INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ANÁLISE DE LUTEOTROFINA HUMANA E DE
GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA, RECOMBINANTE E NATURAL,
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM
FASE REVERSA**

BEATRIZ ELANE DE ALMEIDA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela**

São Paulo

2009

Dedico este trabalho

Aos meus queridos pais Ercília e Pedro, pelo carinho e incentivo dedicado à minha formação.

Aos meus irmãos e irmãs, em especial Marilene e Paulo, pelo apoio e confiança.

Ao meu noivo Emerson, pelo amor e compreensão.

A toda minha família e amigos.

Nas grandes batalhas da vida, as armas mais poderosas são, com frequência, a sabedoria e a compreensão.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom maior que é a vida.

À Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pela orientação e confiança, o meu reconhecimento e gratidão.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela atenção e contribuição neste trabalho.

Ao amigo Johnny, por todo ensinamento e companheirismo.

À Dra. Cibele N. Peroni, Dra. Kayo Okazaki e Dr. Carlos R. J. Soares, pelo incentivo e colaboração.

Às amigas, Arlete, Camila, Cláudia, Cristiane, Dani, Edna, Ednéia, Diane, Eliza, Fernanda, Flávia, Geiza, Janaína, Juliana, Karina, Keli, Larissa, Márcia, Miriam, Natália, Neide, Regina, Renata, Rosa, Rosângela, Rute, Sandra, Sueli, Susana, Taís e Tâmara, pelo incentivo, ajuda e pelas boas risadas. Valeu meninas!

Aos amigos, Eduardo, Eric, Herbert, Jean, José Maria, Junior, Junqueira, Marcos, Maurício, Mosca, Nélio, Renan, Rodrigo, Patrick, companheiros sempre prontos a ajudar.

A todos os colegas do Centro de Biotecnologia, que direta e/ou indiretamente contribuíram para elaboração deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de executar este trabalho e pelo apoio financeiro.

**ANÁLISE DE LUTEOTROFINA HUMANA E DE
GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA, RECOMBINANTE E NATURAL,
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA**

Beatriz Elane de Almeida

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas condições específicas de RP-HPLC para análise de preparações recombinantes e naturais de hLH, de hCG, e de suas subunidades. O hLH e o hCG heterodimérico e suas subunidades α e β migraram com tempos de retenção (t_R) significativamente diferentes, na seguinte ordem de hidrofobicidade crescente: α -hCG < α -hLH < hCG < hLH < β -hCG < β -hLH. Nestas condições, onze preparações foram estudadas: o Padrão Internacional recombinante hLH-WHO 96/602, uma preparação comercial recombinante, duas preparações hipofisárias altamente purificadas de hLH, uma preparação recombinante e duas preparações urinárias de hCG e quatro produtos urinários heterogêneos, contendo hLH + hFSH. Todas as preparações de hLH mostraram um tempo de retenção similar para o pico principal ($t_R = 38,35 \pm 0,42$ min; DPR = 1,1 %; n = 4 preparações), enquanto o pico principal do hCG migrou cerca de 4% mais rápido, quando comparado a este valor médio. Picos de hLH, hFSH e hCG foram também identificados nas preparações urinárias heterogêneas. O método foi validado para as sete preparações homogêneas, sendo a exatidão, precisão e sensibilidade calculadas com base na curva dose-resposta, altamente linear ($r=0,99998$; $p<0,0001$; $n=20$). A quantificação de diferentes gonadotrofinas nas preparações heterogêneas foi também realizada, embora com claras limitações de exatidão.

**ANALYSIS OF RECOMBINANT AND NATIVE
HUMAN LUTROPIN AND HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN BY
REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Beatriz Elane de Almeida

ABSTRACT

Specific RP-HPLC conditions for the analysis of recombinant and native hLH and hCG preparations and of their subunits were set up. Heterodimeric hLH and hCG and their α - and β - subunits all migrated with significantly different retention times (t_R) in the following order of increasing hydrophobicity: α -hCG < α -hLH < hCG < hLH < β -hCG < β -hLH. With basis on these conditions, a total of eleven preparations were studied: the International Standard of recombinant hLH-WHO 96/602, a commercial recombinant and two highly purified pituitary hLH, a recombinant and two urinary hCG preparations and four heterogeneous urinary products containing hLH + hFSH. All hLH preparations showed very similar retention times for the main peak ($t_R = 38.35 \pm 0.42$ min; RSD = 1.1 %; n = 4 preparations), while the hCG main peak ran about 4 % faster when compared to this average value. Human LH, hFSH and hCG peaks could also be identified in the heterogeneous urinary preparations. Quantitative analysis could be validated for the seven homogeneous preparations and accuracy, precision and sensitivity were calculated on the basis of a highly linear dose-response curve ($r=0.99998$; $p<0.0001$; $n=20$). Quantification of the different gonadotropins in the heterogeneous urinary preparations was also carried out, though with clear accuracy limitations.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Material.....	11
3.1.1 Preparações hormonais.....	11
3.1.1.a Preparações de Luteotrofina humana (hLH).....	11
3.1.1.b Preparações de Gonadotrofina Coriônica humana (hCG).....	11
3.1.1.c Preparações de Foliculotrofina humana (hFSH).....	12
3.1.1.d Preparações urinárias de Gonadotrofina Menopausal humana (uhMG).....	12
3.1.2 Reagentes.....	13
3.2 Equipamentos e acessórios principais.....	13
3.3 Métodos.....	15
3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).....	15
3.3.2 Validação.....	17
3.3.2.a Linearidade de resposta.....	17
3.3.2.b Precisão.....	17
3.3.2.c Exatidão.....	18
3.3.2.d Limite de quantificação (Sensibilidade).....	18
3.3.3 Determinação da quantidade de proteína total.....	19
3.3.4 Dissociação do heterodímero.....	20
3.3.5 Ensaio biológico.....	20

4 RESULTADOS.....	21
4.1 Padronização da metodologia de RP-HPLC.....	21
4.2 Análise qualitativa de diferentes preparações de hLH e de hCG.....	27
4.3 Validação do método de RP-HPLC.....	32
4.3.1 Linearidade.....	32
4.3.2 Precisão.....	33
4.3.3 Exatidão.....	35
4.3.4 Sensibilidade.....	36
4.4 Análise quantitativa.....	36
4.5 Análise de outras preparações contendo hLH.....	41
4.5.1 Análise quantitativa de diferentes preparações de hMG.....	46
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

O hormônio luteotrófico humano (hLH) é um hormônio glicoprotéico secretado pelos gonadotropos, na glândula pituitária anterior, em resposta ao estímulo do hormônio liberador de LH (LH-RH), no hipotálamo. O hLH é estruturalmente e funcionalmente relacionado à Gonadotrofina Coriônica humana (hCG), que é primariamente secretada pelos sinciciotrofoblastos, na placenta humana. Ambos os hormônios se ligam ao mesmo receptor, que é uma glicoproteína transmembrana que pertence a super família de receptores acoplados à proteína-G e está presente nas células ovarianas Teca, em fêmeas e nas células testiculares Leydig, em machos (Birken, 1996 a; Rao, 2001).

Apesar de se ligar ao mesmo receptor, o hLH e o hCG apresentam diferentes funções. Na literatura são reportadas várias funções para o hLH: participa na regulação ovariana e testicular, tem papel crítico na maturação folicular, na ovulação, no desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo e intervem na síntese de esteróides, de fatores de crescimento e de citocinas (Rao, 2001; Perera-Marín, 2007). Já o hCG, o hormônio da gravidez, mantém adequados os níveis de esteróides sexuais sintetizados pelo corpo lúteo até que a placenta cumpra a sua função e atua na diferenciação dos trofoblastos e na nutrição fetal, através da angiogênese da artéria espiral, no miométrio (Birken, 1996 a; Cole, 2009).

Ambos, hLH e hCG, fazem parte da família das gonadotrofinas, que inclui também o hormônio Folículo estimulante (hFSH) e são heterodímeros que consistem de duas subunidades (α e β), ligadas não covalentemente. A subunidade α é comum a todas as gonadotrofinas, apresentando uma mesma seqüência de aminoácidos, enquanto a subunidade β é específica de cada uma delas (Figura 1).

Subunidade alfa do hLH e do hCG

Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	10
Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Ser	Gln	20
Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Gln	Cys	Met	Gly	30
Cys	Cys	Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro	40
Leu	Arg	Ser	Lys	Lys	Thr	Met	Leu	Val	Gln	50
Lys	Asn	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	60
Val	Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	Arg	Val	Thr	Val	70
Met	Gly	Gly	Phe	Lys	Val	Glu	Asn	His	Thr	80
Ala	Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	Tyr	Tyr	His	90
Lys	Ser									92

Subunidade beta do hLH

Ser	Arg	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Trp	Cys	His	10
Pro	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Gln	Lys	20
Glu	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ile	Thr	Val	Asn	30
Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr	40
Met	Met	Arg	Val	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Pro	50
Pro	Leu	Pro	Gln	Val	Val	Cys	Thr	Tyr	Arg	60
Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro	70
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	Asp	Pro	Val	Val	80
Ser	Phe	Pro	Val	Ala	Leu	Ser	Cys	Arg	Cys	90
Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Ser	Asp	Cys	100
Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Thr	Cys	110
Asp	His	Pro	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Leu	Phe	120
Leu										121

Subunidade beta do hCG

Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg	10
Pro	Ile	Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Glu	Lys	20
Glu	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ile	Thr	Val	Asn	30
Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr	40
Met	Thr	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Val	Leu	Pro	50
Ala	Leu	Pro	Gln	Val	Val	Cys	Asn	Tyr	Arg	60
Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro	70
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Val	Val	80
Ser	Tyr	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Cys	Gln	Cys	90
Ala	Leu	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Cys	100
Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Thr	Cys	110
Asp	Asp	Pro	Arg	Phe	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	120
Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	130
Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Asp	Thr	140
Pro	Ile	Leu	Pro	Gln						145

Figura 1 - Sequência de aminoácidos das subunidades α e β do hLH e do hCG. (Amoresano, 1996; Cole, 2009).

O hLH e o hCG são hormônios glicoprotéicos cujos pesos moleculares são de 27,8 kDa (Carvalho, 2009) e 35,1 kDa (Laidler, 1995), respectivamente. As cadeias de carboidratos correspondem à 21% do peso total, no caso do hLH (Hara, 1978) e à 25 a 30%, no caso do hCG (Cole, 2009).

