

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA
AVALIAÇÃO DE ESTREPTOQUINASE E CORRELAÇÃO COM O
BIOENSAIO**

Santa Maria, RS
2016

Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE
ESTREPTOQUINASE E CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE
ESTREPTOQUINASE E CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 30 de março de 2016:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Lauren Rosa Crossetti Vaucher, Dra. (UFSM)

Andréa da Silva Ramos Rocha, Dra. (UCPel)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, iluminação, saúde e força para enfrentar os obstáculos;

- ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, por sua dedicação, competência, orientação e revisão crítica, fatores fundamentais na conclusão desse trabalho;

- aos meus pais, Clóvis Dervil Appratto Cardoso e Naise Pereira Cardoso pelo amor, educação, incentivo e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa;

- a minha irmã Amanda Pereira Cardoso pelo amor, amizade e companheirismo durante toda a minha vida;

- a toda a minha família incluindo primos, tios e avós e, em especial, as tias Glaci Tarragó, Gleci Pereira e Rosemary Pereira por sempre atuarem de forma presente em minha vida;

- a todos os meus amigos do Laboratórios do CTEFAR e CEBIFAR, pelo enorme aprendizado, apoio e carinho;

- aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial;

- à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

- à CAPES, pelo apoio financeiro;

- a todos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

*“Não há satisfação maior do que aquela que
sentimos quando proporcionamos alegria
aos outros.”*

Masaharu Taniguchi

RESUMO

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA AVALIAÇÃO DE ESTREPTOQUINASE E CORRELAÇÃO COM O BIOENSAIO

AUTOR: Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior

ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

A estreptoquinase (STK) é uma molécula secretada e isolada de estreptococos β -hemolíticos, constituída de 414 aminoácidos e clinicamente indicada como agente trombolítico para o infarto agudo do miocárdio, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, trombose arterial periférica aguda ou subaguda. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM) para a avaliação de STK em formulações de produtos biofarmacêuticos. No método por CL-FR foi utilizada coluna Jupiter C₄ (250 mm x 4,6 mm d.i.), Phenomenex, mantida a 25°C. A fase móvel A foi constituída por tampão sulfato de sódio 50 mM, pH 7,0, e a fase móvel B por metanol (90:10, v/v), eluída sob fluxo isocrático de 0,8 mL/min. No método por CL-EM foi utilizada coluna Protein KW-802.5 (300 mm x 8,0 mm d.i.), Shodex, mantida a 25°C. A fase móvel foi constituída de tampão acetato de sódio 40 mM, pH 7,0, eluída em vazão isocrática de 1,0 mL/min. Utilizou-se detector de arranjo de diodos (DAD) a 220 nm e 204 nm, para CL-FR e CL-EM, respectivamente. A separação cromatográfica foi obtida nos tempos de 19,3 min e 14,1 min, sendo linear na faixa de concentração de 85 - 25 000 UI/mL ($R^2 = 0,9999$) e 600 - 8 000 UI/mL ($R^2 = 0,9991$), respectivamente, para os métodos por CL-FR e CL-EM. Os limites de detecção e quantificação foram 26 e 85 UI/mL, respectivamente, para o método por CL-FR e 190 e 600 UI/mL por CL-EM. A especificidade foi avaliada em estudos de degradação, e demonstrou-se também que não houve interferência dos excipientes. A exatidão foi 100,24% e 99,88%, com bias inferior a 0,99% e 0,62%, respectivamente, para os métodos por CL-FR e CL-EM. Os métodos propostos foram aplicados para a avaliação da potência de STK, de formas degradadas ou alteradas, de proteínas relacionadas e de alta massa molecular em formulações biofarmacêuticas, e os resultados foram comparados com o bioensaio cromogênico, observando-se diferenças das médias de teor/potência 0,46% e 0,53% superiores para os métodos por CL-FR e CL-EM, respectivamente. Concluiu-se que o trabalho representa contribuição para estabelecer novas alternativas para monitorar a estabilidade e o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biotecnológico. Do mesmo modo, também estabelecem bases para estudos de comparabilidade de biomoléculas, garantindo a segurança e eficácia.

Palavras-chave: Estreptoquinase. Cromatografia Líquida. Validação. Bioensaio. Correlação.

ABSTRACT

VALIDATION OF CHROMATOGRAPHY METHODS FOR THE EVALUATION OF STREPTOKINASE AND CORRELATION WITH THE BIOASSAY

AUTHOR: Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior
ADVISER: Sérgio Luiz Dalmora

The streptokinase (STK) is a secreted and isolated molecule of β -hemolytic streptococci, consists of 414 amino acids and clinically indicated as a thrombolytic agent for myocardial infarction, deep vein thrombosis, pulmonary embolism, acute or subacute peripheral arterial thrombosis. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and size exclusion liquid chromatography (SE-LC) methods were developed and validated for the assessment of STK in biopharmaceutical formulations. A RP-LC method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d.), Phenomenex, maintained at 25°C. The mobile phase consisted of 50 mM sodium sulphate buffer pH 7.0 and methanol (90:10, v/v), run isocratically at a flow rate of 0.8 mL/min. The SE-LC method was carried out on a Protein KW-802.5 column (300 mm x 8.0 mm i.d.), Shodex, maintained at 25°C. The mobile phase consisted of 40 mM sodium acetate buffer pH 7.0, run isocratically at a flow rate of 1.0 mL/min. Chromatographic separation was obtained with retention times of 19.3 min, and 14.1 min, and was linear over the concentration range of 85 - 25 000 IU/mL ($R^2 = 0.9999$) and 600 - 8 000 IU/mL ($R^2 = 0.9991$), respectively, for RP-LC and SE-LC, with photodiode array (PDA) detection at 220 nm and 204 nm. The limits of detection and quantification were 26 and 85 IU/mL, respectively, for the RP-LC and 190 and 600 IU/mL, for the SE-LC. Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. Equally, the accuracy was 100.24% and 99.88%, with bias lower than 0.99% and 0.62%. The validated methods were applied to the determination of STK, and related and higher molecular weight proteins in biopharmaceutical formulations, giving higher mean differences of the estimated content/potencies of 0.46% and 0.53% for the RP-LC and SE-LC related to the chromogenic bioassay, respectively. It is concluded that represents a contribution to establish new alternatives to monitor stability, quality control and thereby assure therapeutic efficacy of the biological medicine.

Keywords: Streptokinase. Liquid Chromatography. Validation. Bioassay. Correlation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura primária da estreptoquinase, adaptada 15

Figura 2 – Ação da estreptoquinase, adaptada 16

3.1 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

Figure 1 – Representative RP-LC chromatograms showing peak 1 = streptokinase; peak 2 = glutamate; peak 3 = deamidated; peaks 4 - 5 = sulphoxides. (a) Biological reference substance of STK; (b) sample of biopharmaceutical formulation; (c) after photodegradation; (d) after degradation by hydrogen peroxide and (e) placebo.44

Figure 2 – Representative SE-LC chromatograms showing peak 1 = streptokinase; peak 2 = albumin; peak 3 = dimmer; peak 4 = aggregate. (a) biological reference substance of STK; (b) sample of biopharmaceutical formulation; (c) after forced mixing; (d) after thermal conditions and (e) placebo.45

LISTA DE TABELAS

3.1 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

| | | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1 | – Accuracy of RP-LC and SE-LC for STK in the formulations | 40 |
| Table 2 | – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the RP-LC method | 41 |
| Table 3 | – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the SE-LC method | 42 |
| Table 4 | – Comparative content/potencies evaluation of STK in biopharmaceutical formulations, by the chromogenic bioassay and LC methods | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|
| μL | Microlitro |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BP | British Pharmacopoeia |
| BRS-STK | Biological Reference Substance of Streptokinase |
| CHMP | Committee for Medicinal Products for Human use |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CL-EM | Cromatografia líquida por exclusão molecular |
| CL-FR | Cromatografia líquida em fase reversa |
| CV | Coefficiente de variação |
| CV% | Coefficiente de variação percentual |
| d.i | Diâmetro interno |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EMA | European Medicines Agency |
| EP | European Pharmacopoeia |
| FDA | Food and Drug Administration |
| ICH | International Conference on Harmonisation |
| INESME | Instituto de Estudios Médico Científicos |
| IS-STK | International Standard of Streptokinase |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Luria-Bertani |
| LD | Limite de detecção |
| LQ | Limite de quantificação |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanômetros |
| °C | Grau Celsius |
| PG | Plasminogênio |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| pNA | Paranitroanilina |
| R ² | Coefficiente de determinação |
| RP-LC | Reverse phase liquid chromatography |
| <i>S. equisimilis</i> | <i>Streptococcus equisimilis</i> |
| SCSA | Streptokinase chromogenic substrate assay |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio |
| SE-LC | Size exclusion liquid chromatography |
| STK | Estreptoquinase |
| STK-PG | Complexo estreptoquinase-plasminogênio |
| UI | Unidade internacional |
| USP | United States Pharmacopoeia |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA | 24 |
| 4 DISCUSSÃO | 46 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 50 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os produtos biotecnológicos têm possibilitado avanços na área terapêutica, com melhora na qualidade de vida e redução da morbidade e mortalidade dos pacientes através da disponibilidade de novos biofármacos como alternativas para o tratamento de enfermidades, tais como câncer, artrite reumatoide e infarto do miocárdio (AMBROSIO 2010; INESME, 2009).

A estreptoquinase (STK) é classificada como produto biológico e sua molécula é secretada e isolada de estreptococos β -hemolíticos dos grupos A, C e G, mas principalmente do grupo C. Sua forma nativa é produzida por fermentação bacteriana, e é usada clinicamente, mas pode apresentar riscos de contaminação. A biomolécula recombinante, geralmente, é produzida através da expressão da proteína em *E. coli* utilizando genes de STK isolados de diferentes cepas de estreptococos.

A estrutura molecular é constituída por 414 aminoácidos que formam uma cadeia polipeptídica, sem pontes dissulfeto, com massa molecular de 47 kDa (MALKE e FERRETTI, 1984).

A atividade farmacológica da STK baseia-se na conversão do plasminogênio (PG), uma proenzima inativa do sistema fibrinolítico, em plasmina, que dissolve a matriz de fibrina contida na estrutura do trombo, gerando subsequente trombólise. Clinicamente é usada para o tratamento de infarto agudo do miocárdio e trombose venosa profunda (COLLEN et al., 1988; HERNÁNDEZ e MARRERO, 2005).

A potência desta biomolécula tem sido avaliada por ensaios biológicos *in vitro* baseados na lise do coágulo de fibrina e pelo ensaio cromogênico de estreptoquinase (EP, 2014). Encontram-se na literatura publicações sobre métodos físico-químicos, porém não existem métodos validados e estudos de correlação com o bioensaio aplicados para a avaliação de teor/potência dos produtos biológicos (BABU et al., 2008; BABU e DEVI, 2015).

Observa-se que produtos biológicos, como a STK, têm estrutura molecular complexa, e podem conter contaminantes originários do processo de expressão e fermentação, bem como, formas degradadas ou alteradas, que podem afetar a atividade, toxicidade e causar efeitos imunogênicos. Deste modo, é necessária a combinação de métodos biológicos, imunológicos e físico-químicos para sua completa identificação, caracterização e avaliação de potência (INESME, 2009; CALVO e ZUNIGA, 2010).

