

SOLUÇÕES EM ANÁLISE DE BIOFÁRMACOS POR HPLC

Índice

Introdução	3
Biomoléculas como biofármacos	4
Métodos de separação de biofármacos	6
Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-LC).....	6
Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC)	12
Cromatografia por troca iônica (IEC)	13
Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)	15
Conclusão	17
Referências	18

Produção: Acore Consumíveis

Elaboração: Jéssica Fernanda Coelho (Doutora em Ciências de Materiais);
Gabriela Pilli (Mestre em Química);
Renato Orsino (Especialista em Cromatografia)

Introdução

O desenvolvimento de biofármacos, também chamados de medicamentos biológicos, tem experimentado um notável crescimento nos últimos anos, estabelecendo uma posição de destaque no mercado farmacêutico global. Produzidos por meio de processos biotecnológicos, esses medicamentos estão ganhando cada vez mais espaço em diversas áreas da medicina, emergindo como uma das abordagens terapêuticas mais eficazes para uma ampla gama de doenças, incluindo cânceres e distúrbios metabólicos. Além disso, os biofármacos apresentam uma série de vantagens em comparação com os medicamentos químicos tradicionais, como maior especificidade e seletividade na ação terapêutica, menor toxicidade e reduzida probabilidade de efeitos colaterais [1].

Ao contrário dos medicamentos químicos tradicionais, os biofármacos são moléculas grandes e complexas, derivadas de organismos vivos como células animais, bacterianas, de leveduras ou plantas, e podem englobar proteínas, peptídeos, glicanos ou outras substâncias biologicamente ativas. Sua produção é mais desafiadora em comparação com os medicamentos químicos tradicionais. Portanto, é fundamental realizar análises detalhadas para garantir a eficácia, segurança e estabilidade dessas moléculas, demandando um monitoramento constante dos processos e da qualidade do produto, aliado a uma minuciosa caracterização das variantes resultantes do processo [2,3].

As principais técnicas utilizadas para a análise de biofármacos e suas impurezas englobam uma variedade de métodos cromatográficos, tais como cromatografia de troca de cátions (CEX), cromatografia de troca de ânions (AEX), cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC), cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC), cromatografia de afinidade (AC), exclusão de tamanho (SEC), troca de íons (IEC) e cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) [4].

Este e-book foi elaborado com o objetivo de oferecer uma introdução clara e acessível das soluções de análise de biofármacos, destacando as principais técnicas analíticas utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a análise desses compostos.

Biomoléculas como biofármacos

As biomoléculas constituem os blocos fundamentais dos organismos vivos, sendo em sua maioria macromoléculas, isto é, moléculas de grande tamanho e complexidade estrutural. Para visualizar esse vasto universo, podemos recorrer à analogia de uma galáxia repleta de elementos únicos, representando as diversas biomoléculas e suas características distintas (Figura 1). As proteínas, como as estruturas maiores, podem ser equiparadas a elementos de variados tamanhos, algumas enormes como o Sol, outras de porte médio como Júpiter, e ainda outras relativamente menores como Saturno. Por sua vez, os peptídeos desempenham o papel da Terra nessa “galáxia”, enquanto os glicanos se assemelham às luas, orbitando em torno das estruturas proteicas como satélites naturais [5].

As massas das proteínas podem variar significativamente. Por exemplo, os Anticorpos Monoclonais (mAb), que são proteínas grandes, têm uma massa molecular de cerca de 150 kDa. Eritropoietina, uma proteína de tamanho médio, tem uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa. Por outro lado, a Mioglobina, uma proteína pequena, possui uma massa molecular de 17 kDa. Além disso, os peptídeos, como o Beta-Endorphin, têm uma massa molecular menor, em torno de 3 kDa, enquanto os glicanos, como a Celulose, têm uma massa molecular ainda menor, aproximadamente 162 Da. Essas variações nas massas são fundamentais para compreender a diversidade e a complexidade das biomoléculas [5].

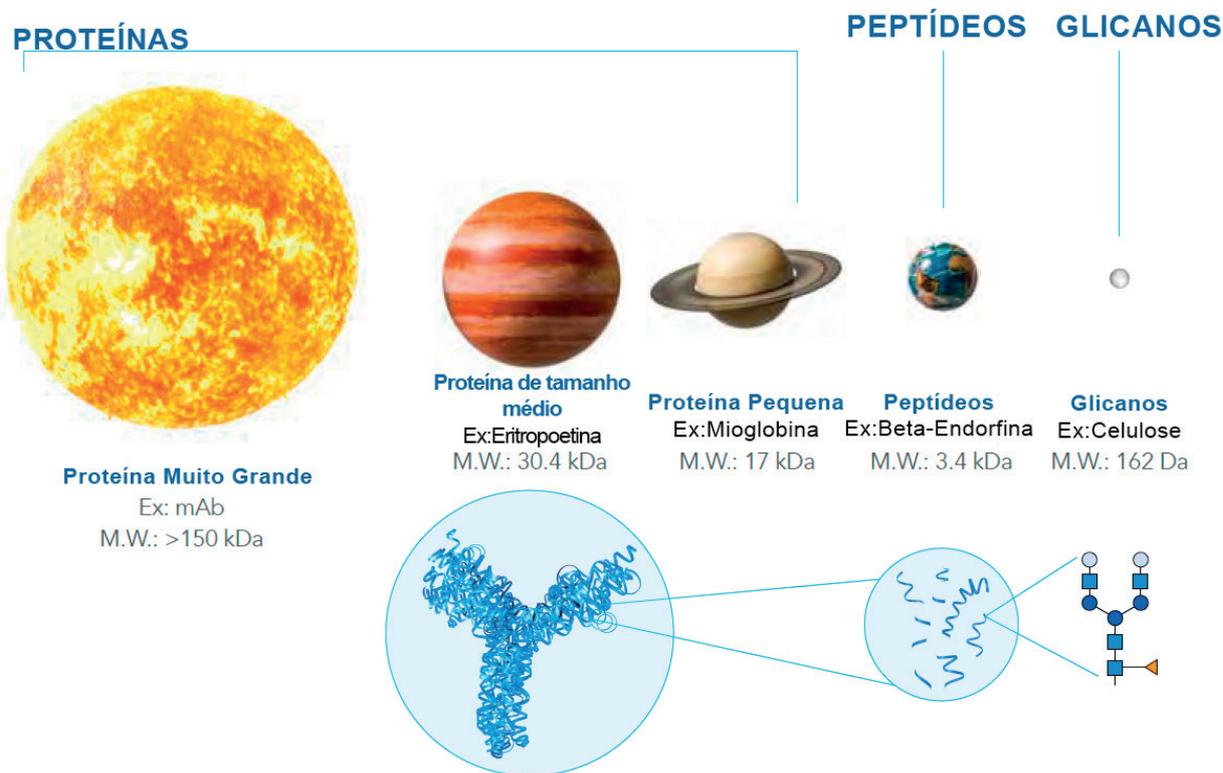


Figura 1: Galáxia de biomoléculas. Adaptado Ref. [5]

Biomoléculas como biofármacos

Cada biomolécula é constituída por unidades que conferem características estruturais e arranjos específicos à molécula. As proteínas, por exemplo, representam macromoléculas complexas compostas por uma ou mais cadeias de aminoácidos. Além de desempenharem funções vitais na biologia celular, as proteínas podem servir como biomarcadores, sendo muitas delas, incluindo os anticorpos monoclonais (mAbs), fundamentais como biofármacos. Nos últimos 150 anos, foram feitos avanços significativos na exploração do potencial terapêutico das proteínas. O desenvolvimento de um tratamento baseado em anticorpos para a difteria em 1891 foi um marco importante, reconhecido com o primeiro Prêmio Nobel de Medicina. Em 1982, o Humulin, uma forma de insulina utilizada para tratar a diabetes, foi o primeiro medicamento terapêutico recombinante à base de proteínas a ser aprovado pelo FDA (do inglês "Food and Drugs Administration") [6,7].