Estes hormônios apresentam alto conteúdo de cisteínas, sendo formadas cinco pontes dissulfeto na subunidade α e seis na subunidade β .

As subunidades α dos dois hormônios são glicosiladas na porção C-terminal da molécula e apresentam duas cadeias de oligossacarídeos de ligação N, com sítios de ligação na Asparagina (Asn) 52 e 78. No caso das subunidades β , enquanto o hLH possui apenas uma cadeia de oligossacarídeo de ligação N, que se liga à Asn 30, o hCG possui duas cadeias de ligação N, com sítios de ligação na Asn 13 e 30 e também quatro cadeias de oligossacarídeos de ligação O, com sítios na Serina (Ser) 121, 127, 132 e 138. Estas importantes propriedades do hLH e do hCG são mostradas na Tabela 1 (Birken, 2000; Ribela, 2006).

Apesar da alta similaridade entre as subunidades β do hLH e do hCG, são encontrados 24 aminoácidos a mais na subunidade β do hCG, formando um peptídeo C-terminal que inclui cadeias de carboidratos com sítios de O-glicosilação, cada uma delas com dois resíduos de ácido siálico. Além desta diferença estrutural, o hCG e o hLH apresentam também diferenças na afinidade ao receptor e na depuração metabólica, tendo o hCG uma meia-vida *in vivo* bem maior que a do hLH, cerca de 3 a 10 vezes (Stanton, 1996; Howles, 2000; Fauser, 2009).

Tabela 1 – Características do hLH e do hCG.

Propriedade		Subunidade α hLH e hCG	Subunidade β	
			hLH	hCG
Estrutura primária		92 aa	121 aa	145 aa
Aminoácido N-terminal		Ala	Ser	Ser
Pontes dissulfeto (Cys-Cys)		7-31 10-60 28-82 32-84 59-87	9-57 23-72 26-110 34-88 38-90 93-100	9-57 23-72 26-110 34-88 38-90 93-100
Sítios de glicosilação	N	Asn 52 Asn 78	Asn 30	Asn 13 Asn 30
	O	-----	-----	Ser 121 Ser 127 Ser 132 Ser 138

Durante muitos anos, as fontes disponíveis de hLH exógeno para uso clínico eram ou de origem hipofisária ou de origem urinária. O hLH tem sido amplamente utilizado em medicina reprodutiva. Em 1958, foi descrita a primeira gravidez obtida com o uso de gonadotrofinas extraídas da hipófise humana (hPG). Entretanto, o uso de hPG foi suspenso devido aos riscos de contaminação por vírus ou príons (doença de Creutzfeld-Jacob, síndrome da imunodeficiência adquirida, hepatite, por exemplo), além das dificuldades ético-legais para obtenção de hipófises de cadáveres. Mais tarde, em 1961, estudos demonstraram que extratos urinários de mulheres menopausadas exerciam potente efeito estimulante nos ovários. Em 1962, foram relatadas as primeiras gestações com o uso de gonadotrofinas extraídas da urina de mulheres menopausadas (uhMG) e desde então se utiliza u hMG como fonte de atividade biológica de hLH (Lunenfeld, 2004).

Preparações de uhMG contem hFSH e hLH, porém os níveis de hLH são variáveis podendo, em algumas situações, apresenta baixa atividade biológica do hLH. Uma vez que nas aplicações clínicas é necessária a mesma atividade biológica de hFSH e de hLH, frequentemente é adicionado hCG às preparações de u hMG, pelo fato deste hormônio possuir a mesma atividade biológica de hLH (Duijkers, 1997; Giudice, 2001 e 2002; Van de Weijer, 2003). Entretanto, a meia-vida longa do hCG pode gerar acúmulo de bioatividade de hCG, o que pode ter efeitos negativos, por exemplo no desenvolvimento folicular e na qualidade do oócito (Howles; 2000, Shoham, 2003; Baer, 2003). Atualmente, o efeito negativo do excesso de atividade biológica de hLH associado ao hCG pode ser evitado pela utilização de hLH recombinante (rhLH), que permite dosagens precisas e seguras para cada patologia (Fonjallaz, 2000; Shoham , 2003; Caglar , 2005). Por exemplo, uma dose diária de

75 UI de rhLH é suficiente para um ótimo desenvolvimento folicular (The European Recombinant Human LH Study Group, 1998). O rhLH quando co-administrado com hFSH tem se mostrado seguro e eficiente na indução folicular e na estimulação ovariana, levando a uma alta taxa de gravidez, inclusive em mulheres com mais de 35 anos (Marrs, 2003; Fischer, 2007; Durnerim, 2008). O uso de rhLH é também especialmente útil para pacientes que apresentam baixa resposta ao tratamento com hFSH. Nestes casos, é reportada uma diminuição na incidência de cisto de ovário e aumento da taxa de implantação e fertilização, bem como melhora na qualidade do oócito (De Plácido, 2005; Dhillon, 2008). O rhLH também tem sido usado para o tratamento do Hipogonadismo Hipogonadotrófico, que é uma disfunção neuroendócrina que impede a foliculogênese (Loumaye, 2003; Kaufmann, 2007; Bougneres, 2008; Shoham, 2008).

Vários sistemas de ensaio, baseados em metodologias biológicas e imunológicas, são utilizados na identificação, detecção e determinação do hCG e do hLH (Costagliola, 1994; Kalia, 2004). Estes avaliam aspectos funcionais e imunoquímicos associados ao hormônio. No caso dos bioensaios *in vivo* e *in vitro*, a medida refere-se à atividade biológica do hormônio, enquanto os imunoensaios monitoram a quantidade de moléculas imunoreativas de hormônio. Diferentes métodos físico-químicos, tais como eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Van de Weijer, 2003; Carvalho, 2009), focalização isoeletrica (Stanton, 1993; Van de Weijer, 2003; Carvalho, 2009) e eletroforese capilar (Morbeck, 1994) tem sido também reportados para identificação e análise do hLH e do hCG. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na análise qualitativa e quantitativa destes

hormônios (Ribela, 2006; Carvalho, 2009). Características da técnica de HPLC, tais como automação, alta resolução, sensibilidade e reprodutibilidade fazem desta metodologia uma opção analítica bastante utilizada, especialmente na indústria farmacêutica, para a identificação e quantificação de impurezas presentes nos fármacos. As principais farmacopéias, United States Pharmacopeia (USP), European Pharmacopeia (EP) e British Pharmacopeia (BP), recomendam extensivo uso da HPLC durante a validação dos processos de fabricação e controle de qualidade de fármacos, sendo determinante no desenvolvimento de novos produtos (Basak, 2007; Kovalski, 2007; Ahuja, 2007; Zacharis, 2009). Um dos modos bastante utilizado é a HPLC de fase reversa (RP-HPLC), cujo princípio de separação baseia-se na interação hidrofóbica entre o soluto e o material em que a coluna foi empacotada, eluindo o soluto menos hidrofóbico mais rapidamente (Nikitas, 2009).

A maioria dos trabalhos empregando RP-HPLC para identificação e caracterização do hLH e do hCG analisaram apenas as subunidades dissociadas (Parson, 1984; Wilks, 1984; Van Dijk, 1992; Hoermann, 1995; Amoresano, 1996; Birken, 1996 b e 2000; Giudice, 2001; Van de Weijer, 2003; Gadkari, 2003; Carvalho, 2009). Para tanto, foram utilizadas, na fase estacionária, colunas de sílica C₁₈ e C₄ e na fase móvel, gradientes de acetonitrila, em pH ácido. Por outro lado, nos procedimentos analíticos e preparativos para análise da forma heterodimérica destes hormônios foram empregadas condições de eluição em pH neutro (Hiyama, 1990; Kristek, 1991; Chlenov, 1993; Giudice, 2002). Entre os trabalhos mencionados, apenas o de Giudice e colaboradores (2002) e o de Gadkari e colaboradores (2003) analisaram preparações recombinantes, hLH (derivado de células de ovário de

hamster chinês) e hCG (derivado de *Pichia pastoris*), respectivamente. Todos os outros trabalhos referem-se a produtos naturais, de origem hipofisária ou urinária.

Para garantir que a metodologia empregada na análise quantitativa de um produto gere resultados confiáveis e reprodutivos é necessário validá-la. Vários trabalhos têm sido reportados na literatura em relação à validação de métodos analíticos, descrevendo definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação (Shabir, 2003; ICH, 2005; Dantus, 2006; Ribani, 2007). Pelo que é de nosso conhecimento, a validação da análise quantitativa do hLH e do hCG em RP-HPLC nunca foi reportada.

2 OBJETIVO

Considerando a alta importância do hLH e do hCG na prática clínica e a necessidade do controle de qualidade destes produtos para garantir a segurança e eficácia terapêutica, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia de análise, por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), para preparações naturais e recombinantes de hLH e hCG e para suas respectivas subunidades.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Preparações hormonais

3.1.1.a Preparações de Luteotrofina humana (hLH)

- Preparações recombinantes derivadas de Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO):
 - Padrão Internacional de rhLH-WHO 96/602 do National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC, South Mimms, Reino Unido);
 - rhLH-Luveris produzido por Laboratoires Serono S.A. (Aubonne, Suíça)
- Preparações de origem hipofisária, produzidas e fornecidas por:
 - A** - National Hormone and Pituitary Program (Torrance, EUA):
 - phLH-NIDDK (hLH – B - SIAFP - 2);
 - α -phLH-NIDDK (Human Alpha Subunit LH – AFP-3294B);
 - β -phLH-NIDDK (Human Beta Subunit LH – AFP-3282B).
 - B** - Dr. Peter A. Torjesen do Aker University Hospital (Oslo, Noruega):
 - phLH-NOR.

3.1.1.b Preparações de Gonadotrofina Coriônica humana (hCG)

- Preparações urinárias derivadas de urina de gestantes:

- Padrão Internacional de uhCG-WHO 75/589 do National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC, South Mimms, Reino Unido);

- uhCG-Choriomon, produzida pelo IBSA Institut Biochimique (Lugano, Suíça) e fornecido por Meizler Biopharma S.A.;

- Preparação recombinante derivada de Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO):

- rhCG-Ovidrel, produzida por Laboratoires Serono S.A. (Aubonne, Suíça).

