar peptídeos de pequena massa molar, por 30 minutos. O gel foi deixado durante a noite em água deionizada e, no dia seguinte, foi lavado com solução de 0,03 mM de DTT por 15 minutos. Em seguida, a solução de 0,1% de  $\text{AgNO}_3$  foi adicionada, incubando-se por 15 minutos. O gel foi lavado rapidamente com água por 10 segundos e, depois, lavado por duas vezes com 3% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  por 15 segundos. Em seguida, o mesmo foi lavado duas vezes com 3% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  contendo 0,02% de formaldeído por 15 segundos. A revelação foi feita em  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3% contendo 0,02% de formaldeído, até aparecerem as bandas, sob lenta agitação. Para parar a revelação, foi adicionado 1M de ácido cítrico. Para armazenar o gel, após 5 minutos, foi colocado em ácido acético 7%.

### IV.2.3 Ensaio de HPLC de fase reversa

Esta análise tem por objetivo identificar a EPO e avaliar o grau de pureza dos eluídos das membranas, sendo mais sensível e fornecendo dados quantitativos quando comparada à eletroforese.

Inicialmente, equilibrou-se a coluna Supelcosil™ LC-318 (4,6 x 250 mm) com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) à vazão de 0,8 mL/min e, em seguida, aplicaram-se 200 mL de amostra. A eluição foi realizada com gradiente linear de acetonitrila 80%/ TFA 0,09%/ água. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 40 minutos. A detecção foi a 214 nm (UV).

### IV.2.4 Imunoensaio do tipo *dot-blot*

O imunoensaio do tipo dot-blot é um ensaio simples e sensível, que permite identificar uma proteína de uma mistura de forma específica. Sob condições otimizadas, o *dot-blot* pode ser utilizado para determinações semi-quantitativas.

Procederam-se às seguintes etapas:

- 1) Uma membrana de nitrocelulose (Immobilon-NC, Millipore) foi umedecida em tampão TBS (Tris 0,05 M, NaCl 0,50 M, pH 7,5) e, em seguida, acondicionada em aparelho para *dot-blot* (Big-Dot, Bio-Rad);
- 2) Aplicou-se, então, um volume de 100 µL de TBS em cada poço com uma pipeta multicanal (MultiMate+, HTL), sendo este tampão posteriormente removido da membrana pelo vácuo;
- 3) Ajustou-se, então, a válvula do aparelho para pressão atmosférica;
- 4) Aplicaram-se nos poços 100 µL das amostras, dos padrões de EPO (EPO comercial Eritromax<sup>®</sup>, EPO semi-pura e IFA), assim como do controle negativo (tampão TBS), deixando-os passar pela membrana por gravidade durante 1 hora;

- 5) Em seguida, aplicou-se um volume de 100  $\mu$ L de TBS em cada poço com a pipeta multicanal e ligou-se o vácuo;
- 6) Após o término da filtração de TBS, a membrana foi retirada do aparato;
- 7) Para bloqueio de eventuais sítios de adsorção ainda livres, foi incubada com BSA 2% (m/v) em TBS, por 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação;
- 8) Lavou-se a membrana por 5 minutos com TBS por 3 vezes;
- 9) Foi à membrana incubado por 1 hora à temperatura ambiente com um anticorpo anti-hEPO de coelho (Sigma-Aldrich), diluído 1:500 em solução de BSA 0,1% (m/v) em solução de TBS com 0,05% Tween 20 (TTBS);
- 10) Após a incubação, lavou-se a membrana 3 vezes mais com TTBS por 5 minutos;
- 11) Incubou-se, a seguir, a membrana por 1 hora com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugada à fosfatase alcalina AP (Zymed, nº 81-6122), diluído 1:2000 em TTBS contendo BSA 0,1% (m/v);
- 12) Após a incubação, lavou-se a membrana 2 vezes com TTBS e uma vez com TBS por 5 minutos;
- 13) Iniciou-se a revelação, colocando-se a membrana em cerca de 5 mL de solução de BCIP/NBT ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, BCIP 0,13% v/v e 0,07% v/v, pH 9,8);
- 14) Após essa etapa, a membrana foi lavada com água corrente, imediatamente seca com papel de filtro e escaneada;
- 15) Finalmente, foi submetida ao processo computacional, denominado “escaneamento”.

## V. Resultados e Discussão

---

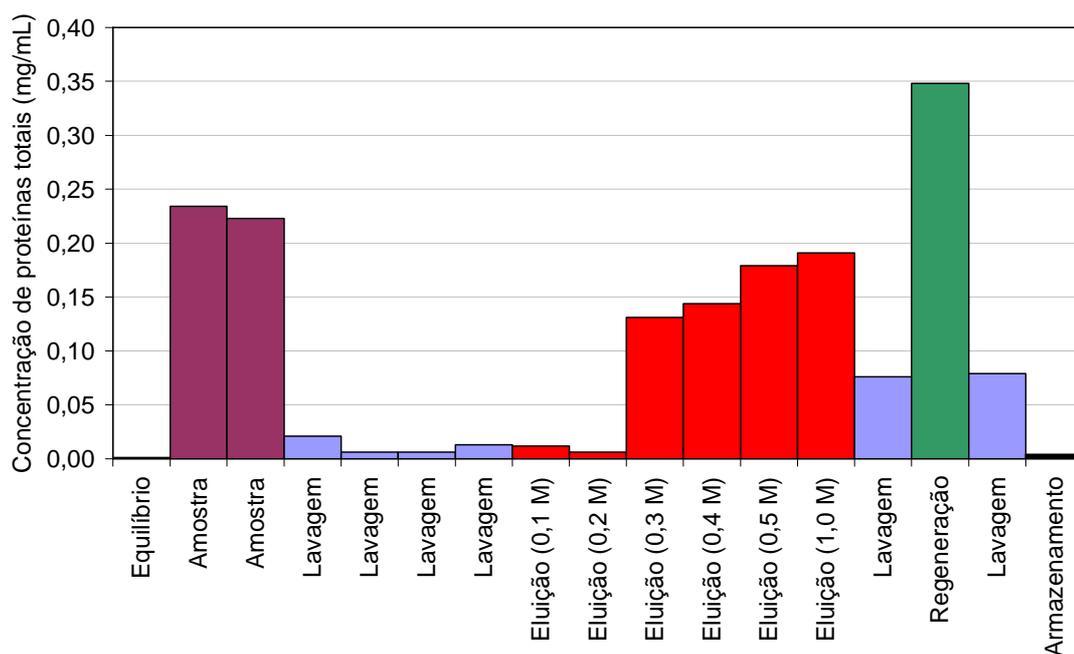
Nesta seção, são mostrados e discutidos os resultados obtidos com as membranas adsorptivas D e Q.

### V.1 Membrana D

A membrana Sartobind D, contendo grupamentos dietilaminoetil (DEAE), é um trocador aniônico fraco. Assim, de acordo com o trabalho de Hu et al. (2004), foi utilizado um tampão de equilíbrio de pH igual a 7,0, no qual as isoformas de interesse da EPO se encontram negativamente carregadas e o trocador aniônico ainda se encontra bastante ionizado (positivamente).

O teste em pequena escala com a membrana adsorptiva D foi realizado como descrito na seção III, utilizando-se uma seringa para injetar os tampões, amostra e demais soluções.

As amostras obtidas foram inicialmente submetidas ao ensaio de Bradford para a determinação de proteínas totais, conforme mostrado na Figura 10 e Tabela 18.



**Figura 10: Determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford das amostras coletadas após passagem através da membrana Sartobind D**

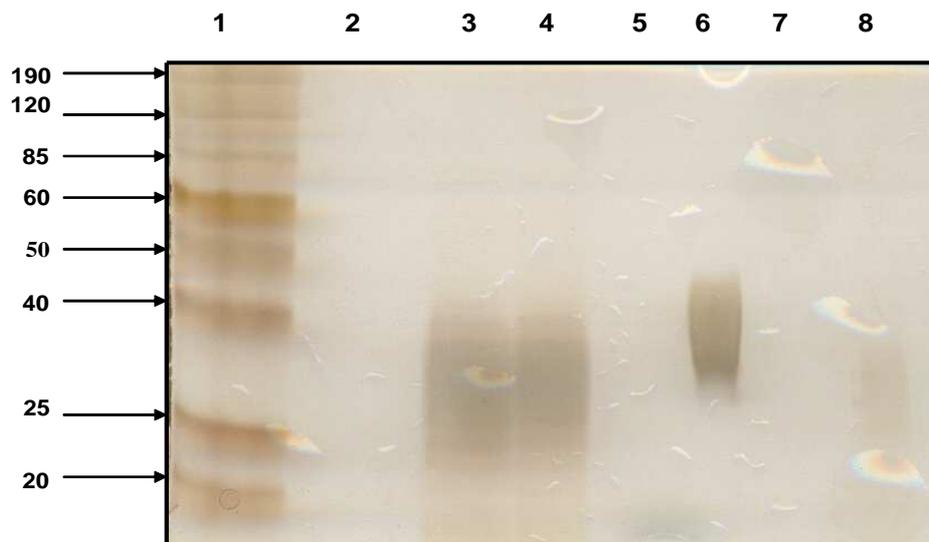
**Tabela 18: Detalhamento das etapas cromatográficas utilizadas no ensaio com a membrana D**

<b>Item</b>	<b>Etapas</b>	<b>Tampão</b>	<b>Volume aplicado (mL)</b>	<b>Concentração de proteínas totais (mg/mL)</b>
1	Equilíbrio	Tris HCl 10 mM pH 7	20	0,001
2	Aplicação de amostra	Sobrenadante	50	0,234
3	Aplicação de amostra	Sobrenadante	50	0,223
4	Lavagem	Tris HCl 10 mM pH 7	20	0,021
5	Lavagem	Tris HCl 10 mM pH 7	20	0,006
6	Lavagem	Tris HCl 10 mM pH 7	20	0,006
7	Lavagem	Tris HCl 10 mM pH 7	20	0,013
8	Eluição	Tp eq. com 0,1 M NaCl	20	0,012
9	Eluição	Tp eq. com 0,2 M NaCl	20	0,006
10	Eluição	Tp eq. com 0,3 M NaCl	20	0,131
11	Eluição	Tp eq. com 0,4 M NaCl	20	0,144
12	Eluição	Tp eq. com 0,5 M NaCl	20	0,179
13	Eluição	Tp eq. com 1,0 M NaCl	20	0,191
14	Lavagem	Tris HCl 10 mM pH 7	20	0,076
15	Regeneração	0,2N NaOH	20	0,348
16	Lavagem	Tris HCl 10 mM pH 7	20	0,079
17	Armazenamento	EtOH 20% (v/v)	20	0,004

Pode-se observar, a partir destes dados, que as proteínas adsorvidas à membrana eluíram em concentrações salinas maiores ou iguais a 0,3M. A alta concentração protéica, na solução de regeneração, indica, também, que muitas proteínas adsorveram tão fortemente à membrana, que só puderam ser eluídas na etapa de regeneração.

Com o objetivo de avaliar se as proteínas determinadas pelo ensaio de Bradford em algumas frações era a eritropoetina, realizou-se eletroforese SDS-PAGE com todas as amostras oriundas do ensaio com a membrana D (Figuras 11 a 13). A fim de padronizar os resultados e poder avaliar comparativamente as alturas das bandas da proteína em estudo, ainda aplicou-se, nos géis, amostras de sobrenadante de eritropoetina (SN) e o insumo farmacêutico ativo (IFA).