As proteínas requerem alto grau de especificidade estrutural para interagir com o sítio de ação. Por essa razão, é enfatizada a caracterização físico-química para demonstrar estruturas correspondentes às formas ativas dos produtos biotecnológicos. As instabilidades químicas e físicas das proteínas têm sido investigadas por diferentes métodos analíticos, tais como por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que viabilizam a separação, identificação e avaliação de teor/potência das substâncias biológicas. Neste contexto, têm sido estudados como procedimentos alternativos e juntamente com os ensaios da atividade biológica, possibilitam também monitorar e caracterizar as formas relacionadas e degradadas, e avançar para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos (STAMM et al., 2013, ALMEIDA et al., 2014). Além disso, métodos cromatográficos são importantes para viabilizar possíveis estudos de similaridade de macromoléculas biologicamente ativas.

Após o desenvolvimento de um método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que este atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ICH, 2005; ROZET et al., 2007). A avaliação de biomoléculas produzidas por fermentação ou pela tecnologia do DNA recombinante, é fundamental para assegurar que os lotes de produção tenham qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos, durante o processo de registro. Por sua vez, as especificações preconizadas para os produtos biológicos visam garantir a eficácia e segurança clínica (EMA, 2014; LONGSTAFF et al., 2009; BRASIL, 2010).

Neste trabalho, objetivou-se: a) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa para a avaliação de proteínas relacionadas e da forma não-alterada de STK em produtos biofarmacêuticos; b) desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular para avaliação de potência, determinação de dímeros e agregados; c) avaliar correlação entre os métodos cromatográficos e o bioensaio cromogênico *in vitro*. Desse modo, visou-se estudar metodologias que pudessem contribuir para a avaliação de identidade, pureza, teor/potência e estabilidade, aprimorar o controle da qualidade e garantir a segurança e eficácia terapêutica desse produto biotecnológico.

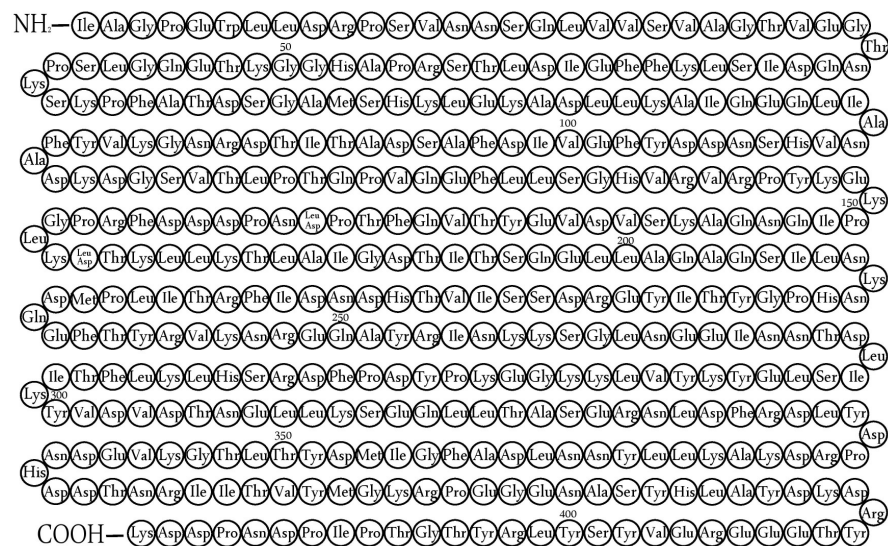
REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A STK foi descrita pela primeira vez por Tillet e Garner (1933), como uma enzima extracelular sintetizada por culturas de estreptococos hemolíticos capaz de dissolver coágulos de sangue humano (SIKRI e BARDIA, 2007). A proteína natural é produzida e secretada por diferentes grupos de *Streptococcus* β -hemolíticos dos grupos A, C e G, sendo o grupo C preferido por não produzir toxinas eritrogênicas. Cepas do grupo C de *Streptococcus equisimilis* H46A (ATCC 12449) isoladas por Christensen (1945) e cepas de *S. equisimilis* do grupo C (ATCC 9542) isoladas por Estrada e colaboradores (1992) são frequentemente empregadas para o isolamento do gene de STK utilizado para expressar a proteína recombinante em outros hospedeiros como *E. coli* e leveduras.

Sua estrutura é composta por 414 aminoácidos em cadeia polipeptídica com massa molecular de 47 kDa. Não contém o aminoácido cisteína, e então, não há formação de pontes dissulfeto. A proteína apresenta sua atividade máxima em pH 7,5 e seu ponto isoelétrico é 4,7. (MULLER et al., 1989; MALKE, 1993; BANERJEE et al., 2004; BABU et al., 2008; LUNARDI, 2011). Sua completa sequência de aminoácidos foi estabelecida por Jackson e Tang (1982), conforme pode ser observado na Figura 1. Todavia, observa-se heterogeneidade entre as STKs produzidas por diferentes grupos de estreptococos, podendo conter 415 aminoácidos.

Figura 1 – Estrutura primária da estreptoquinase, adaptada.

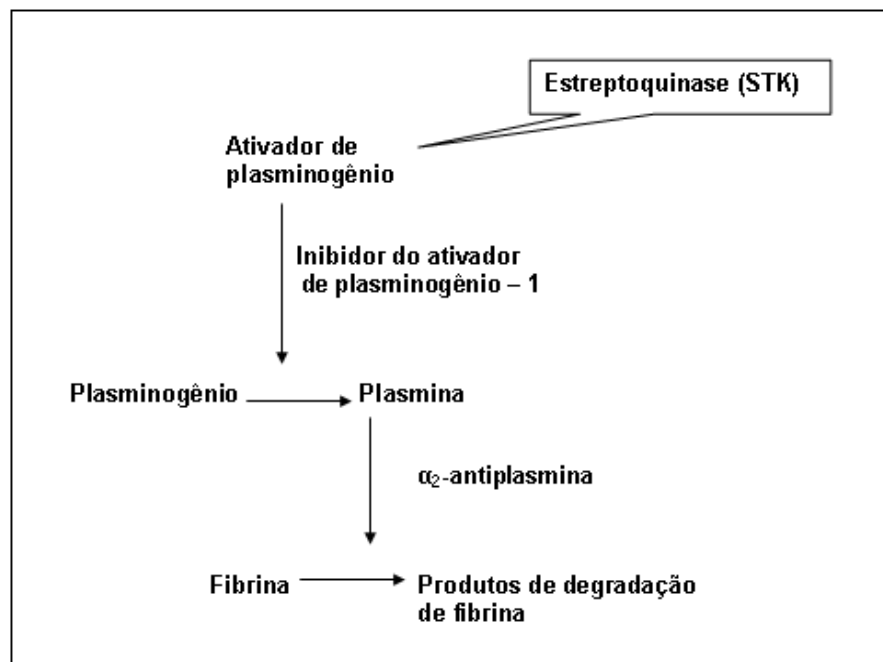


Fonte: (JACKSON e TANG, 1982).

A STK é um agente trombolítico usado clinicamente para o tratamento de infarto agudo do miocárdio, trombose venosa profunda, embolia bilateral das artérias renais, trombose em próteses de válvula cardíaca, além do tratamento de coágulos que se formam nos cateteres pela administração de medicamentos em longos períodos em pacientes sob hemodiálise (HERNÁNDEZ e MARRERO, 2005; SIKRI e BARDIA, 2007).

A ação fibrinolítica acontece pela formação de um complexo na proporção molar de 1:1 com o plasminogênio (STK-PG), que induz uma alteração conformacional no complexo formado, resultando na exposição de um sítio ativo no plasminogênio. No entanto, este complexo não é estável e rapidamente é alterado pela degradação da estreptoquinase para uma forma com 36 kDa e conversão de plasminogênio em plasmina. Isto ocorre devido à clivagem da ligação peptídica Arg560-Val561 do complexo STK-PG, seguido da formação de plasmina e STK proteoliticamente modificada. Por sua vez, esta plasmina é responsável pela dissolução do coágulo de fibrina, conforme esquematizado na Figura 2 (COUTO, 2004; KUNAMNENI e DURVASULA, 2014).

Figura 2 – Ação da estreptoquinase, adaptada.



Fonte: (BANERJEE et al., 2004).

A ativação do PG pela STK ocorre através da função de múltiplos domínios em sua estrutura molecular. O domínio C-terminal é o responsável pelo reconhecimento e ativação do plasminogênio, em especial, a região Asp41-His48 é importante na ligação da molécula de STK ao PG enquanto o domínio γ é essencial para a sua ativação. Por sua vez, o domínio β está envolvido na formação do complexo STK-PG, responsável pela ativação de outras moléculas de plasminogênio em plasmina (KIM et al. 2000; WU et al., 2001; KIM et al., 2002; ZHAI et al., 2003).

O complexo STK-PG possui uma serina em seu sítio catalítico. Desta forma, o complexo é capaz de clivar a ligação Arg560-Val561, convertendo tanto o plasminogênio ativado quanto o livre em plasmina. Portanto, o complexo formado atua também como um ativador de outras moléculas de plasminogênio (REDDY e MARKUS, 1972; MCCLINTOCK et al., 1974; SUMMARIA et al., 1974).

O complexo ativador da STK gera uma rápida produção de plasmina circulante em locais distantes dos coágulos. No entanto, o aumento na produção de plasmina acarreta formação de bradicinina, o que ocasiona diminuição da pressão sanguínea. Portanto, sua infusão venosa é lenta a fim de reduzir estes efeitos adversos, mas isto pode reduzir seu potencial de ação. Sua administração intravenosa geralmente é associada à administração de ácido acetilsalicílico e anticoagulantes (CAMPO, 1999; POLGAR e REED, 1999).

Outro mecanismo de ação da STK descrito baseia-se na capacidade de complexar diretamente com a plasmina, formando, portanto, o ativador de plasminogênio humano. O complexo age cataliticamente sobre as moléculas de PG que são convertidas em plasmina (KUNAMNENI e DURVASULA, 2014).

Nihalani e colaboradores (1997) realizaram estudo com o objetivo de localizar o núcleo de ligação entre o PG e a STK usando pequenos peptídeos sintéticos da estrutura primária da STK. Apenas os peptídeos (SK 234-253, SK 254-273 e SK 274-293) que representam a sequência SK 234-293 demonstraram capacidade de ligação com o PG, indicando que o segmento 234-293 participa diretamente da formação do complexo 1:1 STK-PG. Os epítomos presentes nos resíduos SK 234-253 e SK 274-293 ligam-se ao centro ativo do PG durante a associação intermolecular das duas proteínas para formar o complexo ativador equimolar (1:1). O segmento SK 254-273 confere a capacidade da STK interagir seletivamente com o PG, mas nenhum desses peptídeos foi capaz de ativar o PG.

A atividade biológica de um agente fibrinolítico deve ser determinada com exatidão, para controle adequado da dose, pois variações podem resultar em sérias implicações clínicas (MAHBOUBI et al, 2012).

