

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

**ESTUDO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE
ESTREPTOQUINASE EM PRODUTOS
BIOFARMACÊUTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Raphael Leite Camponogara

Santa Maria, RS, Brasil

2013

ESTUDO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESTREPTOQUINASE EM PRODUTOS BIOFARMACÊUTICOS

Raphael Leite Camponogara

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa 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 grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr.Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE
ESTREPTOQUINASE EM PRODUTOS BIOFARMACÊUTICOS**

elaborada por
Raphael Leite Camponogara

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Daniele Rubert Nogueira, Dr^a. (UB)

José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 26 de Julho de 2013.

AGRADECIMENTOS

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

aos meus pais, Sady Antônio Mario Camponogara e Maria Luiza Leite Camponogara, e irmãos Bruno Leite Camponogara e Bianca Leite Camponogara, pelo amor, paciência, carinho e apoio incondicional na passagem de mais uma etapa;

ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, confiança, orientação e revisão crítica;

aos colegas e bolsistas do Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos (CTEFAR) e Centro de Estudos de Biodisponibilidade e Farmacocinética (CEBIFAR);

aos meus amigos pelo companheirismo, compreensão e apoio;

aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial;

à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

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

“Sempre ande pela vida como se você tivesse algo novo para aprender, e você terá.”

Vernon Howard

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESTREPTOQUINASE EM PRODUTOS BIOFARMACÊUTICOS

AUTOR: RAPHAEL LEITE CAMPONOGARA

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de Julho de 2013.

A estreptoquinase é clinicamente utilizada como agente trombolítico para o tratamento de pacientes com infarto agudo do miocárdio e trombose arterial e venosa. Neste trabalho, validou-se o ensaio com substrato cromogênico para a determinação de potência de formulações biofarmacêuticas. O método foi validado, avaliando-se os parâmetros de linearidade ($r^2 = 0,9988$), precisão intra e inter-dias, exatidão e robustez; o método mostrou resultados adequados, os quais cumpriram os requisitos preconizados, com limite de quantificação de 2,50 UI/mL e limite de detecção de 1,10 UI/mL. O ensaio biológico foi realizado pelo método de ponto final cromogênico, fornecendo potências entre 98,42% e 108,97%. Os resultados demonstraram a validade do ensaio cromogênico para a determinação de potência de estreptoquinase nas formulações biofarmacêuticas. Além disto, as atividades de estreptodornase e estreptolisina foram avaliadas nas mesmas amostras, por métodos otimizados baseados na atividade biológica, dando resultados de acordo com as especificações farmacopeicas. A combinação de ensaios é necessária para assegurar a qualidade e aprimorar os métodos que podem ser aplicados para a caracterização de estreptoquinase, assegurando a consistência entre lotes de soluções concentradas e de produtos biofarmacêuticos acabados.

Palavras-chave: Estreptoquinase. Estreptodornase. Estreptolisina. Validação. Controle de qualidade. Produtos biológicos.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

STUDY OF METHODOLOGY FOR ASSESSMENT OF STREPTOKINASE IN BIOPHARMACEUTICAL PRODUCTS

AUTHOR: RAPHAEL LEITE CAMPONOGARA

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, July 26th 2013.

Streptokinase is clinically used as a thrombolytic agent for the treatment of patients with acute myocardial infarction and venous and arterial thrombosis. In the present work, a substrate chromogenic assay was validated for the potency evaluation of biopharmaceutical formulations. Method validation investigated parameters such as the linearity ($r^2=0.9988$) intra- and inter- day precision, accuracy and robustness; the method yielded good results with a quantitation limit of 2.50 IU/mL and a detection limit of 1.10 IU/mL. The biological assay was carried out by chromogenic end point giving potencies between 98.42% and 108.97%. The results demonstrated the validity of the chromogenic assay for the potency assessment of streptokinase in biopharmaceutical formulations. Besides, the activities of streptodornase and streptolysin were evaluated in the same samples by optimized assays based on the biological activity, giving results according to the Pharmacopoeial specifications. The combination of assays is necessary to assure the quality, and to improve the methods that can be applied for the characterization of streptokinase, by ensuring batch-to-batch consistency of the bulk and finished biopharmaceutical products.

Keywords: Streptokinase. Streptodornase. Streptolysin. Validation. Quality control. Biological products.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura primária de estreptoquinase de <i>S. Aureus</i> , adaptada (JACKSON; TANG, 1982).....	18
FIGURA 2 – Sistema Fibrinolítico e ação da estreptoquinase, adaptada (BANERJEE et al., 2004).....	19

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1	24
TABLE 1 – Repeatability for chromogenic assay for streptokinase in biopharmaceutical formulations.....	35
TABLE 2 – Inter-days precision data of chromogenic assay for streptokinase in biopharmaceutical formulation.....	36
TABLE 3 – Between-analyst precision data of chromogenic assay for streptokinase in biopharmaceutical formulations.....	37
TABLE 4 – Accuracy of chromogenic assay for streptokinase in the formulations	38
TABLE 5 – Conditions investigated during the robustness testing	39
TABLE 6 – Potency, confidence intervals (P=0.95) of streptokinase in biopharmaceutical products by the chromogenic assay.....	40
TABLE 7 – Streptolysin and streptodornase assay in biopharmaceutical products.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
EMA	European Medicines Agency
EP	Farmacopeia Europeia
FDA	Food and Drug Administration
G	Grama
ICH	International Conference on Harmonisation
IS-STK	Padrão Internacional de Estreptoquinase
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
MALDI-TOF	Ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Nm	Nanômetro
PG	Plasminogênio
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
r ²	Coefficiente de determinação
RSD	Desvio Padrão Relativo
SD	Desvio Padrão
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
STK	Estreptoquinase
UI	Unidade Internacional
USP	Farmacopéia Americana
UV-VIS	Ultravioleta - Visível
μL	Microlitro
A	Alfa

B
°C

Beta
Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	24
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÕES.....	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas recentes na área de biotecnologia possibilitaram a transferência de genes de um organismo para outro e viabilizaram a produção de estreptoquinase (STK) para uso clínico.

A STK encontra-se disponível sob a forma injetável, liofilizada. É indicada como agente trombolítico para o infarto agudo do miocárdio, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, trombose arterial periférica aguda ou subaguda, doença arterial oclusiva crônica e adesões intrapleurais.

O mecanismo de ação baseia-se na ligação estequiométrica entre STK e plasminogênio (PG), que forma o complexo ativador STK-PG. Este complexo ativador converte o plasminogênio na potente enzima fibrinolítica plasmina. Esta, por sua vez, dissolve a matriz de fibrina contida na estrutura do trombo com subsequente trombólise.

Estruturalmente, é constituída por 414 aminoácidos que formam uma cadeia polipeptídica, sem pontes dissulfeto, com massa molecular de 47 kDa.

A STK é secretada e foi isolada de estreptococos β -hemolíticos dos grupos A, C e G, mas especialmente do grupo C. Sua forma nativa é produzida por fermentação bacteriana, e é usada clinicamente, mas pode apresentar riscos de contaminação. Por sua vez, o gene da STK de *S. equisimilis* H46A foi expresso pela primeira vez em *E. Coli*, produzindo quantidades significativas da biomolécula recombinante no meio de cultura e tem a vantagem de não usar microorganismos patogênicos (MALKE; FERRETTI, 1984). Paralelamente, têm sido pesquisadas variantes com alteração de um ou mais resíduos de aminoácidos com a finalidade de aumentar a ativação do plasminogênio, e algumas apresentaram maior estabilidade, como a substituição da Lisina⁵⁹ por ácido glutâmico (WU; THIAGARAJAN, 1996).

