

# Avaliação da qualidade de Albumina 20% e Imunoglobulina G 5% produzidas pelo método de cromatografia líquida, no período de 5 anos

## Quality evaluation of Albumin 20% and Immunoglobulin G 5% by means of liquid chromatography method: data from five years period-study

RIALA6/984

Kimiyuki TANAKA<sup>1\*</sup>, Eiko SAWATAN<sup>2</sup>, Emília M. SHIGUEOKA<sup>2</sup>, Georgia A. DIAS<sup>1</sup>, Fernando ARASHIRO<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155 - 1º Andar - CEP 05304 - 000 São Paulo - Brasil  
Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo - Secretaria de Saúde - Governo do Estado de São Paulo

<sup>1</sup> Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento Industrial

<sup>2</sup> Divisão de Controle de Qualidade de Hemoderivados

Recebido: 30/06/2003 - aceito para publicação 06/05/2004

### RESUMO

A qualidade das soluções de albumina 20% e de imunoglobulina G 5%, produzidas na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, foi avaliada pelo método de cromatografia líquida, durante o período de 5 anos. Durante esse período, os medicamentos foram estocados a temperatura de 4° C a 8° C. O método de análise utilizado foi o recomendado pela Portaria n° 2,419 de 17/12/1996 do Ministério da Saúde, Resolução n° 46 de 18/05/2000, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde e Farmacopéia Européia (1997, 2ª edição). As avaliações de qualidade realizadas durante os últimos 5 anos não apresentaram quaisquer alterações nos valores obtidos quando da liberação dos produtos, com exceção da análise de distribuição molecular, na qual se constatou um leve aumento em porcentagem de dímeros nas soluções de albumina 20% e de IgG 5%. Na solução de IgG 5%, após 5 anos de estocagem, foi observada a presença de moléculas poliméricas. Apesar dessas alterações nos referidos produtos, os valores obtidos estão dentro das especificações estabelecidas pelo país.

**Palavras-Chave.** avaliação da qualidade de albumina, avaliação da qualidade de IgG, proteínas de plasma, controle de qualidade de hemoderivados.

### ABSTRACT

The quality of albumin 20% and immunoglobulin G 5%, produced by Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo was assessed by means of liquid chromatography method, for five years period. Immunoglobulin G 5% and albumin 20% were re-evaluated two and three years, respectively after being produced. Five years after manufacturing date, both products were assessed once again. During five years period-study, the products were stored at temperature ranging from 4° C to 8° C. The quality analysis was performed employing the method recommended by Regulation N. 2,419 of 17/12/1996 of the Brazilian Health Ministry, and by Resolution RDC N. 46, 18/05/2000 of the National Agency for Sanitary Surveillance - Brazilian Health Ministry, and European Pharmacopoeia 1997, 2<sup>nd</sup> edition. In quality assessments carried out for the last five years, no change was observed in the obtained values when compared to those presented at the time of the products release, with the exception in molecular analysis distribution, which presented a slight increase in dimmers percentage in albumin 20% and in immunoglobulin G 5% solutions. Also, the presence of polymers was detected in immunoglobulin 5% solution after five years storage. In spite of occurring these changes in the analyzed products, the observed values were within the specific requirement recommendation established by the country.

**Key Words.** plasma protein, quality control of albumin, quality control of IgG, quality evaluation of hemoderivatives

## INTRODUÇÃO

A albumina é a proteína que se encontra em maior quantidade dentro do plasma humano, constituindo cerca de 4,5 g % em uma população normal, com massa molar entre 67.000 a 69.000 daltons. A albumina exerce duas funções importantes: uma de manutenção da pressão oncótica e a outra, na capacidade de fixar e transportar grande quantidade de ligantes livrando assim o organismo de produtos tóxicos<sup>1</sup>. No Brasil, o consumo de albumina humana na concentração de 20% está em torno de 1.500.000 frascos de 50 ml por ano, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS, 2001).

A imunoglobulina G (IgG) é encontrada em torno de 1,2 g % dentro do plasma humano. A sua massa molar está na faixa de 160.000 daltons e exerce função de defesa contra agentes estranhos ao organismo, atuando com um amplo espectro de anticorpos específicos antibacterianos e virais<sup>2</sup>. A demanda brasileira de IgG 5% intravenosa é de aproximadamente, 280.000 frascos de 50 ml por ano, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS, 2001).