Os peptídeos são moléculas menores em comparação com as proteínas, constituídas por cadeias curtas de aminoácidos ligadas por ligações peptídicas. Eles desempenham funções essenciais na comunicação celular, na regulação de processos fisiológicos e no transporte de substâncias no organismo. Exemplos comuns de peptídeos incluem hormônios e neurotransmissores. Recentemente, alguns peptídeos biologicamente ativos têm despertado interesse entre os fabricantes farmacêuticos, e isso se deve ao fato de que, em sistemas hospedeiros vivos, esses peptídeos são capazes de desencadear uma ampla gama de atividades biológicas, tais como antioxidantes, anti-hipertensivos, antimicrobianos, citomoduladores, antidiabéticos, agonistas opioides, ansiolíticos, imunomoduladores, anticancerígenos e anti-inflamatórios, entre outros [8].

Já os glicanos, também conhecidos como carboidratos complexos ou açúcares ligados a proteínas ou lipídios, são moléculas cruciais na adesão celular, no reconhecimento molecular, na sinalização celular e na modulação da estabilidade e função de proteínas. Encontrados em diversas formas e tamanhos, os glicanos são essenciais para a estrutura e função adequadas de muitas proteínas e células do organismo. Diversos medicamentos de moléculas pequenas amplamente conhecidos, como antibióticos e agentes terapêuticos anticancerígenos, são produtos naturais que incluem glicanos em sua estrutura central e/ou como cadeias laterais de açúcar (ou seja, glicosídeos) [9].

Proteínas, peptídeos e glicanos têm sido cada vez mais reconhecidos como potenciais alvos e agentes terapêuticos na medicina moderna, impulsionando a indústria farmacêutica a revisar e redefinir aspectos na investigação de métodos bioanalíticos. Diversas técnicas de separação são empregadas na pesquisa dessas biomoléculas, incluindo cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia de fluidos supercríticos (SFC). Apesar do destaque da SFC e da SFC de Ultra Alta Performance, HPLC e GC continuam sendo as técnicas mais comuns, especialmente quando combinadas com espectrometria de massa, garantindo uma quantificação precisa dos analitos. No entanto, na bioanálise, o HPLC é ainda mais comum, uma vez que não requer que os analitos sejam voláteis, ao contrário do GC [2,3].

Métodos de separação de biofármacos

Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-LC)

Devido à sua notável robustez e excelente capacidade de separação, a cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC) é altamente valorizada como método preferencial para a separação de biofármacos em processos de rotina. Amplamente empregada na análise de amostras de peptídeos e proteínas, a RP-LC desempenha um papel essencial também na purificação dessas moléculas, frequentemente após uma prévia separação por SEC, IEC ou outros métodos de LC. A retenção dos analitos de interesse na RP-LC é predominantemente mediada por interações entre os resíduos hidrofóbicos da biomolécula alvo e as cadeias alquílicas da fase estacionária, como as cadeias C4, C8, C18, por exemplo. No entanto, em algumas colunas de fase reversa, existem grupos funcionais que estabelecem interações intermoleculares adicionais, como é o caso da fase fenil, onde as interações π - π desempenham um papel crucial na separação [10,11].

Outro fator importante a ser considerado na RP-LC é o diâmetro dos poros das partículas da fase estacionária. Isso ocorre porque as interações entre o analito e a fase estacionária ocorrem principalmente na superfície das partículas, onde estão contidas as cadeias alquílicas e grupos funcionais. As partículas, predominantemente porosas, devem possuir poros com tamanho suficiente para acomodar o analito. No caso dos biofármacos, que são moléculas grandes, esse parâmetro deve ser cuidadosamente considerado [12]. Para peptídeos e proteínas menores, um tamanho de poro na faixa de 100–200 Å pode ser suficiente. No entanto, para a separação de proteínas maiores ou fragmentos de mAbs, poros com diâmetros superiores a 200 Å são essenciais,

uma vez que o tamanho molecular do analito deve ser aproximadamente um décimo do tamanho do poro para evitar a difusão restrita e garantir a acessibilidade à área total da superfície do material da fase estacionária. Um tamanho médio de poro entre 250-300 Å é frequentemente mencionado como valor de referência para separações de proteínas, mas recentemente foi demonstrado que partículas de 400 Å eliminaram completamente os efeitos de difusão restritos para moléculas de até cerca de 500 kDa [13].

A Figura 2 oferece uma abordagem para auxiliar na seleção do diâmetro de poro da fase estacionária da coluna cromatográfica, levando em consideração a faixa de peso molecular do analito [14].

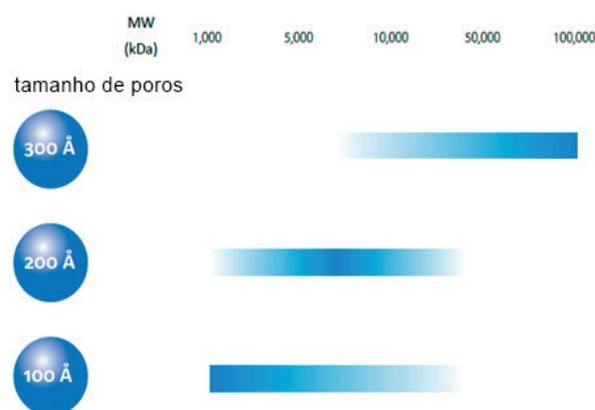


Figura 2: Tamanho dos poros da fase estacionária da coluna cromatográfica e faixa de peso molecular do analito. Adaptado da Ref. [14]

As colunas de fase reversa ProteoSil BioLC são um exemplo destacado no mercado, especialmente projetadas para atender às demandas da proteômica e das separações de proteínas e peptídeos.

Métodos de separação de biofármacos

Cada uma dessas colunas é equipada com hardware bioinerte de PEEK e aço inoxidável, garantindo uma compatibilidade superior com amostras biológicas. As partículas da fase estacionária são fabricadas com sílica de alta pureza, oferecendo uma ampla gama de tamanhos de poro – 100 Å, 200 Å e 300 Å - e proporcionando opções variadas de cadeias alquílicas, incluindo C4, C8, C18 e fenil.