A potência da STK tem sido avaliada por ensaios biológicos *in vitro* baseados na lise do coágulo de fibrina e no ensaio cromogênico do plasminogênio em plasmina. Esta atua sobre substrato cromogênico desenvolvendo coloração amarela proporcional à concentração. Paralelamente, foi avaliada atividade de estreptodornase pelo bioensaio do efeito sobre o DNA, com leitura espectrofotométrica dos resultados. Por sua vez, a atividade da estreptolisina foi determinada pelo ensaio da lise de eritrócitos (HERMENTIN et al., 2005; EP, 2012).

Produtos biológicos, como a STK têm estrutura molecular complexa, e podem conter contaminantes originários do processo de fermentação e produtos de degradação, razão pela qual necessitam da combinação de métodos físico-químicos, biológicos e imunológicos para a identificação, caracterização, testes de pureza e avaliação de potência.

A avaliação de biomoléculas produzidas por fermentação ou pela tecnologia do DNA recombinante, por métodos eficientes e validados é fundamental para assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos para registro do uso terapêutico. As especificações preconizadas para os produtos biológicos visam garantir também a eficácia clínica e segurança.

O presente trabalho teve por objetivos: a) validar o ensaio cromogênico de transformação do plasminogênio em plasmina *in vitro* para a avaliação de potência de estreptoquinase em produtos biofarmacêuticos, e b) identificar e avaliar a atividade de estreptodornase e de estreptolisina por bioensaio *in vitro*. Desse modo, contribuir para aprimorar o controle de qualidade e garantir a eficácia terapêutica e segurança do produto biológico.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A STK foi descrita pela primeira vez por Tillett e Garner (1933) após observar que culturas de estreptococos hemolíticos possuíam a capacidade de dissolver coágulos de sangue humano, atribuindo este fenômeno a uma enzima extracelular. Foi então pela primeira vez usado o termo STK (CHRISTENSEN; MacLEOD, 1945).

A STK é secretada e foi isolada de estreptococos β -hemolíticos e, em 1933, Lancefield usou sorologia para diferenciar os estreptococos β -hemolíticos nos grupos A até O. A maioria das STKs são obtidas dos grupos A, C e G, sendo o grupo C preferidos por não produzirem toxinas eritrogênicas. A STK nativa é produzida por fermentação bacteriana, e é usada clinicamente, mas pode apresentar riscos de contaminação (LUNARDI, 2011).

O grupo C de *Streptococcus equisimilis* H46A (ATCC 12449) isolado de origem humana em 1945 tem sido amplamente usado por produzir a STK mais ativa. Por sua vez, o gene da STK de *S. equisimilis* H46A foi expresso pela primeira vez em *E. Coli*, produzindo quantidades significativas da biomolécula recombinante no meio de cultura e tem a vantagem de não usar microorganismos patogênicos (MALKE; FERRETTI, 1984). A H46A também tem sido expressa em diferentes microorganismos, observando-se heterogeneidade entre as STK produzida por diferentes grupos de estreptococos (BANERJEE et al., 2004).

Estruturalmente é constituída por 414 aminoácidos que formam uma cadeia polipeptídica com massa molecular de 47 kDa e pI 4.7, e apresenta atividade máxima no pH 7.5. A proteína não contém cisteína e não forma pontes dissulfeto conforme Figura 1. A sequência completa de aminoácidos da STK foi determinada. Observa-se heterogeneidade entre as STKs produzidas por diferentes grupos de estreptococos, podendo conter 415 aminoácidos. A determinação da sequência de aminoácidos de uma STK revelou homologia com a sequência da tripsina bovina e proteases de *Streptomyces griseus*, sugerindo que a STK é evoluída de uma protease sérica. (DE RENZO et al, 1967; JACKSON; TANG, 1982; MALKE; FERRETI, 1984).

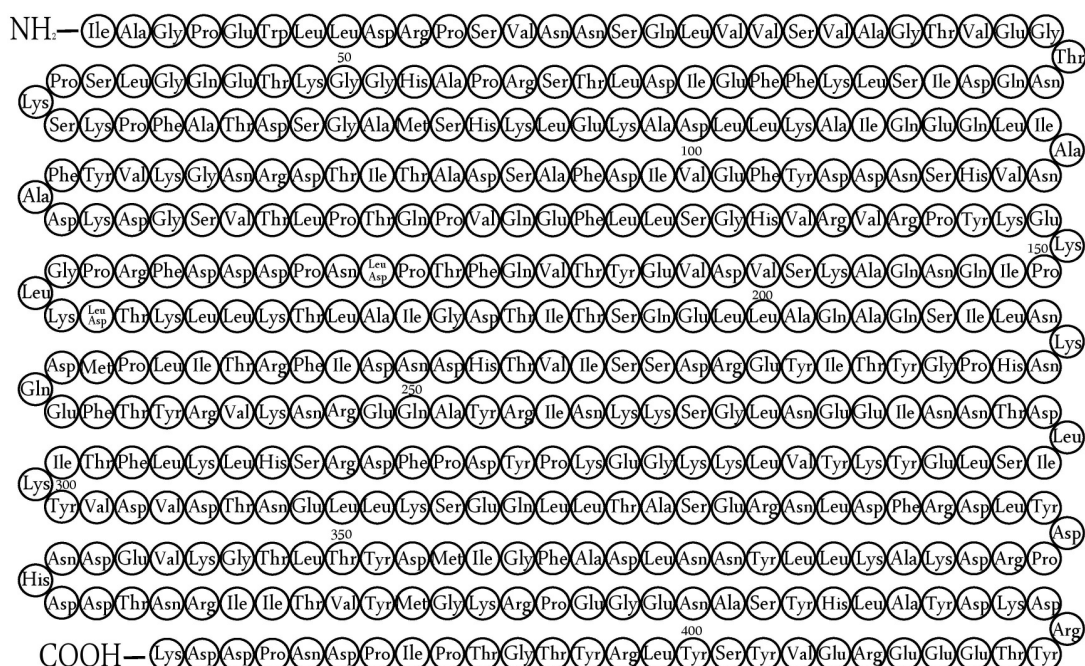


Figura 1 – Estrutura primária de estreptoquinase de *S. Aureus*, adaptada (JACKSON; TANG, 1982)

A STK encontra-se disponível sob a forma injetável, liofilizada, de origem natural ou recombinante. É indicada como agente trombolítico para o infarto agudo do miocárdio (SOUSA et al., 2002), trombose venosa profunda (SIKRI; BARDIA, 2007), trombose venosa profunda pós-quimioterapia (MANO et al., 2006), embolia bilateral das artérias renais (CASSINI et al., 2003) e trombose em próteses de válvula cardíaca (RAMOS et al., 2003). Também tem sido utilizada sob a forma farmacêutica de supositórios para o tratamento de hemorróida aguda, diminuindo a necessidade de intervenção cirúrgica em 90% dos casos (QUINTERO et al., 2010).