Os medicamentos derivados de plasma humano, albumina 20%<sup>3,4,5</sup> e imunoglobulina G (IgG) 5% líquida intravenosa<sup>6,7</sup> foram produzidas em escala industrial em planta-piloto, com capacidade de processar 100 litros de plasma em cada lote, na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, pelo método de cromatografia líquida. Para garantir a segurança biológica, a solução de albumina a 20% foi submetida à inativação viral, utilizando-se o método de pasteurização a 60° C por 10 horas<sup>8,9</sup>. A solução de IgG a 5% foi submetida à dupla inativação viral, sendo uma delas com o solvente / detergente (1% de Tri n-butyl fosfato e 1% de Triton X-100) e a outra a pH 4,0 com pepsina<sup>10,11</sup>. Todas as unidades de plasma usadas para fracionamento foram submetidas a testes sorológicos para Doença de Chagas, Sífilis, anti-HIV 1 e 2, anti-HTLV I e II, anti-HCV, anti-HBc e HBs-Ag no Departamento de Sorologia da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP). Foram utilizadas somente unidades com resultados negativos.

Os produtos foram avaliados por 5 anos e durante esse período ficaram estocados na temperatura de 4° C a 8° C. Todas as análises foram executadas com rigor quanto a estabilidade, pureza e contaminação viral, por serem produtos biológicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos de avaliações foram realizados segundo a Portaria nº 2.419 de 17/12/1996 do Ministério da Saúde<sup>12</sup>, Resolução RDC nº 46 de 18/05/2000, ANVISA – Ministério da Saúde<sup>13</sup> e Farmacopéia Européia (1997), 2ª Edição<sup>14</sup>. As análises foram realizadas em 3 etapas: a primeira, para aprovação dos produtos. A segunda, nos períodos de vencimento de 3 anos para albumina 20% e 2 anos para IgG 5% líquida. A terceira e

última etapa após 5 anos, para ambos os produtos. Os valores de controle de qualidade obtidos para aprovação dos produtos foram considerados como padrão de referência para comparação. Os métodos utilizados para avaliações da qualidade dos produtos foram:

### Avaliação da qualidade de solução de albumina 20%

Primeira etapa de análise para aprovação de solução de albumina 20%:- A pureza da albumina foi determinada por eletroforese de acetato de celulose e também por imunoeletroforese, utilizando-se soro anti-humano total contra a amostra (Figura 3). A concentração protéica foi determinada pelo método de biureto. O rendimento do produto foi calculado em relação à concentração de albumina no plasma a ser fracionado e à concentração de albumina no produto acabado. Foi determinada a presença do Ativador de Procalciferina (PKA) através do método de reação “end point”<sup>15</sup>, utilizando substrato cromogênico S-2302 (Chromogenix – Itália. O nível de alumínio presente no produto foi determinado pelo espectrofotômetro de absorção atômica pela Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – Belo Horizonte. O teste de esterilidade foi realizado em membrana de steritest (Sterility Testing System – Millipore, USA). O pirogênio “in vivo” e a toxicidade foram testados no Laboratório Medlab Produtos Diagnósticos Ltda, São Paulo. O heme foi medido em espectrofotômetro em absorvância de 403 nm (Tabela 1 e Figuras 1 e 2).

A distribuição molecular da albumina foi avaliada pela cromatografia líquida utilizando gel de filtração Superdex 200 HR em coluna HiLoad™ 16/60 (Amersham Biosciences) (Tabela 1 e Figura 4).

Segunda etapa de análises nos períodos de vencimento:- Os valores obtidos foram idênticos aos iniciais, ou seja, aos produtos recém produzidos, com exceção da análise de distribuição molecular, na qual, no decorrer do tempo, até a data do vencimento, apresentou uma queda no valor de monômeros e ligeiro aumento de dímeros (Figura 5).

- Terceira etapa de análise após 5 anos de estocagem:- Nova análise foi realizada após 5 anos de estocagem e todos os valores encontravam-se normais, conforme o padrão. Quanto à distribuição molecular, novamente verificou-se alteração significativa. (Figura 6).