3.1.1.c Preparações de Foliculotrofina humana (hFSH)

- Preparação recombinante derivada de Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO):

- Padrão Internacional de rhFSH-WHO 96/642 do National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC, South Mimms, Reino Unido);

- Preparação de origem hipofisária, produzida e fornecida por: Dr. Peter A. Torjesen do Aker University Hospital (Oslo, Noruega):

- phFSH-NOR

3.1.1.d Preparações urinárias de Gonadotrofina Menopausal humana (uhMG)

- Padrão Internacional de uhMG-WHO 98/704 do National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC, South Mimms, Reino Unido);

- Preparações comerciais de u hMG:

- Menopur 75 UI - Laboratório Ferring GmbH (Kiel, Alemanha);

- Menogon 75 UI - Laboratório Ferring GmbH (Kiel, Alemanha);

- Merional 75/150 UI - IBSA Institut Biochimique (Lugano, Suíça).

3.1.2 Reagentes

- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Ácido acético glacial p.a., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Cloreto de Sódio p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Fosfato de amônio bibásico p. a., Labsynth (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de sódio monobásico p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Fosfato de sódio bibásico p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Hidróxido de amônio p.a., Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Kit para dosagem de proteína total: micro BCA, Pierce (Rockford, EUA).
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA)
- Albumina de soro bovino (BSA), grau RIA (fração V) Sigma (St. Louis, EUA).

3.2 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético, modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil).
- Agitador rotatório (tipo vortex), modelo AP-56, Phoenix (Araraquara, Brasil).
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA).
- Autoclave horizontal, modelo Speedclave 12L, Odontobrás (São Paulo, Brasil).
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo P1000N, Mettler (Zurich, Suíça).
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich, Suíça).
- Bomba de vácuo, modelo Nevoni, NSR (Barueri, Brasil).
- Coluna de aço inoxidável utilizada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por fase reversa C₄ Grace Vydac, 214 TP 54 (25cm X 4,6mm D.I.), tamanho das partículas 5 µm, diâmetro dos poros de 300Å, acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5µm, 1,0cm X 4,6mm D.I.), Grace Vydac Separations Group (Hesperia, EUA).

- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil).
- Freezer –20°C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil).
- Freezer –40°C, modelo AB 240, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Freezer –80°C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, EUA).
- Medidor digital de pH, modelo 420A, Thermo Electron Corporation (Beverly, EUA).
- Membrana de celulose para diálise, modelo D9277-100 FT, Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).
- Membrana filtrante, modelo GVWP 04700, Millipore (São Paulo, Brasil)
- Microtubos estéreis, Eppendorf (São Paulo, Brasil)
- Placas de microtitulação com fundo em “U”, Dynatech (Chantilly, EUA).
- Pipetas de alta precisão, volumes 10, 20, 100, 200, 1000µL, Gilson (Rio de Janeiro, Brasil).
- Ponteiras sem filtro, volumes 10 a 1000µL, Axygen (Union, EUA).
- Refrigerador duplex, modelo 320 Clean, Brastemp (São Paulo, Brasil).
- Refrigerador com porta de vidro, modelo VE 730, Metalfrio (São Paulo, Brasil).
- Seringa para injeção de amostra, volume 10 a 500µL, Hamilton (Nevada, EUA)
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA).

3.3 Métodos

3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

As preparações de hLH e de hCG foram analisadas por RP-HPLC empregando as condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2 Condições experimentais empregadas na RP-HPLC para análise do hLH e do hCG.

Características	Descrição
Coluna	C ₄ Grace Vydac 214 TP 54 (5µm , 25cm X 4,6mm D.I.)
Pré-coluna	C ₄ Grace Vydac 214 FSK 54 (5µm, 1cm X 4,6mm D.I.)
Temperatura da coluna	25°C
Fase Móvel	Solução A: Fosfato de Sódio 0,05M pH 7,0 Solução B: Acetonitrila
Modo de eluição	Gradiente Linear: 12,5 - 60% B
Duração da corrida	50 minutos
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min
Sistema de detecção	Absorbância em luz ultravioleta UV
Comprimento de onda	220nm
Volume injetado	Alíquotas de 5 – 10 µL de phLH, 25 µL de uhCG e rhCG e 150 – 250 µL de rhLH

Para analisar as preparações de hMG as condições utilizadas foram as descritas na Tabela 3.

Tabela 3 Condições experimentais empregadas na RP-HPLC para análise do hMG.

Características	Descrição
Coluna	C ₄ Grace Vydac 214 TP 54 (5µm, 25cm X 4,6mm D.I.)
Pré-coluna	C ₄ Grace Vydac 214 FSK 54 (5µm, 1cm X 4,6mm D.I.)
Temperatura da coluna	25°C
Fase Móvel	Solução A: Fosfato de Amônio 0,05M pH 8,6 Solução B: Acetonitrila
Modo de eluição	Gradiente Linear: 15 - 60% B durante 40 minutos Isocrático: 60% B durante 10 minutos
Duração da corrida	50 minutos
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min
Sistema de detecção	Absorbância em luz ultravioleta UV
Comprimento de onda	220nm
Volume injetado	Alíquotas de 150 – 250 µL de uhMG, 5 – 10 µL de phLH, phFSH, uhCG, e 150 – 250 µL de rhLH e rhFSH

A quantificação de hLH, hCG e hFSH, nas amostras desconhecidas, foi obtida através da análise da área do pico correspondente à proteína de interesse, comparada à área obtida para uma preparação referência. Neste trabalho, foram utilizadas como preparações de referência o hLH recombinante (WHO 96/602) e o hFSH recombinante (WHO 96/642).

3.3.2 Validação

Os seguintes parâmetros foram selecionados e analisados para validar a RP-HPLC, de acordo com as orientações do International Conference on Harmonization (ICH, 2005): linearidade de resposta, precisão, exatidão, limite de quantificação (sensibilidade).

3.3.2.a Linearidade de resposta

A linearidade de resposta consiste na capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais ao grau de concentração da amostra sob análise, dentro de um determinado intervalo. Uma curva de calibração relacionando a área do pico (unidades arbitrárias, u.a.) com quantidades conhecidas de hLH (0,14 µg; 0,28 µg; 0,56 µg; 1,1 µg; 2,3 µg; 4,5 µg e 8,0 µg) foi estabelecida e a linearidade de resposta confirmada através do coeficiente de correlação.

3.3.2.b Precisão

A precisão de um método analítico exprime o grau de variação em torno da média de uma mesma amostra em quantificações repetidas, em ensaios independentes (inter-ensaio) ou no mesmo ensaio (intra-ensaio) e é medida pelo desvio padrão relativo (DPR) calculado por:

$$DPR = \frac{\delta}{\bar{M}} \times 100$$

onde:

$\bar{M}$ = média das determinações

δ = desvio padrão da média

A precisão do método de RP-HPLC foi avaliada intra-dia, analisando-se por cinco vezes consecutivas uma mesma amostra de hLH e inter-dia, analisando-se três amostras com níveis diferentes de hLH, em três dias diferentes.

3.3.2.c Exatidão

A exatidão exprime o grau de concordância entre o valor real da amostra e o valor experimental encontrado. Para determinar a exatidão do método analítico foi realizado um teste de recuperação. Triplicata de amostras com quantidades conhecidas de hLH foram quantificadas por RP-HPLC. A recuperação foi avaliada pela razão entre o valor obtido em RP-HPLC e o valor real da amostra, em porcentagem.

3.3.2.d Limite de quantificação (Sensibilidade)

O limite de quantificação de um método analítico é a menor concentração de uma amostra que pode ser determinada que é significativamente diferente de zero.

A sensibilidade da metodologia de RP-HPLC foi calculada com base nos desvios padrões das respostas relativas à menor dose aplicada (0,14 µg) e à dose zero (apenas o tampão), usando o teste "t" de Student (p=0,05), de acordo com a formulação de Rodbard (1978):

$$y_{\min} = y_0 + ts_p \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}} \quad s_p = \sqrt{\frac{s_0^2(n_0 - 1) + s_1^2(n_1 - 1)}{n_0 + n_1 - 2}}$$

onde:

$y_{\min}$ = resposta mínima detectável (área do pico)

y_0 = resposta da dose zero

n_0 = número de replicatas da dose zero

s_0 = desvio padrão da dose zero

n_1 = número de replicatas da menor dose aplicada

s_1 = desvio padrão da menor dose aplicada

t = valor do "t" de Student correspondente a $n_0 + n_1 - 2$

A dose mínima detectável ($X_{\min}$) foi então calculada pela curva de calibração estabelecida.

3.3.3 Determinação da quantidade de proteína total

A concentração de proteína total foi estimada usando o método "Micro BCA". Este consiste na detecção colorimétrica e quantificação da proteína total em solução diluída após reação com ácido bicinconínico (BCA). A cada ensaio é determinada uma curva padrão de calibração que relaciona diferentes concentrações de soro albumina bovina (BSA) pura (0,5 - 200 µg/mL) com a absorvância correspondente, no comprimento de onda de 540nm. Os seguintes reagentes são adicionados simultaneamente em cada poço de placas de microtitulação: 125 µL de amostra; 125 µL de reagente de trabalho. O reagente de trabalho é constituído por: 50% solução A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, tartarato de sódio e hidróxido de sódio); 48% solução B (solução aquosa de ácido bicinconínico 4%) e 2% solução C (sulfato cúprico penta-hidratado 4%).

Antes do ensaio de BCA foi necessário dialisar as amostras em virtude da interferência dos excipientes. A diálise foi realizada, sob refrigeração, contra Fosfato

de Sódio 0,02 M pH 7,4 + Cloreto de Sódio 0,15 M, com trocas a cada 4 horas e foi utilizada uma membrana de celulose de 10 mm, com limite de corte de 12 kDa.

3.3.4 Dissociação do heterodímero

As subunidades de hCG foram preparadas incubando a preparação recombinante de hCG (40 µg, dissolvida em 100 µL de solução fosfato salina), por 16 horas (“overnight”) a 37 °C com 5 M ácido acético e aplicando o produto da reação de dissociação diretamente na RP-HPLC (Carvalho, 2009).