Para fornecer uma visão abrangente das opções disponíveis, a Tabela 2 apresenta as diferentes colunas ProteoSil, destacando suas características distintas, como fase estacionária, tamanho de partícula, tamanho de poro e aplicabilidade.

Tabela 2: Colunas Proteosil BioLC da GL Sciences para RP-LC de biofármacos

	Analito	MW	Coluna	Fase	USP	Tamanho de partícula (µm)	Tamanho de Poros (Å)
Fase Reversa	Proteínas Peptídeos Oligonucleotídeos Ácidos Nucleico	<5,000	ProteoSil 100-C18	C18	L1 L96	1.9, 3.5	100
		5,000 - 20,000	ProteoSil 200-C18	C18	L1 L96	1.9, 3.5	200
		5,000 - 20,000	ProteoSil 200-C8	C8	L1	1.9, 3.5	200
		>20,000	ProteoSil 300-C18	C18	L1	5	300
		>20,000	ProteoSil 300-C8	C8	L7	5	300
	Proteínas Peptídeos Anticorpos Monoclonais Oligonucleotídeos Ácidos Nucleico	>20,000	ProteoSil 300-C4	C4	L26	5	300
	Proteínas Anticorpos Monoclonais Conjugados anticorpo-fármaco (CAF) Subunidade	>100,000	MonoSelect RP-mAb	Fenil	-	Monolítica	600

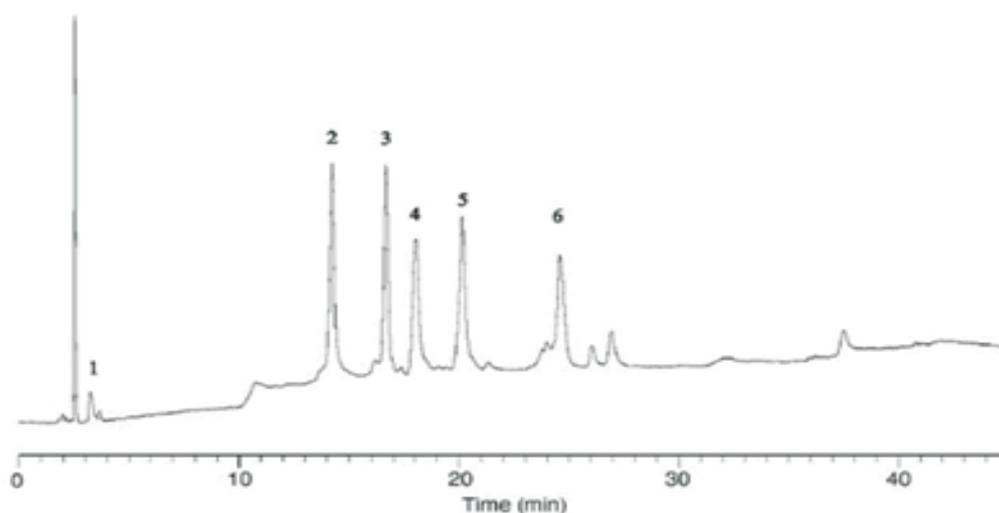
Métodos de separação de biofármacos

No cromatograma apresentado na Figura 3, observamos a separação de seis peptídeos e proteínas com tamanhos moleculares variando de 165 Da a 66 kDa. Para essa análise, foi utilizada uma coluna de fase reversa ProteoSil 300-C18, com tamanho de poros de 300 Å. Os compostos analisados incluíram DL-Fenilalanina, Citocromo C, Lisozima, α -quitotripsinogênio A, Albumina Sérica Bovina (BSA) e Ovalbumina.

A DL-Fenilalanina, um aminoácido de baixo peso molecular, tem aproximadamente 165,19 g/mol. Já o Citocromo C e a Lisozima são proteínas de tamanho médio, com cerca de 13 kDa e 14 kDa, respectivamente.

O α -quitotripsinogênio A apresenta um tamanho molecular em torno de 25 kDa. Por outro lado, a Albumina Sérica Bovina (BSA) é uma proteína de maior porte, com aproximadamente 66 kDa, e a Ovalbumina, encontrada na clara de ovo, possui um tamanho molecular considerável, em torno de 45 kDa. Os resultados demonstraram a capacidade da coluna ProteoSil 300 com fase estacionária C18 em separar eficazmente as seis moléculas de diferentes tamanhos moleculares, todas compatíveis com poros de 300 Å. A separação foi realizada utilizando um gradiente de fase móvel adequado e detecção por UV.

Análise de Peptídeos e Proteínas (ProteoSil 300-C18)



Condições

Coluna: ProteoSil 300-C18 (5 μ m, 150 x 4.6 mm I.D.)
 Fase Móvel: A) CH₃CN/0.05 % TFA = 80/20, v/v
 B) CH₃CN/0.05 % TFA = 10/90, v/v
 A/B = 0/100 - 30 min - 100/0 - 10 min - 100/0, v/v
 Fluxo: 1.0 mL/min
 Temp Col: 30 °C
 Detector: UV 280 nm

Analito

1. DL-Fenilalanina (FW 165)
 2. Citocromo C (FW 13,000)
 3. Lisozima (FW 14,000)
 4. BSA (FW 66,000)
 5. α -Quitotripsinogênio (FW 25,600)
 6. Ovalbumina (FW 45,000)

Figura 3: Cromatograma de separação de peptídeos e proteínas utilizando a coluna de fase reversa ProteoSil 300-C18: 1) DL-Fenilalanina (165 Da), 2) Citocromo C (13 kDa), 3) Lisozima (14 kDa), 4) BSA (66 kDa), 5) α -Quitotripsinogênio A (25,6 kDa), e 6) Ovalbumina (45 kDa). Adaptado Ref. [14]

Métodos de separação de biofármacos

Até aqui, trouxemos uma visão da separação por RP-LC considerando exemplos de colunas constituídas de partículas totalmente porosas (FPP, do inglês “Fully Porous Particles”). No entanto, as análises de biofármacos vêm sendo explorada também dentro do contexto de desenvolvimento de partículas superficialmente porosas (SPP, do inglês “Superficially Porous Particles”). Uma clara vantagem da tecnologia SPP está na capacidade de realizar separações de alta eficiência em menos tempo, com redução das contrapressões em comparação com colunas de partículas totalmente porosas [5].

As SPPs, também conhecidas como partículas Core-Shell, consistem em um núcleo sólido de sílica não porosa envolvido por uma camada externa porosa. As versões modernas dessas partículas para análise de biofármacos estão disponíveis em tamanhos de 2, 2.7, 3.4 e 5 μm , com poros variando de 90 a 1000 \AA (Figura 4). Além disso, as colunas que utilizam essas partículas para fase reversa podem apresentar grupos funcionais como C4, C18, difenil e fenilhexil. Essa combinação de materiais permite o desenvolvimento de colunas que oferecem velocidade e eficiência comparáveis às colunas empacotadas com partículas totalmente porosas sub-2 μm , mas com uma contrapressão mais baixa, o que as torna adequadas para uso em instrumentos HPLC convencionais com pressões máximas de até 300 bar.