A STK e o PG circulante formam um complexo, o qual pode ativar outras moléculas de plasminogênio, transformando-as em plasmina. A estreptoquinase ativa o plasminogênio através de múltiplos domínios, o domínio C-terminal está envolvido no reconhecimento e ativação do substrato. A região Asp41-His48 é importante na ligação da molécula ao plasminogênio, enquanto o domínio γ é essencial para a sua ativação. Da mesma forma, o domínio β está envolvido na formação do complexo STK-PG, responsável pela ativação de outras moléculas de plasminogênio em plasmina. Por sua vez, esta plasmina catalisa a dissolução do coágulo de

fibrina, esquematizado na figura 2 (YOUNG et al., 1998; KIM et al., 2000; WU et al., 2001; RANG et al., 2008).

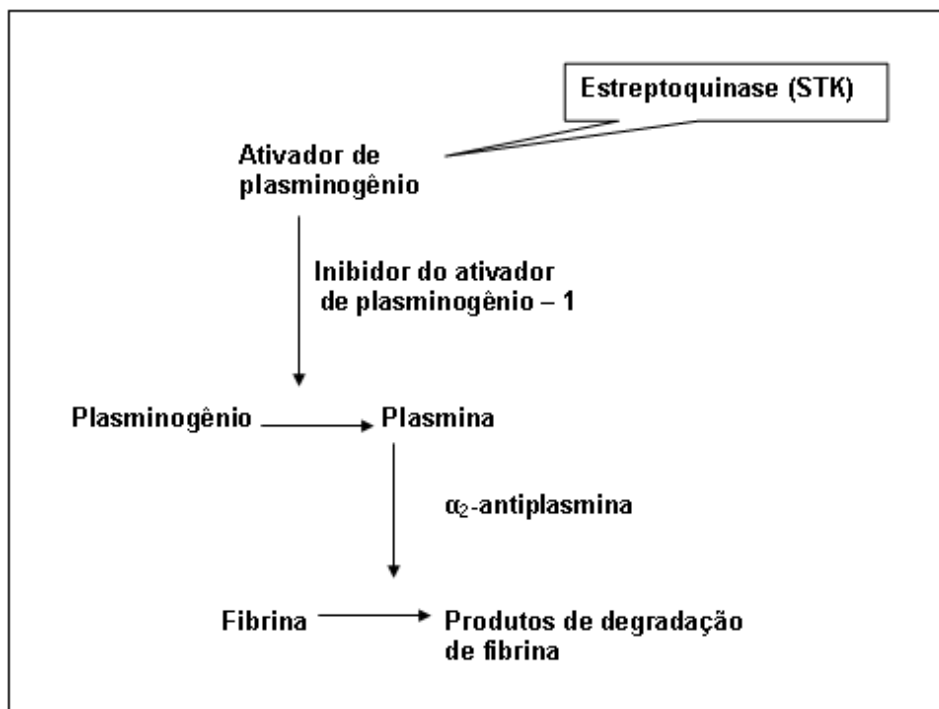


Figura 2 – Sistema Fibrinolítico e ação da estreptoquinase, adaptada (BANERJEE et al., 2004)

Após a expressão e purificação da STK, ainda é possível identificar outras duas proteínas presentes no medicamento, Estreptodornase e Estreptolisina (LUNARDI, 2011). A Estreptodornase possui efeito desoxiribonuclease, hidrolisando a cadeia de DNA e diminuindo a viscosidade em exsudatos purulentos. Sendo, por esse motivo, utilizada para aumentar a depuração de pus em regiões inflamatórias (KACPRZAK et al., 2013). Por sua vez, a Estreptolisina é uma beta-hemolisina presente nas culturas de estreptococos e possui propriedade de lisar eritrócitos e danificar membranas celulares, como neutrófilos, linfócitos, lisossomos e mitocôndrias (NIZET et al., 2000).

A Estreptolisina O é uma toxina imunogênica, oxigênio lábil, que é reversivelmente ativada por ditiotreitól. É liberada no meio extracelular juntamente com outras toxinas, incluindo a Estreptolisina S, que é oxigênio estável, durante o crescimento de cepas de estreptococos do grupo A, algumas do C e G. Os eritrócitos de diferentes espécies animais têm susceptibilidade significativamente diferente à hemólise (ALOUF, 1980). A atividade hemolítica da proteína é exercida quando esta encontra-se no estado reduzido, podendo sua forma oxidada ser ativada pela

adição de agentes redutores, tais como compostos sulfidrilas. Elevado número de pacientes com infecção estreptocócica mostram uma forte resposta de anticorpos durante a doença (HALPERN; RAHMAN, 1968).

Os ensaios biológicos para avaliação de potência da estreptoquinase baseiam-se na sua capacidade de ativar plasminogênio para plasmina, que por sua vez hidrolisa um substrato marcado. A extensão da hidrólise num determinado tempo é usada para avaliar a potência. Ao longo dos anos, foram usados diferentes substratos para a plasmina, que incluíram o coágulo de fibrina, caseína e ésteres sintéticos de lisina e arginina (BANERJEE et al., 2004).

O ensaio da fibrina em placa foi amplamente usado para avaliar a fibrinólise, com base na zona de lise produzida no coágulo de fibrina em placa. Também foi demonstrado que apresentava resultados variáveis de acordo com o pH, concentração do tampão e de plasminogênio (WESTLUND; ANDERSSON, 1991).

O avanço foi alcançado com o estudo de ensaios com ésteres sintéticos como o cloridrato de D-valina-L-leucina-L-lisina-p-nitroanilina como substrato para plasmina e plasminogênio ativado pela STK, originando ensaio mais específico e sensível para a avaliação de potência deste biofármaco (EP, 2012).

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.

Felsia e colaboradores (2011), purificaram parcialmente a STK produzida em *Streptococcus pyogenes* por precipitação com sulfato de amônio, diálise e colunas cromatográficas. Foi quantificada pelo método de Lowry e analisada 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.

No estudo colaborativo que estabeleceu o 3º Padrão Internacional de Estreptoquinase foram realizados os ensaios da lise do coágulo de fibrina e o ensaio cromogênico da ativação do PG em plasmina, que foi preconizado para a avaliação de potência de STK (SANDS et al., 2004).

A atividade de produtos farmacêuticos comerciais de STK foi comparada pelos métodos da lise de coágulo de euglobulina e o ensaio cromogênico da transformação de PG em plasmina, demonstrando diferenças de potências entre as formulações comerciais de uso clínico (COUTO et al., 2004).

Hermentin e colaboradores (2005) selecionaram 16 preparações de uso terapêutico de STK e submeteram a análises por eletroforese em gel de poliacrilamida nativa e redutora e sequenciamento N-terminal. Realizaram, também, ensaios cromogênicos para determinação de atividade de STK. Observaram diferenças significativas entre as potências, pureza e composição das amostras analisadas, sugerindo estudos adicionais para assegurar a eficácia terapêutica. Também foi verificada a existência de “bandas duplas” na região da STK, as quais podem ser derivadas de alterações bioquímicas ou degradação na formulação.

O gene da STK de *Streptococcus equisimilis* foi clonado em vetor de expressão de *E. coli* no espaço periplásmico e extraído por digestão com lisozima. Realizaram a purificação, obtendo a proteína de 47.5 kDa e avaliaram a atividade pelo ensaio cromogênico (AVILÁN et al., 1997).

A sequência nucleotídica do gene da STK de *Streptococcus equisimilis* H46A foi determinada e efetuada a comparação da sequência de aminoácidos deduzida, que revelou mínimas diferenças na estrutura primária em relação à STK comercial (MALKE et al., 1985).

Variantes de STK com a substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos tem sido preparadas visando aumentar a ativação do PG, e algumas apresentaram maior estabilidade. A variante preferida tinha Lisina⁵⁹ substituída por ácido glutâmico (WU; THIAGARAJAN, 1996).