3.3.5 Ensaio biológico

Para a identificação do hFSH e do hLH em preparações de hMG, foi testada a bioatividade *in vivo* de hFSH ou hLH dos picos eluídos da RP-HPLC. Estes ensaios foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria, em colaboração com o Dr. Sérgio Dalmora.

A atividade de hFSH foi determinada pelo método de Steelman e Pohley (Steelman, 1953). Resumidamente, ratas fêmeas Sprague-Dawley entre 19 e 22 dias receberam, por via subcutânea, durante três dias, 0,5, 1 e 3 UI de hFSH. A autópsia foi realizada no quarto dia (72 horas após a primeira injeção). Os ovários foram retirados, dissecados livres de tecidos circundantes e pesados. A bioatividade *in vivo* de hFSH foi avaliada em comparação com o padrão de referência internacional de hFSH (WHO 96/642).

Para avaliar a atividade de hLH, ratos machos Sprague-Dawley entre 19 e 22 dias receberam, por via subcutânea, durante três dias, 1, 2 e 4 UI de hLH. A autópsia foi realizada no quarto dia (72 horas após a primeira injeção). As vesículas seminais foram retiradas, dissecadas livres de tecidos circundantes e pesadas. A bioatividade *in vivo* de hLH foi avaliada em comparação com o padrão de referência internacional de hLH (WHO 96/602) (Storring, 2001).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da metodologia de RP-HPLC

A condição estabelecida neste trabalho para eluição, por RP-HPLC, de hLH, hCG e de suas respectivas subunidades α e β foi a seguinte: gradiente linear de 12,5 - 60% acetonitrila em fosfato de sódio 0,05M pH 7,0, durante 50 minutos. Preparações de hLH, hCG e de suas respectivas subunidades testadas nestas condições, em quatro ensaios independentes, apresentaram os tempos de retenção mostrados na Tabela 4, cuja variação interensaio foi $< 0,6\%$. As subunidades purificadas do hLH foram obtidas do NIDDK, enquanto as subunidades purificadas do hCG foram obtidas após dissociação do heterodímero com 5 M de ácido acético e purificação por RP-HPLC, conforme técnica descrita por Carvalho e colaboradores (2009). Uma boa separação entre a forma heterodimérica e as subunidades correspondentes foi observada, comprovada pela diferença altamente significativa ($p < 0,001$) entre os heterodímeros e suas subunidades. O tempo de retenção relativo ($t_{RR} = t_R \text{ subunidade} / t_R \text{ heterodímero}$) observado para as subunidades α e β dos dois hormônios foi de 0,89 e 1,17, respectivamente no caso do hLH e de 0,93 e 1,07, no caso do hCG.

Tabela 4 – Estatística dos tempos de retenção do hLH, hCG e de suas subunidades α e β , quando analisados por RP-HPLC.

Amostra	Tempo de Retenção^a (min)	DPR^b (%)
Heterodímero p hLH	38,87 $\pm$ 0,088	0,23
Subunidade α -p hLH	34,56 $\pm$ 0,080	0,23
Subunidade β -p hLH	45,34 $\pm$ 0,102	0,22
Heterodímero r hCG	36,63 $\pm$ 0,131	0,36
Subunidade α -r hCG	34,07 $\pm$ 0,180	0,53
Subunidade β -r hCG	39,19 $\pm$ 0,038	0,10

^a Média $\pm$ desvio padrão (n=4 ensaios independentes)

^b Desvio padrão relativo expresso como % da média

Os perfis cromatográficos do hLH e do hCG e de suas respectivas subunidades, analisados por RP-HPLC, nas condições de eluição estabelecidas, são mostrados nas Figuras 2 e 3.

Figura 2 – Perfil cromatográfico em RP-HPLC: (A) Heterodímero p hLH-NIDDK (2,5 µg); (B) α -p hLH-NIDDK (4 µg); (C) β -p hLH-NIDDK (7 µg).

Figura 3 – Perfil cromatográfico em RP-HPLC: (A) Heterodímero rhCG-Ovidrel (5 µg); (B) α -rhCG-Ovidrel (2 µg); (C) β -rhCG-Ovidrel (2 µg).

Observa-se que, enquanto a preparação heterodimérica de hCG é altamente pura (Figura 3 A), a de hLH (Figura 2 A) apresenta impurezas, que provavelmente correspondem às subunidades. Purificando apenas a forma heterodimérica do hLH e repurificando-a na mesma RP-HPLC, obtivemos o perfil mostrado na Figura 4, confirmando a capacidade da técnica de separar o heterodímero de suas subunidades e também confirmando que estas impurezas relacionadas ao hormônio não aparecem em virtude das condições utilizadas na RP-HPLC. Observa-se também que na subunidade β -pHLH (Figura 2 C) há a presença de uma certa quantidade de heterodímero. A subunidade β do hCG, diferentemente daquela do hLH, apresenta duas isoformas (Figura 3 C).

Figura 4 – Perfil em RP-HPLC da forma heterodimérica do p hLH-NIDDK após repurificação.

Foi possível estabelecer com o método desenvolvido, para as seis preparações analisadas, a seguinte escala de hidrofobicidade relativa: α -hCG < α -hLH < hCG < hLH < β -hCG < β -hLH (Figura 5). A técnica padronizada foi capaz de discriminar estas seis espécies moleculares, sendo observada uma diferença significativa entre os tempos de retenção da subunidade α dos dois hormônios ($p < 0,005$), bem como das subunidades β e dos heterodímeros ($p < 0,001$). Foi encontrada também diferença significativa entre o tempo de retenção do α -hLH e do hCG ($p < 0,001$) e do hLH e do β -hCG ($p < 0,005$).

Figura 5 – Avaliação de hidrofobicidade relativa, por cromatografia de fase reversa, do hLH, hCG e respectivas subunidades: α -hCG (2 μ g); α -hLH (4 μ g); hCG (3 μ g); hLH (4 μ g); β -hCG (2 μ g); β -hLH (7 μ g).

4.2 Análise qualitativa de diferentes preparações de hLH e de hCG

Uma vez padronizado o método por RP-HPLC para a determinação de hLH e de hCG, realizamos então a análise qualitativa de quatro amostras de hLH, sendo duas recombinantes e duas hipofisárias, e três preparações de hCG de diferentes origens, duas urinárias e uma recombinante.

A Tabela 5 mostra a variação dos tempos de retenção das preparações acima mencionadas, em quatro ensaios. Uma alta precisão e reprodutibilidade interensaio nas determinações do t_R foi observada, com desvio padrão relativo $\leq 0,6\%$. Enquanto as duas preparações recombinantes de hLH apresentam t_R praticamente coincidentes, com diferença de apenas 0,04 min (0,1%), os t_R das duas preparações hipofisárias apresentam pouco acordo (diferença de 1,03 min, ou $\sim 3\%$). No caso das preparações de hCG, o t_R da preparação recombinante é também $\sim$ coincidente com os das duas preparações urinárias (0,08 min, ou 0,2 % de diferença).

Há uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de retenção das preparações recombinantes e de cada uma das preparações hipofisárias de hLH. Também apresentaram diferença significativa ($p < 0,02$), os tempos de retenção das preparações de hCG, recombinante e urinárias.

Uma alta e significativa diferença ($p < 0,01$) foi encontrada entre a média dos tempos de retenção das quatro preparações de hLH ($38,35 \pm 0,42$) e das três preparações de hCG ($36,68 \pm 0,043$), sendo que o hCG eluiu mais rápido (1,7 min ou $\sim 4\%$).

Tabela 5 - Variação interensaio dos tempos de retenção obtidos para as preparações de hLH e hCG, analisadas por RP-HPLC.

Preparação	Tempo de Retenção ^a	DPR ^b
	(min)	(%)
rhLH WHO 96/602	38,37 ± 0,177	0,46
rhLH LUVERIS	38,33 ± 0,199	0,52
phLH NIDDK	38,87 ± 0,088	0,23
phLH NOR	37,84 ± 0,226	0,60
uhCG WHO 75/589	36,70 ± 0,146	0,40
rhCG OVIDREL	36,63 ± 0,131	0,36
uhCG CHORIOMON	36,71 ± 0,121	0,33

^a Média ± desvio padrão (n=4 ensaios independentes)

^b Desvio padrão relativo expresso como % da média

Os perfis cromatográficos em RP-HPLC de outras diferentes preparações de hLH são mostrados na Figura 6. Os picos observados entre 5 e 10 minutos correspondem aos diferentes excipientes presentes nas preparações analisadas. O pico com tempo de retenção de 44,80 minutos na Figura 6 C, corresponde à albumina sérica humana (HSA) presente na preparação WHO, confirmado pela análise da HSA nas mesmas condições. Por tratar-se de um padrão de referência para bioensaios, esta preparação contém uma grande quantidade desta proteína (da ordem de 200 vezes com relação à proteína de interesse), que é adicionada para funcionar como estabilizante. Este fato cria uma dificuldade muito grande para a utilização desta preparação como padrão em caracterizações físico-químicas, além de sua disponibilidade ser apenas em quantidades extremamente pequenas (8,8 µg/ampola).

Na Figura 7, são mostrados os perfis cromatográficos das três preparações de hCG, sendo a preparação recombinante (Fig. 7 B) a mais pura delas. O pico observado entre 40 e 50 minutos na preparação WHO corresponde à HSA, também presente nesta preparação funcionando como estabilizante.

Figura 6 – Perfil em RP-HPLC: (A) pH-LH-NOR (4 µg); (B) rhLH-Luveris (2 µg); (C) rhLH-WHO 96/602 (1,1 µg).

Figura 7 – Perfil em RP-HPLC: (A) uhCG-Choriomon (5 µg); (B) rhCG-Ovidrel (5 µg); (C) uhCG-WHO 75/589 (5 µg).

4.3 Validação do método de RP-HPLC

4.3.1 Linearidade

Os parâmetros da curva dose-resposta estabelecida para a quantificação de hLH por RP-HPLC são mostrados na Tabela 6. Um coeficiente de correlação altamente significativo ($p < 0,0001$) demonstrou a linearidade de resposta no intervalo analisado.