### Testes Sorológicos

As amostras de cada lote de “pool” de plasma de 100 litros e de produtos acabados foram submetidos a testes sorológicos para anti-HIV 1 e 2, anti-HTLV I e II, anti-HCV e HBs-Ag por ELISA com duas procedências diferentes de conjuntos diagnósticos conforme a exigência da norma brasileira. Além desses, para HCV e HIV, foram realizados testes através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os kits usados foram das marcas Biomérieux bv (The Netherlands), Murex - Abbott (Republic of South Africa), Ortho-Clinical Diagnostics (USA), Amplicor<sup>®</sup> HCV, Roche (New Jersey, USA) e HIV (RNA) pela técnica de Nuclisens. Esses testes foram realizados no

Departamento de Sorologia e Departamento de Biologia Molecular da FPS/HSP.

### Avaliação da qualidade de imunoglobulina G (IgG)

Primeira etapa de análise para aprovação de solução de IgG 5%:- A pureza de IgG líquida intravenosa, foi determinada por eletroforese de acetato de celulose e também por imunoeletroforese, utilizando-se soro anti-humano total contra a amostra (Figura 9). A concentração protéica foi determinada pelo método de biureto. O rendimento do produto foi calculado em relação à concentração de IgG no plasma a ser fracionado e à concentração de IgG no produto acabado. A distribuição molecular de IgG foi avaliada pela cromatografia líquida utilizando gel de filtração Superdex 200 HR em coluna HiLoad™ 16/60 (Amersham Biosciences). (Figura 10). As subclasses de IgG foram analisadas pelo método de imunodifusão radial (The Binding Site Inc., San Diego, CA, USA). Foi determinada a presença do Ativador de Procalcireína (PKA) na IgG 5%, através do método de reação “end point”<sup>15</sup>, utilizando substrato cromogênico S-2302 (Chromogenix – Itália). A atividade anticomplementar (CH<sub>50</sub>) foi determinada pelo método Mayer, utilizando complemento de coabio e hemácias de carneiro. O teste de esterilidade foi realizado em membrana de steritest (Sterility Testing System – Millipore, USA). O pirogênio “in vivo” e a toxicidade foram testados no Laboratório Medlab Produtos Diagnósticos Ltda, São Paulo. O nível de alumínio

presente no produto foi determinado pelo espectrofotômetro de absorção atômica na Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, Belo Horizonte. As atividades de anti-pólio I-II e III, anti-sarampo e anti-herpes foram determinadas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo; anti-rubéola, anti-citomegalovírus e anti-streptolisina O foram determinadas no Laboratório de Imunologia Clínica de IAMSPE, São Paulo (Tabela 2, 3 e Figuras 7 e 8).

Segunda etapa de análises nos períodos de vencimento:- Os valores obtidos foram idênticos aos iniciais, com exceção da análise de distribuição molecular, na qual, no decorrer do tempo, até a data do vencimento, apresentou uma queda no valor de monômeros e ligeiro aumento de dímeros (Figura 11).

Terceira etapa de análise após 5 anos de estocagem:- Nova análise foi realizada após 5 anos de estocagem e todos os valores encontravam-se normais, conforme o padrão. Quanto à distribuição molecular novamente foram observadas alterações significativas (Figura 12).

## RESULTADOS

Os valores obtidos nas análises realizadas em 20 lotes de soluções de albumina 20% e de IgG 5% líquida intravenosa, produzidas por método de cromatografia líquida, foram os seguintes:

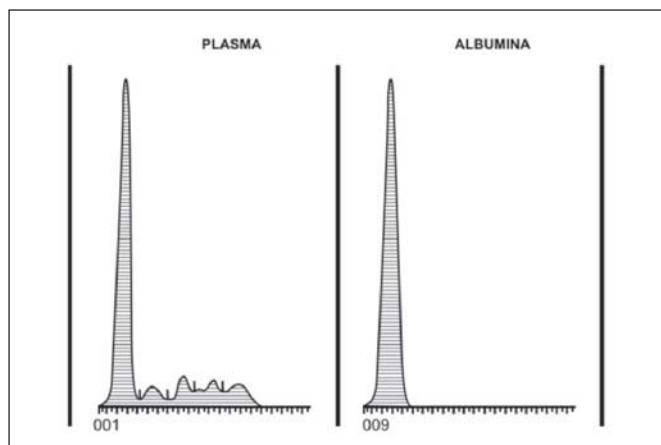
**Tabela 1.** Características da solução de Albumina 20%.

