

Sinéa Mendes de Andrade

**ANÁLISE DE INTERFERON HUMANO RECOMBINANTE PRESENTE EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**

PPGVS / INCQS
RIO DE JANEIRO
2010

Sinéa Mendes de Andrade

**ANÁLISE DE INTERFERON HUMANO RECOMBINANTE PRESENTE EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**

Mestrado Profissional
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras:

Dra. Cássia Ribeiro Ponciano

Dra. Manuela da Silva

Rio de Janeiro

2010

Andrade, Sinéa Mendes de

Análise de Interferon Humano Recombinante Presente em Formulações Farmacêuticas por Espectrometria de Massa/ Sinéa Mendes de Andrade. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.

104 f.: il.

1. Interferon Humano Recombinante. 2. Espectrometria de Massa. 3. Dicroísmo Circular. I. Título.

Título em Inglês: ANALYSIS OF RECOMBINANT HUMAN INTERFERON IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS BY MASS SPECTROMETRY

Análise de interferon humano recombinante presente em formulações farmacêuticas por espectrometria de massa

Sinéa Mendes de Andrade

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em 27 de agosto de 2010

Dra. Isabella Fernandes Delgado (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Ariane Leites Larentis (Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ)

Dr. Itallo Collopy Júnior (IFRJ)

Orientadoras:

Dra. Cássia Ribeiro Ponciano

Dra. Manuela da Silva

Rio de Janeiro

2010

Ao meu marido, Flávio, incentivador presente,

Aos meus filhos queridos, Flavia e Bruno, pela compreensão dos momentos de ausência,

Aos meus pais, que durante toda a minha vida me estimularam a buscar mais,

E a Deus, que me permitiu alcançar mais esta graça

AGRADECIMENTOS

À Direção do INCQS por incentivar que funcionários com longa vivência profissional pudessem aprimorar seus conhecimentos científicos através do Mestrado Profissional do INCQS,

Ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fiocruz,

Aos membros da comissão examinadora, por contribuírem para a qualidade deste trabalho,

A Marcio Labastie (in memoriam) agradeço o estímulo e autorização como chefe no Departamento de Química, para a minha inscrição no Mestrado Profissional do INCQS;

Aos amigos do Laboratório de Imunobiológicos, Cláudia, Juliana, Taís, e em especial, Diego, pela ajuda inestimável na elaboração deste trabalho.

As amigas Bernardete, Janete, pelos sábados que dividimos a angústia de desenvolver nossos trabalhos,

As amigas de sempre, Solange, Mariete, Virgínia, Sônia Simas e Sônia Vellozo, pelo carinho e força nos momentos difíceis,

Aos amigos do Departamento de Química e aqueles de outros departamentos do INCQS, que contribuíram na parte prática ou que carinhosamente me apoiaram com suas palavras de incentivo.

Ao Celso Romero, do IOC, que teve além da ajuda com a parte experimental, a disponibilidade para explicar os resultados,

Ao chefe Filipe, amigo, verdadeiro idealizador deste trabalho, e que sempre me estimulou a fazer o mestrado profissional,

A Cássia, orientadora, agradeço a sua perseverança em buscar os resultados, apesar das dificuldades,

A Manuela, orientadora deste trabalho, que carinhosamente mas firmemente, me manteve no foco.

*Sempre chega a hora em que descobrimos que
sabíamos muito mais do que antes julgávamos.*

José Saramago

RESUMO

Os interferons (INFs) são proteínas produzidas por células animais em resposta a infecções virais. Essas substâncias possuem vários efeitos farmacológicos, incluindo antiviral, antitumoral e imunomodulatório. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, vários interferons passaram a ser produzidos e comercializados como Biofármacos. O mais importante é o α_{2b} , que é uma das bases do tratamento das hepatites virais. A única norma oficial que regulamenta a produção de INF- α_{2b} é a Farmacopéia Européia, sendo que restringe-se a matéria prima. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para caracterizar a estrutura molecular do INF- α_{2b} em formulações farmacêuticas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Para a análise por MALDI-TOF foi necessário inicialmente desenvolver um método de cromatografia líquida para promover a separação entre o INF- α_{2b} constituinte ativo e minoritário e o soro albumina humana, também componente presente nas formulações farmacêuticas. Primeiramente foi desenvolvido um procedimento baseado em imunoafinidade e cromatografia de gel filtração. As amostras preparadas dessa forma apresentaram homogeneidade protéica por eletroforese, sendo analisadas por dicroísmo circular e fluorescência, o que demonstrou ter ocorrido degradação da estrutura tridimensional. Adicionalmente, essas amostras não geraram espectros de massa. Foi desenvolvido então outro método de separação cromatográfica, baseado em fase reversa, obtendo-se amostras com homogeneidade protéica, revelada por eletroforese. As amostras em solução foram submetidas à digestão com tripsina, levadas ao espectrômetro de massa MALDI-TOF, onde seus fragmentos trípticos foram identificados segundo a correlação entre os resultados encontrados a partir das amostras e do padrão de INF- α_2 da Farmacopéia Européia submetido aos mesmos procedimentos. As coberturas de seqüência atingida no padrão foram de 72,7 % e para as amostras de 45,5 %. No produto comercial foi identificada uma ponte disulfeto. Esse trabalho fornece dados importantes que subsidiam o estabelecimento de um protocolo para a análise de INF- α_{2b} em produto final, que poderia substituir o mapa de peptídeos tradicional por cromatografia líquida, com a vantagem de resultar em um maior número de informações sobre a estrutura molecular do biofármaco, importante para a ação farmacológica. Portanto, implementar o controle de qualidade e

caracterização estrutural com a introdução de metodologias analíticas sensíveis de maneira que tenhamos informação acerca da segurança, qualidade e eficácia do biofármaco para o devido suporte para as ações de Vigilância Sanitária.