Christensen (1949) delineou o primeiro método quantitativo para avaliar a STK, no qual considerou uma unidade de STK, como sendo a diluição de solução capaz de lisar um coágulo padrão em dez minutos.

No ensaio da lise do coágulo induzido por STK, a atividade máxima e aparente de STK é fortemente afetada conforme a concentração de tampão, plasminogênio, fibrinogênio e pH (WESTLUND e ANDERSSON, 1991; BANERJEE, 2004).

Os atuais ensaios biológicos para avaliação da potência de STK baseiam-se na sua capacidade de ativar plasminogênio em plasmina, que por sua vez hidrolisa um substrato marcado. A extensão da hidrólise em um determinado tempo é usada para avaliar a potência. Ao longo dos anos, foram utilizados diferentes substratos para a plasmina, que incluíram o coágulo de fibrina, caseína e ésteres sintéticos de lisina e arginina. Estudos de ensaios com ésteres sintéticos indicaram o cloridrato de H-D-Val-Leu-Lis-p-nitroanilina como substrato específico à plasmina, originando ensaio mais específico e sensível para a avaliação de potência deste biofármaco (KULISEK et al., 1989; BANERJEE et al., 2004; EP, 2014).

No estudo colaborativo para estabelecimento do 3º Padrão Internacional de Estreptoquinase foram realizados os ensaios de lise do coágulo de fibrina e o ensaio cromogênico de estreptoquinase, que foi recomendado como método de referência adequado para a avaliação de potência de STK em formulações farmacêuticas (SANDS et al., 2004; EP, 2014).

No ensaio cromogênico, o substrato cromogênico sensível a plasmina é incubado com o complexo estreptoquinase-plasminogênio e hidrolisado resultando na liberação do pNA (paranitroanilina). Esta liberação é medida em 405 nm de forma contínua ao longo da reação ou após interromper a reação com ácido acético ou ácido cítrico. A absorbância determinada é diretamente proporcional à atividade da plasmina, a qual reflete a quantidade de plasminogênio funcional (COUTO, 2004).

Oliva e colaboradores (1998) realizaram a avaliação de potência de amostras de STK, pelos métodos de lise em placa, lise em tubo e cromogênico, demonstrando correlação e validade dos resultados.

Couto (2004) comparou a atividade de cinco produtos farmacêuticos comerciais de STK pelos métodos da lise do coágulo de euglobina e o ensaio cromogênico de estreptoquinase. Observou resultados semelhantes entre os dois métodos, porém com diferenças significativas de potências entre as formulações comerciais de uso clínico. Também verificou consideráveis diferenças em relação ao conteúdo de proteína presente na formulação através da avaliação por SDS-PAGE e análise densitométrica.

Hermentin e colaboradores (2005) submeteram dezesseis preparações de uso terapêutico de STK à análises por eletroforese em gel de poliacrilamida nativa e redutora e sequenciamento N-terminal. Realizaram também o ensaio cromogênico para determinação de atividade de STK. Observaram diferenças consideráveis entre a composição, as potências e a pureza das amostras analisadas. Verificaram a existência de “bandas duplas” na região da STK, as quais podem ser derivadas de alterações bioquímicas ou degradação na formulação.

Mahboubi e colaboradores (2012) estudaram dois diferentes produtos de estreptoquinase a fim de avaliar o efeito do método na avaliação de potência de uma estreptoquinase recombinante (Heberkinasa[®]) e uma nativa (Streptase[®]). A atividade da Streptase[®] no ensaio da lise do coágulo foi de $101 \pm 4\%$ e $97 \pm 5\%$ pelo ensaio cromogênico. Os valores de potência da Heberkinasa[®] obtidos foram de $92,5 \pm 2\%$ pelo ensaio da lise do coágulo e $42 \pm 5\%$ pelo ensaio cromogênico. Além disso, foi realizada a determinação da sequência de aminoácidos da porção N-terminal das moléculas. Os resultados obtidos demonstraram diferenças na sequência de aminoácidos do produto recombinante em relação à forma nativa. Concluíram que a sequência N-terminal da molécula de STK tem um efeito significativo sobre a atividade desta proteína.

Xavier e colaboradores (2015) realizaram validação do bioensaio cromogênico *in vitro*, baseado em leituras a 405 nm, e aplicaram para avaliação de potência de produtos biotecnológicos. Executaram também a avaliação de estreptodornase e estreptolisina nos produtos por bioensaios *in vitro*.

STK's produzidas de diferentes grupos de estreptococos apresentam considerável grau de heterogeneidade das estruturas moleculares. Portanto, diversas técnicas são utilizadas com o objetivo de elucidar completamente a estrutura da molécula (BANERJEE et al., 2004).

A STK não é uma proteína natural do organismo humano, e, portanto, possui propriedades antigênicas podendo induzir a produção de anticorpos anti-estreptoquinase. Estes anticorpos podem causar reações alérgicas e neutralizar os efeitos terapêuticos da STK. Portanto, pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de estudar modificações estruturais através da substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na molécula de STK, visando aumentar a ativação do PG, e o tempo de meia-vida na circulação, além de reduzir a imunogenicidade (TORRÈNS et al., 1999; BELL, 2002).

Bandehpour e colaboradores (2012) clonaram e expressaram uma STK mutante sem o domínio C-terminal de 42 aminoácidos e demonstraram redução na formação de anticorpos em relação à STK nativa. Destacaram que atividade da STK mutante seria menos afetada pelos anticorpos neutralizantes, constituindo-se em alternativa à nativa.

As culturas de estreptococos devem ser manipuladas com precauções em relação à biossegurança, pois as cepas produtoras de STK são patogênicas. Os produtos derivados dessas culturas podem conter estreptolisina e estreptodornase, que são dois contaminantes do processo capazes de apresentar toxicidade (BANERJEE et al., 2004; KUNAMNENI, 2007). Assim, devido ao baixo rendimento na produção de STK a partir de seu hospedeiro natural e sua patogenicidade, justifica-se a pesquisa por fontes recombinantes (KUNAMNENI e DURVASULA, 2014).

Holmstrom (1968) estudou a produção de STK a partir de estreptococos β -hemolíticos do grupo C com a cepa H46A e processos de fermentação, obtendo rendimentos quantitativamente superiores aos existentes.

Malke e Ferretti (1984) expressaram o gene de *Streptococcus equisimilis* H46A (ATCC 12449) em *E. coli*, produzindo quantidades significativas da forma recombinante de STK no meio de cultura, possuindo a vantagem de não usar microrganismos patogênicos. Efetuaram os testes de atividade de estreptoquinase nas diferentes etapas do processo de expressão e purificação.

Malke e colaboradores (1985), determinaram a sequência nucleotídica do gene de *S. equisimilis* H46A e efetuaram a comparação da sequência de aminoácidos, que revelou mínimas diferenças na estrutura primária em relação à STK comercial. Observaram que o gene da estreptoquinase não apresenta regiões de homologia com o gene da estafiloquinase, e que ambas não têm gene ancestral comum e podem ativar o plasminogênio por diferentes mecanismos.

Lee e colaboradores (1997) obtiveram melhores rendimentos na produção de STK em *E. coli* pela remoção do domínio N-terminal à 37°C durante 12 horas em meio Luria-Bertani (LB). O domínio da extremidade N-terminal é conhecido por ser funcionalmente relevante, porém não estão incluídos os 13 primeiros resíduos de aminoácidos da estrutura.

O gene da estreptoquinase de *Streptococcus equisimilis* foi clonado em vetor de expressão de *E. coli* no espaço periplasmático e extraído por digestão com lisozima. Foi realizada a purificação obtendo uma molécula de 47,5 kDa, correspondendo a STK nativa e sua potência foi avaliada pelo ensaio cromogênico (AVILÁN et al., 1997).

A técnica de cultura de alta densidade de células para *E. coli* é amplamente utilizada, principalmente quando se deseja obter altas concentrações de proteínas de interesse. Além disto, a cultura com elevado teor de agentes nutritivos e sais, é um método simples e é altamente empregado para a expressão de proteínas recombinantes com alta atividade

específica (KIM et al., 2004; RAMALINGAN et al., 2007; KUNAMNENI e DURVASULA, 2014).

Sistemas de expressão que produzem grandes quantidades de moléculas recombinantes, como os corpos de inclusão, facilitam a purificação destas proteínas produzidas. Esse sistema de expressão é fundamental, pois o acúmulo de STK ativa é tóxico às células hospedeiras. Portanto, Babu e colaboradores (2008) usaram este sistema e após a extração da forma desnaturada da STK, transformaram a molécula em sua conformação ativa e analisaram por cromatografia em fase reversa demonstrando pureza de 99%. Igualmente submeteram à análise por cromatografia por exclusão molecular determinando os agregados, além da espectrometria de massas MALDI-TOF e a atividade biológica pelo ensaio cromogênico de estreptoquinase. A caracterização da molécula obtida demonstrou a sua similaridade com o 3º Padrão Internacional de Estreptoquinase (WHO 00/464).

Lunardi, em 2011, produziu STK recombinante a partir de culturas de *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* em biorreator, purificou e determinou a atividade biológica utilizando o ensaio cromogênico. Ao mesmo tempo, foi realizado também o ensaio da lise do coágulo de euglobulina, comparando a biomolécula recombinante com amostras comerciais de STK. A STK produzida, em relação a amostra comercial, apresentou 99% de atividade específica, pelo ensaio cromogênico e não apresentou diferenças significativas pelo método da lise do coágulo de euglobina.

Felsia e colaboradores (2011) produziram STK a partir de culturas de *Streptococcus pyogenes* e a purificaram parcialmente por precipitação com sulfato de amônio, diálise e colunas cromatográficas. Quantificaram pelo método de Lowry e analisaram sua mobilidade eletroforética e massa molecular por SDS-PAGE, demonstrando banda única característica de STK, na região de 47 kDa. A atividade biológica foi avaliada pelo ensaio da caseinólise radial obtendo como resultado zonas claras ao redor do poço, indicando atividade caseinolítica da estreptoquinase.

Babu e Devi (2015) relataram pela primeira vez a produção e avaliação da atividade trombolítica *in vitro* de STK purificada produzida a partir de *Streptococcus equinus* VIT_VB2 isolado de leite bovino. A atividade biológica foi avaliada pelo ensaio cromogênico com o substrato S-2251, com resultado de $6330 \pm 2,2$ UI. Determinaram também seu peso molecular de 47 kDa por SDS-PAGE e sua pureza por CLAE.

As estruturas moleculares tridimensionais complexas de alta massa molecular dos produtos biológicos e sua heterogeneidade dependente do processo de fermentação ou de produção faz com que este grupo de biofármacos seja diferente dos medicamentos clássicos.

Assim, os métodos analíticos usuais não conseguem caracterizar estas moléculas suficientemente para confirmar a sua equivalência estrutural com a biomolécula de referência. Deste modo, tem sido utilizada a combinação de métodos para a caracterização, avaliação de identidade, pureza, teor/potência e estabilidade destes produtos (SCHELLEKENS, 2009; KRESSE, 2009; SCHELLEKENS e MOORS, 2010).