A estrutura porosa da camada externa minimiza o alargamento de banda ao reduzir a dispersão das moléculas dentro do leito empacotado. Isso ocorre devido a um menor volume de poros disponível para a difusão longitudinal, o que resulta em uma redução de até 30% no termo B da equação de van Deemter. Além disso, o menor comprimento do caminho de difusão diminui a

contribuição do termo C para o alargamento de banda, devido à rápida transferência de massa. Em comparação com as partículas totalmente porosas, as partículas Core-Shell demonstram uma redução na contribuição do termo C, especialmente notável para moléculas grandes como proteínas e em condições de alto fluxo [15].

A superfície mais rugosa das partículas Core-Shell também contribui para uma redução significativa de 40% na contribuição do termo A, que se refere à regularidade do empacotamento da coluna.

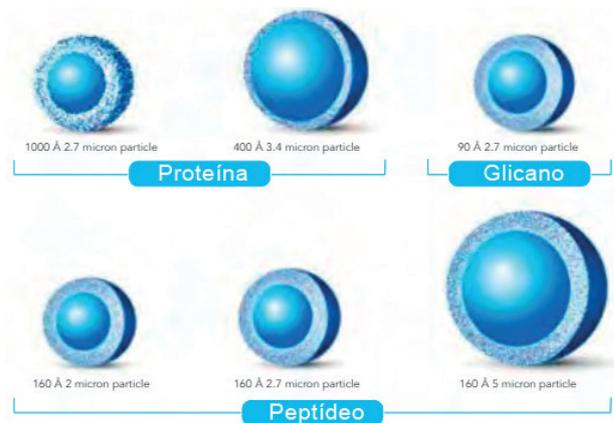
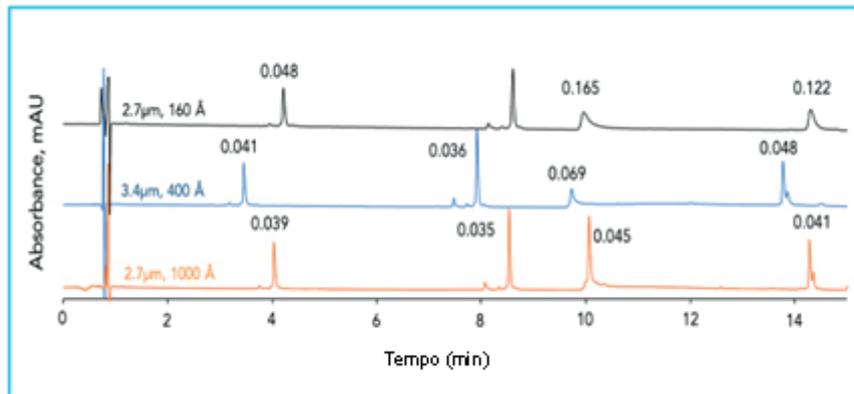


Figura 4: Distribuição típica de tamanho de partícula e poros em partículas Core-Shell usadas em análises de biofármacos. Adaptado Ref. [5]

As colunas da série HALO® BioClass da Advanced Materials Technology são colunas de partículas Core-Shell projetadas para atender às exigências críticas de separação nos processos de desenvolvimento e liberação de biofármacos. Com aplicações que incluem desde análise de mAb intactos até análise de fragmentos reduzidos e alquilados de cadeias pesadas e leves, digestão de proteínas e análise de glicanos, as colunas HALO® BioClass oferecem soluções de partículas personalizadas para enfrentar os desafios mais complexos de separação.

Métodos de separação de biofármacos



IDENTIDADES DE PICO:

1. Ribonuclease A (13,8 kDa)
2. Lisozima (14,4 kDa)
3. SILUT™ Lite SigmaMAb Anticorpo (~150 kDa)
4. Enolase (46,7 kDa)

Figura 5: Estudo comparativo da separação de Ribonuclease A, Lisozima, Enolase e SILu™ Lite SigmaMAb utilizando colunas HALO® ES-C18 com porosidades de 160 Å, 400 Å e 1000 Å. Adaptado da Ref. [17]

Além da tecnologia Core-Shell, as partículas das colunas HALO® BioClass possuem poros significativamente maiores, como no caso da coluna de 1000 Å. Biofármacos de alto peso molecular, como certas proteínas, requerem poros maiores para garantir um melhor acesso à fase estacionária. Um estudo comparativo foi realizado para demonstrar a influência do tamanho de poro das colunas SPP na separação de uma variedade de proteínas, incluindo Ribonuclease A, Lisozima, Enolase e o anticorpo monoclonal SILu™ Lite SigmaMAb. Utilizou-se a coluna HALO® ES-C18 com porosidades de 160 Å, 400 Å e 1000 Å, e os resultados mostraram que a largura dos picos diminui à medida que o tamanho do poro da coluna aumenta, especialmente para o anticorpo monoclonal, conforme ilustrado nos cromatogramas da Figura 5.

Portanto, a Advanced Materials Technology estabelece como regra geral o tamanho de poro das partículas das colunas SPP recomendado para cada faixa de tamanho molecular. Assim, os tamanhos de poro de 160Å, 400Å e 1000Å são recomendados para moléculas nas faixas de 100 Da a 15 kDa, 2 kDa e 500 kDa e acima de 50 kDa, respectivamente.

Colunas monolíticas são uma categoria distinta de fase estacionária utilizadas na separação por RP-LC de biofármacos. Ao contrário das colunas compostas por partículas FPP (totalmente porosas) e SPP (superficialmente porosas), as colunas monolíticas consistem em um leito cromatográfico contínuo, sem partículas individuais. Essas colunas são reconhecidas por sua estrutura que inclui grandes macroporos, proporcionando alta resistência à pressão devido à durabilidade físico-química do material, e mesoporos menores que facilitam a interação eficaz com o analito [16].

Em um estudo comparativo, foi avaliado o desempenho superior da coluna monolítica de fase reversa MonoSelect RP-mAb da GL Sciences em relação às colunas de partículas totalmente porosas de sílica gel e poliméricas na recuperação de um anticorpo monoclonal (mAb). Os resultados (Figura 6) mostram que as partículas de sílica apresentaram menor retenção, possivelmente devido ao tamanho reduzido dos poros, enquanto a MonoSelect RP-mAb demonstrou excelente capacidade de recuperação do mAb intacto. Os mesoporos são projetados para ter 600 Å, o que é ideal para análise de mAb.

Métodos de separação de biofármacos

Além disso, observou-se que a contrapressão na coluna MonoSelect RP-mAb é significativamente inferior à encontrada em colunas preenchidas com partículas poliméricas. Por essa razão, a coluna MonoSelect RP-mAb é preferencialmente escolhida para a análise de mAb, oferecendo não apenas maior eficiência de retenção, mas também uma operação com menor contrapressão, o que é vantajoso para a eficiência e a durabilidade do sistema cromatográfico.

A propósito, as partículas poliméricas mencionadas neste exemplo também são uma opção de fase estacionária a ser usada em separações de biofármacos por RP-LC.