Análise	Resultado	Especificação*
Rendimento (g/l plasma)	26,0+0,5	-
Concentração protéica (p/v)	20,0+1,0%	>95% - <105%
Pureza (electroforese de acetato de celulose)	>99,0%	>95%
Distribuição molecular		
Monômeros	99,0+0,3%	mono+dímeros=95%
Dímeros	1,0+0,3%	
Polímeros	não detectado	polímeros=5%
Pirogenios	Satisfatório	Satisfatório
Toxicidade	Satisfatório	Satisfatório
Caprilato de sódio	0,16mmol/g prot	-
Determinação de PKA	<5 IU/ml	<35 UI/ml
Alumínio	<50 µg/l	<200 µg/l
pH	6,8 to 7,0	6,7 to 7,3
Sódio	140+5 mmol/l	<160 mmol/l
Potássio	<0,05mmol/g prot	<0,05mmol/g prot
Heme (absorbância a 403 nm)	<0,04	<0,15
Anti-HIV 1 e 2	Negativo	Negativo
Anti-HCV	Negativo	Negativo
HBs-Ag	Negativo	Negativo
Anti-HTLV-I e II	Negativo	Negativo

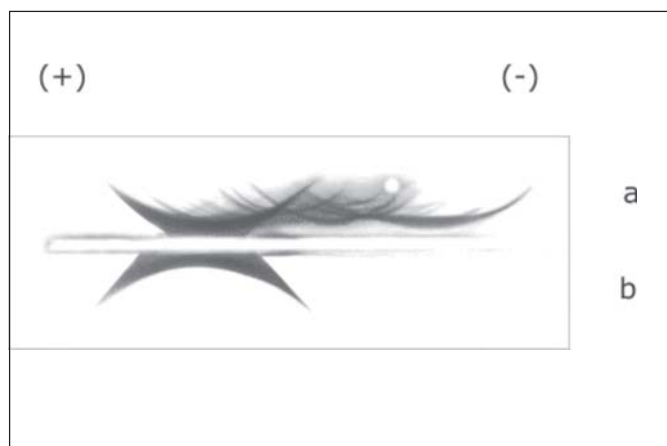
N=20 \* Portaria nº 2.419 - MS<sup>12</sup>, Resolução-RDC nº 46 - ANVISA/ MS<sup>13</sup> e European Pharmacopeia<sup>14</sup>.



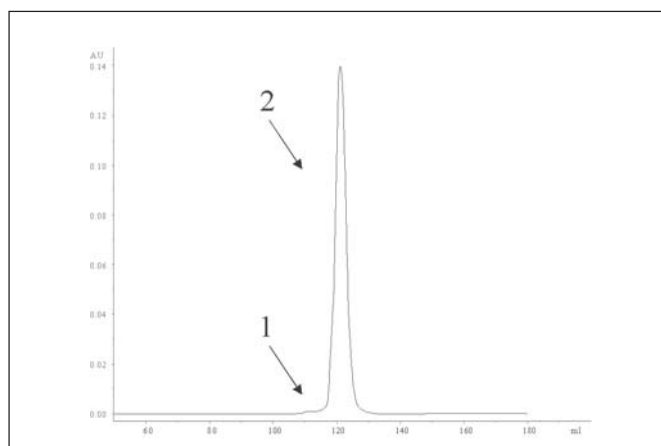
**Figura 1.** Eletroforese em acetato de celulose - a) "Pool" de plasma. b) Albumina