Ao mesmo tempo, as patentes de muitos biofármacos estão expirando. Assim, uma nova geração de biomoléculas conhecida como biossimilares, está sendo desenvolvida (SCHLLEKENS, 2004; KUHLMANN e COVIC, 2006; COVIC e KUHLMANN, 2007). No entanto, a segurança e eficácia desses produtos deve ser comprovada demonstrando a equivalência com o produto original (LUNARDI, 2011), pois pequenas diferenças no processo de fabricação podem afetar a eficácia e segurança das proteínas recombinantes. É essencial para a segurança do paciente que tanto o biofármaco inovador quanto o biossimilar tenham assegurada a consistência de sua produção lote-a-lote, através da rigorosa avaliação de pureza e atividade (KUHLMANN e COVIC, 2006). Além disso, o fabricante do biossimilar deve apresentar dados adicionais em relação à comparabilidade físico-química, bioequivalência em pacientes, além de dados clínicos sobre imunogenicidade (SCHLLEKENS, 2004).

Os estudos de métodos físico-químicos que possam ser usados em combinação ou como alternativas aos bioensaios são importantes para as análises qualitativas e quantitativas das proteínas relacionadas, e das formas de alta massa molecular das macromoléculas biologicamente ativas. Além disso, a precisão, exatidão e facilidade de execução em relação ao ensaio biológico contribuem para aprimorar o controle da qualidade dos produtos biológicos (CHMP, 2005; EMA, 2014).

A cromatografia líquida destaca-se entre os métodos usados para análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, apresentando-se como método específico, sensível, robusto e reproduzível, com custo e duração de análise adequados (ZARRIN et al., 2006; STAMM et al., 2013). Os métodos por CL-FR exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas e têm sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, separação e quantificação de formas oxidadas e desamidadas das proteínas, com detecção no ultravioleta (SOUTO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014). Um inconveniente deste método é a possível desnaturação ou dissociação das proteínas adsorvidas à matriz da coluna, não sendo apropriado para estabelecer a potência dos produtos farmacêuticos que contêm oligômeros não covalentes e polímeros biologicamente inativos (MANNING et al., 2010; LEAL et al., 2011). Do mesmo modo, a cromatografia líquida por

exclusão molecular (CL-EM) é uma técnica versátil adotada para determinação de proteínas e das formas agregadas na sua configuração nativa (FEKETE et al., 2014).

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005, FDA, 2015; USP 39, 2016). Os principais parâmetros a serem avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. Desse modo, esses parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (SHABIR et al., 2007; ROZET, et al. 2007).

A publicação científica efetuada no contexto da dissertação está anexada a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos na mesma.

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3.1 – Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior, Rafaela Ferreira Perobelli, Bruna Xavier and Sérgio Luiz Dalmora. Assessment of Streptokinase: Correlation of bioassay with LC Methods.

Assessment of Streptokinase: Correlation of bioassay with LC Methods

Clóvis D. A. Cardoso Jr.^b, Rafaela Ferreira Perobelli^b, Bruna Xavier^a and Sérgio Luiz Dalmora^a

^aDepartment of Industrial Pharmacy and ^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil

*Corresponding author. Phone./fax: + 55 55 32208952

E-mail address: sdalmora@terra.com.br (Sérgio Luiz Dalmora)

ABSTRACT

Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and size exclusion liquid chromatography (SE-LC) methods were developed and validated for the assessment of Streptokinase (STK). The RP-LC method was carried out on a Jupiter C₄ column (250 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at 25 °C. The mobile phase A consisted of 0.05 M sodium sulphate buffer, pH 7.0, and the mobile phase B was methanol (90:10, v/v), run isocratically at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The SE-LC method was carried out on a Protein KW 802.5 column (300 mm x 8.0 mm i.d.), maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 0.04 M sodium acetate buffer, pH 7.0, run isocratically at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. Chromatographic separation was obtained with retention times of 19.3 min, and 14.1 min, and was linear over the concentration range of 85 – 25 000 IU mL⁻¹ ($R^2 = 0,9999$) and 600 – 8 000 IU mL⁻¹ ($R^2 = 0,9991$), respectively, for RP-LC and SE-LC, with photodiode array (PDA) detection at 220 nm and 204 nm. Specificity was established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. Equally, the accuracy was 100.24% and 99.88%, with bias lower than 0.99% and than 0.62%. Chromatographic methods were applied for the content/potency assessment of STK, related proteins and high molecular weight forms in biopharmaceutical formulations, and the results were correlated to those of a bioassay. It is concluded that the employment of the methods in conjunction allows a great improvement in monitoring stability, contributing to evaluate alternatives which improve the quality control and thereby assure the therapeutic efficacy of the biotechnology-derived medicine.

Keywords: Streptokinase, Size-exclusion Liquid Chromatography, Reversed-Phase Liquid Chromatography, Validation, *in vitro* bioassay.

1 INTRODUCTION

Biotechnology-derived product streptokinase (STK) has been obtained as a native protein from pathogenic beta-hemolytic streptococci A, C and G, being the group C preferred as they lack erythrogenic toxins. Besides, recombinant streptokinase with reduced immunogenicity was cloned and expressed in *E. coli* (MALKE e FERRETTI, 1984; HERNANDÉZ et al., 2005; BABU et al., 2008).

The STK molecule is a polypeptide chain consisting of 414 amino acids, that does not contain disulphide bonds, yielding a molecular mass of 47 kDa with pI 4.7. Due to its ability to activate the fibrinolytic system, converting plasminogen to plasmin, it is clinically used worldwide as a thrombolytic agent to treat patients with acute myocardial infarction, deep vein thrombosis, arterial thrombosis and embolism (KUNAMNENI et al., 2007; BUTCHER et al., 2013).

The biological potency of STK was assessed by the *in vitro* fibrin clot lysis assay. More recently the chromogenic substrate assay (SCSA), based on plasminogen to plasmin activation and measuring spectrophotometric responses, has been recommended as the bioassay for the potency evaluation of streptokinase in biopharmaceutical formulations (SANDS et al., 2004; EP, 2014).

Streptokinases produced by diverse groups of streptococci have different structures, and a complete characterization of the preparations is critical for the safe and effective fibrinolytic therapy (HERMETIN et al., 2005). Liquid chromatographic has been successfully applied to monitor content, purity, identity and chemical stability of the biotechnology-derived products (ALMEIDA et al., 2010; FEKETE et al., 2012). RP-LC offers a high level of accuracy and sensitivity for the analysis of closely related protein variants or degradation products, which may have reduced activity (WANG, 1999). Moreover, SE-LC has been applied for quantification and to determine the native size of protein and to reveal possible dimmers and aggregates which have no or reduced activity, and altered immunogenicity (GROOT & SCOTT, 2007; WANG et al., 2010). Physicochemical techniques cannot yet predict the biological activity, but can produce information about structure and composition, and a combination of methods has been successfully applied to monitor stability, and correlation studies (BRISTOW & JEFFCOATE, 1992; DALMORA et al., 2012).

The aim of this work was to develop and validate specific, sensitive and stability-indicating RP-LC and SE-LC methods for the characterization and content assessment of STK

in biopharmaceutical formulations, and to correlate the results with the SCSA *in vitro* bioassay. Thus contributing to the development of alternative methods to monitor stability, improve quality control, and thereby assure the therapeutic efficacy of the biological product.

1. EXPERIMENTAL

1.1 CHEMICALS AND REAGENTS

The 3rd International Standard of Streptokinase – WHO 00/464 (IS-STK) was obtained from National Institute for Biological Standards and Control - NIBSC (Hertz, UK). Batches of Solustrep[®] Bergamo (São Paulo, Brazil), containing 1 500 000 IU per vial were acquired from commercial sources within their shelf life period. Plasminogen of bovine plasma and human serum albumin were acquired from Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, USA) and chromogenic substrate S-2251 was purchased from Chromogenix[®] (Milan, Italy). Sodium sulphate anhydrous, methanol, glutamate, sodium phosphate, sodium acetate, acetic acid used as reagents or excipients, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade.

1.2 APPARATUS

Liquid Chromatography (LC) analysis was carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10AVP system controller, a LC-10 ADVP pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10ADVP autosampler, and a SPD-M10AVP PDA detector. The peak areas were automatically integrated by computer using Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program.

The absorbances of the chromogenic assay were measured on a Multiskan FC microplate reader Thermo Scientific[®] (Vantaa, Finland).

1.3 SAMPLES AND STANDARD SOLUTIONS

A commercial batch of streptokinase was calibrated against the 3rd International Standard of Streptokinase (WHO 00/464) and used as a in house biological reference substance of STK (BRS-STK) for the liquid chromatography methods, with the label claim of 1 500 000 IU/vial, equal to 14.56 mg/vial, based on the WHO 00/464 (1030 IU=10 µg).

Working standard and sample solutions of STK were prepared daily by diluting the BRS-STK and the samples of biopharmaceutical formulations in ultrapure water to a final concentration of 5 000 IU mL⁻¹ (48.54 µg/mL) for RP-LC and to a final concentration of 4 000 IU mL⁻¹ (38.83 µg/mL), for SE-LC. For all of the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system from Millipore (Bedford, USA). All solutions were degassed by ultrasonication Tecnal (São Paulo, Brazil) and filtered through a 0.22 µm Millex filter Millipore (Bedford, USA).

1.4 PROCEDURES

1.4.1 Reversed-phase Liquid Chromatography (RP-LC)

The experiments were performed on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C4 column (250 mm x 4.6 mm i.d., with a particule size of 5µm and pore size of 300 Å) maintained at 25 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 0.05 M sodium sulphate buffer, pH 7.0, and methanol, (90:10, v/v), run at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. PDA detection at 220 nm was used. The injection volume was 50 µL for both reference substance and samples.

1.4.2 Size-Exclusion Liquid Chromatography (SE-LC)

The experiments were performed on a size-exclusion Shodex (Tokyo, Japan) Protein KW 802.5 column (300 mm x 8.0 mm i.d., with a particule size of 5 µm and pore size of 150 Å) maintained at 25 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 0.04 M sodium acetate buffer, pH 7.0, run at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. PDA detection at 204 nm was used. The injection volume was 50 µL for both the reference substance and samples.

1.4.3 Streptokinase chromogenic substrate assay (SCSA):

The bioassay was performed as described elsewhere for the concentrated solution, modified accordingly (EP, 2014; XAVIER et al., 2015). Volumes of 25 µL of the IS-STK and the sample solutions with five concentrations between 2.5 and 40 IU mL⁻¹, were added to the 96-well plate, respectively in triplicate, and allowed to equilibrate at 37 °C in water-bath for 1

min. Then, 100 μL of the chromogenic substrate (diluted 1:1 in water) were added to each well, and the plate was incubated for exactly 2 min, followed by the addition of 50 μL of the 1 mg mL^{-1} plasminogen. The reaction was stopped 10 min after, by adding 90 μL of 20% acetic acid. The absorbance was measured at 405 nm in the microplate reader and the biological potencies were calculated against the IS-STK by the parallel line statistical method using the CombiStats software (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM Council of Europe).