Pode-se observar que a EPO, quando presente, apresenta-se na forma de uma banda difusa. O fato supostamente pode ocorrer como consequência da microheterogeneidade da glicosilação, ou seja, da presença de diferentes isoformas com distintos graus de glicosilação. Isto foi observado também por Krystal et al. (1986) e Yanagi et al. (1987).



**Figura 11: Eluição da membrana D (D1/3).**

Eletróforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata.

Aplicação de 5  $\mu$ L de padrão de peso molecular, sobrenadante (SN) e ingrediente farmacêutico ativo (IFA). E aplicação de 10  $\mu$ L de amostra por raia.

**Raia 1:** PM - Marcador de massa molar em kDa.

**Raia 2:** Amostra coletada referente à fração da etapa de equilíbrio (Tris-HCl, 10mM, pH=7.0).

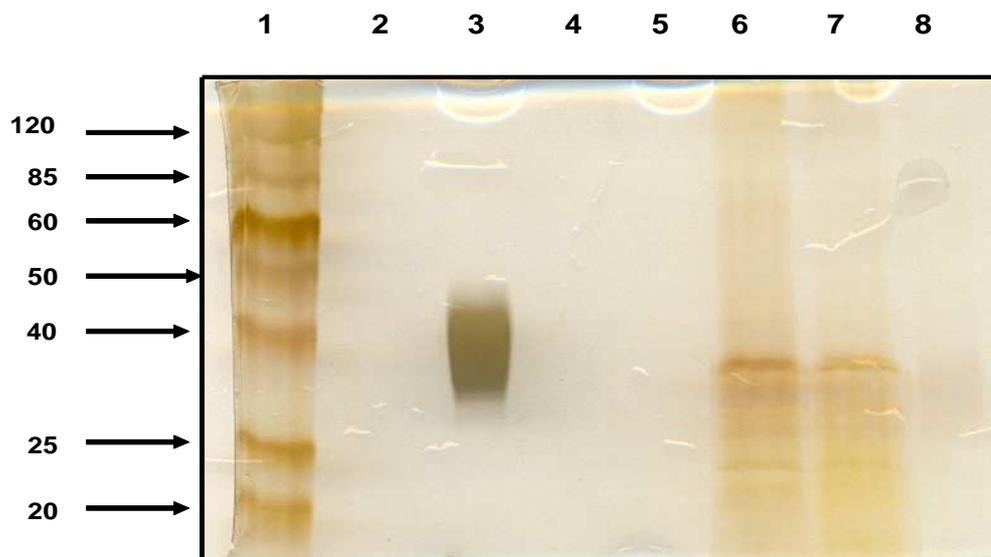
**Raias 3 e 4:** Amostra coletada referente à fração da etapa de aplicação do sobrenadante de eritropoetina.

**Raia 5:** Amostra coletada referente à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 10mM, pH=7.0).

**Raia 6:** IFA. Controle positivo, Ingrediente farmacêutico ativo.

**Raia 7:** Amostra coletada referente à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 10mM, pH=7.0).

**Raia 8:** SN - Sobrenadante de cultivo de células CHO produtoras de eritropoetina.



**Figura 12: Eluição da membrana D (D2/3).**

Eletróforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata.

Aplicação de 5  $\mu$ L de padrão de peso molecular, sobrenadante (SN) e ingrediente farmacêutico ativo (IFA). E aplicação de 10  $\mu$ L de amostra por raia.

**Raia 1:** PM - Marcador de massa molar em kDa.

**Raia 2:** Amostra coletada referente à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 10mM, pH=7.0).

**Raia 3:** IFA. Controle positivo, Ingrediente farmacêutico ativo da eritropoetina.

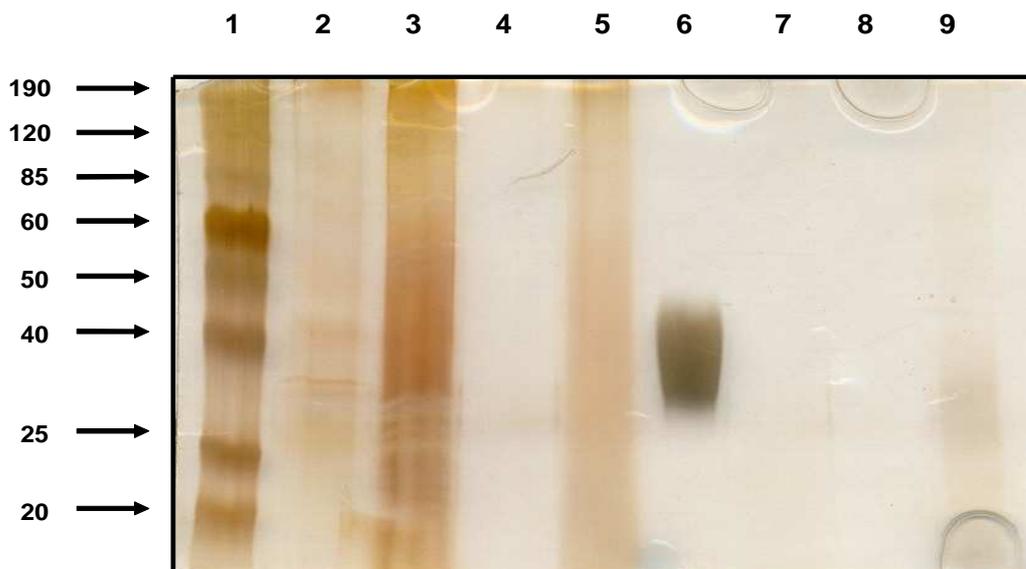
**Raia 4:** Amostra coletada referente à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 10mM, pH=7.0).

**Raia 5:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,2 M NaCl).

**Raia 6:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,3 M NaCl).

**Raia 7:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,4 M NaCl).

**Raia 8:** SN - Sobrenadante de cultivo de células CHO produtoras de eritropoetina.



**Figura13: Eluição da membrana D (D3/3).**

Eletróforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata.

Aplicação de 5  $\mu$ L de padrão de peso molecular, sobrenadante (SN) e ingrediente farmacêutico ativo (IFA). E aplicação de 10  $\mu$ L de amostra por raia.

**Raia 1:** PM - Marcador de massa molar em kDa.

**Raia 2:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,5 M NaCl).

**Raia 3:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 1,0M NaCl).

**Raia 4:** Amostra coletada referente à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 10mM, pH=7.0).

**Raia 5:** Amostra coletada referente à fração da etapa de regeneração (0,2N NaOH).

**Raia 6:** IFA. Controle positivo, Ingrediente farmacêutico ativo da eritropoetina.

**Raia 7:** Amostra coletada referente à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 10mM, pH=7.0).

**Raia 8:** Amostra coletada referente à fração da etapa de armazenamento (20% Etanol).

**Raia 9:** SN - Sobrenadante de cultivo de células CHO produtoras de eritropoetina.

Observa-se que, nas amostras 10 a 13 (Figuras 13 e 14), relativas à eluição com NaCl em concentração 0,3 a 1,0 M, foram observadas bandas que aparentemente são das isoformas de eritropoetina. Verifica-se que nas amostras 10 e 11 (Figura 13), a banda em torno de 40 kDa está mais clara. Esta faixa de massa molar indica que a eritropoetina está altamente glicosilada, uma vez que a EPO não glicosilada apresenta massa molar de apenas 18 kDa (Yang e Butler, 2002).

É possível, também, detectar, nas amostras 2 e 3, referentes ao *flow-through* de sobrenadante aplicado à membrana, haver uma banda difusa bastante forte na faixa de massa molar esperada para a EPO. Isto talvez evidencie um indicativo de que, da EPO aplicada, parte não adsorveu à membrana, provavelmente porque o volume de amostra foi excessivo para o volume de leito de membrana, de modo que os sítios de adsorção se tornaram precocemente saturados, ou seja, totalmente ocupados com proteínas negativamente carregadas do sobrenadante.

## V.2 Membrana Q

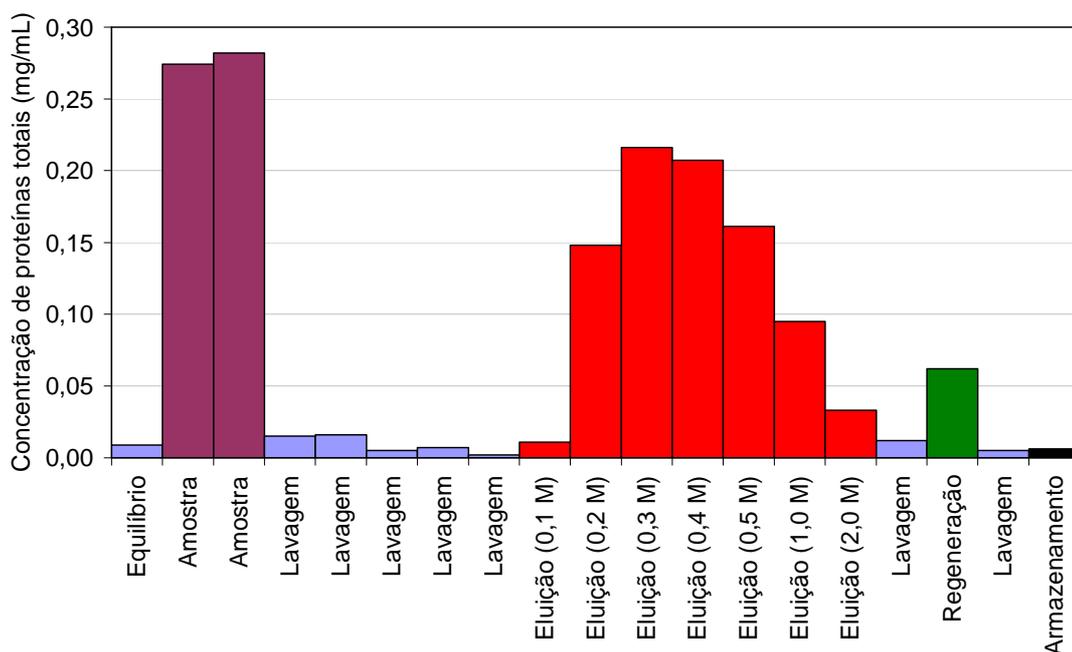
A membrana Sartobind Q, cujo ligante positivamente carregado é uma amina quaternária, é um trocador aniônico forte. Assim, de acordo com o trabalho de Broudy et al. (1998), foi utilizado um tampão de equilíbrio de pH igual a 8,0, no qual as isoformas de interesse da EPO estão negativamente carregadas e, portanto, interagem com o trocador aniônico que se encontra fortemente ionizado (positivamente).

O teste em pequena escala, com a membrana adsortiva Q, foi realizado como descrito na seção III, utilizando-se uma seringa para injetar os tampões, amostra e demais soluções. Neste experimento, por tratar-se de um trocador aniônico forte e, também, devido à alta concentração de proteínas totais encontrada na etapa de regeneração do ensaio com a membrana D, foi adicionada uma etapa adicional de eluição com NaCl 2,0 M.

As amostras obtidas foram submetidas ao ensaio de Bradford, conforme mostrado na Tabela 19 e Figura 14.