**Figura 2.** Perfil densitométrico de eletroforese em acetato de celulose

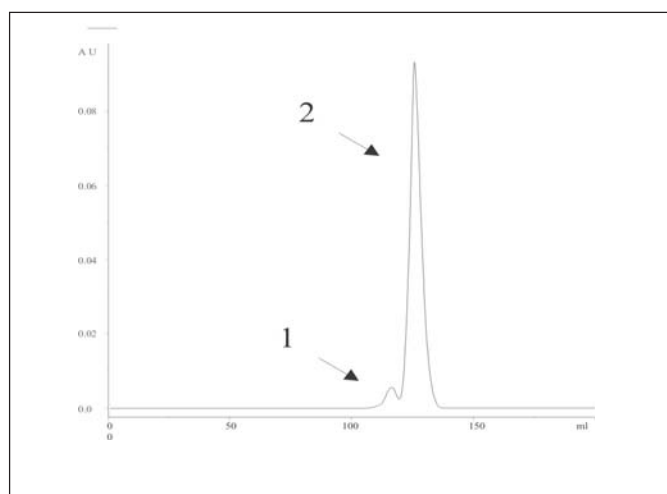


**Figura 3.** Imunoeletroforese - a) "Pool" de plasma. b) Albumina



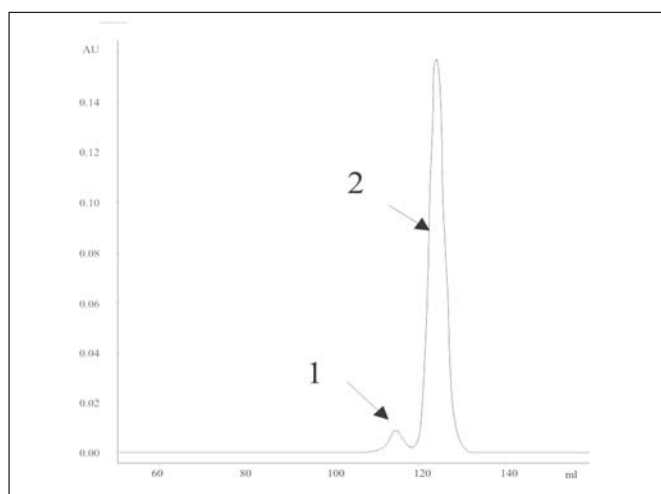
**Figura 4.** Determinação de polímeros da albumina em gel Sephadex 200, para aprovação e liberação do produto.

1 - Dímeros = 0,7 %  
2 - Monômeros = 99,3%



**Figura 5.** Determinação de polímeros da albumina em gel Sephadex 200, com 3 anos de estocagem após a data de vencimento.

1 - Dímeros = 1,8 %  
2 - Monômeros = 98,2 %



**Figura 6.** Determinação de polímeros da albumina em gel Sephadex 200, após 5 anos de estocagem.

1 - Dímeros = 3,0 %  
2 - Monômeros = 97,0 %

**Tabela 2.** Características da Ig G 5% líquida intravenosa com dupla inativação viral.

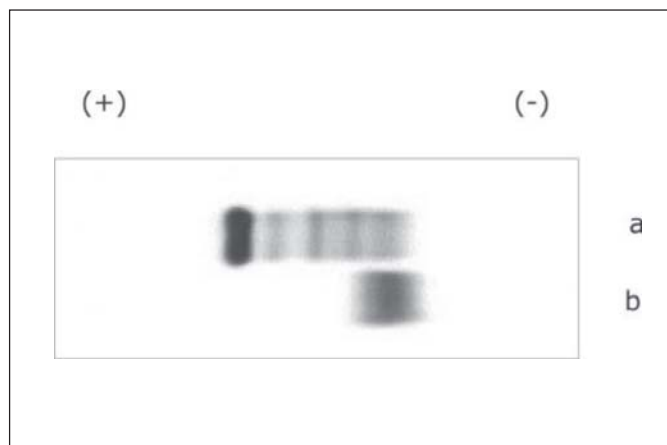
Análise	Resultado	Especificação*
Concentração protéica	5,0 + 0,2%	>4,6 to <5,5%
Determinação de pH	4,5 – 5,0	4,0 – 7,4
Pureza (eletroforese)	> 98%	>95%
IgA	N.D.	-
IgM	N.D.	-
Anti-A hemaglutinina	< 1:8	< 1:64
Anti-B hemaglutinina	< 1:8	< 1:64
Atividade anticomplementar	< 0,55CH <sub>50</sub> /mg IgG	< 1 CH <sub>50</sub> /mg IgG
Determinação de PKA	< 5,0 IU/ml	< 35 IU/ml
Alumínio	< 50 ¼g/l	< 200 ¼g/l
Distribuição molecular		
Monómeros	98,8 + 0,5%	mono+dímeros=90%
Dímeros	1,2 + 0,5%	
Polímeros	N.D.	polímeros < 3%
Subclasses de IgG		
IgG <sub>1</sub>	58,4%	distribuição de subclasses similar ao plasma.
IgG <sub>2</sub>	32,8%	
IgG <sub>3</sub>	4,5%	
IgG <sub>4</sub>	2,3%	
Rendimento	3,8 + 0,2g/l plasma	-
Estabilidade (aquecimento 57°C/4h)	satisfatório	não deve gelificar
Pirogênio “in vivo”	satisfatório	satisfatório
Toxicidade	satisfatório	satisfatório
HBs-Ag	Negativo	Negativo
Anti-HCV	Negativo	Negativo
Anti-HIV 1 e 2	Negativo	Negativo
Anti-HTLV-I e II	Negativo	Negativo