Tabela 6 - Parâmetros de linearidade na determinação de hLH, por RP-HPLC.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade (μg)	0,14 – 8,0
Inclinação (b) $\pm$ desvio padrão	959,4 $\pm$ 14,02
Intercepto (a) $\pm$ desvio padrão	- 27,6 $\pm$ 45,05
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
nº de determinações	20

4.3.2 Precisão

A Tabela 7 mostra a variabilidade da quantificação por RP-HPLC de uma mesma amostra de hLH, em 5 determinações realizadas intra-dia. A precisão intra-dia, avaliada pelo desvio padrão relativo, foi de 0,72%.

Tabela 7 - Determinação intra-dia de uma mesma amostra de hLH, por RP-HPLC (n=5).

Corrida #	Quantidade de hLH determinada (μg)
1	0,274
2	0,278
3	0,276
4	0,276
5	0,275
M $\pm$ DP	0,276 $\pm$ 0,002
DPR (%)	0,72 %

A variabilidade da quantificação por RP-HPLC de três amostras com níveis diferentes de hLH, em diferentes dias é mostrada na Tabela 8. A precisão inter-dia, avaliada pelo desvio padrão relativo, foi $< 1,4\%$.

Tabela 8 - Determinação inter-dia de amostras com níveis diferentes de hLH, por RP-HPLC (n=3).

Ensaio #	Quantidade de hLH determinada (μg)		
	A	B	C
1	0,148	2,208	4,402
2	0,150	2,209	4,407
3	0,152	2,210	4,406
M $\pm$ DP	0,15 $\pm$ 0,002	2,21 $\pm$ 0,001	4,41 $\pm$ 0,003
DPR (%)	1,33	0,05	0,07

4.3.3 Exatidão

Uma recuperação média de $99,7 \pm 3,04$ %, com desvio padrão relativo de 3% (n = 7), foi observada na determinação do pH-LH-NOR, demonstrando a exatidão da metodologia de RP-HPLC (Tabela 9).

Tabela 9 – Teste de recuperação de quantidades conhecidas de hLH quantificadas por RP-HPLC.

Quantidade de hLH adicionada (μg)	Quantidade de hLH determinada ^a (μg)	DPR (%)	Recuperação (%)
0,14	$0,148 \pm 0,002$	1,35	105,7
0,28	$0,277 \pm 0,003$	1,08	98,9
0,56	$0,557 \pm 0,002$	0,36	99,5
1,1	$1,11 \pm 0,003$	0,27	100,9
2,3	$2,21 \pm 0,001$	0,05	96,1
4,5	$4,41 \pm 0,003$	0,07	98,0
8,0	$7,88 \pm 0,003$	0,04	98,5

^a Determinada por RP-HPLC (n=3 determinações)

4.3.4 Sensibilidade

A dose mínima detectável calculada de acordo com a formulação de Rodbard (1978) foi de 34,1 ng. A exatidão desta determinação foi confirmada experimentalmente tendo sido obtido, em dois ensaios, um valor médio de $32,2 \pm 0,64$ ng e desvio padrão relativo de 1,98%.

4.4 Análise quantitativa

Para a análise quantitativa por RP-HPLC, utilizamos a preparação rhLH-WHO 96/602 como padrão referência. Foi necessário para isto, entretanto, estabelecer um fator de correção (f.c.) que levasse em conta a perda de área correspondente àquela coberta pela HSA que, como já mencionado, está presente nesta preparação. Este fator foi estabelecido comparando a área do rhLH-WHO 96/602 com a área da preparação comercial rhLH-Luveris, que é extremamente pura, e estabelecendo a perda que se tem ao considerar apenas a área assinalada na Figura 6 C. Com uma estatística de $n=5$ determinações, o fator de correção a ser aplicado às áreas obtidas experimentalmente para o padrão do rhLH-WHO 96/602 é de: $f.c. = 1,18 \pm 0,061$, $DPR=5,2\%$.

Usando este fator de correção juntamente com a determinação direta foi possível estabelecer um parâmetro interno de referência de potência, em unidades de área/ μ g, para as diferentes preparações analisadas de hLH e hCG (Tabela 10). Para uma intercomparação entre as diferentes preparações foi determinado o conteúdo de proteína total das mesmas por BCA, com exceção das preparações WHO, em virtude da presença de HSA, sendo neste caso considerado o conteúdo protéico declarado.

Tabela 10 – Potência em área/μg de diferentes preparações de hLH e hCG, analisadas por RP-HPLC.

Preparação	Proteína Total (μg/ampola)	Área (ua/ampola)	Potência área/μg	Nº de determinações
phLH NIDDK	3,18 ^a	1924 ± 182	605 ± 57,4	16
phLH NOR	5,48 ^a	3820 ± 447	696 ± 81,5	11
rhLH WHO 96/602	8,80 ^b	8511 ± 398	967 ± 36,6	9
rhLH LUVERIS	3,00 ^a	2969 ± 212	990 ± 70,6	8
rhCG OVIDREL	272 ^a	227553 ± 17913	837 ± 66,4	5
uhCG CHORIOMON	375 ^a	266033 ± 16329	709 ± 44,0	9
uhCG WHO 75/589	70 ^b	43503 ± 2489	621 ± 35,6	3

^a Determinada por BCA

^b Declarado pelo fabricante

As preparações recombinantes apresentaram uma maior potência, tanto para o hLH quanto para o hCG, sendo observada uma potência média interpreparações de $931 \pm 82,5$ ua/ μ g (DPR = 8,9%). Este parâmetro foi utilizado para a normalização da curva padrão construída com a preparação phLH-NOR. Por razões práticas, a quantificação de hCG utilizou os mesmos parâmetros de potência estabelecidos para o hLH, assumindo que ambos os hormônios purificados tem aproximadamente a mesma absorvância específica em 220 nm, fato este confirmado pelos dados apresentados na Tabela 10.

Utilizando então como padrão de referência a preparação rhLH-WHO 96/602 obtivemos, em cinco ensaios independentes, a quantificação das amostras de hLH e de hCG apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Quantificações de diferentes preparações de hLH e de hCG por BCA e por RP-HPLC.

Preparação	Conteúdo protéico µg/ampola	Conteúdo de hLH/hCG^b µg/ampola	Fração de massa
phLH NIDDK	3,18 ^a	2,37 ± 0,37	0,75
phLH NOR	5,48 ^a	4,17 ± 0,44	0,76
rhLH LUVERIS	3,00 ^a	3,02 ± 0,21	1,01
rhCG OVIDREL	272 ^a	237 ± 18,7	0,87
uhCG CHORIOMON	375 ^a	277 ± 17,0	0,74
uhCG WHO 75/589	70 ^c	45,7 ± 2,2	0,65

^a Determinado por BCA

^b Determinado por RP-HPLC

^c Declarado pelo fabricante

Observamos uma fração de massa de 100 % somente para a preparação recombinante comercial de hLH (Luveris), uma preparação recombinante do mesmo fabricante que aquela utilizada pelo NIBSC-WHO para preparar o Padrão Internacional (NIBSC “Technical Sheet on” rhLH-WHO 96/602, 18/01/2008). As demais preparações de hLH e hCG apresentaram frações de massa que variaram de 65 – 87 %.

Comparando o conteúdo protéico por nós calculado por BCA com aquele declarado pelo fabricante (com exceção do uhCG-Choriomon que não declara seu conteúdo protéico) observa-se um perfeito acordo para a preparação rhLH-Luveris. Para as preparações phLH-NOR e rhCG-Ovidrel foram observadas diferenças de ~ 10%. O conteúdo declarado de proteína total da preparação phLH-NIDDK foi, entretanto, – 36% do conteúdo estimado por BCA. Com relação à preparação uhCG-

WHO 75/589 não foi possível a comparação, uma vez que a presença de HSA torna a determinação por BCA inútil.

A biopotência das preparações de hLH e de hCG foi também calculada (Tabela 12). Novamente, observa-se a maior potência das preparações recombinantes, uma bioatividade média interpreparações de 23.466 ± 1.789 IU/mg (DPR = 7,6 %). A preparação uhCG WHO 75/589 foi a que apresentou a menor biopotência.

Tabela 12 – Biopotência de hLH e de hCG nas preparações homogêneas.

Preparação	Conteúdo UI/ampola^a	Biopotência UI/mg
rhLH WHO 96/602	189	21.477 ^b
rhLH LUVERIS	75	25.000 ^c
uhCG WHO 75/589	650	9.286 ^b
uhCG CHORIOMON	5.000	13.333 ^c
rhCG OVIDREL	6.500	23.897 ^c

^a Declarado pelo fabricante

^b Calculado com base no conteúdo de proteína total declarado

^c Calculado com base na determinação por BCA

4.5 Análise de outras preparações contendo hLH

Analizamos também neste trabalho a Gonadotrofina Menopausal Humana (hMG), uma preparação urinária usada clinicamente, que contém atividade biológica de hLH e hFSH. As condições anteriormente estabelecidas para analisar hLH e hCG não se mostraram apropriadas para a análise destas amostras, uma vez que, sob estas condições, o hFSH se dissocia. Isto era de se esperar, baseado em trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório por Loureiro e colaboradores (2006) que aponta a necessidade de uma condição mais alcalina para manter a integridade do hFSH. Alterando parâmetros do gradiente, tempo de corrida e solução da fase móvel, a seguinte condição de eluição foi estabelecida para a análise deste tipo de amostra heterogênea: gradiente linear de 15 - 60% de acetonitrila em fosfato de amônio 0,05M pH 8,6, durante 40 minutos seguida de eluição isocrática de 60% de acetonitrila, durante 10 minutos. Nestas condições, as preparações puras de hLH, hFSH e hCG eluíram com os seguintes tempos de retenção, em 3 determinações: hFSH: $22,55 \pm 0,181$ minutos; hCG: $34,61 \pm 0,221$; hLH: $38,04 \pm 0,241$. Os tempos de retenção correspondentes às três preparações puras apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$).

O perfil cromatográfico do Padrão Internacional de uhMG-WHO 98/704 sob esta condição de eluição, é mostrado na Figura 8. A atividade biológica das frações assinaladas neste cromatograma foi avaliada. A fração coletada entre 22 a 29 minutos apresentou atividade biológica de hFSH, enquanto aquela entre 32 a 39 minutos apresentou atividade de hLH. Os tempos de retenção em que eluem as preparações puras de hFSH, hLH e de hCG (indicados por flechas na Figura 8) e também os dados dos ensaios biológicos, sugerem que a preparação uhMG-WHO 98/704 contém hFSH, hCG e hLH, este último em quantidade bem menor do que o hCG. Esta conclusão está de acordo com os dados reportados por Van de Weijer e colaboradores (2003) na análise, por métodos físico-químicos e imunológicos, de uma preparação de hMG.