**Tabela 19: Detalhamento das etapas cromatográficas utilizadas no ensaio com membrana Q**

Item	Etapa	Tampão	Volume aplicado (mL)	Concentração de proteínas totais (mg/mL)
1	Equilíbrio	Tris HCl 20 mM pH 8	50	0,009
2	Aplicação de amostra	Sobrenadante	40	0,274
3	Aplicação de amostra	Sobrenadante	40	0,282
4	Lavagem	Tris HCl 20 mM pH 8	20	0,015
5	Lavagem	Tris HCl 20 mM pH 8	20	0,016
6	Lavagem	Tris HCl 20 mM pH 8	20	0,005
7	Lavagem	Tris HCl 20 mM pH 8	20	0,007
8	Lavagem	Tris HCl 20 mM pH 8	20	0,002
9	Eluição	Tp eq. com 0,1 M NaCl	20	0,011
10	Eluição	Tp eq. com 0,2 M NaCl	20	0,148
11	Eluição	Tp eq. com 0,3 M NaCl	20	0,216
12	Eluição	Tp eq. com 0,4 M NaCl	20	0,207
13	Eluição	Tp eq. com 0,5 M NaCl	20	0,161
14	Eluição	Tp eq. com 1,0 M NaCl	20	0,095
15	Eluição	Tp eq. com 2,0 M NaCl	20	0,033
16	Lavagem	Tris HCl 20 mM pH 8	20	0,012
17	Regeneração	0,2N NaOH	20	0,062
18	Lavagem	Tris HCl 20 mM pH 8	20	0,005
19	Armazenamento	EtOH 20% (v/v)	20	0,006



**Figura 14: Determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford das amostras do ensaio com a membrana Sartobind Q**

Pode-se observar, a partir destes dados, que praticamente não houve dessorção de proteínas para concentração de NaCl igual a 0,1 M. As proteínas adsorvidas à membrana eluíram em concentrações salinas maiores (ou iguais) a 0,2 M, sendo o pico verificado entre 0,3 e 0,4 M de NaCl. Embora tenha sido adicionada uma etapa extra de eluição com NaCl 2,0 M, a concentração de proteínas dessorvidas nesta etapa não foi muito elevada (0,033 mg/mL), tendo-se observado uma concentração maior eluída na etapa de regeneração da membrana com NaOH 0,2 N (0,062 mg/mL). Mesmo assim, a concentração proteica na solução de regeneração indica que, apesar de proteínas terem adsorvido fortemente à membrana, somente sendo eluídas na etapa de regeneração, esta concentração foi bastante menor do que no caso da membrana D, o que é um resultado positivo.

Assim como no ensaio com a membrana D, realizou-se eletroforese SDS-PAGE com todas as amostras oriundas do ensaio com a membrana Q (Figuras 15 a 17), com o objetivo de avaliar se as proteínas determinadas pelo ensaio de Bradford, em algumas frações, era a eritropoetina. Aplicou-se nos géis, também, amostras de sobrenadante de eritropoetina (SN) e o insumo farmacêutico ativo (IFA), para fins de comparação com as amostras.

Novamente observou-se que a EPO, quando presente, apresenta-se na forma de uma banda difusa, provavelmente devido à microheterogeneidade da glicosilação (Krystal et al., 1986; Yanagi et al., 1987). Verificou-se, também, a provável presença de EPO no *flow-through* da etapa de aplicação da amostra, indicando que a capacidade máxima adsortiva da membrana foi atingida precocemente.



**Figura 15: Eluição da membrana Q (Q1/3).**

Eletoforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata.

Aplicação de 5  $\mu$ L de padrão de peso molecular, sobrenadante (SN) e ingrediente farmacêutico ativo (IFA). E aplicação de 10  $\mu$ L de amostra por raia

**Raia 1:** PM - Marcador de massa molar em kDa.

**Raia 2:** Amostra coletada referente à fração da etapa de equilíbrio (Tris-HCl, 20mM, pH 8,0).

**Raia 3:** Amostra coletada referente à fração da etapa de aplicação do sobrenadante.

**Raia 4:** IFA. Controle positivo, Ingrediente farmacêutico ativo da eritropoetina.

**Raia 5:** Amostra coletada referente à fração da etapa de aplicação do sobrenadante.

**Raias 6, 7, 8 e 9:** Amostras coletadas referentes à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 20 mM, pH 8,0).

**Raia 10:** SN - Sobrenadante de cultivo de células CHO produtoras de eritropoetina.



**Figura 16: Eluição da membrana Q (Q2/3).**

Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata.

Aplicação de 5  $\mu$ L de padrão de peso molecular, sobrenadante (SN) e ingrediente farmacêutico ativo (IFA). E aplicação de 10  $\mu$ L de amostra por raia

**Raia 1:** PM - Marcador de massa molar em kDa.

**Raia 2:** Amostra coletada referente à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 20 mM, pH=8,0).

**Raia 3:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,1M NaCl).

**Raia 4:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,2M NaCl).

**Raia 5:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,3M NaCl).

**Raia 6:** IFA. Controle positivo, Ingrediente farmacêutico ativo da eritropoetina.

**Raia 7:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,4M NaCl).

**Raia 8:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,5M NaCl).

**Raia 9:** SN - Sobrenadante de cultivo de células CHO produtoras de eritropoetina.



**Figura 17: Eluição da membrana Q (Q3/3).**

Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE), corado com nitrato de prata.

Aplicação de 5  $\mu$ L de padrão de peso molecular, sobrenadante (SN) e ingrediente farmacêutico ativo (IFA). E aplicação de 10  $\mu$ L de amostra por raia.

**Raia 1:** PM - Marcador de massa molar em kDa.

**Raia 2:** Amostra coletada referente à fração da etapa de lavagem (Tris-HCl, 20 mM, pH=8,0).

**Raia 3:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,1M NaCl).

**Raia 4:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,2M NaCl).

**Raia 5:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,3M NaCl).

**Raia 6:** IFA. Controle positivo, Ingrediente farmacêutico ativo da eritropoetina.

**Raia 7:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,4M NaCl).

**Raia 8:** Amostra coletada referente à fração da etapa de eluição (Tp eq. com 0,5M NaCl).

Observa-se que, nas amostras 10 a 15 (Figuras 16 e 17), relativas à eluição com NaCl em concentração 0,2 a 2,0 M, foram observadas bandas que poderiam ser das isoformas de eritropoetina. Especialmente nas amostras 11 e 12 (Figura 16), bandas um pouco abaixo de 40 kDa, provavelmente de isoformas de EPO, estão mais claras.

### V. 3 Concentração das Etapas Cromatográficas das Membranas

Comparando-se as concentrações obtidas pela análise de Bradford das membranas D e Q, a partir das tabelas 20 e 21 e das figuras 18, 19, 20 e 21 observa-se que:

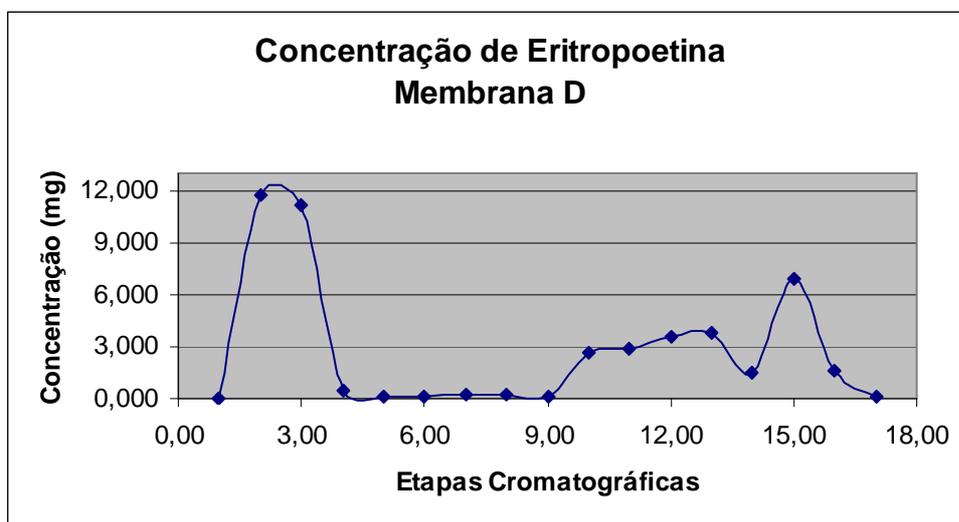
1) Nas quatro primeiras etapas (equilíbrio, aplicação da amostra e lavagem), a membrana D adsorveu maior quantidade de proteína (nos poros da membrana) do que a Q. A quantidade adsorvida de eritropoetina na membrana D foi de 23,290 mg e na membrana Q, foi de 22,990 mg.

2) Nas etapas de eluição, a membrana D, iniciou a dessorção de eritropoetina, a partir da segunda etapa (com gradiente salino), com uma eluição total de 13,260 mg. Já a membrana Q, iniciou a dessorção, a partir da primeira etapa (com gradiente salino), com uma eluição total de 17,420 mg.

3) Após a etapa de eluição (nas etapas de lavagem, regeneração, lavagem e armazenamento), a quantidade de proteína dessorvida na membrana D foi de 10,140 mg e 1,700 mg na membrana Q.

**Tabela 20: Detalhamento das concentrações da eritropoetina nas diferentes etapas cromatográficas utilizadas no ensaio com membrana D**

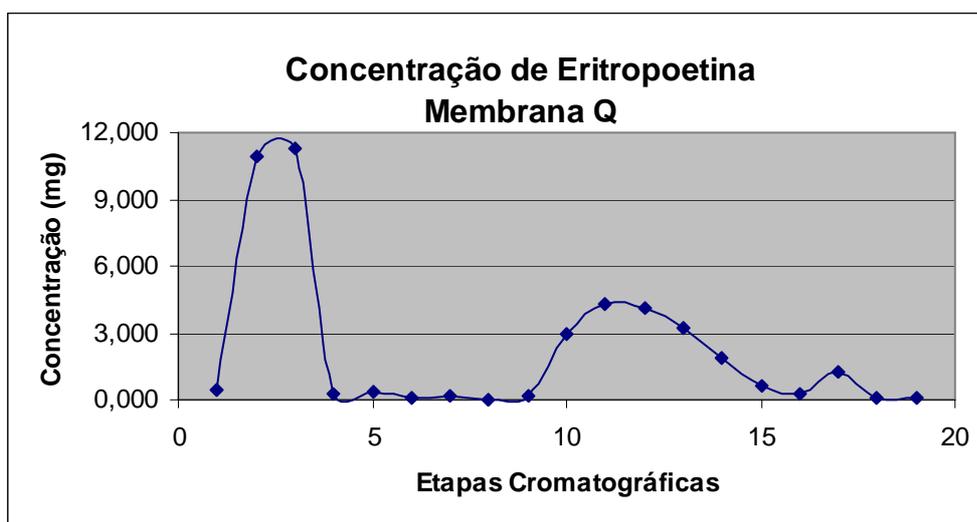
Itens	Etapas	mg	
1	Equilíbrio	0,020	0,020
2	Aplicação de amostra	11,700	22,850
3		11,150	
4	Lavagem	0,420	0,920
5		0,120	
6		0,120	
7		0,260	
8	Eluição	0,240	13,260
9		0,120	
10		2,620	
11		2,880	
12		3,580	
13		3,820	
14	Lavagem	1,520	1,520
15	Regeneração	6,960	6,960
16	Lavagem	1,580	1,580
17	Armazenamento	0,080	0,080