N=20 ND=Não Detectado \* Portaria nº 2.419 - MS<sup>12</sup>, Resolução RDC nº 46 - ANVISA / MS<sup>13</sup> e European Pharmacopoeia<sup>14</sup>

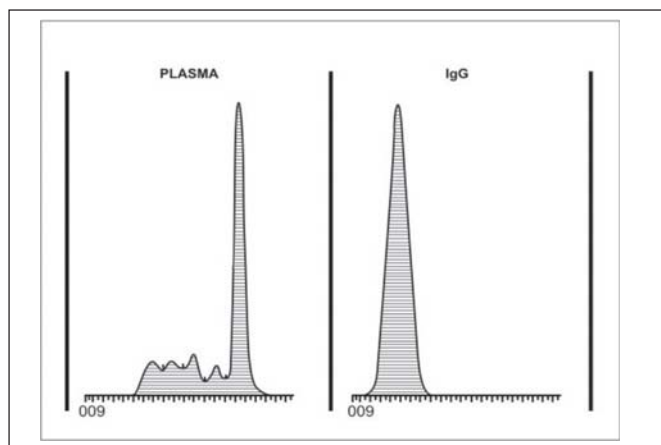
**Tabela 3.** Espectros de anticorpos em IgG 5% líquido intravenosa.

Anticorpos	Método	Título e/ou unidade
Anti-herpes	Imunofluorescência	1:128
Anti-pólio I	Teste de neutralização	1:256
Anti-pólio II	Teste de neutralização	1:128
Anti-pólio III	Teste de neutralização	1:64
Anti-sarampo	Inibição de hemaglutinação	1:64
Anti-rubeola	ELISA	765 UI/ml
Anti-citomegalovirus	ELISA	887 UI/ml
Anti-streptolisina O	Nefelometria	721 UI/ml

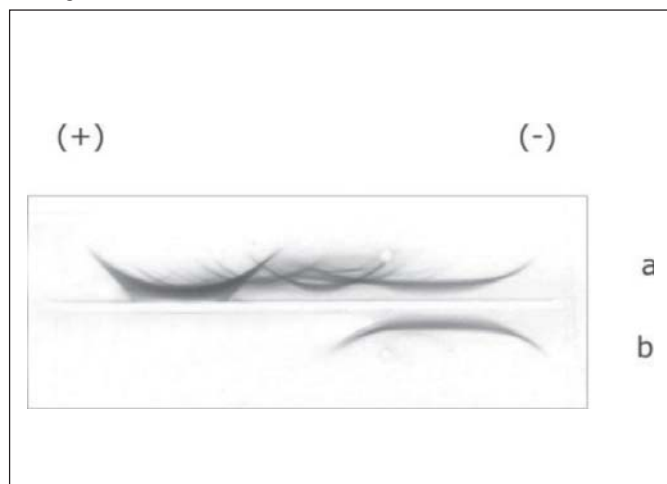
N=10



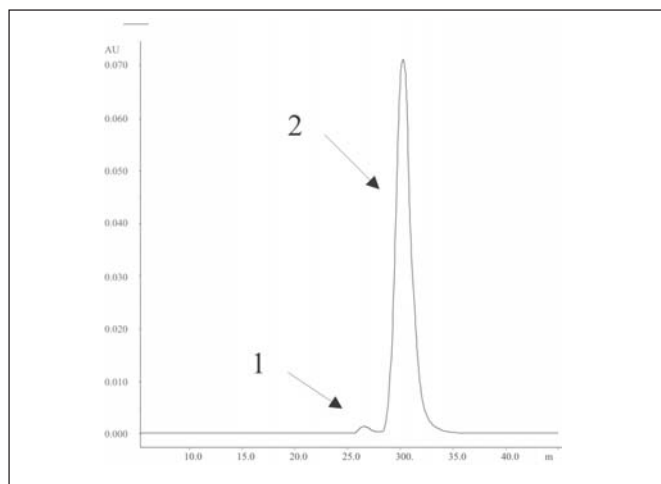
**Figura 7.** Eletroforese em acetato de celulose - a) "Pool" de plasma. b) Imunoglobulina G