1.5 VALIDATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHODS

The methods were validated using samples of biopharmaceutical formulations of STK with a label claim of 1 500 000 IU vial^{-1} by determinations of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, detection limit (DL), quantitation limit (QL), robustness, stability, and system suitability test, following the guidelines (ICH, 2005; FDA, 2015).

1.5.1 Specificity

The specificity of the RP-LC method was assessed by subjecting a BRS-STK solution and a sample of STK biopharmaceutical formulations (5 000 IU mL^{-1}) to oxidative conditions induced by 3% hydrogen peroxide for 24 hours. Photodegradation was induced by exposing the samples in a photostability chamber to 200 W h m^{-2} of near ultraviolet light for 24 hours. For the SE-LC a BRS-STK solution and a sample of STK biopharmaceutical formulations (4000 IU mL^{-1}) were subjected to neutral hydrolysis (80 $^{\circ}\text{C}$, for 2 h) and mixing condition (shaken for 35 min). In addition, interference from excipients of the biopharmaceutical formulations was determined by injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of formulation excipients). Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity using a PDA detector.

1.5.2 Linearity

The linearity of the RP-LC and SE-LC methods was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight concentrations of the BRS-STK, over the 85 – 25 000 IU mL^{-1} and 600 – 8 000 IU mL^{-1} range, respectively. Three replicate 50 μL

injections of the reference solutions were prepared to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of BRS-STK to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and the determination coefficient.

1.5.3 Precision and accuracy

Assay precision was determined by means of repeatability (intra-day) and intermediate precision. Repeatability was examined by eight evaluations of a sample of STK on the same day under the same experimental conditions. The intermediate precision of the methods was assessed by analysis of two samples of the biopharmaceutical formulations on three different days (inter-days) and also by submitting the samples to analysis by other analysts in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was assessed applying the proposed methods to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the biomolecule to obtain solutions at concentrations of 4000, 5000 and 6000 IU mL⁻¹ for the RP-LC, and 3200, 4000 and 4800 IU mL⁻¹ for the SE-LC method, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. Accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation; it was expressed as the percentage relative error (bias%) between the measured mean concentrations and the added concentrations.

1.5.4 Detection and Quantitation Limits

The detection limit (DL) and the quantitation limit (QL) were calculated, as defined by ICH (ICH, 2005), by using the mean values of three independent analytical curves determined by a linear-regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio of the standard deviation of the intercept and the slope. The QL was also evaluated in an experimental assay.

1.5.5 Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters; it provides an indication of its reliability for routine analysis. The robustness of the RP-LC and SE-LC methods was determined by

analyzing the same samples containing (5 000 IU mL⁻¹ and 4 000 IU mL⁻¹), respectively, under a variety of conditions of the method parameters, such as: mobile phase concentration, mobile phase pH, flow rate and wavelength. To assess the stability of the STK samples, analysis was performed after their storage at 2 – 8 °C for 24 h and 48 h, and also placed into the auto sampler, at room temperature, for 24 h. To study the stability of these solutions, the experiment was run and any changes in the chromatographic pattern as compared with the freshly prepared solutions were noted.

1.5.6 System Suitability Test

A system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and repeatability of the RP-LC and SE-LC system. Five replicate injections of BRS-STK containing 5 000 IU mL⁻¹ and 4 000 IU mL⁻¹, respectively, were used. The peak area, retention time, theoretical plates, and tailing factor (peak symmetry) were measured using CLASS-VP® V 6.12 software.

1.5.7 Analysis of STK in Biopharmaceutical Formulations

For the quantitation of STK by the RP-LC and SE-LC methods, the respective solutions were diluted to appropriate concentration in ultrapure water, injected in triplicate and the percentage recoveries of the biopharmaceutical calculated against the BRS-STK, calibrated against the IS-STK.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1 OPTIMIZATION OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

For the RP-LC method, tests were carried out to determine which mobile phase would lead to satisfactory selectivity and sensitivity within a short separation time. Sodium sulphate buffer resulted in higher sensitivity related to phosphate buffer, and lower retention time compared to trifluoroacetic acid and acetonitrile in water. Resolution was improved using as mobile phase 0.05 M sodium sulphate buffer and methanol (90:10, v/v). For the selection of the best wavelength detection, a PDA detector was used. The optimized conditions of the RP-LC method were validated for the analysis of STK in biopharmaceutical formulations.

For the SE-LC method, tests were carried out to determine which mobile phase would lead to satisfactory selectivity and sensitivity within a short separation time. Sodium acetate buffer resulted in higher sensitivity related to phosphate buffer, and lower retention time compared to phosphoric acid. Resolution was improved using as mobile phase 0.04 M sodium acetate buffer. For the selection of the best wavelength detection, a PDA detector was used. The optimized conditions of the SE-LC method were validated for the analysis of STK in biopharmaceutical formulations.

Typical chromatograms obtained by the proposed methods, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to STK with a retention time of 19.3 min and 14.1min, shown in Fig. 1(a) and 2(a).

2.2 METHODS VALIDATION

2.2.1 Specificity

The specificity of the RP-LC method for the biological product was evaluated under oxidative conditions and photodegradation generating the main peak at 19.3 min, and additional peaks of related proteins with retention times at 13.7 min, 14.7 min and 15.5, respectively, as shown in Fig. 1. Specificity of the SE-LC method was evaluated by forced mixing and thermal conditions generating the peak of the monomer at 14.1 min, and additional peaks of aggregates and dimmers with retention times at 11.8 min and 12.4 min (Fig. 2). Moreover, the injection of a sample containing only the in-house mixture of the formulation excipients showed only one peak of human serum albumin with a retention time at 7.1 min. Then, the specificity was established by determining the peak purity in the BRS-STK and the samples using a PDA detector.

2.2.2 Linearity

For the RP-LC method, the analytical curves constructed for STK were found to be linear over the range of 85 – 25 000 IU mL⁻¹. The value of the determination coefficient was calculated as $R^2 = 0.9999$, $y = (982.24 \pm 18.75) x - (29034 \pm 8511.20)$, where x is concentration and y is the peak absolute area, indicating the linearity of the analytical curve for the method. Equally, for the SE-LC method, the analytical curves were found to be linear over the range of 600 – 8 000 IU mL⁻¹. The value of the determination coefficient was

calculated as $R^2 = 0.9991$, $y = (468.02 \pm 18.98) x - (38358 \pm 2549.08)$, indicating the linearity of the analytical curve for the method.

2.2.3 Precision

The precision of the methods was studied by calculating the relative standard deviation (RSD %) for eight analyses at a concentration of 5 000 IU mL⁻¹ and 4 000 IU mL⁻¹, respectively, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD value was 0.25% and 0.74%. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-days), giving RSD values for the contents/potencies of 0.44 and 0.25%, respectively for the RP-LC and 1.30 and 1.25%, for the SE-LC methods. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD after analysis of two samples of the same biopharmaceutical formulations by three analysts; the mean values were found to be 0.98 and 0.55%, respectively, for the RP-LC and 0.50 and 0.68%, for the SE-LC methods, as given in.

2.2.4 Accuracy

The accuracy of the RP-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 4 000, 5 000 and 6 000 IU mL⁻¹. In addition, the accuracy of the SE-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 3 200, 4 000 and 4 800 IU mL⁻¹, respectively. The absolute means were obtained with a mean value of 100.24% and 99.88% and a bias lower than 0.99% and 0.62% (Table 1), respectively, showing that the methods are accurate within the desired ranges.

2.2.5 Detection and Quantitation Limits

The DL and QL of the LC methods were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression line by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 26 and 85 IU mL⁻¹, respectively, for the RP-LC and 190 and 600 IU mL⁻¹, for the SE-LC. The evaluated experimental QL with a precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$ (SHABIR et al.,

2007), was found to be 85 IU mL⁻¹ and 600 IU mL⁻¹, respectively. The DL and QL of the LC methods are suitable for the quality control analysis of biopharmaceutical formulations.

2.2.6 Robustness

The robustness of the analytical procedure was determined by analyzing samples of an BRS-STK solution in triplicate by the one-variable-at-a-time (OVAT) approach. The results and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 2 and Table 3, together with the optimized values. Additionally, the robustness was also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach at three levels (1 unit per parameter up or down around optimized values). This procedure gives results for minimum changing of the maximum number of parameters at a time, and is a very useful, rapid and efficient approach for robustness determination. The results for the OVAT and MVAT procedures were within the acceptable deviation ($RSD \leq 2\%$), and an analysis of the variance showed non-significant differences ($p > 0.05$). The analysis performed with a wider level of variations of the solution pH and flow rate showed changes of the retention time related to the optimized conditions. Moreover, the peak symmetry values were also evaluated, showing non-significant differences ($p > 0.05$). The stability of reference and sample solutions was assessed, showing non-significant changes ($< 2\%$) of the main peak relative to freshly prepared samples.

2.2.7 System Suitability

The system suitability tests was performed and RSD values calculated for the retention time, peak symmetry and peak area were 1.78, 1.18 and 0.14%, respectively for the RP-LC method, and 0.16, 1.32 and 1.18%, for the SE-LC. The number of theoretical plates was about 9396, with an RSD of 1.21% and 15938, with an RSD of 1.48%, respectively. The experimental results showed that the parameters tested were within the acceptable range ($RSD < 2\%$), indicating that the system is suitable for the intended analysis.

2.3 METHOD APPLICATION

The validated methods were applied to the determination of native STK in biopharmaceutical formulations, giving contents/potencies within 98.19 and 101.44% of the

stated potency, as shown in Table 4, with mean values 0.46% and 0.53% higher for the RP-LC and SE-LC compared to the *in vitro* bioassay. In addition, samples subjected to photodegradation, oxidative degradation and neutral hydrolysis conditions were evaluated by the SCSA and the LC methods, which showed significant effects ($p < 0.05$) on the potencies (Table 4), with changes in the chromatographic profiles that demonstrated the potential and importance of the LC methods. The experimental values were compared statistically by analysis of variance (ANOVA), which showed significant correlation ($p > 0.05$), demonstrating also the stability-indicating capability and the application of the methods, also to support biosimilarity studies of the biomolecule (SCHELLEKENS & MOORS, 2010).

3. CONCLUSIONS

The results of the validation studies show that the RP-LC and SE-LC methods are specific, accurate, and sensitive. Separation of STK was achieved with a retention time of 19.3 and 14.1 min for the RP-LC and SE-LC, respectively, and the methods were successfully used for the analysis of products, showing comparable profiles and mean values of the estimated content/potency 0.46% and 0.53% higher compared to those of the *in vitro* bioassay. The LC methods can be applied in combination with the *in vitro* chromogenic bioassay during the biotechnology process, and through subsequent purification steps, to assure also the batch-to-batch consistency of the bulk and finished biological products, contributing to monitor the stability and improve quality of the biotechnology-derived medicine.

Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Projects 477013/2011 and 306898/2011-0.