Isso porque, em alguns métodos, a temperatura é um dos parâmetros que desempenha um papel significativo. Ao aumentar a temperatura da coluna, por exemplo, para 80 a 90 °C, a viscosidade da fase móvel diminui, melhorando a difusão dos analitos. No entanto, a temperatura não pode ser aumentada excessivamente devido ao risco de degradação térmica das proteínas e à redução da vida útil da coluna. Para evitar ou pelo menos limitar a desnaturação proteica que pode ocorrer sob tais condições, é recomendado o uso de fases estacionárias poliméricas, como PVA (álcool polivinílico), que são conhecidas por serem mais inertes do que as fases com partículas à base de sílica [18].

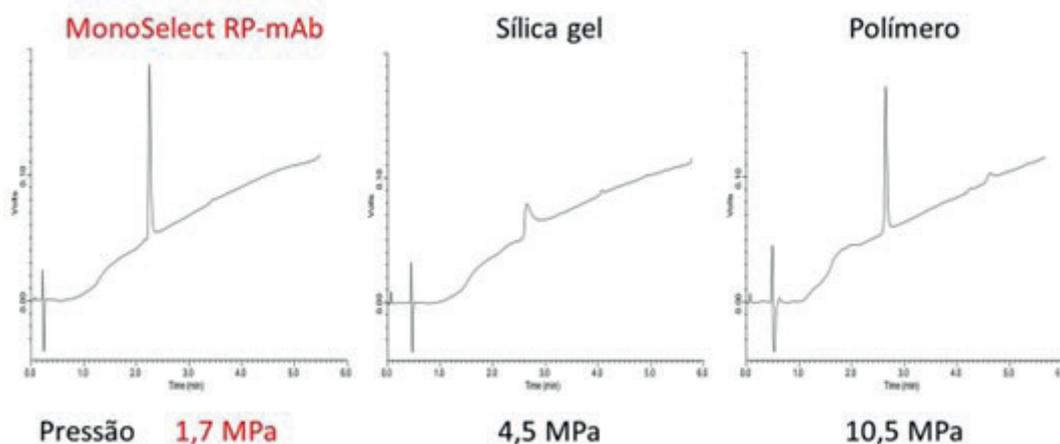


Figura 6: Estudo comparativo da recuperação de um anticorpo monoclonal (mAb) por RP-LC em três tipos de coluna cromatográfica: partículas de sílica, partículas poliméricas e monólito (MonoSelect RP-mAb).

A coluna de fase reversa Asahipak ODP-50 da Shodex, com matriz à base de PS-DVB e tamanho de poros de 250 Å, é ideal para análises rápidas de uma variedade de proteínas, proporcionando boa recuperação mesmo em altas taxas de fluxo, graças à sua pressão máxima de trabalho de 22 MPa. Em uma análise de diversas proteínas, esta coluna demonstrou excelente recuperação (Figura 7) para Lis-Bradicinina (97%),

Bradicinina (92%), Met-enkefalina (97%), Neurotensina (99%), Leu-enkefalina (100%), Substância P (93%), Bacitracina (81%), Insulina (95%), Cadeia B de insulina (91%), Lisozima (96%), Mastoparan (96%) e Mioglobina (83%).

Métodos de separação de biofármacos

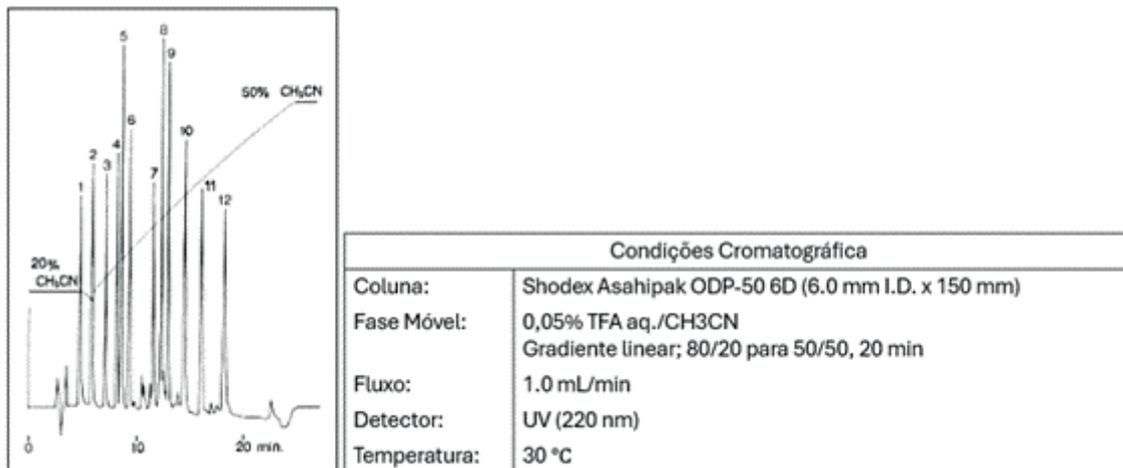


Figura 7: Cromatograma de separação de proteínas utilizando a coluna de fase reversa Asahipak ODP-50: 1) Lis-Bradícinina, 2) Bradícinina, 3) Met-enkefalina, 4) Neurotensina, 5) Leu-enkefalina, 6) Substância P, 7) Bacitracina, 8) Insulina, 9) Cadeia B de insulina, 10) Lisozima, 11) Mastoparan e 12) Mioglobina. Adaptado da Ref. [19]

Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC)

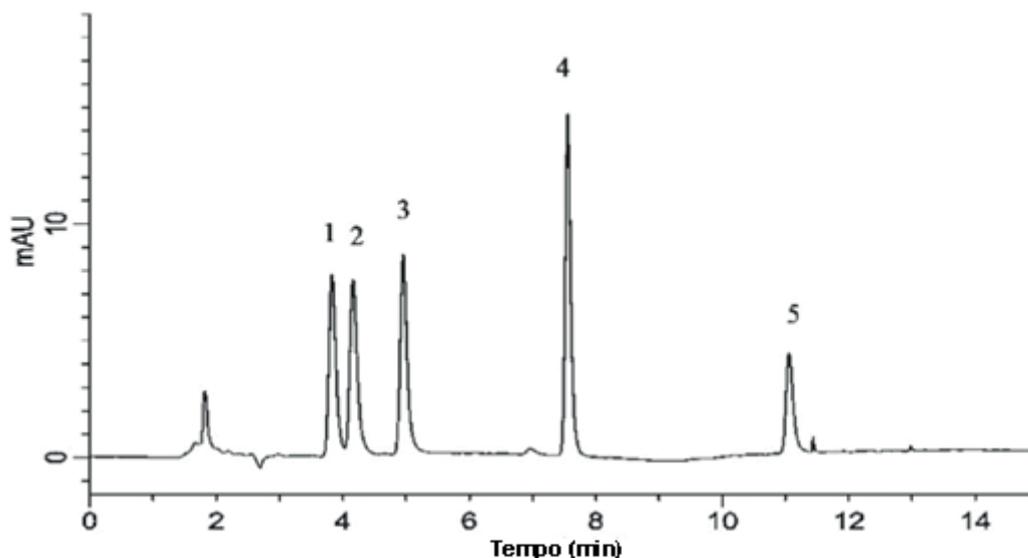
A cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC) é uma variante da cromatografia de fase normal que emprega uma fase estacionária polar, mas com uma fase móvel composta por uma mistura de água e um solvente orgânico aprótico miscível, geralmente acetonitrila, em maior proporção. O mecanismo de retenção em HILIC baseia-se principalmente na partição hidrofílica de compostos polares entre uma camada de água formada na superfície da fase estacionária e a fase móvel altamente orgânica. Dependendo da natureza tanto da fase estacionária quanto das fases móveis, bem como das propriedades físico-químicas dos analitos, podem ocorrer mecanismos adicionais de interação, incluindo ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações iônicas [20].