**Figura 8.** Perfil densitométrico de eletroforese em acetato de celulose

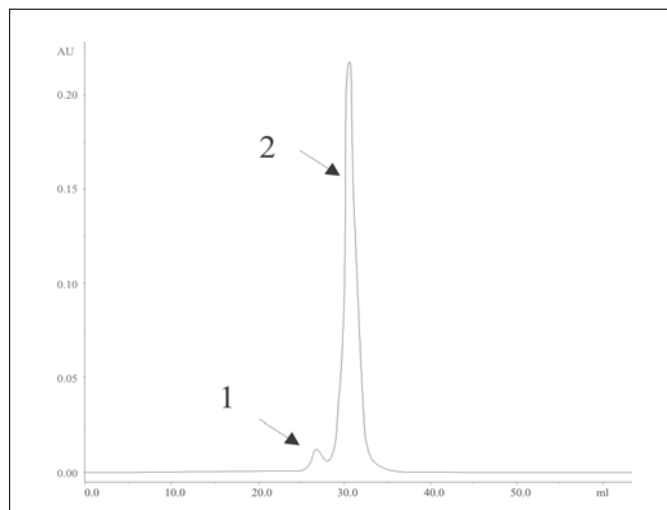


**Figura 9.** Imunoeletroforese - a) "Pool" de plasma. b) Imunoglobulina G



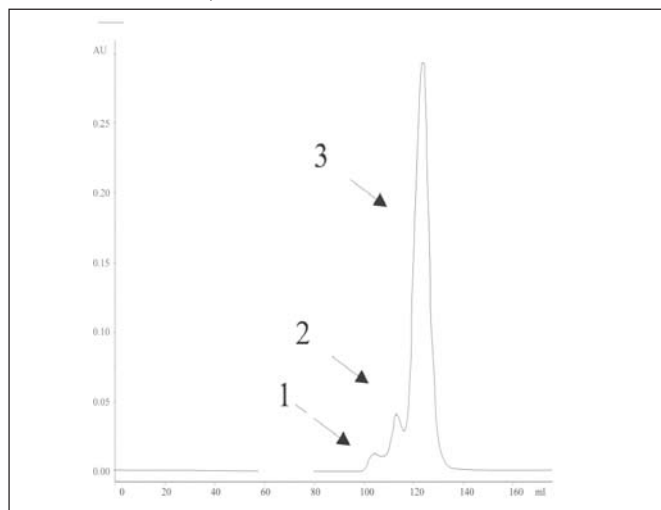
**Figura 10.** Determinação de polímeros de IgG em gel Sephadex 200, para aprovação e liberação do produto.