REFERENCES

- ALMEIDA, B. E.; OLIVEIRA, J. E.; CARVALHO, C. M.; DALMORA, S. L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, São Paulo, v. 53, p. 90-97, mar., 2010.
- BABU, P. V. C.; SRINIVAS, V. K.; MOHAN, V. K.; KRISHNA. Renaturation, purification and characterization of streptokinase expressed as inclusion body in recombinant *E. coli*. **Journal of Chromatography B**, India, v. 861, p. 218-226, 2008.
- BRISTOW, A. F.; JEFFCOATE, S. L. Analysis of therapeutic growth hormone preparations: report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies. **Biologicals**, UK, v. 20, p. 221-231, 1992.
- BUTCHER, K.; SHUAIB, A.; SAVER, J.; DONNAN, G.; DAVIS, S. M.; NORRVING, B.; WONG, K. S. L.; ABD-ALLAH, F.; BHATIAR, R.; KHAN, A. Thrombolysis in the developing world: is there a role for streptokinase? **International Journal of Stroke**, v. 8, p. 560-565, 2013.
- DALMORA, S. L.; DOS SANTOS, B. C.; MACHADO, F. T.; WALTER, M. E.; DALMORA, M. E. A.; SOUTO, R. B. Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its correlation with reversed-phase liquid chromatography method and bioassay. **Talanta (Oxford)**, v. 94, p. 1-7, 2012.
- EUROPEAN Pharmacopoeia 8th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2014.
- FDA. *Guidance for industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics* (2015).
- FEKETE, S.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 09 – 27, 2012.
- GROOT, A. S.; SCOTT, D. W. Immunogenicity of protein therapeutics. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 11, p. 482-490, 2007.
- HERMETIN, P.; CUESTA-LINKER, T.; WEISSE, J.; SCHMIDT, K.; KNORST, M.; SCHELD, M.; THIMME, M. Comparative analysis of the activity and content of different streptokinase preparations. **European Heart Journal**, v. 26, p. 933-940, 2005.
- HERNÁNDEZ, L.; MARTINEZ, Y.; QUINTANA, M.; BESADA, V.; MARTINEZ, E. Heberkinasa: recombinant streptokinase. **European Heart Journal**, p. 1691, 2005.
- ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

KUNAMNENI, A.; ABDELGHANI, T. T. A. ELLAIAH, P. Streptokinase—the drug of choice for thrombolytic therapy. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 23, p. 09-23, 2007.

MALKE, H.; FERRETTI, J. J. Streptokinase: Cloning, expression, and excretion by *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 3557-3561, 1984.

SANDS, D.; WHITTON, C. M.; LONGSTAFF, C. International collaborative study to establish the 3rd International Standard for Streptokinase. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 2, p. 1411-1415, 2004.

SCHELLEKENS, H.; MOORS, E. Clinical comparability and European biosimilar regulations. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 28-31, 2010.

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. L.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311-333, 2007.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, n. 2, p. 129-188, 1999.

WANG, W.; NEMA, S.; TEAGARDEN, D. Protein aggregation—Pathways and influencing factors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, p. 89-99, 2010.

XAVIER, B.; CAMPONOGARA, R. L.; CARDOSO JÚNIOR, C. D. A.; PEROBELLI, R. F.; WALTER, M. E.; MALDANER, F. P. S.; DALMORA, S. L. Validation of the chromogenic bioassay for the potency assessment of streptokinase in biopharmaceutical formulations. **Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 6, n. 6, 2015.

Table 1 – Accuracy of RP-LC and SE-LC for STK in the formulations

| Method | Nominal concentration (IU mL ⁻¹) | Mean concentration measured ^a (IU mL ⁻¹) | RSD ^b (%) | Accuracy (%) | Bias ^c (%) |
|--------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------|--------------------------|
| RP-LC | 4 000 | 4 011.78 | 1.28 | 100.29 | 0.29 |
| | 5 000 | 5 049.36 | 1.05 | 100.99 | 0.99 |
| | 6 000 | 5 965.73 | 0.51 | 99.43 | - 0.57 |
| SE-LC | 3 200 | 3213.89 | 0.58 | 100.43 | 0.43 |
| | 4 000 | 3 975.37 | 0.79 | 99.38 | - 0.62 |
| | 4 800 | 4791.27 | 0.25 | 99.82 | - 0.18 |

^a Mean of three replicates. ^b RSD = Relative standard deviation. ^c Bias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

Table 2 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the RP-LC method

| Variable | Range investigated | STK ^a (%) | RSD ^b (%) | Optimized value |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| Mobile phase pH | 6.5 | 99.62 | 0.17 | 7.0 |
| | 7.0 | 99.49 | 0.16 | |
| | 7.5 | 99.55 | 0.28 | |
| Sodium sulphate concentration (M) | 0.04 | 98.86 | 1.25 | 0.05 |
| | 0.05 | 100.06 | 1.05 | |
| | 0.06 | 98.96 | 1.17 | |
| Flow rate (mL min ⁻¹) | 0.7 | 99.46 | 0.19 | 0.8 |
| | 0.8 | 99.62 | 0.13 | |
| | 0.9 | 99.71 | 0.25 | |
| Solution stability | Autosampler 24 h | 100.50 | 0.08 | – |
| | 2 – 8 °C 24 h | 99.95 | 0.03 | – |
| | 2 – 8 °C 48 h | 100.05 | 0.84 | – |
| Wavelength (nm) | 190 – 320 | – | – | 220 |

^a Mean of three replicates. ^b RSD = Relative standard deviation.

Table 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing for the SE-LC method

| Variable | Range investigated | STK ^a (%) | RSD ^b (%) | Optimized value |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| Mobile phase pH | 6.5 | 99.23 | 0.88 | 7.0 |
| | 7.0 | 99.81 | 0.31 | |
| | 7.5 | 99.56 | 0.92 | |
| Sodium acetate concentration (M) | 0.03 | 100.23 | 0.55 | 0.04 |
| | 0.04 | 100.47 | 0.24 | |
| | 0.05 | 100.89 | 0.32 | |
| Flow rate (mL min ⁻¹) | 0.7 | 101.03 | 0.72 | 0.8 |
| | 0.8 | 100.68 | 0.19 | |
| | 0.9 | 100.30 | 0.63 | |
| Solution stability | Autosampler 24 h | 101.12 | 0.25 | – |
| | 2 – 8 °C 24 h | 100.97 | 0.37 | – |
| | 2 – 8 °C 48 h | 100.42 | 0.49 | – |
| Wavelength (nm) | 190 – 320 | – | – | 204 |

^a Mean of three replicates. ^b RSD = Relative standard deviation.

Table 4 – Comparative content/potency evaluation of STK in biopharmaceutical formulations, by the chromogenic bioassay and LC methods

| Sample | Theoretical amount (IU) | Chromogenic bioassay | | RP-LC ^a | | SE-LC ^a | |
|-----------------|----------------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|
| | | Potency (%) | Confidence intervals (P = 0.95) | Main peak (%) | Deamidated/sulfoxides (%) | Monomer (%) | Aggregate/dimer (%) |
| 1 | 1 500 000 | 100.20 | (94.60 – 106.10) | 100.56 | 0.87 | 101.44 | 1.33 |
| 2 | 1 500 000 | 99.70 | (93.40 – 106.30) | 99.87 | 0.66 | 100.73 | 0.56 |
| 3 | 1 500 000 | 101.70 | (95.90 – 107.80) | 101.12 | 1.12 | 101.31 | 1.16 |
| 4 | 1 500 000 | 100.80 | (95.80 – 106.20) | 100.98 | 1.09 | 100.84 | 0.43 |
| 5 | 1 500 000 | 99.20 | (93.60 – 105.10) | 99.56 | 0.82 | 99.68 | 0.27 |
| 6 | 1 500 000 | 97.60 | (91.80 – 103.80) | 98.19 | 1.03 | 98.83 | 1.87 |
| 7 | 1 500 000 | 97.30 | (91.30 – 103.70) | 99.35 | 1.24 | 98.98 | 1.99 |
| 8 | 1 500 000 | 100.40 | (95.40 – 105.70) | 100.96 | 0.34 | 99.27 | 0.97 |
| Mean | – | 99.61 | – | 100.07 | 0.90 | 100.14 | 1.07 |
| SD ^b | – | 1.53 | – | 1.02 | – | 1.06 | – |
| 9 ^c | – | 59.60 | (53.20 – 64.10) | 62.59 | – | – | – |
| 9 ^d | – | 84.10 | (79.10 – 90.40) | 85.98 | – | – | – |
| 9 ^e | – | 94.10 | (90.70 – 101.30) | – | – | 96.42 | – |
| 9 ^f | – | 91.37 | (85.40 – 94.60) | – | – | 92.16 | – |

^aMean of three replicates. ^bSD = Relative standard deviation. Content of altered samples: ^cUV degraded. ^dOxidative condition. ^eThermal condition. ^fForced mixing.

Fig – 1 Representative RP-LC chromatograms showing peak 1 = streptokinase; peak 2 = glutamate; peak 3 = deamidated; peaks 4 - 5 = sulphoxides. (a) Biological reference substance of STK; (b) sample of biopharmaceutical formulation; (c) after photodegradation; (d) after degradation by hydrogen peroxide and (e) placebo.

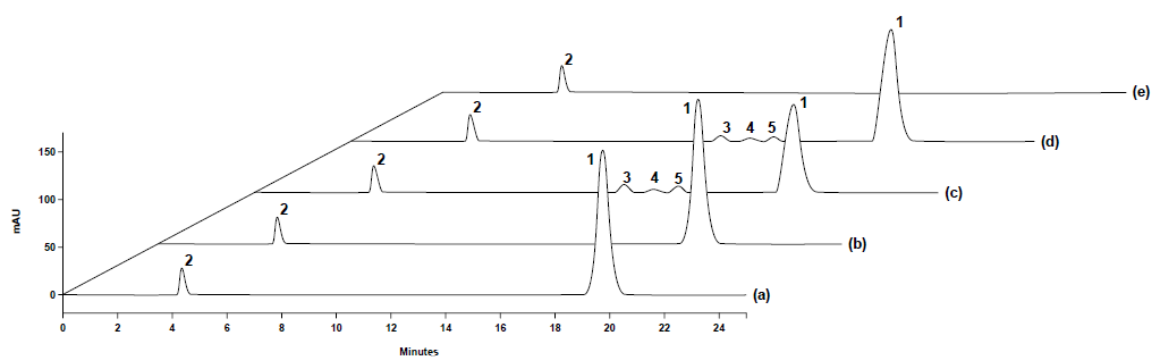
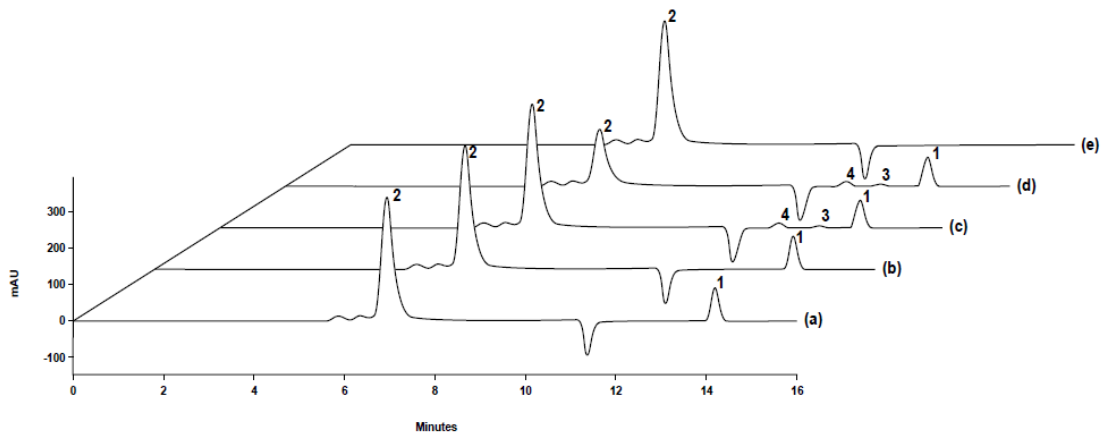


Fig – 2 Representative SE-LC chromatograms showing peak 1 = streptokinase; peak 2 = albumin; peak 3 = dimer; peak 4 = aggregate. (a) biological reference substance of STK; (b) sample of biopharmaceutical formulation; (c) after forced mixing; (d) after thermal conditions and (e) placebo.



DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Os avanços no domínio da tecnologia do DNA recombinante e dos processos de fermentação possibilitaram a produção de proteínas de interesse terapêutico em larga escala, como a estreptoquinase. Paralelamente, o desenvolvimento de metodologias para avaliação de identidade, pureza e potência, fundamenta-se na combinação de técnicas biológicas, físico-químicas e imunológicas, necessárias para a completa caracterização de biofármacos de uso clínico.

Os ensaios biológicos expressam a atividade biológica e sua realização é essencial para a avaliação da potência de biomoléculas, para os quais em geral não se dispõem de metodologias analíticas para o controle de qualidade. Em especial, para a STK a potência biológica tem sido determinada por bioensaios *in vitro*, entre os quais atualmente destaca-se o ensaio cromogênico de estreptoquinase (SANDS, 2004, EP, 2014), adotado no presente trabalho.

Realizou-se teste de identificação por SDS-PAGE não-redutora, obtendo-se perfil eletroforético com banda relativa a STK na região de 47 kDa, confirmada também pelos marcadores e pelo padrão de referência, aplicados no mesmo gel.

Os métodos cromatográficos têm sido usados para diferentes produtos biológicos recombinantes nas etapas de expressão, purificação e análise qualitativa e quantitativa, e para estudos de correlação com os bioensaios. Desse modo, optou-se por pesquisar e validar métodos por cromatografia líquida em fase reversa e exclusão molecular para a determinação da STK, suas proteínas relacionadas e suas formas de alta massa molecular em produtos biofarmacêuticos.

A discussão apresentada a seguir está baseada no **ARTIGO 3.1**.

A separação por CL-FR foi alcançada com tempo de corrida de aproximadamente 19,3 min (Figura 1). A geração de picos adicionais, relativos aos desamidados e sulfóxidos, sob condições oxidativas e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, conforme pureza do pico da STK demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 85 a 25 000 UI/mL ($R^2 = 0,9999$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV inferiores a 0,98 % o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Na tabela 1 podem ser observados os valores experimentais obtidos,

com média de 100,24%, confirmando exatidão significativa. As potências obtidas nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, conforme demonstra a tabela 2. Por sua vez, os dados da verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, pois os valores de CV% foram inferiores a 2% (ICH, 2005; USP 39, 2016). Conforme descrito em publicações, um inconveniente deste método é a desnaturação ou dissociação das proteínas quando adsorvidas à matriz da coluna. Além disso, as condições típicas da fase reversa podem afetar a conformação da proteína e a resposta obtida não necessariamente representa a atividade da biomolécula (DALMORA et al., 1997; FEKETE et al., 2012). Porém, viabiliza a determinação de desamidados e sulfóxidos que é necessária devido às possíveis respostas imunogênicas que podem causar no organismo humano (EMA, 2007; GROOT e SCOTT, 2007).

A separação por CL-EM foi obtida com tempo de retenção de aproximadamente 14,1 min (Figura 2). A geração de picos adicionais, relativos aos dímeros e agregados, realizada sob aquecimento e a análise de amostra preparada com os excipientes da formulação, confirmaram a especificidade do método, com pureza do pico da STK demonstrada com detector de arranjo de diodos (DAD). O método por CL-EM apresentou regressão linear significativa na faixa de 600 a 8 000 UI/mL ($R^2 = 0,9991$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV inferiores a 1,30%, o que mostra a precisão do método. Na tabela 1 podem ser observados os valores experimentais obtidos, com média de 99,88%, confirmando exatidão significativa. As potências obtidas nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, de acordo com a tabela 3. Por sua vez, os dados da verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e as condições dos métodos são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, pois os valores de CV% foram inferiores a 2% (ICH, 2005; USP 39, 2016).

Demonstrou-se, portanto, que os métodos propostos cumprem os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregados para análise da STK em produtos biofarmacêuticos.

Estudou-se então, a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e o bioensaio cromogênico com as amostras selecionadas, conforme demonstra a tabela 4. Observou-se que o teor/potência por CL-FR e por CL-EM foram em

média 0,46% e 0,53% superiores, em relação ao bioensaio cromogênico, respectivamente, com diferença não significativa, conforme calculado pelo teste t de Student ($p>0,05$).

Determinaram-se também, os sulfóxidos e desamidados nas amostras analisadas por CL-FR e os dímeros e agregados nas amostras por CL-EM, através da soma das áreas dos picos com tempo de retenção menor que o principal, em relação à área total, conforme demonstrado na Tabela 4. Os valores foram expressos em percentagem com teores máximos encontrados de 1,24% para sulfóxidos e desamidados e 1,99% para dímeros e agregados. Observa-se que geralmente as farmacopeias preconizam limite máximo de 12% para os sulfóxidos e de 6% para os compostos de alta massa molecular nas amostras de proteínas recombinantes (BP, 2015; USP 39, 2016).

Acrescenta-se também, que as amostras de produtos biofarmacêuticos submetidas à condições de degradação forçada, foram analisadas por CL-FR e CL-EM, e as potências biológicas avaliadas pelo bioensaio cromogênico, de acordo com a Tabela 4, demonstrando correlação entre os métodos ($p>0,05$). Por sua vez, observa-se o potencial e a capacidade dos métodos físico-químicos para separação e quantificação das alterações da biomolécula.

Até o presente momento não se encontram métodos validados publicados pela literatura para a STK, importantes no contexto da produção e caracterização de produtos biológicos recombinantes. Sugere-se, portanto, que os métodos por CL-FR e CL-EM sejam adotados em combinação com o bioensaio cromogênico para a avaliação de potência e pureza da STK durante as etapas do processo de expressão e purificação para monitorar variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica (SOUTO et al., 2012) e para o controle da qualidade do produto farmacêutico acabado.

Neste contexto, os resultados alcançados contribuem para aprimorar o controle da qualidade, através da validação de novos métodos para avaliação da identidade, pureza, potência e estabilidade aplicáveis para o biofármaco e produtos biotecnológicos de uso terapêutico. Do mesmo modo, estabelecem bases para estudos de comparabilidade de biomoléculas, garantindo a segurança e eficácia.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa específico, preciso, exato e robusto para avaliação de estreptoquinase em formulação biofarmacêutica, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e avaliação de desamidados, sulfóxidos e da forma não-alterada.
- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular específico, preciso, exato e robusto para avaliação de estreptoquinase em formulação biofarmacêutica, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação, avaliação de dímeros, agregados e monômero.
- ✓ Estudou-se a correlação entre os resultados fornecidos pelos métodos cromatográficos e o ensaio cromogênico de estreptoquinase com as amostras selecionadas. Observou-se que os teores/potências por CL-FR e por CL-EM foram em média 0,46% e 0,53% superiores, em relação ao bioensaio cromogênico, respectivamente.
- ✓ Demonstrou-se, conforme a Tabela 4, que as formas degradadas ou de agregação determinadas pelos métodos cromatográficos apresentam redução de sua atividade biológica.
- ✓ Sugere-se a aplicação dos métodos cromatográficos para avaliação da estreptoquinase em combinação com o ensaio cromogênico de estreptoquinase, pois representa contribuição para análise do produto farmacêutico, devido à determinação de proteínas relacionadas e formas de alta massa molecular em relação ao ensaio biológico *in vitro*.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, de comparabilidade com biomoléculas da área e procedimentos para aprimorar o controle da qualidade do produto biotecnológico disponível no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, B. E.; DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J. E.; DALMORA, S. L.; TORJESEN, P.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. **Analytical Methods**, v. 6, p. 6688 – 6694, 2014.

AMBROSIO, A. H. Biosimilares: situación regulatoria para su autorización. **Farmacia Hospitalaria**, v. 34, p. 16-18, 2010.

AVILÁN, L.; YARZÁBAL, A.; JURGENSEN, C.; BASTIDAS, M.; CRUZ, J.; PUIG, J. Cloning, expression and purification of recombinant streptokinase: partial characterization of the protein expressed in *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 1427-1430, 1997.

BABU, P.V.C.; SRINIVAS, V.K.; MOHAN, V.K.; KRISHNA, E. Renaturation, purification and characterization of streptokinase expressed as inclusion body in recombinant *E. coli*. **Journal of Chromatography B**, v. 861, p. 218-226, 2008.

BABU, V.; DEVI, C. S. *In vitro* thrombolytic activity of purified streptokinase extracted from *Streptococcus equinus* VIT_VB2 isolated from bovine milk. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 39, p. 71-78, 2015.

BANDEHPUR, M.; SHARIFNIA, Z.; MOHAJERI, N.; TAHERKHANI, M.; KOOCHAKI, A.; YARIAN, F.; SEYYED, N.; SHIRVANI, R.; PAKZAD, P.; SAADAT H.; KAZEMI, B. Comparative study of the reactivity of natural and mutated streptokinase with total antistreptokinase antibodies in human sera. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 23, n. 8, p. 734-738, 2012.

BANERJEE, A.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 287-307, 2004.

BELL, R. W. Therapeutic Agents – Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Review in cardiovascular Medicine**, v. 3, n. 2, p. 34-44, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 55, de 16 de Dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 dez. 2010.

BRITISH Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2015.

CALVO, B.; ZUNIGA, L. Medicamentos Biotecnológicos: Requisitos Exigidos para El Desarrollo y Aprobación de Biosimilares. **Información Tecnológica**, v. 21, n. 6, p. 125-132, 2010.

CAMPO, J. M. Fibrinolytic Therapy – Past, Present and Future. In: 2° VIRTUAL CONGRESS OF CARDIOLOGY, 1999, Hershey, PA. E.U.A.

CHMP – Committee for medicinal products for human use, “**Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues**”. London, October 2005.

CHRISTENSEN, L. R. Methods for measuring the activity of components of the streptococcal fibrinolytic system, and Streptococcal desoxyribonuclease. **The Journal of General Physiology**, p. 163-172, 1949.

CHRISTENSEN, L. R. Streptococcal fibrinolysis - a proteolytic reaction due to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. **The Journal of General Physiology**, p. 363-383, 1945.