STK recombinante expressa como corpos de inclusão em *E. coli* foi renaturada para a forma ativa, purificada e caracterizada por métodos cromatográficos e espectrometria de massas MALDI-TOF, e a atividade biológica foi avaliada pelo ensaio cromogênico (BABU et al., 2008).

Nagai e colaboradores (1999) compararam os efeitos de ativadores de PG, STK e estafiloquinase, em isquemia cerebral e lise de coágulo pulmonar em modelos de hamster. Demonstraram que os agentes trombolíticos causam um aumento do tamanho do foco de isquemia cerebral após a ligação com a artéria cerebral média, sendo que este fenômeno pode ocorrer na ausência de geração de plasmina sistêmica e a hidrólise do fibrinogênio.

Nihalani e colaboradores (1997) realizaram o mapeamento do sítio de ligação do PG com a STK através de pequenos peptídeos sintéticos, que foram obtidos através da proteólise parcial da molécula de STK, identificando dois tipos de interação, sendo a primeira um complexo 1:1 (STK-PG) e a segunda formando um complexo ternário durante cada ciclo de ativação do PG. Também verificaram a presença de um fragmento chamado SK143-293, o qual apresentava capacidade de ligar-se ao PG, formando um complexo, ou apenas ativá-lo.

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 é um método simples e é altamente empregado para a expressão de proteínas recombinantes com alta atividade específica (LEE, et al., 1996; KIM et al., 2004; RAMALINGAN et al., 2007).

A STK recombinante foi obtida a partir de culturas de *Streptococcus dysgalactiae* subs. *equisimilis* e purificada. Posteriormente, foi determinada a atividade da enzima produzida em biorreatores utilizando o ensaio cromogênico do plasminogênio em plasmina com substrato de acetato de tosil-glicina-prolina-lisina-4 nitranilida. Em paralelo, foi realizado o ensaio da lise do coágulo de euglobulina, realizando a comparação entre a biomolécula recombinante com amostras comerciais de STK (LUNARDI, 2011).

Estudos tiveram como objetivo a purificação de estreptodornase no medicamento Varidase®, utilizando cromatografia de afinidade da molécula a uma matriz DNA-Celulose. Após a purificação, foi obtida uma fração de endonuclease não específica, com massa molecular de, aproximadamente, 38 kDa e pI de 4.6, sendo atribuída à proteína estreptodornase (LOCKE et al., 1997).

Estudaram-se os efeitos do substrato, pH e temperatura sobre a atividade de estreptodornase, uma desoxiribonuclease de origem de estreptococos, presente como componente ativo no medicamento Varidase®, sobre RNA e DNA. Os dados sugeriram a possível existência da conformação semi-desnaturada menos estável da molécula com reduzida atividade DNase (LOCKE; CARPENTER, 2004).

Lee e Song (1997) realizaram a purificação da STK extracelular do meio de cultura de *Streptococcus equisimilis* por etapas em coluna cromatográfica de carboximetil-sepharose. Examinaram mudança conformacional induzida pela ligação ao DNA de timo de bezerro, por dicroísmo circular, que mostrou mudanças na estrutura secundária da α -hélice.

Sun e colaboradores (2013) estudaram ensaio por fluorescência no infravermelho próximo (NIR) para determinação de atividade de DNase, baseado no quadruplex com verde malaquita (MG). Na presença de Na⁺ ou K⁺, o DNA de única hélice é capaz de formar estrutura quadruplex, aumentando a rigidez da estrutura do MG que resulta em aumento da fluorescência no NIR. A DNase I é capaz de clivar todos os tipos de DNA para liberar nucleotídeos, os quadruplexos são clivados em oligonucleotídeos na presença de DNA. Como resultado da rigidez

da estrutura do MG é reduzida, e a fluorescência NIR da solução diminui, com aumento da atividade de DNA I, gerando modelo útil, de baixo custo para detecção da atividade DNase I.

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (FDA, 2001; ICH, 2005; USP 35, 2012), e foram adotados como base para os ensaios biológicos, pois não se encontram recomendações específicas. Os principais parâmetros a serem avaliados são especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e adequabilidade do sistema. Esses parâmetros encontram-se detalhadamente descritos em dissertações já desenvolvidas no laboratório de produtos biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (BARTH, 2007; SILVA, 2009) e no artigo (ARTIGO 3.1). Desse modo, esses parâmetros demonstram que o ensaio é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (SHABIR et al., 2007; ROZET et al., 2007).

Os estudos de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, são importantes para as avaliações qualitativas e quantitativas de produtos biotecnológicos. Ao mesmo tempo, são necessários para estudos de correlação entre métodos biológicos e físico-químicos, realizados com a finalidade de estabelecer alternativas importantes para a determinação de proteínas relacionadas e de formas de alta massa molecular das biomoléculas biologicamente ativas. As estruturas moleculares tridimensionais complexas de alta massa molecular dos biofármacos e sua heterogeneidade dependente do processo de fermentação ou de produção de células vivas fazem com que as biomoléculas sejam diferentes dos fármacos clássicos. Deste modo, tem sido usada a combinação de métodos que representam a tecnologia do estado-da-arte para caracterização, avaliação de identidade, pureza, teor/potência e estabilidade. Os guias oficiais recomendam parâmetros e especificações para os produtos biológicos, que têm sido avaliados e atualizados com destaque para o impacto na segurança e eficácia terapêutica (EMEA, 2005; SCHELLEKENS; MOORS, 2010).

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 – CAMPONOGARA, R. L.; SOUTO, R. B.; STAMM, F. P.; CARDOSO JUNIOR, C. D. A.; SCHRAMM, V.; PEROBELLI, R. F.; WALTER, M. E.; DALMORA, S. L. Biological Potency Assessment of Streptokinase in Biopharmaceutical Formulation. Artigo a ser publicado.

Biological Potency Assessment of Streptokinase in Biopharmaceutical Formulation

Raphael Leite Camponogara^b, Ricardo Bizogne Souto^b, Fernanda Pavani Stamm^b,
Clovis Dervil Appratto Cardoso Junior^a, Vanessa Schramm^a, Rafaela Ferreira Perobelli^a,
Mauricio Elesbão Walter^b e Sergio Luiz Dalmora^a.

^aDepartment of Industrial Pharmacy and

^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences,

Federal University of Santa Maria

97.105-900 – Santa Maria-RS, Brazil

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

E-mail address: dalmorasl@gmail.com. (Sérgio Luiz Dalmora)

Abstract

Streptokinase is clinically used as a thrombolytic agent for the treatment of patients with acute myocardial infarction and venous and arterial thrombosis. A substrate chromogenic assay was validated for the potency evaluation of biopharmaceutical formulations. Method validation investigated parameters such as the range, linearity ($r^2= 0.9988$) intra- and inter-day precision, accuracy and robustness; the method yielded good results with a quantification limit of 2.50 IU/mL and a detection limit of 1.10 IU/mL. The biological assay was carried out by chromogenic end point giving potencies between 98.42% and 108.97. The results demonstrated the validity of the chromogenic assay for the potency assessment of streptokinase in biopharmaceutical formulations. Besides, the activities of streptodornase and streptolysin were evaluated in the same samples by optimized assays based on the biological activity, giving results according to the Pharmacopoeial specifications. The combination of assays is necessary to assure the quality, and allows a great improvement which can be applied for the characterization of streptokinase, by ensuring batch-to-batch consistency of the bulk and finished biopharmaceutical products.