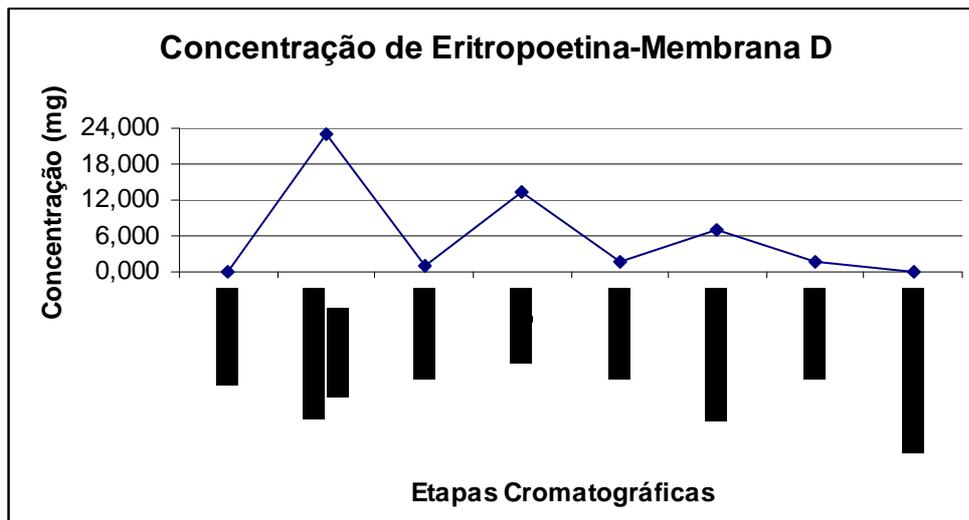
**Figura 18: Concentração da Eritropoetina (mg) nas etapas cromatográficas referente à membrana D.**

**Tabela 21: Detalhamento das concentrações da eritropoetina nas diferentes etapas cromatográficas utilizadas no ensaio com membrana Q**

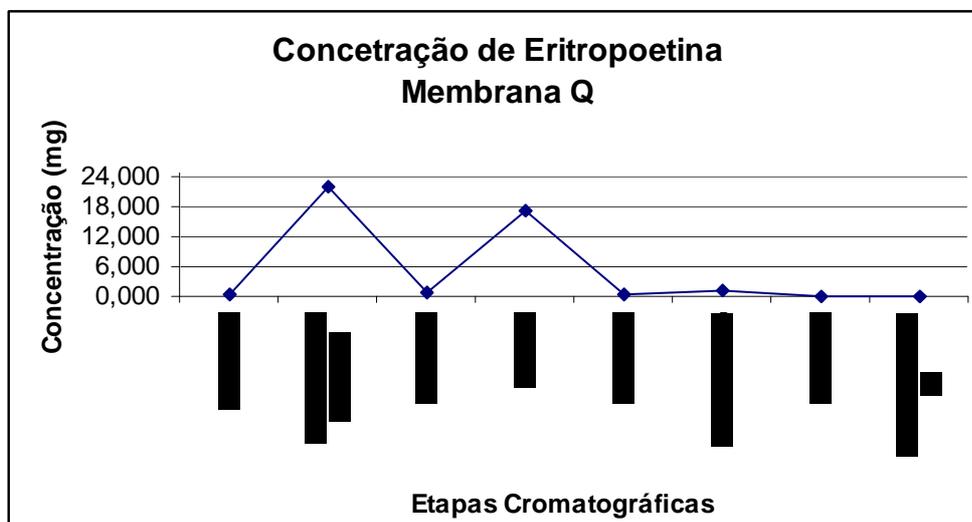
Itens	Etapas	mg	
1	Equilíbrio	0,450	0,450
2	Aplicação de amostra	10,960	22,240
3		11,280	
4	Lavagem	0,300	0,864
5		0,320	
6		0,100	
7		0,140	
8		0,004	
9	Eluição	0,220	17,420
10		2,960	
11		4,320	
12		4,140	
13		3,220	
14		1,900	
15	0,660		
16	Lavagem	0,240	0,240
17	Regeneração	1,240	1,240
18	Lavagem	0,100	0,100
19	Armazenamento	0,120	0,120



**Figura 19: Concentração da Eritropoetina (mg) nas etapas cromatográficas referente à membrana Q.**



**Figura 20: Concentração da Eritropoetina (mg) nas etapas cromatográficas referente à membrana D**



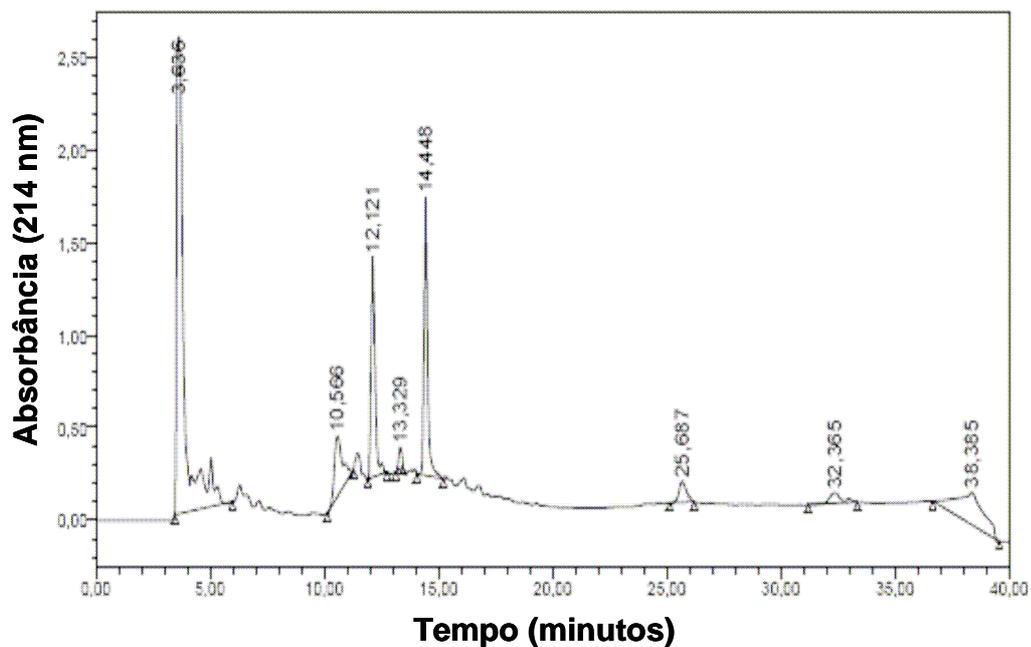
**Figura 21: Concentração da Eritropoetina (mg) nas etapas cromatográficas referentes à membrana Q.**

## V. 4 Análises de RP-HPLC

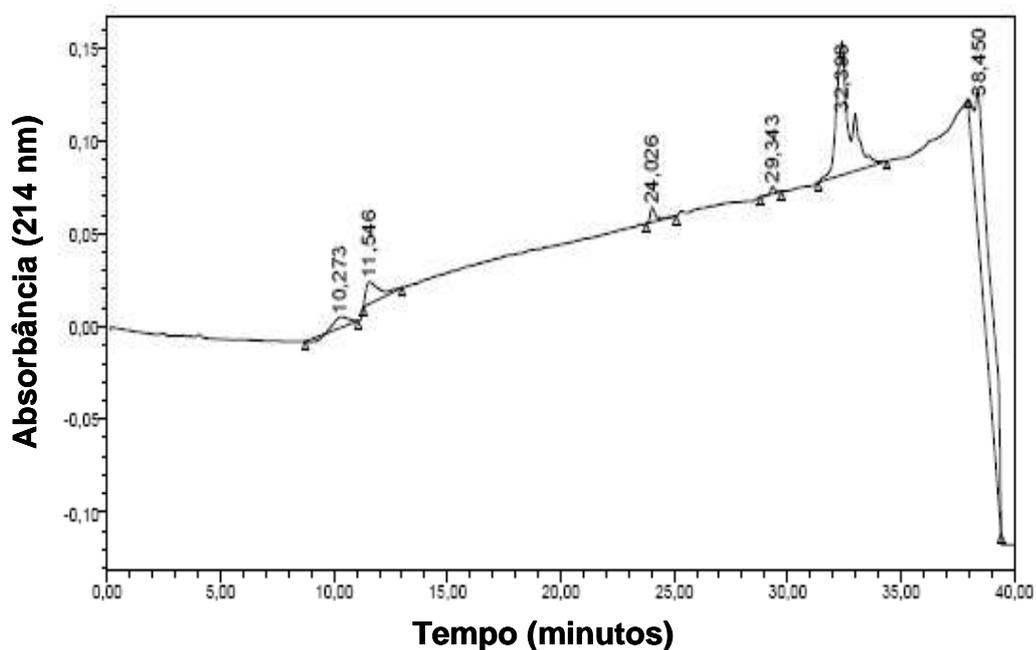
Na tentativa de confirmar e quantificar os resultados obtidos por eletroforese, foram realizadas análises de cromatografia líquida de alto desempenho com coluna de fase reversa (RP-HPLC), método de alta resolução utilizado na quantificação e determinação de pureza de proteínas.

As Figuras 22 a 28 contêm os cromatogramas de RP-HPLC relativos ao sobrenadante de cultura de células CHO produtoras de EPO humana, à EPO comercial (Eritromax<sup>®</sup>) e à EPO semipura, assim como as análises das frações eluídas da membrana D que, de acordo com os géis de eletroforese corados com prata, apresentaram bandas na região de 35-40 kDa (amostras 10 a 13).

Não foi possível realizar as mesmas análises para a membrana Q, pois infelizmente, não houve tempo hábil.



**Figura 22:** Análise por RP-HPLC de amostra de sobrenadante do mesmo lote que o aplicado à membrana D.



**Figura 23:** Análise por RP-HPLC de amostra de EPO comercial (Eritromax®).

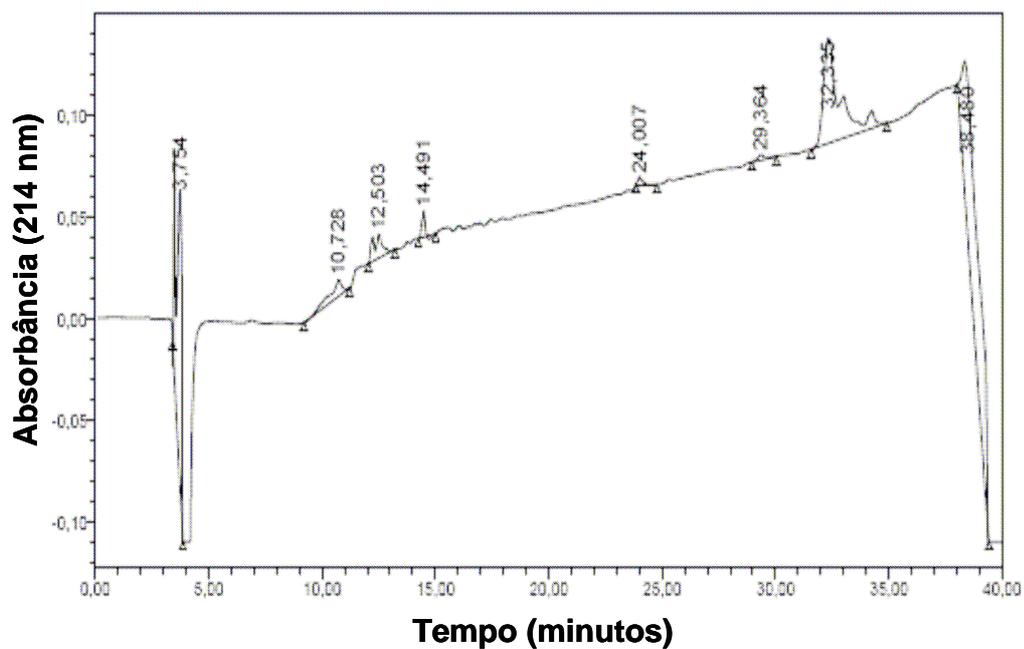


Figura 24: Análise por RP-HPLC de amostra de EPO semi-pura.

