

B4 - Identificação do IFN-alfa-2b através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Adherlene Viera Gouvêa^{1*}; Claudia Maria da Conceição¹; Anna Carolina Machado Marinho¹; Ozéias de Lima Leitão¹; Andreza Santos da Costa¹; Clarissa Fontes Lopes¹; Julio Cesar Queiroz Penha¹; Filipe Soares Quirino¹; Ana Beatriz de Oliveira Leite e Bragança¹; Juliana Estevão Porto¹

1 - INCQS

Introdução:

Os interferons (IFNs) são citocinas e são utilizados como medida terapêutica contra a infecção de vírus e outras doenças devido tanto à sua atividade antiviral quanto imunomodulatória. A classificação dos IFNs é definida de acordo com suas propriedades físicas e funcionais e o IFN- α pertence à classe I. O IFN- α tem efeito contra algumas viroses importantes, principalmente hepatite A, B e C. Em relação ao IFN- α apenas um subtipo (IFN- α -2) é utilizado para terapias. Os IFN-hr- α -2a e IFN-hr- α -2b são proteínas bioterapêuticas não glicosiladas contendo 165 aminoácidos e diferindo apenas pela presença de uma lisina e arginina na posição 23, respectivamente. Possuem duas pontes de dissulfeto e massa molar de aproximadamente 19,3 kDa. Para garantir a qualidade desse produto é necessária a realização de ensaios de controle de qualidade. Os ensaios de controle de qualidade em produto final dos medicamentos biológicos ainda representam um desafio, já que a maior parte deles são formulados junto com alguns excipientes que acabam por interferir nas metodologias de caracterização proteica. Desta forma, na farmacopeia brasileira (FB) não existe monografia para este tipo de produto somente recomendações de ensaios gerais, por outro lado na farmacopeia europeia (FE) encontra-se monografia para o interferon, porém somente para matéria prima, sendo recomendado os seguintes ensaios físico-químicos: focalização isoelétrica, mapa de peptídeos e SDS-PAGE.

Objetivo:

O objetivo deste trabalho foi identificar IFN- α -2b (produto final) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Metodologia:

Para a realização das análises foi utilizado um cromatógrafo líquido acoplado

a um espectrômetro de massas do fabricante Waters® Corporation. Modelo SY NAPT G2-S HDMS. Esse modelo é um equipamento híbrido com um analisador tipo quadrupolo, uma câmara de mobilidade iônica e um detector tempo de voo (“time-of-flight – TOF”). O ensaio para avaliação da proteína intacta foi realizado com a injeção de cinco amostras em uma coluna de dessalinização e analisadas no espectrômetro de massas no modo MS.

Resultados:

Foram identificadas em todas as amostras o IFN- α -2b mesmo com a presença da albumina na formulação. Os íons formados pela albumina, na fonte de ionização, poderiam interferir no conjunto de íons provenientes do IFN- α -2b. No entanto foi possível diferenciar ambos os sinais e identificar ambas as moléculas com erros de 13,5 a -13,7 ppm na definição da massa molar experimental. Os resultados em massa molar encontrada variaram de 19265.8633 Da a 9265.8945 Da (massa molar teórica 19265.0098 Da). A duração do ensaio foi de apenas 10 minutos com a injeção da amostra sem tratamento.

Conclusão:

Com a utilização da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi possível confirmar a identidade de todas as amostras de IFN-a-2b na presença da albumina mediante ferramentas de bioinformática. Desta forma a vantagem de utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é tanto para a definição da massa molar do IFN - α -2b quanto para a caracterização de isoformas no produto final sem um tratamento prévio em apenas uma análise. Estes resultados demonstraram a potencialidade da técnica, como uma importante ferramenta na análise de medicamentos biológicos podendo futuramente ser sugerida a Farmacopeia Brasileira como uma potencial metodologia de identificação não só de interferon, mas também de outros medicamentos biológicos.

Palavras-Chave: Interferon, espectrometria de massas