Keywords: Streptokinase, Streptodornase, Streptolysin, Validation, Quality control, Biological products.

1. Introduction

Streptokinase (STK) consists of a 414 amino acids polypeptide chain, that does not contain disulfide bonds, yielding a molecular mass of 47 kDa with pI 4.7. Because of its ability to activate the fibrinolytic system, converting plasminogen to plasmin, it is clinically used worldwide as a thrombolytic agent for the treatment of patients with acute myocardial infarction, deep vein thrombosis, arterial thrombosis and embolism (BROGDEN et al., 1973; KUNAMNENI et al., 2007; BUTCHER et al., 2013).

Most of the native Streptokinases are obtained from pathogenic beta-hemolytic streptococci A, C and G, being the group C preferred as they lack erythrogenic toxins. Recombinant streptokinases with reduced immunogenicity have been produced, and the gene from *Streptococcus equisimilis* H46A was first cloned and expressed in *E.Coli* releasing substantial amounts of STK into the culture medium (MALKE & FERRETTI, 1984; BABU et al., 2008; HUANG et al., 1989).

The assessment of the biological activity of STK preparations has been performed by the fibrin clot lysis assay and the chromogenic substrate assay, which were used in an international collaborative study organized to establish the 3rd international Standard for streptokinase. It was demonstrated that the chromogenic plasminogen activation method is a suitable procedure for potency determination of the streptokinase preparations (SANDS et al., 2004; EP, 2012).

Sixteen preparations of streptokinase available worldwide for clinical use were compared by a chromogenic assay and SDS-PAGE electrophoresis showing wide variations of the activities, purity and composition (HERMENTIN et al., 2005). Potencies of different preparations of streptokinase were also evaluated by the euglobulin lysis test and the chromogenic substrate assay, showing significant variations between products available for clinical use (COUTO et al., 2004). Streptokinase gene of *Streptococcus equisimilis* in an

expression vector of *E. Coli* to overexpress the profibrinolytic protein under the control of a tac promoter was cloned. Almost all the recombinant STK was exported to the periplasmic space and recovered after gentle lysozyme digestion of induced cells, and the bioactivity was assayed by the chromogenic assay (AVILÁN et al., 1997). STK expressed as inclusion body in recombinant *E. coli* was refolded into active forms proteins, purified and characterized by chromatographic methods and MALDI-TOF, and the bioactivity was evaluated by the chromogenic assay (BABU et al, 2008).

Functional characteristics such as substrate specificity and the effects of pH and temperature on the activity of Streptodornase present as an active constituent of Streptodornase marketed product, against the native, double stranded DNA were evaluated showing a possible existence of semi-denatured “meta-stable” conformations with reduced levels of DNase activity (LOCKE & CARPENTER, 2004).

Streptokinase was produced from *Streptococcus pyogenes* species and partially purified by ammonium sulfate precipitation and chromatographic column, quantified by Lowry's method and its electrophoretic mobility and molecular weight were determined by SDS-PAGE. The biological activity was evaluated by the radial caseinolysis assay (FELSIA et al., 2011).

The aim of this research was to validate a specific, sensitive and stability-indicating chromogenic substrate assay for the potency assessment of streptokinase; evaluate the content of streptolysin and streptodornase as components of the product by *in vitro* bioassay; thus contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy of the biological medicine.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

The 3rd international standard streptokinase (IS-STK WHO 00/464), containing 1030 IU/vial was obtained from National Institute for Biological Standards and Control-NIBSC (Hertz, UK). A total of ten batches of Solustrep[®] (Bergamo, São Paulo, Brazil), containing 1500 000 IU/vial and 750 000 IU/vial of streptokinase were identified by numbers from 1 to 10 and two batches of Streptonase[®] (Blausiegel, São Paulo, Brazil), containing 1500 000 IU/vial of streptokinase were identified by numbers from 11 to 12. The samples were obtained from commercial sources within their shelf life period. Plasminogen of bovine plasma Sigma (St. Louis, USA), chromogenic substrate S2251 Chromogenix[®] (Milan, Italy), Tris(hydroxymethyl) aminomethane and Acetic acid Merck[®] (Germany).

2.2. Apparatus

The assays were carried out on a Multiskan FC microplate reader Thermo Scientific[®] (Vantaa, Finland) and Shimadzu[®] UV-VIS Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.3. Procedure

2.3.1. Streptokinase Chromogenic assay

2.3.1.1. Samples and Standard Solutions

Working standard and sample solutions were prepared daily by diluting the IS-STK and the samples of biopharmaceutical formulations in 25 mM tris(hydroxymethyl) aminomethane solution, pH 7.7, to a final concentration of 2.5, 5, 10, 20 and 40 IU/mL.

The dilutions of the substance to be examined and the dilutions of the reference preparation were added, in triplicate, to the 96-well plate. To each well it was added 25 μ L of the appropriate dilution of the substance to be examined or the reference standard, respectively. Then, the solution was gently mixed and allowed to equilibrate at 37°C in water-bath for 1 min, and added to each well 100 μ L of chromogenic substrate. The plate was

incubated for exactly 2 min and then added 50 μ L of plasminogen. The reaction was stopped after exactly 10 min by adding 90 μ L of 20% acetic acid. The absorbances were measured at 405 nm in the microplate reader. The assay was performed in triplicate.

2.3.2. *Streptodornase assay*

Sample solution: dilute in imidazole buffer solution pH 6.5 to obtain a concentration of 150 000 IU of streptokinase activity per millilitre.

Reference Standard solution: dissolve the International Standard of streptodornase WHO 08/230 in imidazole buffer solution pH 6.5 to obtain a solution containing 20 IU of streptodornase activity per millilitre.

Procedure: To each of 8 numbered centrifuge tubes, add 0.5 mL of a 1 g/L solution of sodium deoxyribonucleate in imidazole buffer solution pH 6.5. To tube number 1 and tube number 2 add 0.25 mL of imidazole buffer solution pH 6.5, 0.25 mL of the test solution and, immediately, 3.0 mL of 2.5 % of perchloric acid. Mix, centrifuge at about 3000 g for 5 min and measure the spectrophotometric absorbances of the supernatant liquids at 260 nm, using as the compensation liquid a mixture of 1.0 mL of imidazole buffer solution pH 6.5 and 3.0 mL of 2.5% perchloric acid (absorbances A1 and A2). To the other 6 tubes (numbers 3 to 8) add 0.25 mL, 0.25 mL, 0.125 mL, 0.125 mL, 0 mL and 0 mL respectively of imidazole buffer solution pH 6.5; add to each tube 0.25 mL of the test solution and 0 mL, 0 mL, 0.125 mL, 0.125 mL, 0.25 mL and 0.25 mL respectively of the reference solution. Mix the contents of each tube and heat at 37 °C for 15 min. To each tube add 3.0 mL of 2.5 % perchloric acid, mix and centrifuge. Measure the absorbances of the supernatant liquids at 260 nm using the compensation liquid described above (absorbances A3 to A8). The absorbances comply with the following requirement equivalent to a maximum 10 IU of streptodornase activity per 100 000 IU of streptokinase activity:

:

$$(A_3 + A_4) - (A_1 + A_2) < \frac{(A_5 + A_6 + A_7 + A_8)}{2} - (A_3 + A_4)$$

2.3.3. Streptolysin assay

In a polystyrene tube, use a quantity of the sample preparation equivalent to 500 000 IU of streptokinase activity and dilute to 0.5 mL with a mixture of 1 volume of phosphate buffer solution pH 7.2 and 9 volumes of a 0.9 % solution of sodium chloride. Add 0.4 mL of a 2.3 % solution of sodium thioglycollate . Heat in a water-bath at 37 °C for 10 min. Add 0.1 mL of a solution of a reference standard of human antistreptolysin O containing 5 IU/mL. Heat at 37 °C for 5 min. Add 1 mL of rabbit erythrocyte suspension. Heat at 37 °C for 30 min. Centrifuge at about 1000 g. In the same manner, prepare a polystyrene tube in which the solution of the sample preparation has been replaced by 0.5 mL of a mixture of 1 volume of phosphate buffer solution pH 7.2 and 9 volumes of a 0.9 % solution of sodium chloride. Measure the spectrophotometric absorbances of the supernatant liquids at 550 nm. The absorbance of the sample solution is not more than 50 per cent greater than that of the reference standard solution.