A HILIC é amplamente utilizada na análise de pequenos compostos polares e/ou ionizáveis, peptídeos e glicanos. No entanto, sua aplicação na análise de proteínas intactas ainda não é

comum, exceto para a caracterização de proteínas de membrana lipofílicas, que podem se ligar irreversivelmente à fase estacionária em condições de cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC).

A linha BioLC da GL Sciences apresenta a coluna Proteosil HILIC, que incorpora uma fase estacionária contendo grupos funcionais amida, disponível em tamanhos de partícula de 1,9 e 3,5 μm , com poros de 100 Å. Essa coluna foi utilizada para a análise de peptídeos como leucina-enkefalina, metionina-enkefalina, angiotensina 2, Val-Tyr-Val e Gly-Val (Figura 8). Esses peptídeos são compostos por aminoácidos e/ou derivados peptídicos que possuem grupos funcionais polares, como amina e carboxila. Essa polaridade os torna adequados para a retenção e interação seletiva com a fase estacionária amida em uma coluna HILIC [14].

Métodos de separação de biofármacos



Condições

Coluna: ProteoSil HILIC
(1.9 μm , 150 \times 2.1 mm I.D.)
Fase Móvel: A) CH₃CN
B) 10 mM HCOONH₄ + 0.1% HCOOH in H₂O

Tempo (min)	A (vol%)	B (vol%)
0	80	20
15	50	50

Fluxo: 0.2 mL/min
Temp Col: 40 °C
Detector: UV 254 nm
Vol Inj: 1 μL
Amostra: Padrão de Referência

Analito

1. Leucina-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)	500 mg/L
2. Metionina-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met)	500 mg/L
3. Angiotensina II (Humana) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)	500 mg/L
4. Val-Tyr-Val	500 mg/L
5. Gly-Tyr	500 mg/L

Figura 8: Cromatograma de separação de peptídeos utilizando a coluna Proteosil HILIC: 1) Leucina-encefalina, 2) Metionina-encefalina, 3) angiotensina 2, 4) Val-Tyr-Val, 5) Gly-Val. Adaptado da Ref. [14]

Cromatografia por troca iônica (IEC)

A cromatografia de troca iônica (IEC) é uma técnica cromatográfica usada para separar e analisar íons e moléculas carregadas, com base em suas interações com uma fase estacionária carregada eletricamente. Esta técnica é dividida em dois tipos principais: troca iônica aniônica e catiônica. Na troca iônica aniônica, uma fase estacionária com grupos funcionais carregados positivamente (cátions) é usada para separar

íons e moléculas carregadas negativamente (ânions). Por outro lado, na troca iônica catiônica, uma fase estacionária com grupos funcionais carregados negativamente (ânions) é empregada para separar íons e moléculas carregadas positivamente (cátions) [21].

Métodos de separação de biofármacos

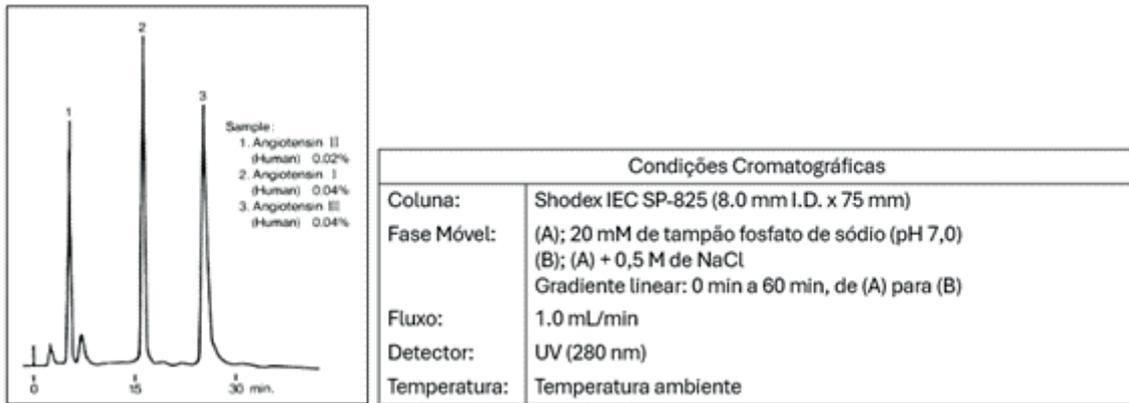


Figura 9: Separação das Angiotensinas I, II e III por cromatografia de troca catiônica usando uma coluna IEC SP-825

A IEC é amplamente utilizada para a caracterização de variantes de carga de proteínas terapêuticas devido à natureza carregada dos aminoácidos que as compõem. Cada aminoácido possui um grupo amino (-NH₂), que pode aceitar um próton (H⁺), tornando-se um grupo amônio (-NH₃⁺), positivamente carregado, e um grupo carboxila (-COOH), que pode perder um próton (H⁺), tornando-se um grupo carboxilato (-COO⁻), negativamente carregado. No entanto, as proteínas podem ter também carga líquida zero, determinada pelo seu ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico (pI) é o pH onde a proteína possui carga líquida zero.

Dependendo do pH do meio, a proteína assumirá diferentes cargas líquidas. Em um pH acima do pI, as proteínas assumem carga líquida negativa e se ligam as fases estacionárias carregadas positivamente (trocares aniônicos). Em um pH abaixo do pI, as proteínas assumem carga superficial líquida positiva e se ligam as fases estacionárias carregadas negativamente (trocares catiônicos) [21].

As colunas de IEC separam as variantes de carga das proteínas com base em suas diferentes interações com a fase estacionária carregada.

À medida que o peso molecular da amostra aumenta, o número de variantes de carga possíveis também cresce. Modificações nas proteínas podem resultar em mudanças de carga aditivas ou subtrativas, tornando os perfis de IEC mais complexos e dificultando a resolução das variantes individuais. Por isso, tanto as formas intactas quanto as formas reduzidas ou digeridas (como na proteólise limitada ou no mapeamento de peptídeos) de proteínas terapêuticas são frequentemente caracterizadas por IEC [21,22].