Figura 8 – Perfil em RP-HPLC do uhMG-WHO 98/704.

■ Atividade Biológica de hFSH; □ Atividade Biológica de hLH

Três outras preparações heterogêneas comerciais foram também analisadas nesta condição e reforçam estas conclusões (Tabela 13 e Figura 9). O pico com atividade biológica de hFSH eluiu, nas preparações de hMG analisadas, no intervalo de 22,70 a 24,29 minutos, um valor médio de 23,6 minutos, enquanto os picos com atividade biológica de hLH eluíram no intervalo de 33,74 a 37,38 minutos, sendo um pico de hCG com tempo de retenção médio de 34,4 minutos e um pico de hLH com tempo de retenção médio de 37,4 minutos. Nas preparações comerciais analisadas, somente na preparação Menogon foi possível identificar o provável pico de hLH (Figura 9 C).

Tabela 13 - Variação interensaio dos t_R obtidos para hFSH, hCG e hLH presentes nas preparações de hMG, analisadas por RP-HPLC.

Preparação	Tempo de Retenção ^a		
	(min)		
	hFSH	hCG	hLH
uhMG-WHO 98/704	24,29 ± 0,221	33,74 ± 0,166	37,38 ± 0,208
uhMG-MENOPUR	22,70 ± 0,333	34,28 ± 0,294	
uhMG-MERIONAL	23,08 ± 0,675	34,35 ± 0,221	
uhMG-MENOGON	24,21 ± 0,179	35,26 ± 0,239	37,36 ± 0,035
Média interpreparações	23,57 ± 0,80	34,41 ± 0,63	37,37 ± 0,014
DPR^b	3,4 %	1,8 %	0,04 %

^a Média ± desvio padrão (n=3 ensaios independentes)

^b Desvio Padrão Relativo

Figura 9 – Perfil em RP-HPLC das preparações comerciais de uhMG: (A) uhMG-Menopur; (B) uhMG-Merional; (C) uhMG-Menogon.

■ Atividade Biológica de hFSH; □ Atividade Biológica de hLH

4.5.1 Análise quantitativa de diferentes preparações de hMG

A quantificação das quatro preparações de hMG analisadas por RP-HPLC, foi realizada mediante 3 ensaios independentes (Tabela 14). Utilizamos como Padrão referência as preparações recombinantes hLH WHO 96/602, para quantificar o conteúdo de hLH e/ou hCG nos picos com atividade biológica de hLH, e hFSH WHO 96/642, para quantificar o conteúdo de hFSH nos picos com atividade biológica de hFSH.

Tabela 14 – Quantificação de diferentes preparações de hMG, por BCA e por RP-HPLC, em 3 determinações.

Preparação	Conteúdo protéico ^a	Conteúdo de hFSH ^b	Conteúdo de hLH/hCG ^b	Conteúdo de hFSH + hLH/hCG ^b	Fração de gonadotrofina
	µg/ampola				
WHO 98/704	909	216	146	362	0,40
MENOPUR	30,4	4,9	8,2	13,1	0,43
MERIONAL	30,7	7,1	4,7	11,9	0,38
MENOGON	459	111	47	158	0,34

^a Determinado por BCA

^b Determinado por RP-HPLC

Todas as preparações de hMG apresentaram uma fração de gonadotrofina similar (34 – 43%), inferior àquela obtida para as preparações homogêneas, embora o conteúdo protéico destas preparações seja bem variável. Ressaltamos que todas as preparações heterogêneas declaram um conteúdo de 75 UI hFSH + 75UI hLH por ampola, apresentando entretanto um conteúdo protéico que varia de 30,4 a 909 µg/ampola e portanto uma potência variando de 77 a 2.467 UI/mg, potências estas bastante distantes daquelas das preparações recombinantes (23.466 UI/mg) (Tabela 15). Salientamos ainda que a proteína total destas preparações foi determinada por BCA. Apenas duas das preparações estudadas (WHO 98/704 e Menopur) declaram o conteúdo de proteína total, sendo estes +6 e +18%, respectivamente, dos conteúdos estimados por nós, por BCA. Sob a presente condição de eluição não pôde ser realizada a validação da análise quantitativa das preparações heterogêneas.

Tabela 15 – Biopotência de hLH/hCG nas preparações heterogêneas.

Preparação	Conteúdo UI/ampola^a	Biopotência UI/mg ^b
uhMG-WHO 98/704	70	77
uhMG-MENOPUR	75	2.467
uhMG-MERIONAL	75	2.443
uhMG-MENOGON	75	163

^a Declarado pelo fabricante

^b Calculado com base na determinação por BCA

5 DISCUSSÃO

Este trabalho descreve duas condições específicas de eluição da RP-HPLC para análise qualitativa e quantitativa de diferentes preparações de hLH e hCG e de suas subunidades α e β e a intercomparação entre preparações de diferentes origens, recombinante e natural (hipofisária e urinária). Foram analisadas sete preparações homogêneas e quatro preparações heterogêneas (hMG) contendo estes hormônios. Ambas as condições permitiram uma separação adequada das formas heterodiméricas destes hormônios.

Diferentes condições de eluição em RP-HPLC foram estabelecidas por diversos autores, nos últimos 25 anos, para o isolamento e a análise de subunidades e de formas heterodiméricas do TSH (Tireotrofina), FSH, LH e CG (Ribela, 2006). Os trabalhos pioneiros de Bristow e colaboradores (1983), que descreveram pela primeira vez a detecção do hTSH heterodimérico por RP-HPLC, e de Parsons e colaboradores (1984), que estabeleceram as condições de eluição para a análise das subunidades dissociadas destes hormônios, serviram de base para trabalhos posteriores em que diferentes tipos de gradientes para detectar também as formas heterodiméricas de TSH, LH e CG foram estudados (Hiyama, 1990; Chlenov, 1993;

Oliveira, 2003; Oliveira, 2007, Carvalho, 2009). As condições estabelecidas no presente trabalho foram conseguidas alterando a fase móvel e o gradiente (duração e inclinação) adotados para a RP-HPLC em trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório para o hTSH (Oliveira, 2003), para o hFSH (Loureiro, 2006) e para as subunidades dos hormônios glicoprotéicos (Carvalho, 2009). Foi necessário estabelecer condições diferentes para a análise das amostras homogêneas e heterogêneas, porque no caso das últimas há também a presença de hFSH e este, quando analisado nas condições adequadas para hLH e hCG, dissocia-se. A este respeito, enfatizamos que apenas Loureiro e colaboradores (2006) tiveram sucesso na separação, identificação e análise do hFSH heterodimérico.

A condição cromatográfica estabelecida para análise das preparações homogêneas de hLH e hCG permitiu uma boa separação entre a forma heterodimérica e as subunidades correspondentes. Enquanto no caso do hCG a diferença entre o t_R do heterodímero e da subunidade α ou β foi de $\sim 5\%$, no caso do hLH a diferença foi maior (9 e 13%, respectivamente). Estas diferenças são da mesma ordem do que aqueles que pudemos inferir dos trabalhos de Hiyama e colaboradores (1990) e Chlenov e colaboradores (1993), onde diferenças de $\sim 8\%$ e 13 % foram obtidas para o hLH por Hiyama e Chlenov, respectivamente. No caso do hCG, Chlenov e colaboradores (1993) apresentaram estudos dos quais pudemos inferir uma diferença, de $\sim 3\%$. A capacidade da técnica de separar o heterodímero das subunidades, também evidenciada repurificando apenas a forma heterodimérica de uma preparação de hLH que apresentava subunidades livres, torna possível a

identificação direta destas impurezas, cuja ausência precisa ser demonstrada em produtos farmacêuticos.

A diferença significativa encontrada na hidrofobicidade das subunidades α do hLH e do hCG, que teoricamente são iguais, confirmou dados reportados na literatura sobre o diferente padrão de glicosilação destas, que difere para os diferentes hormônios na quantidade relativa de determinadas estruturas de carboidratos. Por exemplo, na subunidade α CG os oligossacarídeos triantenários são bastante raros, enquanto no α LH eles são tão abundantes quanto as estruturas biantenárias (Hartree, 1992; Amoresano, 1996).

A alta sensibilidade da metodologia aqui descrita em detectar diferenças estruturais mínimas ficou evidenciada também na análise da subunidade β do r hCG, que apresentou duas isoformas, que provavelmente refletem a perda em uma delas de um glicano de ligação N, como reportado por Van de Weijer e colaboradores (2003) quando analisaram o mesmo hormônio em SDS-PAGE. Salientamos que para a obtenção das subunidades de r hCG, utilizamos a metodologia de dissociação e caracterização, desenvolvida em recente trabalho (Carvalho, 2009).

Ao analisar as sete preparações de hLH e hCG listadas na Tabela 5, observamos que as preparações recombinantes possuem uma hidrofobicidade significativamente diferente das preparações naturais (hipofisárias, no caso do hLH e urinária, no caso do hCG). Comportamento análogo foi também descrito por Oliveira e colaboradores (2003) e Damiani e colaboradores (2009), para o hTSH e por

Loureiro e colaboradores (2006), para o hFSH. Estas diferenças devem estar relacionadas com diferenças de carboidratos existentes nestas preparações de origens diferentes. Diferença significativa também foi observada na hidrofobicidade do hLH e do hCG, sendo o hLH o mais hidrofóbico, confirmando dados reportados por Chlenov e colaboradores (1993).

A validação da metodologia de RP-HPLC desenvolvida neste trabalho para amostras homogêneas de hLH e de hCG mostra um alto grau de exatidão, precisão, linearidade e sensibilidade. O excelente limite de detecção (34 ng) calculado pela formulação de Rodbard foi confirmado, na prática, por um teste de recuperação.