2.4. Validation of the Streptokinase chromogenic assay

The assay was validated using samples of a biopharmaceutical formulation of streptokinase with a label claim of 1500 000 IU/vial and 750 000 IU/vial by determinations of the following parameters: linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness and stability, following to ICH guidelines (ICH, 2005).

2.4.1. Linearity

The linearity of the assay was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight concentrations of IS-STK over the range of 2.5 - 40 IU/mL. The absorbances were plotted against the respective concentrations of streptokinase 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.

2.4.2. Precision

The precision of the assay was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-days). Repeatability was examined by six evaluations of sample of streptokinase, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the methods was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulations on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts).

2.4.3. Accuracy

The accuracy was assessed by applying the proposed assay to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the biomolecule, to obtain solutions with concentrations at 120 000, 150 000 and 180 000 IU/mL equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentrations, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias%) between the measured mean concentrations and the added concentrations.

2.4.4. Limits of Detection and Quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by (ICH, 2005) by using the mean values of the 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 from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

2.4.5. Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness of the chromogenic assay was determined by analyzing the same samples containing 1500 000 IU/mL and 750 000 IU/mL, respectively, under a variety of conditions of the assay parameters, such as: reaction time between streptokinase and plasminogen (5, 10, and 15 minutes), reaction time between streptokinase and substrate chromogenic (1, 2 and 3 minutes), pH of buffer solution (pH 7.4, 7.7 and pH 8.0), assay temperature (34, 37, 40 °C) and stability of the analytical solution at 2 – 8 °C.

2.4.6. Statistical Analysis

Statistical analysis of the assays data were carried out by parallel line methods, using PLA 2.0 software (Stegmann Systemberatung, Rodgau, Germany).

3. Results and discussion

3.1. Method Validation

The procedure was performed to demonstrate that the performance characteristics of the chromogenic assay meet the requirements for the potency assessment of streptokinase in biopharmaceutical formulations. The validation parameters were established according to the ICH guidelines (ICH 2005), adjusted for the *in vitro* assay.

3.1.1. Linearity

The dose–response curve was constructed plotting the experimental values of absorbances versus the logarithms of the concentration; this demonstrated good linearity in the 2.5–40 IU/mL range. A linear regression line by the least squares method was applied. The value of the determination coefficient calculated [$r^2 = 0.9988$, $y = (55817 \pm 218.568) x - (103001 \pm 8245.099)$, where, x is concentration and y is the absorbance] indicated linearity of the analytical curve for the assay. The measurement was carried out in triplicate.

3.1.2. Precision.

The precision of the chromogenic assay was studied by calculating the relative standard deviation (RSD%) for six analyses at a concentration of 1500 000 IU/mL, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD value was 1.62% (Table 1).

Table 1 – Repeatability of chromogenic assay for streptokinase in biopharmaceutical formulations

Sample	Chromogenic Assay			
	Potency ^a (%)	Confidence intervals (<i>P</i> =0.95)	Combined Potency (%)	RSD ^b
1	101.98	93.45 – 110.23		
2	103.61	89.95 – 112.43		
3	100.19	92.44 – 108.23	101.12	1.62
4	98.87	86.05 – 106.12		
5	99.45	91.77 – 109.56		
6	101.93	90.62 – 114.89		

^aCombination of three assays.

^b RSD = Relative standard deviation.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the biopharmaceutical formulations on three different days (inter-days), giving RSD values of 0.57 and 0.48%, respectively (Table 2).

Table 2 – Inter-days precision data of chromogenic assay for streptokinase in biopharmaceutical formulations

Sample	Day	Potency ^a %	Confidence interval (<i>P</i> = 0.95)	Combined Potency %	RSD ^b (%)
	1	99.83	94.87-120.31		
1	2	99.12	91.14-109.10	100.17	0.57
	3	101.57	91.82-117.32		
	1	100.75	84.56-110.65		
2	2	101.07	88.35-115.25	100.91	0.48
	3	100.88	84.29-114.24		

^a Combination of three assays.

^b RSD = Relative standard deviation.

The between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples of the biopharmaceutical formulations by three analysts; the values were found to be 1.34 and 1.75%, respectively, as given in Table 3.

Table 3 – Between-analyst precision data of chromogenic assay for streptokinase in biopharmaceutical formulations

Sample	Analyst	Potency ^a %	Confidence interval (P = 0.95)	Combined Potency %	RSD ^b (%)
1	A	100.97	92.18-107.54	100.18	0.34
	B	99.42	94.13-106.52		
	C	100.15	89.07-104.11		
2	A	98.45	87.47-109.14	99.04	0.66
	B	99.57	92.36-116.88		
	C	99.12	85.56-108.63		

^a Combination of three assays

^b RSD = Relative standard deviation.

3.1.3. Accuracy

The accuracy of the chromogenic assay was assessed from three replicate determinations of three solutions containing 120 000, 150 000 and 180 000 IU/mL, respectively. The absolute means obtained with a mean value of 100.34 and a bias lower than 1.23% (Table 4) show that the method is accurate within the desired range.

Table 4 – Accuracy of chromogenic assay for streptokinase in the formulations

Nominal concentration (IU/mL)	Mean concentration found ^a (IU/mL)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
120 000	120 456	2.16	100.38	0.66
150 000	150 150	1.69	100.10	1.23
180 000	180 954	1.87	100.53	0.85

^a Mean of three replicates.

^b RSD = relative standard deviation.

^c Bias = [(measured concentration - nominal concentration)/nominal concentration] x 100.

3.1.4. Limits of Detection and Quantitation

The LOD and LOQ of the chromogenic assay were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression model, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 1.10 and 2.61 IU/mL, respectively. The evaluated experimental LOQ with a precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$, (SHABIR et al., 2007) was found to be 2.50 $\mu\text{g/mL}$, and therefore, suitable for quality control analysis.

3.1.5. Robustness

The results of the assay and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 5, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromogenic assay pattern when modifications were introduced into the experimental conditions, thus showing the assay to be robust. The stability of the sample solutions was studied and the data obtained showed the stability for 24 h when maintained at 2-8 °C.