A Shodex oferece colunas IEC com ligantes tanto aniônicos (troca de cátions) quanto catiônicos (troca de ânions), especialmente desenvolvidas para essa aplicação, utilizando matrizes à base de polihidroximetacrilato com poros de 5000 Å. A coluna de troca catiônica IEC SP-825, funcionalizada com grupos sulfopropil fortes, foi empregada na separação de três angiotensinas (Figura 9). Angiotensinas são peptídeos bioativos que elevam a pressão sanguínea: Angiotensina I é um decapeptídeo, Angiotensina II um octapeptídeo e Angiotensina III um hexapeptídeo. Estes três componentes foram separados eficientemente por meio de eluição gradiente com aumento na concentração de sal.

Métodos de separação de biofármacos

Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (SEC) separa macromoléculas com base em seus tamanhos. Esta separação ocorre devido à exclusão diferencial ou inclusão das moléculas nos poros do material de empacotamento da coluna. Durante a separação em SEC, moléculas grandes são rapidamente eluídas pela coluna, pois não penetram nos poros, enquanto moléculas menores levam mais tempo para eluir, pois penetram parcialmente nos poros da fase estacionária. Dessa forma, para aplicar SEC de maneira eficaz, é essencial conhecer o tamanho e o peso molecular do biofármaco para determinar a coluna e o tamanho de poro adequados, permitindo sua entrada nos poros de forma eficiente. [23,24].

Infelizmente, o tamanho de um biofármaco, como uma proteína, normalmente não é um parâmetro comum que é conhecido. No entanto, é comum que se empregue a técnica de dispersão de luz multiangular (MALS), no qual mede a luz espalhada em vários ângulos conforme interage com partículas em solução. Isso permite a determinação do tamanho e do peso molecular de moléculas grandes através da análise dos padrões de luz espalhada. A técnica de MALS pode ser integrada à SEC para oferecer informações detalhadas sobre características moleculares, como tamanho e peso molecular. Esses dados são essenciais para otimizar a escolha do tamanho dos poros das colunas de SEC [24].

A SEC é amplamente reconhecida por sua eficácia na caracterização econômica e oportuna de diversos biofármacos comerciais.

Entre suas vantagens destacam-se o excelente desempenho quantitativo, a facilidade de implementação e a aceitação positiva pelas autoridades regulatórias. Ela opera com condições cromatográficas suaves, permitindo a análise de moléculas biológicas com mínimo impacto em sua conformação (condições nativas). Portanto, a SEC é amplamente reconhecida como um modo cromatográfico não desnaturante [25].

Existem dois tipos básicos de cromatografia de exclusão por tamanho: a cromatografia de permeação em gel (GPC) e a cromatografia por filtração em gel (GFC). A GPC é utilizada quando são empregados solventes orgânicos, enquanto a GFC é aplicada quando a cromatografia de exclusão por tamanho é realizada com solventes aquosos. Na análise de biofármacos, a cromatografia por exclusão de tamanho geralmente empregada é a GFC. Isso ocorre porque os biofármacos, como proteínas e outras biomoléculas, são frequentemente analisados em condições aquosas, que são adequadas para a GFC.

Nas fases estacionárias usadas na SEC, o progresso na separação de proteínas tem se concentrado principalmente no aumento do volume total dos poros, sem permitir interações físico-químicas com o analito. Este aumento é crucial porque a separação na SEC depende exclusivamente da capacidade dos analitos de passarem fisicamente através dos poros das partículas. Essas melhorias resultaram em diversas variações de fases estacionárias, como partículas de sílica porosa, partículas híbridas orgânicas/inorgânicas porosas e colunas monolíticas cromatográficas.

Métodos de separação de biofármacos

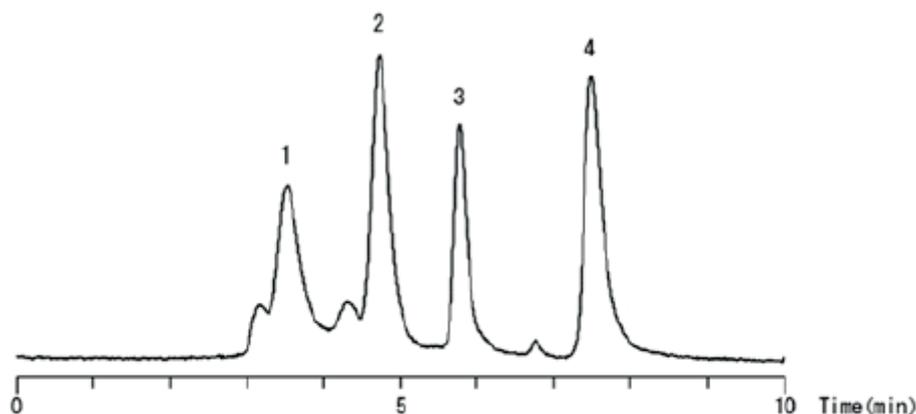
Além disso, para minimizar interações físico-químicas, técnicas como derivatização com silanos hidrofílicos, funcionalização com diol e ligação com óxido de polietileno metilado ou hidroxilado são frequentemente empregadas [26].

As colunas da série BioLC, como a Proteosil 100-SEC com poros de 100 Å para moléculas com massa molecular inferior a 5 kDa e a Proteosil 300-SEC com poros de 300 Å para moléculas com massa molecular de 5 kDa a 600 kDa, são uma família de colunas de SEC de alto desempenho. Elas são constituídas de partículas de sílica funcionalizadas com grupos diol e são

especialmente projetadas para separar anticorpos monoclonais, proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos e ácidos nucleicos, entre outros.

A coluna Proteosil 300-SEC foi utilizada na análise de quatro proteínas: Tireoglobulina, BSA, Insulina Cadeia A e Ocitocina (Figura 10). A composição da fase móvel foi cuidadosamente selecionada para refletir as condições fisiológicas, com pH ajustado entre 6,2 e 7,5, comum para proteínas biológicas. O tampão fosfato foi empregado como agente tamponante dentro dessa faixa de pH durante a análise. Os resultados mostraram que a coluna é capaz de separar eficientemente os analitos.

Análise de Proteínas (ProteoSil 300-SEC)



Condições

Coluna: ProteoSil 300-SEC (5 μ m, 250 x 4.6 mm I.D.)
 Fase Móvel: 0.1 M Na₂HPO₄ (pH 6.9, NaH₂PO₄)
 Fluxo: 0.5 mL/min
 Temp Col: 30 °C
 Detector: UV 220 nm
 Vol Inj: 20 μ L

Analito

1. Tireoglobulina (0.25 mg/mL)
 2. BSA (0.25 mg/mL)
 3. Insulina Cadeia A (0.25 mg/mL)
 4. Ocitocina (0.21 mg/mL)

Figura 10: Cromatograma da separação das proteínas 1) Tireoglobulina, 2) BSA, 3) Insulina Cadeia A e 4) Ocitocina por cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna ProteoSil 300-SEC.