Quando preparações homogêneas de hLH e de hCG de diferentes origens foram comparadas, foi confirmada a maior pureza das três preparações recombinantes, como esperado. Isto nos permitiu definir um parâmetro interno de potência, expresso em unidades de área/ μg , o qual permitiu quantificações com aceitável exatidão. Apenas as preparações recombinantes de hCG e de hLH apresentaram uma fração de massa da ordem de 0,9 – 1,0, enquanto para as preparações naturais esta foi da ordem de 0,75. O Padrão Internacional de uhCG WHO 75/589 foi aparentemente a preparação menos pura de todas, provavelmente por tratar-se de material antigo e mais impuro, preparado exclusivamente para bioensaios *in vivo*. Isto pode ser inferido também a partir da potência declarada e da biopotência calculada (Tabela 14), que é bastante inferior àquela das três

preparações recombinantes, confirmando portanto, a sua pureza e potência superiores.

É difícil realizar testes de validação para a quantificação das preparações heterogêneas de hMG, análogos aos realizados para as amostras homogêneas. No caso das amostras heterogêneas os dados da RP-HPLC tem maior importância do ponto de vista qualitativo. Entretanto, foi encontrado um acordo razoável na fração de gonadotrofina das preparações comerciais de hMG e no Padrão de Referência (0,3 – 0,4), independente da potência declarada de hLH, que variou aproximadamente 30 vezes. É interessante também comentar o acordo razoável entre o conteúdo declarado de proteína total, quando disponível, e o determinado por nós, por BCA, acordo este inclusive interlaboratorial e inter-lotes: no caso da preparação de uhMG Menopur, por exemplo, Giudice e colaboradores (2001) encontraram um valor médio de conteúdo protéico para esta preparação de 33 µg/ampola, estimado por Bradford, enquanto a nossa determinação por BCA foi de 30,4 µg/ampola. Nas análises de diferentes preparações de uhMG verificou-se que a presença de hLH só é evidenciada na preparação uhMG-WHO 98/704 e uhMG-Menogon. Nas outras duas (uhMG-Menopur e uhMG-Merional), se há hLH ele está provavelmente coberto pelo pico de proteína maior, que corresponde à hCG. Relatos na literatura também referem-se a não detectabilidade do hLH à adição de hCG para compensar a baixa atividade de hLH, em amostras de hMG (Rodgers, 1992; Stokman, 1993; Duijkers, 1997; Giudice, 2001; Van de Weijer, 2003). A condição estabelecida para a análise

das amostras heterogêneas conseguiu, portanto, a discriminação das três formas heterodiméricas (hFSH, hCG e hLH) que compõe este tipo de preparação.

Nas preparações uhMG-Menopur e uhMG-Merional, a quantidade de hCG determinada por RP-HPLC (8,2 e 4,7 µg), considerando o conteúdo declarado de 75 IU de hLH/ampola, resulta em potência de ~ 9.100 e 15.000 IU/mg respectivamente, o que é uma boa indicação da adição de hCG puro. Entretanto, não é fácil explicar a evidência de picos de hCG para as preparações uhMG-WHO 98/704 e uhMG-Menogon, isto é, em produtos cujas potências são 15 – 50 vezes menores do que a potência do hCG puro. Uma possível explicação é que o material adicionado é um extrato cru, com impurezas que tem aproximadamente a mesma hidrofobicidade do hCG.

Cabe ainda comentar sobre a grande dificuldade destes tipos de estudos físico-químicos no que se refere à disponibilidade de padrões de referência. Preparações com pureza adequada, homogeneidade e quantidade de material suficiente são necessários para o desenvolvimento e aplicação destes testes, que cada vez mais estão sendo introduzidos por Agências Reguladoras e pelas Farmacopéias para a substituição dos ensaios biológicos *in vivo*, cujo custo e imprecisão são bem conhecidos (Miethe, 2002; Longstaff, 2009).

Enfatizamos ainda o fato que os hormônios aqui estudados, especialmente os recombinantes, são muito utilizados na prática clínica, seja em

diagnóstico ou terapia e, portanto, o estrito controle físico-químico destes produtos é um pré-requisito para assegurar a sua identidade e eficácia, o presente trabalho contribuindo nesta direção.

Os resultados do presente trabalho foram submetidos à Journal of Chromatography A.

6 CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se e validou-se uma condição específica de RP-HPLC que permitiu a análise qualitativa e quantitativa de sete preparações homogêneas de hLH, hCG e de suas subunidades, de diferentes origens.
- Estabeleceu-se uma escala de hidrofobicidade relativa: α -hCG < α -hLH < hCG < hLH < β -hCG < β -hLH.
- Estabeleceu-se uma segunda condição de RP-HPLC para análise qualitativa de quatro preparações heterogêneas de hMG, de origem urinária.
- Detectou-se a presença de hCG nas preparações de hMG.
- Realizou-se a quantificação de diferentes gonadotrofinas nas preparações heterogêneas, embora com limitações de exatidão.
- O presente trabalho contribui para o controle de qualidade destas preparações de uso farmacêutico, garantindo sua identidade, segurança e eficácia terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, n.1, p.3-11, 2007.

AMORESANO, A.; SICILIANO, R.; ORRU, S.; NAPOLEONI, R.; ALTAROCCA, V.; DE LUCA, E.; SIRNA, A.; PUCCI, P. Structural characterisation of human recombinant glycohormones follitropin, lutropin and choriogonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells. **Eur. J. Biochem.**, v.242, n.3, p.608-18, 1996.

BAER, L. G.; LOUMAYE, E. Comparison of recombinant human luteinising hormone (r-hLH) and human menopausal gonadotropin (hMG) in assisted reproductive technology. **Curr. Med. Resear. Opin.**, v.19, n.2, p.83-88, 2003.

BASAK, A. K.; RAW, A. S.; AL HAKIM, A. H.; FURNESS, S.; SAMAAAN, N. I.; GILL, D. S.; PATEL, H. B.; POWERS, R. F.; YU, L. Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, n.1, p.64-72, 2007.

BIRKEN, S.; KOVALEVSKAYA, G.; O'CONNOR, J. Metabolism of hCG and hLH to multiple urinary forms. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.125, n.1-2, p.121-31, 1996 a.

BIRKEN, S.; MAYDELMAN, Y.; GAWINOWICZ, M. A.; POUND, A.; LIU, Y.; HARTREE, A. S. Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin. **Endocrinology**, v.137, n.4, p.1402-11, 1996 b.

BIRKEN, S.; MAYDELMAN, Y.; GAWINOWICZ, M. A. Preparation and analysis of the common urinary forms of human chorionic gonadotropin. **Methods**, v.21, n.1, p.3-14, 2000.

BOUGNERES, P.; FRANCOIS, M.; PANTALONE, L.; RODRIGUE, D.; BOUVATTIER, C.; DEMESTEERE, E.; ROGER, D.; LAHLOU, N. Effects of an early postnatal treatment of hypogonadotropic hypogonadism with a continuous subcutaneous infusion of recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.93, n.6, p.2202-2205, 2008.

BRISTOW, A. F.; WILSON, C.; SUTCLIFFE, N. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of human thyroid-stimulating hormone. **J. Chromatogr.**, v.270, p.285-92, 1983.

BRITISH Pharmacopeia, London:The Stationery office, 2007.

CAGLAR, G. S.; ASIMAKOPOULOS, B.; NIKOLETTOS, N.; DIEDRICH, K.; AL-HASANI, S. Recombinant LH in ovarian stimulation. **Reprod. Biomed. Online**, v.10, n.6, p.774-785, 2005.

CARVALHO, C. M.; OLIVEIRA, J. E.; ALMEIDA, B. E.; UEDA, E. K. M.; TORJESEN, P. A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Efficient isolation of the subunits of recombinant and pituitary glycoprotein hormones. **J. Chromatogr. A**, v.1216, n.9, p.1431-1438, 2009.

CHLENOV, M. A.; KANDYBA, E. I.; NAGORNAYA, L. V.; ORLOVA, I. L.; VOLGIN, Y. V. High-Performance Liquid-Chromatography of Human Glycoprotein Hormones. **J. Chromatogr.**, v.631, n.1-2, p.261-267, 1993.

COLE, L. A. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.7, p. 8-45, 2009.

COSTAGLIOLA, S.; NICCOLI, P.; FLORENTINO, M.; CARAYON, P. European collaborative study on luteinizing hormone assay: 2. Discrepancy among assay kits is

related to variation both in standard curve calibration and epitope specificity of kit monoclonal antibodies. **J. Endocrinol. Invest.**, v.17, n.6, p.407-16, 1994.

DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J. E.; VORAUER-UHL, K.; PERONI, C. N.; VIANNA, E. G.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing alpha 2,6-sialyltransferase. **Protein Expr. Purif.**, v.67, n.1, p.7-14, 2009.

DANTUS, M. High-performance liquid chromatography in the pharmaceutical industry: Application, validation, and regulatory issues under the PAT framework. **Adv. Chromatogr.**, v.44, p.237-256, 2006.

DE PLACIDO, G.; ALVIGGI, C.; PERINO, A.; STRINA, I.; LISI, F.; FASOLINO, A.; DE PALO, R.; RANIERI, A.; COLACURCI, N.; MOLLO, A.; RECOMBIN, I. C. G. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. **Hum. Reprod.**, v.20, n.2, p.390-396, 2005.

DHILLON, S.; KEATING, G. M. Lutropin alfa. **Drugs**, v.68, n.11, p.1529-1540, 2008.

DUIJKERS, I. J.; KLIPPING, C.; MULDER, T. M.; OUT, H. J.; COELINGH BENNINK, H. J.; VEMER, H. M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics after repeated subcutaneous administration of three gonadotrophin preparations. **Hum. Reprod.**, v.12, n.11, p.2379-84, 1997.

DURNERIN, C. I.; ERB, K.; FLEMING, R.; HILLIER, H.; HILLIER, S. G.; HOWLES, C. M.; HUGUES, J. N.; LASS, A.; LYALL, H.; RASMUSSEN, P.; THONG, J.; TRAYNOR, I.; WESTERGAARD, L.; YATES, R.; GRP, L. P. Effects of recombinant LH treatment on folliculogenesis and responsiveness to FSH stimulation. **Hum. Reprod.**, v.23, n.2, p.421-426, 2008.

EUROPEAN Pharmacopeia. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.

FAUSER, B. C. J. M.; MANNAERTS, B. M. J. L.; DEVROEY, P.; LEADER, A.; BOIME, I.; BAIRD, D. T. Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. ***Hum. Reprod. Update***, v.15, n.3, p.309-321, 2009.