COLLEN, D.; STUMP, D. C.; GOLD, H. K. Thrombolytic therapy. **Annual Reviews**, v. 39, p. 405-423, 1988.

COUTO, L. E. T. **Análise fibrinolítica de cinco formulações comerciais de estreptoquinase**. 2004. 71 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

COVIC, A.; KUHLMANN, M. K. Biosimilars: recent developments. **International Urology and Nephrology**, v. 39, p. 261 – 266, 2007.

DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, J. E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M. T.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 782, n. 2, p. 199-210, 1997.

EMA – European Medicines Agency. “**Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1)**”. London, December 2014.

EMA –European Medicines Agency. “**Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins**”. London, July 2007.

ESTRADA, M. P.; HERNANDEZ, L.; PEREZ, A.; RODRIGUEZ, P.; SERRANO, R.; RUBIERA, R.; PEDRAZA, A.; PADRÓN, G.; ANTUCH, W.; DE LA FUENTE, J.; HERRERA, L. High level expression of streptokinase in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 10, n. 10, p. 1138-1142, 1992.

EUROPEAN Pharmacopoeia 8th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2014.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Analytical Procedure and Methods Validation for Drugs and Biologics**, July 2015.

FEKETE, S.; BECK, A.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 161 – 173, 2014.

FEKETE, S.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 09 – 27, 2012.

FELSIA, X. F.; VIJAYAKUMAR, R.; KALPANA, S. Production and partial purification of streptokinase from *Streptococcus pyogenes*. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 3, p. 289-291, 2011.

GROOT, A. S.; SCOTT, D. W. Immunogenicity of protein therapeutics. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 11, p. 482-490, 2007.

HERMENTIN, P.; CUESTA-LINKER, T.; WEISSE, J.; SCHMIDT, K. H.; KNORST, M.; SCHELD, M.; THIMME, M. Comparative analysis of the activity and content of different streptokinase preparations. **European Heart Journal**, v. 26, p. 933-940, 2005.

HERNÁNDEZ, L.; MARRERO, M. A. Estreptoquinasa: a propósito de un agente trombolítico patentado em Cuba. **Biotecnología Aplicada**, v. 22, p. 182-190, 2005.

HOLMSTROM, B. Production of Streptokinase in Continuous Culture. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 73-77, 1968.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

INSTITUTO DE ESTUDIOS MÉDICO CIENTÍFICOS (INESME). **Equivalencias terapêuticas de los medicamentos biotecnológicos**. Madrid, 2009.

JACKSON, K. W.; TANG, J. Complete Aminoacid Sequence of Streptokinase and Its Homology with Serine Proteases. **Biochemistry**, v. 21, p. 6620-6625, 1982.

KAISER, R. E.; STREGE, M. A.; LAGU, A. L. Assessment of protein drugs obtained by recombinant DNA technology. **Process Control and Quality**, v. 10, n. 1-2, p. 205-228, 1997.

KIM, B. S.; LEE, S. C.; LEE, S. Y.; CHANG, Y. K.; CHANG, H. N. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 147 – 150, 2004.

KIM, D. M.; LEE, S. J.; KIM, I. C.; KIM, S. T.; BYUN, S. M. Asp41-His48 Region of Streptokinase Is Important in Binding to a Substrate Plasminogen. **Thrombosis Research**, v. 99, p. 93-98, 2000.

KIM, D. M.; LEE, S. J.; YOON, S. K.; BYUN, S. M. Specificity role of the streptokinase C-terminal domain in plasminogen activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 585-588, 2002.

KRESSE, G. B. Biosimilars-science, status, and strategic perspective. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 479-486, 2009.

KUHLMANN, M.; COVIC, A. The protein science of biosimilars. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 04 – 08, 2006.

KULISEK, E. S.; HOLM, S. E.; JOHNSTON, K. H. A chromogenic assay for the detection of plasmin generated by plasminogen activator immobilized on nitrocellulose using a para-nitroanilide synthetic peptide substrate. **Analytical Biochemistry**, v. 177, p. 78 – 84, 1989.

KUNAMNENI, A.; ABDELGHANI, T. T. A.; ELLAIAH, P. Streptokinase—the drug of choice for thrombolytic therapy. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 23, p. 09 – 23, 2007.

KUNAMNENI, A.; DURVASULA, R. Streptokinase-A Drug for Thrombolytic Therapy: A Patent Review. **Recent Advances in Cardiovascular Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 106-121, 2014.

LEAL, D. P.; SOUTO, R. B.; SCHUTKOSKI, R.; BERGAMO, A. C.; DALMORA, S. L. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: Evaluation of biopharmaceutical formulations by stability-indicating RP-LC method and bioassay. **Biologicals**, v. 39, p. 211 – 216, 2011.

LEE, S. H.; KIM, I. C.; BAE, K. H.; BYUN, S. M. Enhanced production and secretion of streptokinase into extracellular medium in *Escherichia coli* by removal of 13 N-terminal amino acids. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 2, p. 151-154, 1997.

LONGSTAFF, C.; WHITTON, C. M.; STEBBINGS, R.; GRAY, E. How do we assure the quality of biological medicines? **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 1-2, p. 50-55, 2009.

LUNARDI, J. **Produção da proteína recombinante estreptoquinase (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) em biorreator utilizando diferentes estratégias de batelada alimentada**. 2011. 79 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.

MAHBOUBI, A.; SADJADY, S. K.; ABADI, M. M. S.; AZADI, S.; SOLAIMANIAN, R. Biological activity analysis of native and recombinant streptokinase using clot lysis and chromogenic substrate assay. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 4, p. 1087-1093, 2012.

MALKE H.; FERRETTI J. J. Streptokinase: cloning, expression and excretion by *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 3557-3561, 1984.

MALKE, H. Polymorphism of the streptokinase gene: implications for the pathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 278, p. 246-257, 1993.

MALKE, H.; ROE, B.; FERRETTI, J. J. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. **Gene**, v. 34, p. 357-362, 1985.

- MANNING, M. C.; CHOU, D. K.; MURPHY, B. M.; PAYNE, R. W.; KATAYAMA, D. S. Stability of protein pharmaceuticals: an update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 544 – 575, 2010.
- McCLINTOCK, D. K.; ENGLERT, M. E.; DZIOBKOWSKI, C.; SNEDEKER, E. H.; BELL, P. H. Two distinct pathways of the streptokinase-mediated activation of highly purified human plasminogen. **Biochemistry**, v. 13, n. 26, p. 5334-5344, 1974.
- MÜLLER, J.; REINERT, H.; MALKE, H. Streptokinase mutations relieving *Escherichia coli* k-12 (*prlA4*) of detriments caused by the wild-type *skc* gene. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 4, p. 2202-2208, 1989.
- NIHALANI, D.; RAGHAVA, G. P. S.; SAHNI, G. Mapping of the plasminogen binding site of streptokinase with short synthetic peptides. **Protein Science**, v. 6, p. 1284-1292, 1997.
- OLIVA, L. M.; GUAGLIARDO, M. V.; ALBERTENGO, M. E. Estreptoquinasa: Correlación entre diferentes métodos de valoración biológica. **Sangre**, v. 43, n. 3, p. 231-235, 1998.
- POLGAR, J.; REED, G. L. A critical role for N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) in platelet granule secretion. **Blood**, v. 15, n. 4, p. 1313-1318, 1999.
- RAMALINGAM, S.; GAUTAM, P.; MUKHERJEE, K. J.; JAYARAMAN, G. Effects post-induction feed strategies on secretory production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 34-41, 2007.
- REDDY, K. N.; MARKUS, G. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 6, p. 1683-1691, 1972.
- ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111-125, 2007.
- SANDS, D.; WHITTON, C. M.; LONGSTAFF, C. International collaborative study to establish the 3rd International Standard for Streptokinase. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 2, p. 1411-1415, 2004.
- SCHELLEKENS, H. Biosimilar therapeutics - what do we need to consider? **Nephrology Dialysis Transplantation Plus**, v. 2, n. 1, p. 27-36, 2009.
- SCHELLEKENS, H. How similar do 'biosimilars' need to be? **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1357 – 1359, 2004.
- SCHELLEKENS, H.; MOORS, E. Clinical comparability and European biosimilar regulations. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 28-31, 2010.
- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the

International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. L.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311-333, 2007.

SIKRI, N.; BARDIA, A.; A History of Streptokinase Use in Acute Myocardial Infarction. **Tex Heart Inst J**, v. 34, n. 3, p. 318-327, 2007.

SOUTO, R. B.; STAMM, F. P.; RIBELA, M. T. C. P.; BARTOLINI, P.; CALEGARI, G. Z.; DALMORA, S. L. Validation of a stability-indicating RP-LC method for the assessment of recombinant human interleukin-11 and its correlation with bioassay. **Analytical Science**, v. 28, n. 3, p. 215 – 220, 2012.

STAMM, F. P.; CALEGARI, G. Z.; FREITAS, G. W.; SOUTO, R. B.; PORTO, L. P.; CARDOSO JUNIOR, C. D. A.; DALMORA, S. L. Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays. **Analyst**, v. 138, p. 1419 – 1426, 2013.

SUMMARIA, L.; ARZADON, L.; BERNABE, P.; ROBBINS, K. C. The interaction of streptokinase with human, cat, dog, and rabbit plasminogens. The fragmentation of streptokinase in the equimolar plasminogen-streptokinase complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 15, p. 4760-4769, 1974.

THE UNITED States Pharmacopeia. 39. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2016.

TILLET, W. S.; GARNER, R. L.; The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 58, p. 485-502, 1933.

TORRENS, I.; OJALVO, A. G.; SERALENA, A.; HAYES, O.; DE LA FUENTE, J. A mutant streptokinase lacking the C-terminal 42 amino acids is less immunogenic. **Immunology Letters**, v. 70, p. 213-218, 1999.

WESTLUND, L. E.; ANDERSSON, L. O. Variables Influencing the Clot Lysis Assay of Streptokinase. **Thrombosis Research**, v. 64, p. 713-721, 1991.

WU, D. H.; SHI, G. Y.; CHUANG, W. J.; JSU, J. M.; YOUNG, K. C.; CHANG, C. W.; WU, H. L. Coiled Coil Region of Streptokinase γ -Domain Is Essential for Plasminogen Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 15025-15033, 2001.

XAVIER, B.; CAMPONOVARA, R. L.; JUNIOR, C. D. A. C.; PEROBELLI, R. F.; WALTER, M. E.; MALDANER, F. P. S.; DALMORA, S. L. Validation of the chromogenic bioassay for the potency assessment of streptokinase in biopharmaceutical formulations. **Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 6, n. 6, 2015.

ZARRIN, A.; FOROOZESH, M.; HAMIDI, M.; MOHAMMADI-SAMANI, S. A simple and rapid HPLC method for quantification of interferon- α 2b in dosage forms and delivery systems. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 2, p. 199-203, 2006.

ZHAI, P.; WAKEHAM, N.; LOY, J. A.; ZHANG, X. C. Functional roles of streptokinase C-terminal flexible peptide in active site formation and substrate recognition in plasminogen activation. **Biochemistry**, v. 42, p. 114-120, 2003.