Conclusão

O campo da bioanálise tem visto avanços notáveis impulsionados pelo rápido crescimento do desenvolvimento de biofármacos. Biofármacos, que incluem proteínas, peptídeos e glicoproteínas derivadas de organismos vivos, oferecem benefícios terapêuticos direcionados com reduzida toxicidade em comparação com medicamentos químicos tradicionais. No entanto, essas moléculas apresentam desafios analíticos devido à sua complexidade e tamanho, exigindo métodos sofisticados para sua caracterização e avaliação de qualidade.

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) é uma das técnicas bioanalíticas de ótimo desempenho na separação e quantificação de biofármacos. Entre as diversas técnicas de HPLC discutidas, a Cromatografia Líquida de Fase Reversa (RP-LC) se destaca por sua robustez e eficiência na separação de biofármacos com base em suas propriedades hidrofóbicas. O uso de RP-LC com tecnologias avançadas de coluna, como partículas totalmente porosas (FPP) e partículas superficialmente porosas (SPP), melhorou significativamente a resolução e velocidade das análises, sendo crucial para o desenvolvimento farmacêutico e controle de qualidade.

Além disso, a Cromatografia de Interação Hidrofílica (HILIC) tem se mostrado interessante na separação de compostos polares e hidrofílicos, como glicoproteínas, oferecendo insights complementares sobre as propriedades estruturais e funcionais dessas biomoléculas.

À medida que a demanda por biofármacos continua a crescer, aumentará também a necessidade de estratégias analíticas inovadoras. Desenvolvimentos futuros em HPLC, incluindo químicas de colunas aprimoradas e acoplamento com espectrometria de massa, prometem revolucionar ainda mais as capacidades bioanalíticas, garantindo a segurança, eficácia e conformidade regulatória dos biofármacos de próxima geração.

Referências

- [1] KESIK-BRODACKA, M. (2018) Progress in Biopharmaceutical Development, *Biotechnol Appl Biochem*, 65(3), p. 306-322.
- [2] LI, X. (2023). Recent applications of quantitative mass spectrometry in biopharmaceutical process development and manufacturing, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 234, 115581.
- [3] MORALES, A.; CANDREVA, J.; JAYARATHNE, T.; ESTERMAN, A.L.; VORUGANTI, S.; FLAGG, S.C.; SLANEY, T.; LIU, P.; ADAMO, M.; PATEL, S.; DAS, T.K.; ZENG, M.; LIA, X. (2023). A comprehensive strategy for the identification of biologics by liquid-chromatography–mass spectrometry for release testing in a regulated environment, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 234, 115580.
- [4] TARTAGLIA, A.; LOCATELLI, M.; SAMANIDOU, V. (2020). Trends in the Analysis of Biopharmaceuticals by HPLC, *Current Analytical Chemistry*, 16, p. 52-58.
- [5] HALO, Bioanalysis Solutions Guidebook – Disponível em <https://halocolumns.com/product-literature/halo-bioclass-guidebook/>
- [6] MARAKOVA, K.; TOMASOVSKY, R.; OPETOVA, M.; SHUG, K.A. (2024). Greenness of proteomic sample preparation and analysis techniques for biopharmaceuticals, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 171, 117490.
- [7] EBRAHIMI, S.B.; SAMANTA, D. (2023). Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design, *Nature Communications*, 14(2411).
- [8] AGYEI, D.; TAN, K.X.; PAN, S.; UDENIGWE, C.C.; DANQUAH, M.K. (2018). 9 - Peptides for biopharmaceutical applications, Editor(s): Sotirios Koutsopoulos, *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, Woodhead Publishing, p. 231-251.
- [9] VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO, J.D.; et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579918/> doi: 10.1101/9781621824213.
- [10] PARR, M.K.; MONTACIR, O.; MONTACIR, H. (2016). Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, p. 366-389.
- [11] BOYES, B.E.; ALPERT, A.J. Chapter 11: Biochemical Samples: Proteins, Nucleic Acids, Carbohydrates, and Related Compounds, in: *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
- [12] FREEMAN, R.; DIFEIO, D.; WIRTH, H.J.; GOOLEY, A. (2011). Effects of Particle Porosity on the Separation of Larger Molecules. *Journal of Biomolecular Techniques*, 22, 171.

Referências

- [13] FEKETE, S.; VEUTHEY, J.-L. (2015). Modern Column Technologies for the Analytical Characterization of Biopharmaceuticals in Various Liquid Chromatographic Modes. *LCGC*, 33(10), p. 8-15.
- [14] Bioseparation Solution Bio LC Column. Disponível em https://www.glsciences.com/product/lc_columns/bio_column/02862.html
- [15] PRETI, R. (2016). Core-Shell Columns in High-Performance Liquid Chromatography: Food Analysis Applications. *International Journal of Analytical Chemistry*, p. 1-9.
- [16] JAAG, S.; WEN, C.; PETERS, B.; LÄMMERHOFER, M. (2022). Kinetic performance comparison of superficially porous, fully porous and monolithic reversed-phase columns by gradient kinetic plots for the separation of protein biopharmaceuticals, *Journal of Chromatography A*, 1676, 463251.
- [17] HALO Technical Resources. Disponível em: https://halocolumns.com/wp-content/uploads/2021/03/AMT_21_AC_WEBPREP_76.pdf
- [18] D'ATRI, V.; MURISIER, A.; FEKETE, S.; VEUTHEY, J.-L.; GUILLARME, D. (2020). Current and future trends in reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of therapeutic proteins, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 130, 115962.
- [19] Shodex Applications. Disponível em <https://www.shodex.com/en/dc/01/03/05.html>
- [20] PERIAT, A.; FEKETE, S.; CUSUMANO, A.; VEUTHEY, J.L.; BECK, A.; LAUBER, M.; GUILLARME, D. (2016). Potential of hydrophilic interaction chromatography for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals, *Journal of Chromatography A*, 1448, p. 81-92.
- [21] FEKETE, S.; BECK, A.; VEUTHEY, J.L.; GUILLARME, D. (2015). Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, p. 43-55.
- [22] FEKETE, S.; GASSNER, A.L.; RUDAZ, S.; SCHAPPLER, J.; GUILLARME, D. (2013). Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies, *Trends in Analytical Chemistry*, 42, p. 74-83.
- [23] SCHRAG, D.; CORBIER, M.; RAIMONDI, S. (2014). Size Exclusion-High-Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC). *Monoclonal Antibodies*, p. 507-512.
- [24] D'ATRI, V.; IMIOŁEK, M.; QUINN, C.; FINNY, A.; LAUBER, M.; FEKETE, S.; GUILLARME, D. (2024). Size exclusion chromatography of biopharmaceutical products: From current practices for proteins to emerging trends for viral vectors, nucleic acids and lipid nanoparticles, *Journal of Chromatography A*, 1722, 464862.

Referências

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

[26] ROSADO, M.; SILVA, R.; BEXIGA, M.G.; JONES, J.G.; MANADAS, B.; ANJO, S.I. (2019). Advances in biomarker detection: Alternative approaches for blood-based biomarker detection, *Advances in Clinical Chemistry*, 92, p. 141-199.

contato@acoreconsumiveis.com.br
www.acoreconsumiveis.com.br
acoreconsumiveis