Table 5 – Conditions investigated during the robustness testing

Variable	Range investigated	Potency %	Confidence interval (<i>P</i> = 0.95)	Variable Selected
Plasminogen reaction time	5 minutes	100.72	96.41-109.11	
	10 minutes	100.12	97.23-113.65	10 minutes
	15 minutes	101.17	94.42-111.59	
Substrate chromogenic incubation	1 minute	100.51	98.62-102.14	
	2 minutes	100.31	92.51-109.17	2 minutes
	3 minutes	99.00	89.91-109.03	
Buffer pH	pH = 7.4	98.48	87.88-110.24	
	pH = 7.7	99.80	98.40-101.20 91.25-	pH 7.7
	pH = 8.0	101.12	112.03	
Assay temperature	34 °C	102.01	92.11-112.97	
	37 °C	99.92	90.13-110.82	37 °C
	40 °C	98.33	89.94-107.75	
Solution stability	Initial	102.90	(98.01-120.83)	-
	24 hours (2 – 8°C)	100.91	(96.57-120.88)	-

3.2. Method Application

The validated chromogenic assay was applied for the determination of streptokinase in biopharmaceutical products, giving biological potencies within 98.42 and 108.97% of the

stated potency. As shown in Table 6, the samples meet the potency specifications claimed between 90 and 111% (EP. 2012).

Table 6 – Potency, confidence intervals ($P=0.95$) of streptokinase in biopharmaceutical products by the chromogenic assay

Sample	Potency Stated UI	Chromogenic Assay		
		Potency Found ^a		Confidence Intervals ($P=0.95$)
		UI	%	
1	1500 000	1515 150	101.01	96.40-105.80%
2	1500 000	1582 200	105.48	100.10-111.10%
3	1500 000	1522 500	101.50	94.40-109.00%
4	1500 000	1576 950	105.13	97.20-113.60%
5	1500 000	1589 100	105.94	102.90-109.10%
6	1500 000	1600 350	106.69	102.50-110.9%
7	1500 000	1499 550	99.97	93.21-111.65%
8	1500 000	1476 300	98.42	95.00-101.90%
9	1500 000	1569 750	104.65	100.30-109.00%
10	750 000	806 475	107.53	103.50-111.60%
11	750 000	798 000	106.40	97.50-116.10%
12	750 000	817 275	108.97	98.10-115.10%
Mean	-	-	104.85	-
SD ^b	-	-	3.31	-

^a Mean of three replicates.

Besides, the activities of streptodornase and streptolysin of the same samples were evaluated by the optimized assays and the results shown in Table 7 demonstrates that the biopharmaceutical products meet the Pharmacopoeial specifications and the quality of the preparations.

Table 7 – Streptolysin and streptodornase assay in biopharmaceutical products

Sample	Streptodornase ^a	Streptolysin ^b
	Absorbances Sample < Absorbances Standard + Sample	%
1	0.05945 < 0.0815	17.01
2	0.06235 < 0.0792	30.38
3	0.06055 < 0.0803	27.85
4	0.056 < 0.0933	27.60
5	0.072 < 0.0875	29.40
6	0.055 < 0.084	13.53
7	0.026 < 0.0675	18.29
8	0.069 < 0.0705	47.26
9	0.073 < 0.0825	16.75
10	0.052 < 0.0945	17.61
11	0.067 < 0.098	17.06
12	0.075 < 0.094	28.88

^a Maximum 10 IU of streptodornase activity per 100 000 IU of streptokinase activity.

^b The absorbance of the test solution is not more than 50 per cent greater than that of the reference solution.

4. Conclusion

The validated chromogenic assay is sensitive and possesses excellent linearity and precision characteristics, and can be applied for the potency assessment of the streptokinase in biological products to assure the quality, safety and therapeutic efficacy.

5. Acknowledgements

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

6. References

BROGDEN, R. N.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Streptokinase: a review of its clinical pharmacology, mechanism of action and therapeutic uses. **Drugs**, v. 5, p. 357-445, 1973.

KUNAMNENI, A.; ABDELGHANI, T. T. A.; ELLAIAH, P. Streptokinase- the drug of choice for thrombolytic therapy. *Journal of Thromb. Thrombolysis*, v. 23, p. 9-23, 2007.

BUTCHER, K.; SHUAIB, A.; SAVER, J.; DONNAN, G.; DAVIS, S. M.; NORRVING, B.; WONG, K. S. L.; ABD-ALLAH, F.; BHATIA, R.; KHAN, A. Thrombolysis in the developing world: is there a role for streptokinase? **International Journal of Stroke**, 2013.

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.

BABU, 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.

HUANG T. T.; MALKE, H., FERRETTI, J. J. Heterogeneity of the streptokinase gene in group A Streptococci. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 502-506, 1989.

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.

EUROPEAN Pharmacopoeia 7th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2012.

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.

COUTO, L. T.; DONATO, J. L.; NUCCI, G. Analysis of five streptokinase formulations using the euglobulin lysis test and the plasminogen activation assay, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1889-1894, 2004.

AVILÁN, L.; YARZÁBAL, A.; JÜRGENSEN, 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.

LOCKE, I. C.; CARPENTER, B. G. Functional Characteristics of the Streptococcal Deoxiribonuclease ‘Streptodornase’, a Protein with DNase Activity Present in the Medicament Varidase®. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 67-73, 2004.

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.

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.

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.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Os processos biotecnológicos baseados na tecnologia do DNA recombinante, e em especial, a fermentação, viabilizaram a produção da substância biológica estreptoquinase. Apesar dos avanços nas etapas de purificação, a estreptoquinase produzida por fermentação, usada no presente trabalho, pode apresentar componentes do processo como a estreptodornase e estreptolisina. Deste modo, são necessárias metodologias analíticas para avaliação da qualidade dos produtos biofarmacêuticos, observando que a Farmacopeia Europeia, preconiza ensaios (EP, 2012), porém, a validação e otimização dos ensaios biológicos são necessárias para aprimorar o controle da qualidade.

Os ensaios biológicos expressam a atividade biológica e sua execução é necessária para avaliar a potência, especialmente de produtos biológicos, que não podem ser completamente caracterizados por métodos físico-químicos, ou para os quais ainda não se estabeleceu correlação entre as metodologias.

A discussão apresentada a seguir baseia-se no ARTIGO 3.1, elaborado para publicação.

Validou-se o ensaio biológico cromogênico da ativação do plasminogênio em plasmina *in vitro*, avaliando-se os parâmetros preconizados na literatura (ICH, 2005), porém adaptados ao bioensaio. O bioensaio apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 2,5 a 40 UI/mL ($r^2 = 0,9988$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram CV inferiores a 1,62 %, conforme as tabelas 1, 2 e 3, demonstrando a precisão do método proposto. Na tabela 4 podem ser observados os valores experimentais de exatidão obtidos, com média de 100,34 %, confirmando sua significância. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados, apresentando valores de 1,10 e 2,61 UI/mL, respectivamente, indicando a capacidade do método de detectar e quantificar a biomolécula com confiabilidade adequada nos produtos biofarmacêuticos. As potências obtidas nas análises não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas, comprovando a robustez do método proposto, de acordo com a tabela 5. Demonstrou-se, portanto, que o bioensaio proposto cumpre com os requisitos preconizados pela literatura oficial e foi aplicado para avaliação de potência biológica de estreptoquinase em produtos biofarmacêuticos. As potências destas bioformulações variaram entre 98,42% e 108,97%, obtendo-se média de potência de 104,85% de acordo com a tabela 6.

Paralelamente, foi executado o bioensaio *in vitro* para determinação da atividade de estreptodornase, utilizando DNA de salmão, fornecendo resultados inferiores a 10 UI para cada 100 000 UI de estreptoquinase, cumprindo especificação para produtos de uso terapêutico, conforme demonstra a tabela 7.