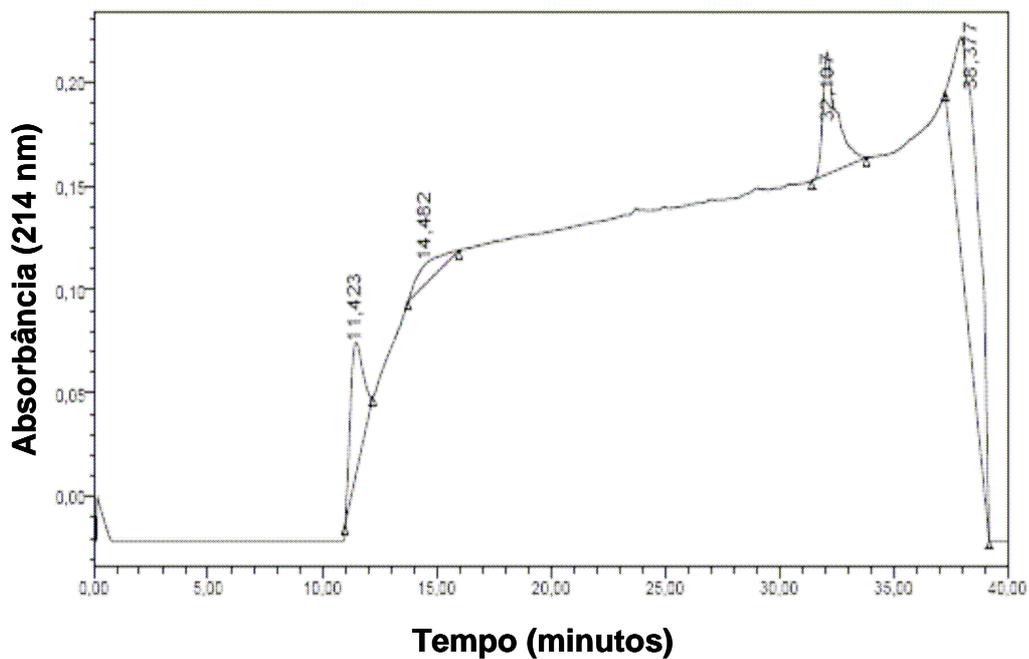
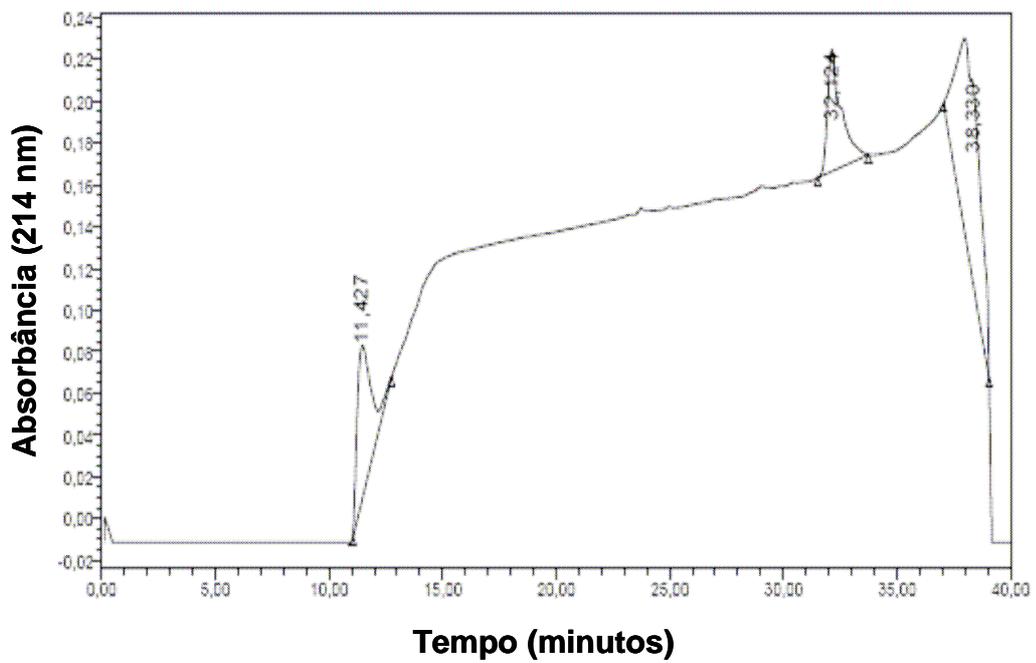
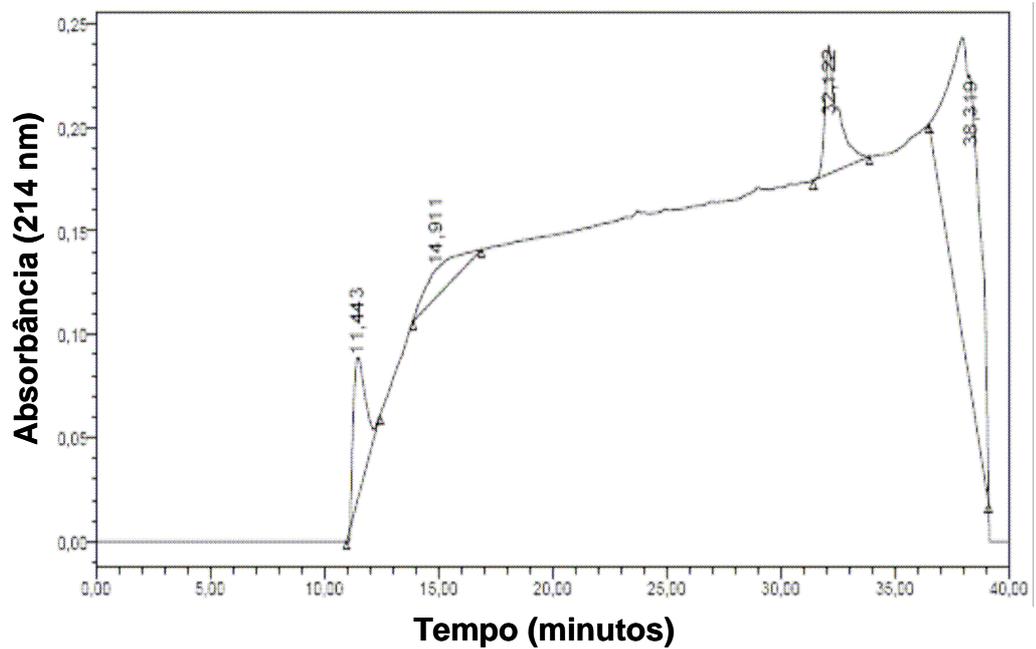


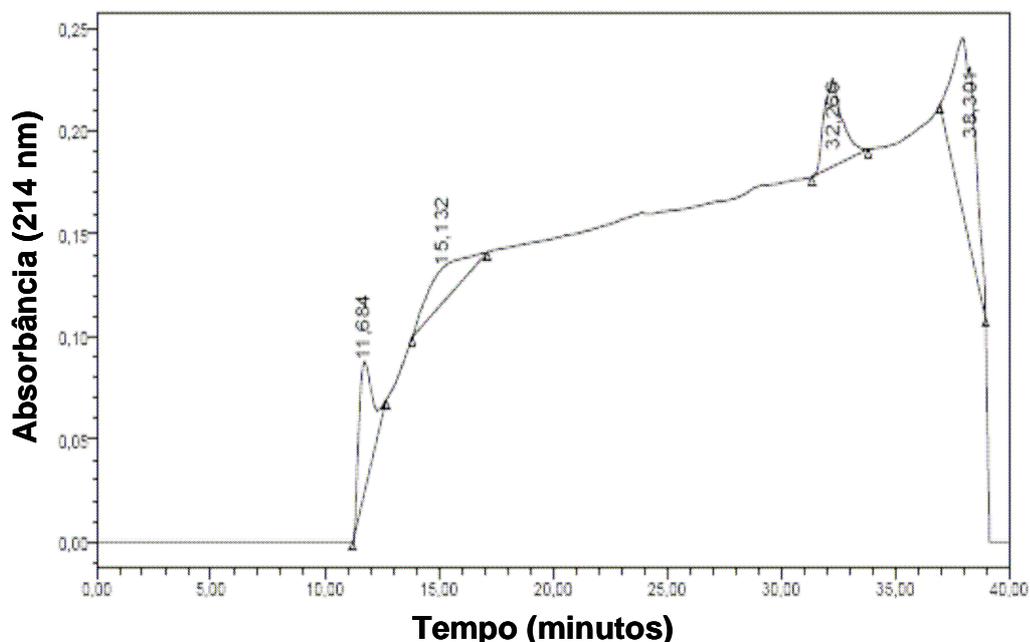
Figura 25: Análise por RP-HPLC de amostra 10, eluída da membrana D com NaCl 0,3 M.



**Figura 26:** Análise por RP-HPLC de amostra 11, eluída da membrana D com NaCl 0,4 M.



**Figura 27:** Análise por RP-HPLC de amostra 12, eluída da membrana D com NaCl 0,5 M.



**Figura 28: Análise por RP-HPLC de amostra 13, eluída da membrana D com NaCl 1,0 M.**

Com base nas Figuras 24 até 28, o pico com tempo de retenção de aproximadamente 32 minutos parece ser aquele relativo à eritropoetina. Esta conclusão foi tirada considerando que a EPO semi-pura (Figura 24) contém, segundo o fornecedor (CIM – Centro de Imunología Molecular), EPO com grau de pureza igual a 90%.

Picos com esse mesmo tempo de retenção foram verificados para todas as amostras analisadas oriundas da eluição da membrana D com NaCl 0,3 a 1,0 M (Figuras 25 a 28). Adicionalmente, em todos os eluídos, este foi o pico dominante, de maior área. Isto indicaria que apenas uma etapa de adsorção na membrana de troca aniônica fraca estaria promovendo um elevado fator de purificação. Comparando-se os cromatogramas das amostras eluídas (Figuras 25 a 28) com aquele do sobrenadante de cultura (Figura 22), observou-se a presença de um menor número de picos, indicando o aumento do grau de pureza após a adsorção na membrana D.

Entretanto, comparando-se os cromatogramas das Figuras 24 e 25 (EPO comercial e EPO semi-pura), não se detectou nenhuma diferença significativa, com exceção de pequenos picos na região de 10 a 15 minutos. Entretanto, sabe-se que, na formulação de eritropoetinas comerciais, como a Eritromax<sup>®</sup>, há soroalbumina humana presente e que a concentração de albumina é, geralmente, de 1 a 2 ordens de grandeza superiores à concentração de EPO.

Além disso, em todos os cromatogramas, o início do gradiente de eluição, aos 10 min, causou um aumento da absorbância a 214 nm, que dificultou a identificação e a integração dos picos. A interferência do solvente, utilizado na eluição, foi confirmada através da realização de duas corridas com água ultra-pura: uma utilizando o método empregado nas análises mostradas nas Figuras 23 a 29, e outra, com o mesmo método, porém sem o gradiente de eluição. Neste último, observou-se que a absorbância permaneceu constante e nula em todos os 40 min da análise.