1 - Dímeros = 1,2 %  
2 - Monômeros = 98,8 %



**Figura 11.** Determinação de polímeros de IgG em gel Sephadex 200, com 2 anos de estocagem, após data de vencimento.

1 - Dímeros = 2,5 %  
2 - Monômeros = 97,5 %



**Figura 12 -** Determinação de polímeros de IgG em gel Sephadex 200, após 5 anos de estocagem.

1 - Polímeros = 2,3 %  
2 - Dímeros = 5,5 %  
3 - Monômeros = 92,2 %

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A qualidade das soluções de albumina 20% e de Imunoglobulina G 5% produzidas pelo método de cromatografia líquida na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo foi avaliada durante o período de 5 anos. Os métodos de análise utilizados foram os recomendados pela Resolução RDC nº 46 de 18 de maio de 2000, ANVISA – Ministério da Saúde<sup>13</sup> e Farmacopéia Européia (1997), 2ª Edição<sup>14</sup>. A primeira análise foi realizada para aprovação dos produtos e os valores obtidos nessas avaliações de qualidade foram considerados como padrão para comparação posterior. A segunda análise foi realizada nos períodos de vencimento de 3 anos para albumina 20% e 2 anos para IgG 5%, e a terceira, após 5 anos para ambas. Os valores obtidos na segunda análise foram idênticos aos iniciais, com exceção da análise de distribuição molecular, na qual, no decorrer do tempo até a data de vencimento constatou-se uma queda no valor de monômeros e ligeiro aumento de dímeros. A albumina 20% apresentou queda de 99,0% para 98,2% de monômeros e aumento de dímeros de 0,7% para 1,8% (Figuras 4 e 5). Em relação à IgG 5%, também houve queda de 98,8% para 97,5% de monômeros e aumento de dímeros de 1,2% para 2,5%. (Figura 10 e 11) Após 5 anos de estocagem dos mesmos produtos, uma nova análise foi realizada e todos os valores encontraram-se normais, conforme o padrão, porém a distribuição molecular, novamente mostrou alteração significativa. A albumina 20% apresentou uma queda de 99,0% para 97,0% de monômeros e aumento de dímeros de 0,7% para 3,0% (Figuras 4 e 6). A solução de IgG 5% apresentou uma queda mais acentuada, de 98,8% para 92,2% de monômeros e aumento de dímeros de 1,2% para 5,5%. Uma alteração significativa foi observada em solução de IgG 5%, com a presença de 2,3% de polímeros (Figuras 10 e 12). Apesar das diferenças apresentadas pelos produtos, os valores obtidos estão dentro dos padrões de referência, recomendados pela Resolução RDC nº 46 e Farmacopéia Européia (1997).

Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização do método de cromatografia líquida para produção industrial de medicamentos derivados de plasma humano, resultou em produtos de alto grau de pureza, boa estabilidade e bom rendimento. O método cromatográfico é uma tecnologia moderna e eficiente para produção de derivados de plasma e tem como característica principal não causar danos às moléculas protéicas durante o processamento. Além disso, este método tem a vantagem de introduzir o procedimento de dupla inativação viral para IgG durante o processo de produção, sem adicionar etapas especiais ao mesmo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Érica Kitahara e Dra. Paula Kagueyama da Amersham Biosciences, e Dr. Oswaldo Koga da Millipore, pelo apoio e concessão de géis de cromatografia e de Pellicon Cassette System 100.000 daltons.

Agradecimento especial: Kimiyuki Tanaka agradece ao sr. Yoitiro Hiraiwa, “aquele que me colocou no trilho da vida para seguir avante e vencer; meu sucesso devo à você, muito obrigado Hiraiwa-sam”.

## REFERÊNCIAS

1. Tanaka K. – **Fracionamento de plasma humano para obtenção de albumina em escala industrial pelo método de cromatográfico**. São Paulo, 1992. (Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo)
2. Ferri R. G., Calich V. L. G. e Vaz C. A. C.. - **Imunologia**. Editora Edgard Blücher Ltda São Paulo, 1977.
3. Curling J.M. - **Separation of Plasma Proteins**. Pharmacia Fine Chemicals A.B., Uppsala, Sweden, 1983.
4. Tanaka K. et al. - An alternative column chromatographic process for the production of human albumin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 29: 185-191, 1996.
5. Tanaka K. et al. – Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31: 1383-1388, 1998.
6. Tanaka K. et al. - A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31: 1375-1381, 1998.
7. Tanaka K. et al. – High quality immunoglobulin G purified from Cohn fraction by liquid chromatography. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33: 27-30, 2000.
8. Gellis S. S. – Chemical clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. Inactivation of the virus of homologous serum hepatitis in solutions of normal human serum albumin by means of heat. **Journal of Clinical Investigation**, 27: 238-244, 1948.
9. Murray R. e Diefenbach W. C. I. - Effect of heat on the agent of homologous serum hepatitis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 84: 230-231, 1953.
10. Horowitz B. et al. - Inactivation of viruses in labile blood derivatives: I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri (n-butyl) phosphate detergent combination. **Transfusion**, 25: 516-522, 1985.
11. Hamalainen E., Suomela H. and Kukkonen P. - Virus Inactivation during Intravenous Immunoglobulin Production. **Vox Sang.** 63:06-11, 1992.
12. Portaria nº 2.419 de 17/12/1996. Diário Oficial da União (19 / 12 / 1996). – Ministério da Saúde.
13. Resolução-RDC nº 46 de 18/05/2000. Diário Oficial da União (19 / 05 / 2000). – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde.
14. European Pharmacopoeia - Maisonneuve S.A., Sainte Ruffine, France. 1997, 2<sup>nd</sup> edition Part II.
15. Sawatani E. et al. - Extração de substrato de procalcitreína para determinação do ativador de procalcitreína (PKA) na albumina e IgG humano. **LAES & HAES**, 114:168-174, 1998.