



# Identificação do IFN- $\alpha$ -2b através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

GOUVÊA\*, A. V.; CONCEIÇÃO\*, C. M.; MARINHO\*, A. C. M.; LEITÃO\*, O. L.; PENHA\*, J. C. Q.; COSTA\*, A. S.; LOPES\*, C. F.; PORTO, J. E.; BRAGANÇA, A. B. O. L.; SILVA\*, F. Q.

\*FIOCRUZ – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Departamento de Química (DQ) – Laboratório de Biológicos e Artigos para a Saúde (LBAS) – Setor de Produtos Biológicos. e-mail: [adherlene.gouvea@incqs.fiocruz.br](mailto:adherlene.gouvea@incqs.fiocruz.br)

## 1. 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. Os IFN-hr- $\alpha$ -2a e IFN-hr- $\alpha$ -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. 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 IFN- $\alpha$ , porém somente para matéria-prima, sendo recomendado os seguintes ensaios físico-químicos: focalização isoelétrica, mapa de peptídeos e SDS-PAGE.

## 2. Objetivo

Identificar IFN- $\alpha$ -2b (produto final) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

## 3. Metodologia

Para a realização das análises foi utilizado um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas do fabricante Waters® Corporation. Modelo SYNAPT 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. Na figura 1 encontra-se a sequência de aminoácidos do IFN- $\alpha$ -2b e na tabela 1 as condições operacionais do equipamento.

Figura 2. Sequência e estrutura do IFN- $\alpha$ -2b.

CDLPQTHSLG	SRRTIMLLAQ	MRX <sub>1</sub> ISLFSCL	KDRHDFGFQ
EFGNQFQKA	ETIPVLHEMI	QQIFNLFSTK	DSSAAWDET
LDFYFTELYQ	QLNDLEACVI	QGVGVETPL	MKEDSILAVR
KYFQRITLYL	KEKYSYPCAW	EVVRAEIMRS	FSLSTNLQES
LSRKE			

Designation	Residue at position 23 (X)
alfa-2a	Lys
alfa-2b	Arg



Tabela 1. Condições operacionais do equipamento no experimento de proteína intacta.

Cromatógrafo Líquido		Espectrômetro de Massas	
Modelo:	ACQUITY UPLC®	Modelo:	SYNAPT® G2-S HDMS
Fase A2:	Água + 0,1% Ácido Fórmico	Modo de ionização:	ESI +
Fase B2:	Acetonitrila + 0,1% Ácido Fórmico	Capilar:	3,2 kV
Gradiente:	10% - 45% B2 0,2 mL/min	Cone:	40 V
Tempo de Corrida:	10 min	Temperatura de Dessolvatação:	350 °C
Coluna:	MassPREP™ Micro Desalting	Temperatura da Fonte:	150 °C
Temperatura do forno:	80 °C	Gás de Dessolvatação (N <sub>2</sub> ):	800 L/h
Volume de injeção:	10 mL	Faixa de aquisição:	500 – 3000 m/z

## 4. Resultados

Foram identificadas em todas as amostras o IFN- $\alpha$ -2b mesmo com a presença da albumina na formulação através do experimento de proteína intacta. Os erros encontrados de massa molar experimental estão descritos na tabela 2. Nas figuras 2 e 3 encontram-se o espectro de íons formados pela albumina e pelo IFN- $\alpha$ -2b da amostra 1, respectivamente.

Tabela 2. Resultados do experimento de proteína intacta.

Amostra	Calculated Protein Mass (Da)	RT (Min)	Analyte Mass (Da)	Analyte Mass Error (ppm)
1 (3MUI)	19265,1543	4	19264,8906	-13,7
2 (10MUI)	19265,1543	4	19264,8633	-15,1
3 (5MUI)	19265,1543	4	19264,8945	-13,5
4 (10MUI)	19265,1543	4	19264,8926	-13,6
5 (3MUI)	19265,1543	4	19264,8887	-13,8

ppm = partes por milhão  $\Delta m/m \times 10^6$   
 $\Delta m$  = diferença entre a massa medida e a massa teórica  
 $m$  = massa teórica

Figura 3. Espectro de íons formados pela albumina na amostra 1.

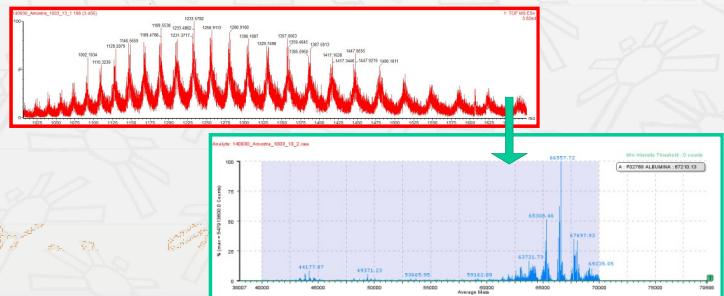
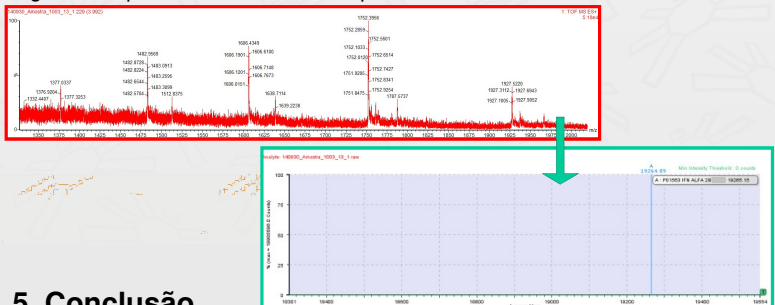


Figura 4. Espectro de íons formados pelo IFN- $\alpha$ -2b na amostra 1.



## 5. 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- $\alpha$ -2b na presença da albumina mediante ferramentas de bioinformática com o experimento de proteína intacta. A vantagem de utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é tanto para a definição da massa molar do IFN- $\alpha$ -2b quanto para a caracterização da sequência de aminoácidos da proteína 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 do IFN- $\alpha$ -2b, mas também de outros medicamentos biológicos.