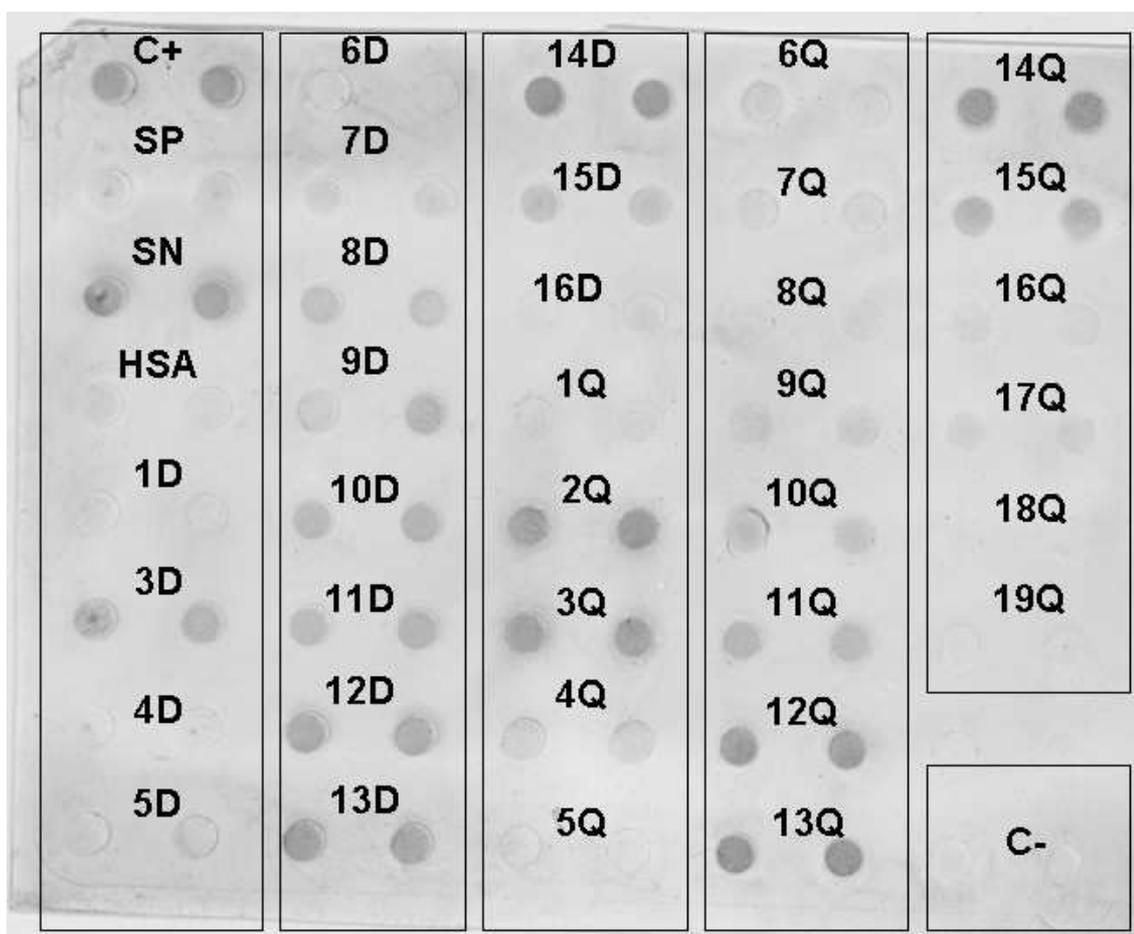
Assim, com base nas duas limitações acima expostas, considerou-se que os resultados de RP-HPLC não estavam fornecendo informações conclusivas e que seria melhor adotar um ensaio que utilizasse anticorpos anti-EPO, que permitisse detectar a EPO presente em uma mistura proteica de forma imuno-específica.

## V. 5 Imunoensaio do tipo *dot-blot*

A técnica de *dot-blot* é um imunoensaio e, como tal, consegue identificar de forma imuno-específica a EPO presente em uma mistura. Esta técnica se baseia na ligação da proteína de interesse a uma membrana de nitrocelulose e sua posterior detecção através do emprego de dois anticorpos. O anticorpo primário, que reconhece a proteína que se deseja detectar (a EPO, no caso do presente trabalho), é adicionado e permanece a ela ligado caso encontre a sua proteína alvo. O anticorpo secundário é aquele que reconhece a porção constante do anticorpo primário e é conjugado a uma enzima. Na etapa final, adiciona-se um substrato para a reação enzimática, que permite a detecção de um composto corado sobre a membrana.

No presente trabalho, utilizou-se, como anticorpo primário, um policlonal anti-hEPO produzido em coelho e, como anticorpo secundário, uma imunoglobulina G produzida em coelho, que reconhece a porção constante de anticorpos de coelho. Este anticorpo secundário era conjugado à enzima fosfatase alcalina, tendo-se usado, para detecção, o substrato da enzima (BCIP/NBT).

O aparelho de *dot-blot* empregado permite a aplicação até em 96 amostras. Assim, em uma única corrida, foram analisadas, em duplicata, as amostras de todas as etapas dos ensaios com as membranas D e Q, assim como a EPO semi-pura (SP), o sobrenadante (SN) e a soroalbumina humana (HSA). Foram adicionados, também, um controle positivo (C+) e um controle negativo (C-), para fins de avaliação da validade do ensaio. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 29.



**Figura 29: Análise por imunensaio dot-blot de todas as amostras oriundas dos ensaios com as membranas D e Q, assim como controles positivos (EPO semi-pura, SP; sobrenadante, SN; C+) e controles negativos (soroalbumina humana, HSA; C-).**

A validade do ensaio foi confirmada pelos controles positivos e negativos, assim como pela intensidade total de cor em amostras oriundas das etapas de lavagem das membranas. Isto confirma os dados obtidos pelo método de Bradford e por eletroforese, que haviam indicado, para as amostras de lavagem, concentrações proteicas praticamente nulas e ausência de bandas de proteínas nos géis corados com prata.

As amostras do *flow-through* dos sobrenadantes aplicados às membranas (amostras 3D, 2Q e 3Q) confirmam os dados obtidos anteriormente: uma quantidade considerável de EPO não adsorveu à membrana, provavelmente devido à saturação dos sítios de adsorção, sendo perdida nas amostras de alimentação coletadas após passarem pelas membranas.

Entretanto, o mais importante resultado desta análise foi a confirmação da forte presença de EPO nas amostras eluídas de ambas as membranas, confirmando a aplicabilidade das membranas adsortivas de troca aniônica Sartobind D e Sartobind Q, como estágios em um processo global de purificação de eritropoetina humana recombinante.

## VI. Conclusões e Sugestões

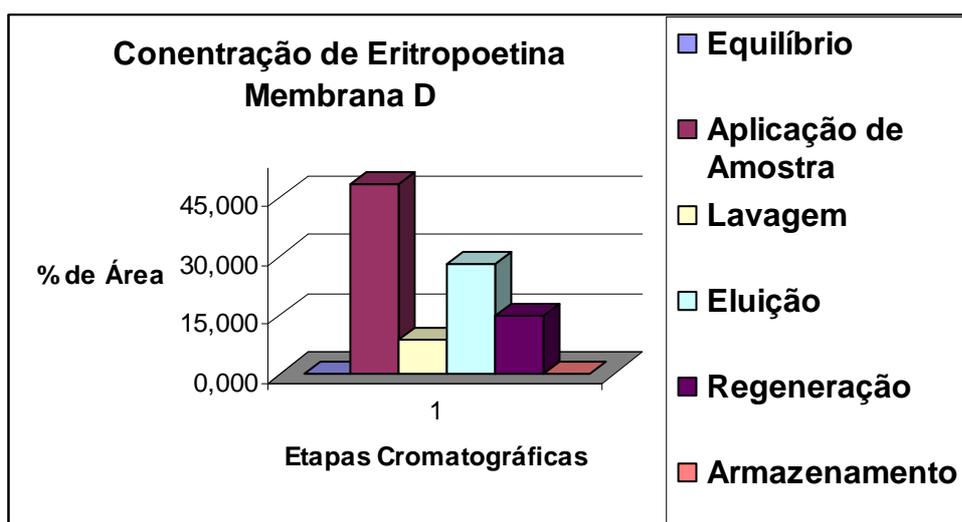
---

Avaliou-se em quantidades percentuais, as etapas cromatográficas de cada membrana, conforme demonstrado na Tabela 22, Figuras 30 e 31. Observou-se significativas diferenças em cada etapa, assim:

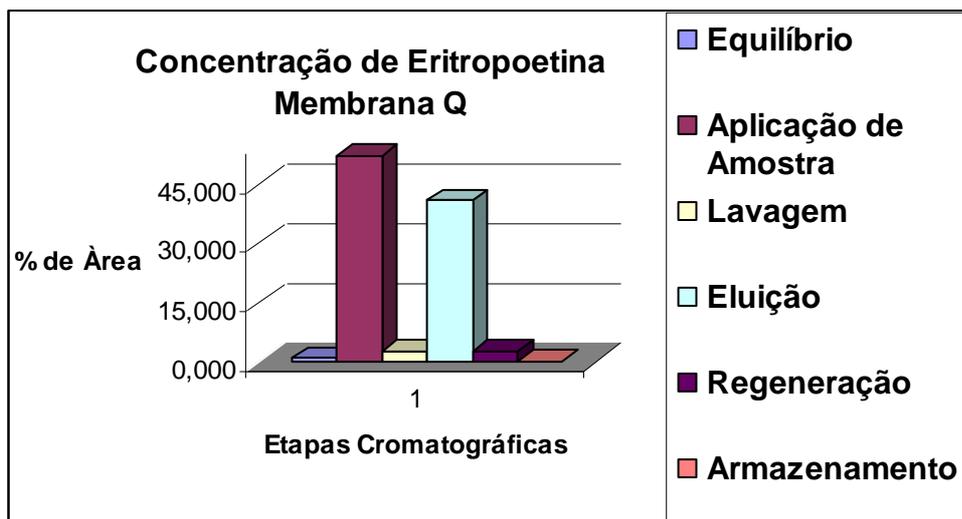
- 1) Na etapa de aplicação de amostra, a membrana Q apresenta maior perda de EPO (flow-through);
- 2) Na etapa de lavagem, a membrana D desorveu maior quantidade de proteína;
- 3) Na etapa de eluição, a membrana Q eluiu maior quantidade de proteína e
- 4) Na etapa de regeneração, a membrana D desorveu maior quantidade de proteína.

**Tabela 22: Percentagem de área (em mg de eritropoetina) nas etapas cromatográficas utilizadas no ensaio com as membranas D e Q**

Membranas	D	Q
Etapas	% de área	
Equilíbrio	0,042	<b>1,055</b>
Aplicação de Amostra	48,421	<b>52,116</b>
Lavagem	<b>8,519</b>	2,821
Eluição	28,099	<b>40,821</b>
Regeneração	<b>14,749</b>	2,906
Armazenamento	0,170	<b>0,281</b>
<b>Total</b>	<b>100,000</b>	<b>100,000</b>



**Figura 30: Percentagem de Eritropoetina nas etapas cromatográficas referentes à membrana D**



**Figura 31: Percentagem de Eritropoetina nas etapas cromatográficas referentes à membrana Q.**

Verificou-se, portanto, a utilidade e a praticidade dos módulos de membranas adsorptivas Sartobind MA75 para a condução de ensaios simples, porém úteis, de adsorção de proteínas nos adsorventes.

Dependendo da pureza e concentração da amostra inicial, será mais benéfico a membrana D ou Q, de acordo com as avaliações, tabelas e figuras analisadas acima.

Através dos ensaios conduzidos e dos resultados obtidos pelas análises de eletroforese e *dot-blot*, confirmou-se a adsorção e eluição de rhEPO nas membranas de troca aniônica Sartobind D e Sartobind Q. Ambas as membranas apresentaram resultado equivalente, indicando que ambas são elegíveis para emprego em um processo global de purificação de EPO humana recombinante.