FISCHER, R.; BAIRD, D.; BOSCH, E.; HUGUES, J. N.; HUMAIDAN, P.; LUDWIG, M.; SHOHAM, Z.; WESTERGAARD, L. Understanding the role of LH: myths and facts. ***Reprod. Biomed. Online***, v.15, n.4, p.468-477, 2007.

FONJALLAZ, P.; LOUMAYE, E. Glucagon rDNA origin (GlucaGen (R)) and Recombinant LH (No. 12 in a series of articles to promote a better understanding of the use of genetic engineering). ***J. Biotechnol.***, v.79, n.2, p.185-189, 2000.

GADKARI, R.; DESHPANDE, R.; DIGHE, R. R. Hyperexpression and purification of biologically active human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin using the methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. ***Protein. Expr. Purif.***, v.32, n.2, p.175-84, 2003.

GIUDICE, E.; CRISCI, C.; ALTAROCCA, V.; O'BRIEN, M. Characterisation of a partially purified human menopausal gonadotropin preparation. ***J. Clin. Research***, v.4, p.27-34, 2001.

GIUDICE, E.; GIARTOSIO, C. E. Physico-chemical differences between recombinant LH Luveris (R) vs hMG. ***Fertil. Steril.***, v.78, n.3, p.S195-S195, 2002.

HARA, K.; RATHNAM, P.; SAXENA, B. B. Structure of Carbohydrate Moieties of Alpha-Subunits of Human Follitropin, Lutropin, and Thyrotropin. ***J. Biol. Chem.***, v.253, n.5, p.1582-1591, 1978.

HARTREE, A. S.; RENWICK, A. G. C. Molecular-Structures of Glycoprotein Hormones and Functions of Their Carbohydrate Components. **Biochem. J.**, v.287, p.665-679, 1992.

HIYAMA, J.; RENWICK, A. G. C. Separation of Human Glycoprotein Hormones and Their Subunits by Reversed-Phase Liquid-Chromatography. **J. Chromatogr.**, v.529, n.1, p.33-41, 1990.

HOERMANN, R.; SPOETTL, G.; BERGER, P.; MANN, K. Immunoreactive Human Chorionic-Gonadotropin Beta-Core Fragment in Human Pituitary. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v.103, n.5, p.324-331, 1995.

HOWLES, C. M. Role of LH and FSH in ovarian function. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.161, n.1-2, p.25-30, 2000.

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use, “**Guidelines on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**”, 2005.

KALIA, V.; JADHAV, A. N.; BHUTANI, K. K. Luteinizing hormone estimation. **Endocr. Res.**, v.30, n.1, p.1-17, 2004.

KAUFMANN, R.; DUNN, R.; VAUGHN, T.; HUGHES, G.; O'BRIEN, F.; HEMSEY, G.; THOMSON, B.; O'DEA, L. S. L. Recombinant human luteinizing hormone, lutropin alfa, for the induction of follicular development and pregnancy in profoundly gonadotrophin-deficient women. **Clin. Endocrinol.**, v.67, n.4, p.563-569, 2007.

KOVALESKI, J.; KRAUT, B.; MATTIUZ, A.; GIANGIULIO, M.; BROBST, G.; CAGNO, W.; KULKARNI, P.; RAUCH, T. Impurities in generic pharmaceutical development. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, n.1, p.56-63, 2007.

KRYSTEK, S. R.; DIAS, J. A.; ANDERSEN, T. T. Identification of Subunit Contact Sites on the Alpha-Subunit of Lutropin. **Biochemistry**, v.30, n.7, p.1858-1864, 1991.

LAIDLER, P.; COWAN, D. A.; HIDER, R. C.; KEANE, A.; KICMAN, A. T. Tryptic Mapping of Human Chorionic-Gonadotropin by Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Mass-Spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.9, n.11, p.1021-1026, 1995.

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

LOUMAYE, E.; ENGRAND, P.; SHOHAM, Z.; HILLIER, S. G.; BAIRD, D. T.; GROUP, R. L. S. Clinical evidence for an LH 'ceiling' effect induced by administration of recombinant human LH during the late follicular phase of stimulated cycles in World Health Organization type I and type II anovulation. **Hum. Reprod.**, v.18, n.2, p.314-322, 2003.

LOUREIRO, R. F.; OLIVEIRA, J. E.; TORJESEN, P. A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Analysis of intact human follicle-stimulating hormone preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v.1136, n.1, p.10-8, 2006.

LUNENFELD, B. Historical perspectives in gonadotrophin therapy. **Hum. Reprod. Update**, v.10, n.6, p.453-467, 2004.

MARRS, R.; MELDRUM, D.; MUASHER, S.; SCHOOLCRAFT, W.; WERLIN, L.; KELLY, E. Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (follitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. **Reprod. Biomed. Online** v.8, p.175-182, 2003.

MIETHE, G. Possibilities of replacing and reducing animal tests in the pharmacopoeias: An evaluation of unused methods and proposals for change. **Atla-Altern. Lab. Anim.**, v.30, n.2, p.229-240, 2002.

MORBECK, D. E.; MADDEN, B. J.; MCCORMICK, D. J. Analysis of the Microheterogeneity of the Glycoprotein Chorionic-Gonadotropin with High-Performance Capillary Electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v.680, n.1, p.217-224, 1994.

NIKITAS, P.; PAPPA-LOUISI, A. Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v.1216, n.10, p.1737-1755, 2009.

OLIVEIRA, J. E.; MENDONCA, F.; PERONI, C. N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Determination of Chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v.787, n.2, p.345-355, 2003.

OLIVEIRA, J. E.; DAMIANI, R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Practical reversed-phase high-performance liquid chromatography method for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. **J. Chromatogr. A**, v.1164, n.1-2, p.206-11, 2007.

PARSONS, T. F.; STRICKLAND, T. W.; PIERCE, J. G. Rapid and Easy Separation of the Subunits of Bovine and Human Glycoprotein Hormones by Use of High-Performance Liquid-Chromatography. **Endocrinology**, v.114, n.6, p.2223-2227, 1984.

PERERA-MARIN, G.; MURCIA, C.; GONZALEZ-PADILLA, E. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: Characterization and physiological relevance. **Anim. Reprod. Sci.**, v.101, n.3-4, p.187-207, 2007.

RAO, C. V. Multiple novel roles of luteinizing hormone. **Fertil. Steril.**, v.76, n.6, p.1097-1100, 2001.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **J. Chromatogr. A**, v.1156, n.1-2, p.201-205, 2007.

RIBELA, M. T. C. P.; GOUT, P. W.; OLIVEIRA, J. E.; BARTOLINI, P. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Curr. Pharm. Anal.**, v.2, n.2, p.103-126, 2006.

RODBARD, D. Statistical Estimation of Minimal Detectable Concentration (Sensitivity) for Radioligand Assays. **Anal. Biochem.**, v.90, n.1, p.1-12, 1978.

RODGERS, M.; MITCHELL, R.; LAMBERT, A.; PEERS, N.; ROBERTSON, W. R. Human Chorionic-Gonadotropin Contributes to the Bioactivity of Pergonal. **Clin. Endocrinol.**, v.37, n.6, p.558-564, 1992.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr. A**, v.987, n.1-2, p.57-66, 2003.

SHOHAM, Z. Treatment of female infertility with recombinant human luteinising hormone: is there a benefit over other available drugs? **Expert Opin. Pharmacother.**, v.4, n.11, p.1985-1994, 2003.

SHOHAM, Z.; SMITH, H.; YEKO, T.; O'BRIEN, F.; HEMSEY, G.; O'DEA, L. Recombinant LH (lutropin alfa) for the treatment of hypogonadotrophic women with

profound LH deficiency: a randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-efficacy study. **Clin. Endocrinol.**, v.69, n.3, p.471-478, 2008.

STANTON, P. G.; POZVEK, G.; BURGON, P. G.; ROBERTSON, D. M.; HEARN, M. T. Isolation and characterization of human LH isoforms. **J. Endocrinol.**, v.138, n.3, p.529-43, 1993.

STANTON, P. G.; BURGON, P. G.; HEARN, M. T.; ROBERTSON, D. M. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.125, n.1-2, p.133-41, 1996.

STEELMAN, S. L.; POHLEY, F. M. Assay of the Follicle Stimulating Hormone Based on the Augmentation with Human Chorionic Gonadotropin. **Endocrinology**, v.53, n.6, p.604-616, 1953.

STOKMAN, P. G. W.; DELEEUW, R.; VANDENWIJNGAARD, H. A. G. W.; KLOOSTERBOER, H. J.; VEMER, H. M.; SANDERS, A. L. M. Human Chorionic-Gonadotropin in Commercial Human Menopausal Gonadotropin Preparations. **Fertil. Steril.**, v.60, n.1, p.175-178, 1993.

STORRING, P. L.; DAS, R. E. G. The fourth International Standard for Human Urinary FSH and LH: specificities of LH seminal vesicle weight gain assays in the collaborative study differ between laboratories. **J. Endocrinol.**, v.171, n.1, p.119-129, 2001.

The European Recombinant Human LH Study Group. Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: a dose-finding study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.83, n.5, p.1507-14, 1998.

The United States Pharmacopeia. 30. ed. Rockville: The United states Pharmacopeia Convention, 2007.

VAN DE WEIJER, B. H.; MULDER, J. W.; BOS, E. S.; VERHAERT, P. D.; VAN DEN HOOVEN, H. W. Compositional analyses of a human menopausal gonadotrophin preparation extracted from urine (menotropin). Identification of some of its major impurities. **Reprod. Biomed. Online**, v.7, n.5, p.547-57, 2003.

VAN DIJK, S.; WARD, D. N. Heterogeneity in porcine pituitary luteinizing hormone: amino acid and carbohydrate analysis. **Endocrinology**, v.130, n.4, p.1966-74, 1992.

WILKS, J. W.; BUTLER, S. S. Biologic Activity of Human Chorionic-Gonadotropin Following Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr.**, v.298, n.1, p.123-130, 1984.

ZACHARIS, C. K. Accelerating the quality control of pharmaceuticals using monolithic stationary phases: a review of recent HPLC applications. **J. Chromatogr. Sci.**, v.47, n.6, p.443-51, 2009.