Também foi realizado o ensaio *in vitro* para determinação da atividade de estreptolisina, usando como substrato os eritrócitos de coelho. Os resultados obtidos mostram que as amostras testadas apresentaram absorvâncias, no máximo 50%, superiores em relação à absorvância da solução de referência, cumprindo especificações farmacopeicas para os produtos biofarmacêuticos (EP, 2012), conforme os resultados expressos na tabela 7.

Destaca-se que o teor/potência de estreptoquinase, até o momento, é avaliado somente por ensaios biológicos, justificando estudos sucessivos para aprimorar sua caracterização e viabilizar estudos de estabilidade por métodos físico-químicos. Neste contexto, a validação realizada e a avaliação dos componentes dos produtos biofarmacêuticos representam contribuição para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia do produto biológico.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Validou-se o ensaio biológico do substrato cromogênico do plasminogênio em plasmina, específico, sensível e preciso para a avaliação de potência de estreptoquinase.
- ✓ Realizou-se identificação e avaliação de atividade de estreptodornase e de estreptolisina em produtos biofarmacêuticos que forneceram resultados de acordo com as especificações.
- ✓ Avaliou-se a potência de estreptoquinase em produtos comerciais de uso terapêutico que apresentaram resultados entre 98,42 a 108,97% em relação à potência declarada.
- ✓ As metodologias estudadas contribuem para aprimorar o controle da qualidade, pesquisar avanços de metodologias analíticas, e para garantir a eficácia terapêutica e segurança do produto biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOUF, J. E. Streptococcal Toxins (Streptolysin O, Streptolysin S, Erythrogenic Toxin), **Pharmacology & Therapeutics**, v. 11, p. 661-717, 1980.

AVILÁN, L.; YARZÁBAL, A.; JÜRGENSEN, 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, 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.

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

BARTH, T. **Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para avaliação de potência de eritropoietina humana recombinante. Correlação com o ensaio biológico.** 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

CASSINI, M. F.; CASSINI, P. L.; RUSSO, R. L. Thrombolytic Therapy in Bilateral Embolism of Renal Arteries Branches. **International Braz J Urol**, v. 29, n. 2, p. 147-148, 2003.

CHRISTENSEN, L. R.; MacLEOD, C. M. A Proteolytic Enzyme of Serum: Characterization, Activation, and Reaction with Inhibitors. **The Journal of General Physiology**, v. 28, p. 559-583, 1945.

COUTO, L. T.; DONATO, J. L.; NUCCI, G. Analysis of five streptokinase formulations using the euglobulin lysis test and the plasminogen activation assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1889-1894, 2004.

DE RENZO E. C.; SIITERI P. K.; HUTCHINGS B. L.; BELL P. H. Preparation and certain properties of highly purified streptokinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 10, p. 533-542, 1967.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guidance on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues**”. London, 30 June 2005.

EUROPEAN Pharmacopoeia 7th ed., Strasbourg: Council of Europe, 2012.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, May, 2001.

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.

HALPERN, B. N.; RAHMAN, S. Studies on the Cardiotoxicity of Streptolysin O. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p. 441-452, 1968.

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.

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.

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

KACPRZAK, G.; MAJEWSKI, A.; KOŁODZIEJ, J.; RZETCHONEK, A.; GÜRLICH, R.; BOBEK, V. New therapy of pleural empyema by deoxyribonuclease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 90-93, 2013.

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 pHstat. **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.

LEE, M.; SONG, K. B. Purification of Streptodornase from *Streptococcus equisimilis* and Its DNA-Induced Conformational Change. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 230, p. 13-15, 1997.

LEE, S.Y., High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 98-105, 1996.

LOCKE, I. C.; COX, S. F.; CARPENTER, B. G. Purification of a Streptococcal deoxyribonuclease by affinity chromatography based on a DNA-cellulose matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 788, p. 75-80, 1997.

LOCKE, I. C.; CARPENTER B. G. Functional Characteristics of the Streptococcal Deoxyribonuclease 'Streptodornase', a Protein with DNase Activity Present in the Medicament Varidase®. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 67-73, 2004.

LUNARDI, J. **Produção da Proteína Recombinante Estreptoquinase (*Streptococcus dysgalactiae* subs. *equisimilis*) em Biorreator Utilizando Diferentes Estratégias de Batelada Alimentada**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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

MANO, M. S.; GUIMARAES, J. L. M.; SUTMOLLER, S. F. M. C.; REIRIZ, A. B.; SULMOLLER, C. S. S. C.; DI LEO, A. Extensive deep vein thrombosis as a complication of testicular cancer treated with the BEP protocol (bleomycin, etoposide and cisplatin): case report. **São Paulo Medical Journal**, v. 124, n. 6, p. 343-345, 2006.

NAGAI N.; VANLINTHOUT, I.; COLLEN D., Comparative Effects of Tissue Plasminogen Activator, Streptokinase, and Staphylokinase on Cerebral Ischemic Infarction and Pulmonary Clot Lysis in Hamster Models. **Circulation**, v. 100, p. 2541-2546, 1999.

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.

NIZET, V.; BEALL, B.; BAST, D. J.; DATTA, V.; KILBURN, L.; LOW, D. E.; AZAVENDO, J. C. S. Genetic Locus for Streptolysin S Production by Group A Streptococcus. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4245-4254, 2000.

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.

QUINTERO, L.; HERNANDEZ, F.; ACELIA, M.; MARIA, C.; LOPEZ, M.; BARCELONA, S.; IBARGOLLIN, R.; BOBILLO, H.; AGUILERA, A.; BERMUDEZ, Y.; PAEZ, R.; MARTINEZ, E.; RODRIGUEZ, H.; AGUIAR, A.; RAMIREZ, R.; LOPEZ, P. Initial evidence of safety and clinical effect of recombinant streptokinase suppository in acute hemorrhoidal disease. Open, proof-of-concept, pilot trial. **Biotecnología Aplicada**, v. 27, p. 277-280, 2010.

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.

RAMOS, A. I. O.; RAMOS, R. F.; TOGNA, D. J. D.; ARNONI, A. S.; STAICO, R.; GALO, M. M.; MENEGHELO, Z. M. Fibrinolytic Therapy for Thrombosis in Cardiac Valvular Prosthesis Short and Long Term Results. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 81, n. 4, p. 393-398, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

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.

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.

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

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

SILVA, L. M. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para avaliação de interferon-alfa 2a em formulações farmacêuticas**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SOUSA, J. M. A.; SEVERINO, L.; REZENDE, E. C.; ALENCAR, J. N.; LIMA, V. C.; HERMANN, J. L. V. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 78, n. 4, p. 416-419, 2002.

SUN, S. K.; WANG, B. B.; YAN, X. P.; A label-free near-infrared fluorescent assay for the determination of deoxyribonuclease I activity based on malachite green/G-quadruplexest. **Analyst**, v. 138, p. 2592-2597, 2013.

THE UNITED States Pharmacopeia. 35. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2012.

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

YOUNG, K. C.; SHI, G. Y.; WU, D. H.; CHANG, L. C.; CHANG, B. I.; OU, C. P.; WU, H. L. Plasminogen Activation b Streptokinase via a Unique Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 5, p. 3110-3116, 1998.

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.

WU, K. K.; THIAGARAJAN, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. **Annual Review of Medicine**, v. 47, p. 315-331, 1996.