Como sugestões para trabalhos futuros, sugere-se um aprofundamento no tema, através das seguintes atividades:

A) Realização de ensaios com as membranas Sartobind em sistema automatizado de cromatografia, para fins de realização de gradiente de eluição e detecção em linha da absorbância da corrente de eluído, com o objetivo de determinar a concentração salina ótima para obtenção de EPO;

B) Padronização da técnica de *dot-blot* através da aplicação de padrão de EPO em diferentes concentrações e análise dos resultados por densitometria, de modo a poder explorar o caráter semi-quantitativo desta técnica;

C) Padronização de um imunoenensaio do tipo ELISA que tenha alta sensibilidade e reprodutibilidade, com o objetivo de poder quantificar a EPO presente em todas as amostras e, desta forma, determinar parâmetros importantes do processo de purificação, tais como fator de purificação e rendimento;

D) Realização de isotermas de adsorção para determinar a constante de associação e a capacidade adsortiva máxima das membranas D e Q, visando determinar qual das duas é mais promissora como trocador aniônico para a purificação de eritropoetina humana recombinante e

E) Com base na capacidade adsortiva máxima determinada por isotermas de adsorção, determinar o volume de sobrenadante que pode ser aplicado por volume de leito de membrana, de modo a evitar a perda de EPO no *flow-through*.

Como mestrado profissional, o desafio foi enorme, e apesar de todas as dificuldades encontradas, desde a origem da proteína até os experimentos mais conclusivos, o engrandecimento técnico e profissional foi imensurável.

## Referências Bibliográficas

---

Adams GP, Weiner LM. **Monoclonal antibody therapy of cancer**. Nature Biotechnology 2005, 23:1147-1157.

Altamirano CG. **Análisis del metabolismo de células CHO recombinantes y desarrollo de estratégias de cultivo en médios definidos**. Dissertação de tese de doutorado, Espanha.2000. Departament d'Enginyeria Química, Universitat Autônoma de Barcelona.

Alves PM, Carrondo MJT, Cruz PE, **Culturas de Células Animais**, 2005. In: Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica. Organizadoras: Castilho LR, Augusto EFP, Moraes AM.

Andersen CD, Krummen L, **Recombinant protein production for therapeutic applications**. Current Opinion Biotechnology 2002, 13:117-123.

Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, Souza MT. **Técnicas básicas em biologia molecular**, 2003. UNB - Fundação Universidade de Brasília. Páginas 175-186

Bailey JE, **Biochemical engineering – molecular, cellular, and process frontiers**. Editorial Overview, Current Opinion Biotechnology 1999, 10(2), 115-116.

Bíblia TA, Robinson DK, **In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production**. Biotechnol Prog.1995,11:1-13.

Bradford MM, **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding**. Analytical Biochemistry 1976, v. 72, n. 1-2, pp. 248-254.

Brand S, Golfe RA, Kessler SB, O'Connor JL, Zale SE, **Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications**. Bio Technol. 1998, 6:779-782.

Broudy VC, Tait JF, Powell JS, **Recombinant human erythropoietin: purification and analysis of carbohydrate linkage**. Arch. Biochem. Biophys. 1998, Sep; 265 (2):329-36.

Brower V. **Erythropoietin: Good or Bad for Câncer?** Nat.Med. 2003, 9:1439.

Browne JK, Cohen AM, Egrie JC, Lai PH, Lin FK, Strickland T, Watson E, Stebbing N, **Erythropoietin: Gene cloning, protein structure and biological properties**. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986, 51:693-702.

Bruce A, Alexander J, Julian L, Martin R et al. **Molecular biology of the cell**. Garland Science, New York 2002. 4<sup>a</sup> edição.

Bueno SMA, Miranda EA, **Membranas adsortivas**, In: Pessoa Júnior A, Killikian BV (Eds), *Purificação de Produtos Biotecnológicos* 2005, Editora Manole, São Paulo, p. 176-195.

Butler M, Jenkins H, **Nutritional aspects of growth of animal cells in culture**. *J Biotechnol* 1989, 12:97-110.

Butler M, **Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals**. *Appl Microbiol Biotechnol*. Springer – Verlag 2005, 68: 283-291.

Castilho LR, **Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells**. *Biotechnik/Medizintechnik*. VDI – Verlag, Düsseldorf 2001, Coleção Fortschritt-Berichte – Reihe 17.

Castilho LR, Medronho RA, **Cell retention devices for suspended cell perfusion cultures**, In: **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology: Tools and Applications of Biochemical Engineering Science**. Scheper, T. (ed), Springer Verlag, Heidelberg 2002, v.74,129-169.

Castilho LR, Anspach FB, Decwer WD, **Comparison of Affinity Membranes for the Purification of Immunoglobulins**. *Journal of Membrane Science* 2002b, v.207, n. 2 (Sep), pp. 253-264.

Cavalcanti JM, **Estudo do metabolismo de células CHO.K1 e sua adaptação a concentrações reduzidas de soro fetal bovino**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de microbiologia. Monografia para obtenção do grau de bacharel em microbiologia e imunologia, 2003.

Charcosset C, **Purification of Proteins by Membrane Chromatography**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1998, v. 71, n. 2 (Feb), pp. 95-110.

Chisty Y, **Strategies in Downstream Processing**. *Bioseparation and Bioprocessing: a Handbook* 1998, Vol. II, capítulo 11, 1ª edição. Weinheim, Wiley-VCH. Subramanian, G. (ed),

Ciola R, *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC*. 1998, Editora Edgard Blücher Ltda.

Cruz HJ, Moreira JL, Carrondo MJ, **Metabolically optimized BHK cell fed-batch cultures**. *J Biotechnol* 2000, 80:109-118.

Damm JBL, **The Application of Glycobiology for the Generation of Recombinant Glycoprotein Therapeutics**. *Bioseparation and Bioprocessing: a Handbook* 1998, Vol. II, capítulo 5, 1ª edição, Weinheim, Wiley-VCH. Subramanian, G. (ed).

Demmer W, Nussbaumer D, **Glycoprotein Oligosaccharide Analysis Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography**, Technical Note 42 - Dionex, 1997. *J Chromatogr A*. 1999 Aug 6;852(1):73-81.

Demmer W, Frühholz F, Nussbaumer D, Melzner D, **Economic Production of Biopharmaceuticals by High-speed Membrane Adsorbers**. New Insights into Membrane Science and Technology: Polymeric and Bifunctional Membranes, 2003, cap.14, 1<sup>ª</sup>ed, Elsevier Science & Technology Books. Bhattacharyya D, Butterfield DA (eds).

Dionex, **Glycoprotein Oligosaccharide Analysis Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography**, 1997, Technical Note 42.

Dondos A. **Applicability of the modified universal calibration of gel permeation chromatography on proteins**, 2006, J. Chromatogr. A, Volume 1127, Issue 1-2, 15 September 2006, Pages 183-186.

Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E, **The role of carbohydrate in erythropoietin action**. Endocrinology 1985; 116:2293-2299.

Doyle A, Griffiths JB, **The cell: selection and standardization**. Cultured Environment In: Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology 1998, New York, John Wiley & Sons, p.5 e 87. Doyle, A. & Griffiths, J.B. (eds).

Egrie JC, Browne J, Lai P, Lin FK, **Characterization of recombinant monkey and human erythropoietin**. Prog Clin Biol Res 1985,191:339-350.

Elliott S, Lorenzini T, Asher S, Aoki K, Brankow D, et al, **Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering**. Nat. Biotechnol 2003, 21:414-421.

European Pharmacopeia. **Concentrated erythropoietin solution**. Pág. 3199. Supplement 5.2 to the 5th edition. 2005, Monography n<sup>o</sup>01/2005:1316.

Fernandes P, Prazeres DMF, Cabral JMS, **Membrane assisted extractive bioconversions**. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol 2003, 80, 115-148.

Ferrario E, Ferrari L, Bidoli P, Cândis DD, et al, **Treatment of cancer-related anemia with epoetin alfa: a review**. Cancer Treatment Reviews 2004, 30, 563-575. [Elevierhealth.com/journals/ctrv](http://Elevierhealth.com/journals/ctrv). General and Supportive Care.

Fukuda MN, Sasaki H, Lopez L, **Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates**. Blood 1989, 73, 84-89.

Gebauer KH, Thommes J, Kula MR, **Breakthrough performance of high capacity membrane adsorbers in protein chromatography**. Chemical Engineering Science, 1997, Vol.52, No.3, 405-419.

Ghosh R, **Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges**. J. Chromatogr. A 2002, 952:13-27.

Gokana A, Winchenne JJ, Ben-Ghanem A, et al, **Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms.** J Chromatogr A. 1997 Dec 12;791(1-2):109-18.

Griffiths JB, **Cell Products: An overview.** Animal Cell Biotechnology 1988, Vol. 3. Ed.Academic press. London, pp 179-221.

Griffiths JB, **Scale-up of suspension cells and anchorage-dependent cells.** Methods in Molecular Biology 1990, vol. 5, pp.49-63, Humana Press, Clifton, NJ. Pollard JW & Walker JM (eds).

Hage DS, **High-performance affinity chromatography: A powerful tool for studying serum protein binding.** 2002, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. Volume 768, Issue1, Pages 3-30.

Hahn R, Deinhofer K, Machold C, Jungbauer A. **Hydrophobic interaction chromatography of proteins: II. Binding capacity, recovery and mass transfer properties.** 2003, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies un the Biomedical and Life Sciences. Volume 790, Issue 1-2, Pages 99-114.

Hamilton WG, Ham RG, **Clonal growth of CHO cell lines in protein free media.** In vitro 1977, 13 (9): 537—547.

Handa A, Emery AN & Spier RE, **Detrimental effects of sparger aeration on suspended mammalian cell cultures and their prevention.** Proceedings of the 4<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology 1987, 3:601-604.

Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al, **Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin.**1985: *Nature* 313, 806 – 810, 28 February; doi:10.1038/313806a0.

Karlsson E, Rydén L, Brewer J, **Ion Exchange Chromatography, Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods and Applications.** 2<sup>o</sup> edição, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, p. 145-206. In: Janson JC, Rydén L,(Eds).

Kilikian BV & Pessoa Jr. A, **Purificação de produtos biotecnológicos.** In: Schmidell, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica. 2001, São Paulo. Edgard Blücher.

Kishino S, Miyazaki K, **Separation methods for glycoprotein analysis and preparation.** J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1997,Oct 10;699(1-2):371-81.

Klein E, **Affinity membranes: a 10-year review,** J. Membr.Sci.2000,179:1-27.

Kratje R, **Modificaciones pos-traduccionales**. In: Anais do evento "Production of Biopharmaceuticals in Animal Cell Cultures", 2004, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro/RJ, julho de 2006.

Kretzmer G, **Industrial processes with animal cells**. Appl Microbiol Biotechnol 2002, 59:135-142.

Krystal G, Pankratz HRC, Farber NM, Smart JE, **Purification of Human Erythropoietin to Homogeneity by a Rapid Five-step Procedure**. Blood, Am.Soc.Hematology 1986, v. 67, n. 1 (Jan), pp. 71-79.

Kubota N, Miura S, Saito K, Sugita K, Watanabe K, Sugo T, **Comparison of protein adsorption by anion-exchange interaction onto porous hollow-fiber membrane and gel bead-packed bed**. Journal of Membrane Science, 1996, Vol.117, No.1-2, 135-142.

Kunert R, Steinfellner W, Purtscher M, Assadian A, Katinger H, **Stable recombinant expression of the anti HIV-1 monoclonal antibody 2F5 after IgG3/IgG1 subclass switch in CHO cells**, Biotechnol.Bioeng. 2000, 67, 97-103.

Laemmli UK, **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4**, Nature, 1970, v. 227, n. 5259, pp. 680-685.

Lane D, **Immunoblotting**. Antibodies: A laboratory manual, 1988.

Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG, **EPO's Alter Ego: Erythropoietin Has Multiple Actions**. Stem Cells 2002, 20:485-492.

Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z. **Cloning and expression of the human erythropoietin gene**. Proc Natl Acad Sci USA 1985, 82:7580-7584.

Malakian A, Golebiowska M, Bellefeuille J, **Purification of monoclonal and polyclonal IgG with affinity membrane matrix coupled with proteins A and G**. American Laboratory 1993, 25:40P.

Mellado MCM, **Purificação de Eritropoetina Recombinante Empregando Membranas de Afinidade**. Tese de Mestrado. [Rio de Janeiro] 2005, (COPPE-UFRJ-Engenharia Química).

Menezes JC, Alves SS, Lemos JM, Azevedo SF, **Sugar Analysis of Industrial Penicillin Fermentation Broths Containing Complex Nutrient Sources**, Biotechnol. Techn. 1992, 6(1),1-4.

Mercille S, Johnson M, Lanthier S, Kamen AA, Massie B, **Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates**. Biotechnol. Bioeng. 2000, 67:435-450.

Miyake T, Kung CK and Goldwasser E, **Purification of Human Erythropoietin**. JBC, 1977, Vol. 252, Issue 15, 5558-5564, Aug.

Panina GF, **Monolayer growth systems: multiple processes**. Animal Cell Biotechnology, 1985, vol1, pp.211-242. Academic Press, Orlando. In: Spier RE & Griffiths JB (eds).

Quelle FW, Caslake LF, Burkert RE and Wojchowski DM. **High Level-Expression and Purification of a Recombinant Human Erythropoietin Produced Using a Baculovirus Vector**. Blood 1989, Am.Soc.Hematology Page 1. 652 Blood, Vol 74, No 2 (August 1), pp 652-657.

Rao CS, **Purification of large proteins using ion-exchange membranes**. Process Biochemistry 2001, Volume 37, Number 3, November 2001, pp. 247-256(10).

Reuveny S, Velez D, Miller L & Macmillian JD. **Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors**. Journal of Immunological Methods 1986, 86:61-69.

Reuveny S & Lazar A, **Equipment and procedures for production of monoclonal antibodies in culture**. Monoclonal Antibodies: Production and Application, Advances in Biotechnological Processes 1989, vol 11, pp. 45-80. Alan R.Liss, New York. In: Mizrahi A (ed).

Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM, **Chemistry for peptide and protein PEGylation**. Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54-459-476 Elsevier.

Rodriguez A, Castro FO, Aguilar A, Ramos B et al, **Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits**. Biol. Res. 28, 141-153.

Rosário A, Rosa V, Simona P, Angel FR, Jose AP, Roberta P, Rita DG, Piergiorgio Z, Jordi S. **Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004, 35:1169-1177.

Schütt C, **Patents for Biotechnological Inventions: Current Legal Situation and Case Law in Europe, the US and Japan**. Postgraduate Studies in Intellectual Property Swiss Federal Institute of Technology Zurich. Diploma Paper.Dr.sc.nat. Referee: Dr. U. Kinkeldey. Co-Referee: Dr. V. Meyer. October 2004.

Singh RS, Tiwary AK, Kennedy JF, **Lectins: Sources, Activities and Applications**, Critical Reviews in Biotechnology 1999, v. 19, n. 2, pp. 145-178.

**Schmidt CA, Ramos AS, Silva JEP, Fronza M, Dalmora SL**, Avaliação da Atividade e Caracterização de Eritropoetina Recombinante em Produtos Farmacêuticos, **Arq.Bras.Endocrinol.Metab.** 2003, vol 47, nº2, abril.

Specht R, Han B, Wickramasinghe SR, Carlson JO, et al, **Desonucleosis Virus Purification by Ion Exchange Membranes**. *Biotechnology and Bioengineering*-2004,doi.wiley.com.Page 1.

Suck K, Walter J, Menzel F, et al, **Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems**. *J.Biotechnol.*2006, Feb 10;121(3):361-7. Epub 2005 Sep 12.

Thömmes J, Kula MR, **Membrane Chromatography – an integrative concept in the downstream processing of proteins**. *Biotechnology Progress* 1995, 11:357.

Tsuneda S, Saito K, Furusaki S, Sugo T, **High-throughput processing of proteins using a porous and tentacle anion-exchange membrane**. *Journal of Chromatography A*, 1995,Vol.689, Number 2, 13 January, pp. 211-218(8). Elsevier.

Ulber R, Plate K, Reif OW, Melzner D, **Membranes for Protein Isolation and Purification**. *Isolation and Purification of Proteins*, 2003, cap.6, 1ª edição, New York, Marcel Dekker. In: HATTI-KAUL, R., MATTIASSON, B. (eds).

Walsh G, **Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology**, 1999, 1ª edição, Chichester, John Wiley & Sons.

Walsh G, **Biopharmaceuticals benchmarks**. *Nat Biotechnol* 2003, 21:865-887.

Wang MD, Yang M, Huzel N, Butler M. **Erythropoietin production from CHO cells grown by continuous culture in a fluidized-bed bioreactor**, *Biotechnology and Bioengineering*,2001, vol.77, Issue 2, Pages 194-203.

Xie L, Wang DI, **Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells**. *Trends Biotechnol* 1997,15:109-113.

Yanagi H, Ayoko S, and Ogino S. **Purification of Human Urinary Erythropoietin**. *Journal of Chromatography* 1987, v. 417, n. 1 (Jun), pp. 178-182.

Zaia DAM, Zaia CTBV e Lichtig J, **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes**; 1998, *Química Nova*, v.21, nº 6 São Paulo.

Zanette D, Soffientini A, Sottani C, Sarubbi E, **Evaluation of phenylboronate agarose for industrial-scale purification of erythropoietin from mammalian cell cultures**. *Journal of Biotechnology* 2003, 101:275-287.

Patentes:

Alliger P, **Chromatographic purification of recombinant human erythropoietin**. Patente WO 03/045996 A1, PCT/EPO2/13299, 05/06/2003, Novartis AG, Corporate Intellectual Property Patent and Trademark Department, CH-4002, Basel (CTT). World Intellectual Property Organization. International Bureau.

Alliger P, Palma N, **Chromatographic purification of recombinant human erythropoietin**. Patente USP 20060099674, 11/05/2006. United States Patent Application.

Baygan G, Venture Capital Policies in Korea. OECD Science. **Venture Capital and Patent database. Technology and Industry Working Papers**. 2003/2 OECD Publishing. Doi:10.1787/248000716362.

Carcagno CM, Criscuolo M, Melo C, Vidal JA, **Purification Methods from recombinant human eritropoietin**. Patente WO 00/27869 7 A1, PCT/US99/26241, 18/05/2000, World Intellectual Property Organization – International Bureau, Buenos Aires, Argentina.

Chiba, et al, **Process for production erythropoietin**. USPTO Patent Full, Text and Image Database. United States Patent August 14, 1984, nº 4,465,624.

Hideo C, Uji JP, Ryuzo S, Kyoto JP, Masatsugu U, Kawagoe JP, **Erythropoietin purification process**. Patente USP 4465624, 14/08/1984. United States Patent.

Hoedemaekers R, **Patents for Biotechnological Inventions: Current Legal Situation and Case Law in Europe**, outubro 2004, the US and Japan, vol.4, n.2, SpringerLink.

Huang L, Sylvia, **Purification method by reverse imunoaffinity chromatography**, Patente USP 4568488, 11/01/1984. United States Patent.  
Sugimoto K, Okayama JP, Yasushi H, Okayama JP, **Human Erythropoietin production process**. Patente USP 4377513, 22/03/1983. United States Patent.

Renner WA, **Production of Recombinant Human Erytjropoietin**. Canadian Intellectual Property Office, CA 2 342 859, 02/03/2001, CYTOS BIOTECHNOLOGY AG, Suíça.

Zanette D, Giacomo SE, Adolfo S, Restelli G; Gerenzano E, Armando G, **Processos de purificação de glicoproteínas, como a eritropoetina**. Patente WO 96/32413, PCT/EP96/01509, 17/10/1996, World Intellectual Property Organization – International Bureau. Italy.

Zeng S, Bogner FM; Kunert R, Mueller D, Unterluggauer F, **Cell culture process**. Patente USP 20050069979 A1, 31/03/2005. United States Patent Application.

Sites:

[www.accessexcellence.org/LC/SS/chromatography\\_background.html](http://www.accessexcellence.org/LC/SS/chromatography_background.html)  
Monteiro C, Rosado C, Pinho C, Martins S, **Técnicas de Análises de Proteínas**. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Biologia Celular e Molecular 2003.

Acesso: 18/04/2006.

[www.amersham.com](http://www.amersham.com) – Íon Exchange Chromatography, Principles and Methods.  
Acesso em: 07/02/2007.

[www.anvisa.gov.br/medicamentos/csmed/boletim/social/02\\_230506.htm](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/csmed/boletim/social/02_230506.htm)  
Acesso em 05/04/2007

[www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B13153-2-0%5D.PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B13153-2-0%5D.PDF)  
Acesso em 07/04/2007

[www.bioprocess.amershambiosciences.com](http://www.bioprocess.amershambiosciences.com)

Amersham Pharmacia Biotech. Data File Expanded Bed Adsorption StreamlinerProteinA,2002.

Acesso:05/02/2006

[www.fda.gov/cber/efoi/approve.htm](http://www.fda.gov/cber/efoi/approve.htm)

Acesso em: 22/01/2007.

[www.fiocruz.br/ccs/revista/n08\\_dez05/pdfs/pags24/27biofarmacos.pdf](http://www.fiocruz.br/ccs/revista/n08_dez05/pdfs/pags24/27biofarmacos.pdf)  
Acesso em: 25/05/2006.

[www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br)

Bio Notícias.Informativo de Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Abril 2005. Número 22.

Acesso em: 20/04/2007.

[www.laubscherlabs.com/Presentation/Sartorius%20Sartobind%20VVS%20.pdf](http://www.laubscherlabs.com/Presentation/Sartorius%20Sartobind%20VVS%20.pdf).

Sartobind membrane adsorbers for rapid purification of proteins

Acesso: 10/05/2006.

[www.opas.org.br/medicamentos/legisla/pnm.pdf](http://www.opas.org.br/medicamentos/legisla/pnm.pdf)

Serra J.Ministério da Saúde-Serra

Acesso: 20/01/2007.

[www.orgchem.colorado.edu/hndbksupport/GC/GC.html](http://www.orgchem.colorado.edu/hndbksupport/GC/GC.html)

Acesso em: 20/12/2006

www.pdb.org, Protein Data Bank  
Acesso: 05/05/2005.

www.portalweb05.saude.gov.br  
([http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/doc/medicamentos\\_excepcionais\\_ana\\_marcia.ppt#29](http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/doc/medicamentos_excepcionais_ana_marcia.ppt#29)). Messeder AM, Política Pública de Assistência Farmacêutica – Medicamentos de Dispensação em Caráter Excepcional. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. SCTIE/MS 2005.  
Acesso: 12/12/2006.

www. Sartorius-bbi-systems.com

Frühholz, SF, Membrane adsorbers. Part1: New dimensions in chromatographic purification, 2006.

Acesso: 10/03/2007.

[www.sartorius.com/fileadmin/sartorius\\_pdf/biotech\\_generic\\_process/BrochSartobind\\_SL-1513-e.pdf](http://www.sartorius.com/fileadmin/sartorius_pdf/biotech_generic_process/BrochSartobind_SL-1513-e.pdf)  
Acesso: 05/05/2006.

www.saude.gov.br  
Política Nacional de Medicamentos. Brasília, maio de 2001.  
Acesso: 20/01/2007.