Palavras chave: Interferon α_{2b} humano recombinante, proteína, espectrometria de massa MALDI-TOF, CLAE-FG, CLAE-FR, dicroísmo circular e fluorescência.

ABSTRACT

Interferons (INFs) are proteins produced by animal cells that respond to viral infections. These compounds exert many biological actions including broad-spectrum antiviral effects, inhibition of tumor cell proliferation and enhancement of immune functions. With the advent of recombinant DNA technology several interferons have been produced and sold as biopharmaceutical. Interferon α_{2b} , is used on the viral hepatitis treatment. The European Pharmacopoeia is the only official regulation that specifies parameters to the INF α_{2b} production, however just for the raw material. The development of analytical protocol by MALDI-TOF mass spectrometry for INF α_{2b} pharmaceutical formulations was the aim of this study. For the MALDI-TOF analyses, initially it was necessary to develop a high pressure liquid chromatography (HPLC) method to separate the minor active component INF α_{2b} from the human serum albumin, also present in the pharmaceutical formulations. Firstly it was developed a procedure based on the immunoaffinity and HPLC-Gel Filtration with protein homogeneity verified by electrophoresis. They were analysed by circular dichroism and fluorescence. However, these samples did not give results when they were submitted to the mass spectrometry. The next step was to develop another separation method using chromatography based on reversed phase. This procedure produced samples with protein homogeneity revealed by electrophoresis. The samples in the solution were submitted to trypsin digestion, afterwards their triptic fragments were introduced to the MALDI-TOF mass spectrometer and identified by the correlation among the results from the samples and from the European Pharmacopoeia standard INF α_{2b} following the same conditions. The coverage achieved in the standard sequence were 72,7 % and 45,5 % of the samples. In the commercial product a disulfide bridge was identified. This study provides important data that support the establishment of a protocol for the analysis of INF α_{2b} in the final product, which could replace the traditional map of peptides by liquid chromatography with the advantage of resulting in a greater amount of information on the structure molecular of the biopharmaceutical, which is important for the pharmacological action. Therefore, implementing quality control and structural characterization with the introduction of sensitive analytical methodologies in order to obtain information

about the safety, quality and efficacy of the biopharmaceutical due to the support for the actions of Sanitary Surveillance.

Key words: Human recombinant interferon α_{2b} , protein, MALDI-TOF mass spectrometry, HPLC-SEC, HPLC-RP, circular dichroism and fluorescence

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Modelo de complexo receptor para INF tipo I	3
Figura 2:	Estrutura tridimensional da INF- α_{2a} , determinada por ressonância magnética nuclear em solução	7
Figura 3:	Fluxograma de obtenção das INFs- α_{2b}	13
Figura 4:	Química de conjugação PEG-INF.	18
Figura 5:	Vista da estrutura secundária do INF- α_{2a} .	20
Figura 6:	Vista da estrutura do INF α_{2a} com destaque para os dois resíduos de triptofano	21
Figura 7	Componentes básicos de um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF	26
Figura 8:	Esquema de operação do TOF linear	28
Figura 9:	Diagrama do espectrômetro de massa Biflex III Bruker	30
Figura 10:	Espectrômetro de Massa Biflex III Bruke	33
Figura 11:	Esquema do movimento do porta-amostra	34
Figura 12:	Curva de calibração de peso molecular para a coluna TSK-GEL SWxl 2000, fase móvel: tampão PBS, 50 mM, pH 7,4	45
Figura 13:	Curva de calibração de peso molecular para a coluna TSK-GEL SWxl 2000, fase móvel: tampão PBS, 100 mM, pH 7,4	46
Figura 14:	Curva de calibração de peso molecular para a coluna TSK-GEL SWxl 3000, fase móvel: tampão PBS, 50 mM, pH 7,4, análise SDS-PAGE	47
Figura 15:	Curva de calibração de peso molecular para a coluna Superdex® 75, fase móvel: tampão, PBS 50 mM pH 7,0,	48
Figura 16:	Curva de calibração de peso molecular para a coluna Superdex® 75, fase móvel: tampão, PBS 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM	49

Figura 17:	Curva de calibração de peso molecular para a coluna Superdex® 75, fase móvel: tampão, PBS 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, 5% propanol	50
Figura 18:	Perfil cromatográfico da fração coletada da membrana de imunoafinidade, e padrão de INF FE	51
Figura 19:	Análise de SDS PAGE de frações da formulação de INF	52
Figura 20:	Espectros de dicroísmo circular do padrão de INF- α_{2a}	55
Figura 21:	Perfil de fluorescência do padrão de INF- α_{2b} da F.E.	57
Figura 22:	Cromatograma da formulação de INF α_{2b} obtido por CLAE-FR	58
Figura 23:	Cromatograma do padrão de INF- α_{2b} F.E. 100 μ L de solução 35 μ g/100 μ L	59
Figura 24:	Análise de SDS PAGE das frações coletadas da CLAE-FR	60
Figura 25:	Espectro de massa MALDI-TOF da análise do padrão FE de INF- α_{2b} submetido a digestão trípica	61
Figura 26:	Espectro de MALDI-TOF dos hidrolisados da coleta CLAE-FR	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Composição de medicamentos a base de INF α_{2b}	15
Tabela 2:	Diferenças farmacocinéticas, químicas e estruturais entre INF peguilados (PEG-INFs)	17
Tabela 3:	Colunas de CLAE FG, e tampões testados para a separação INF- α_{2b}	38
Tabela 4:	Condições experimentais e os tempos de retenção esperados e observados nas seis tentativas de separação por CLAE-FG de INF e HSA na formulação	44
Tabela 5	Peptídeos formados pela hidrólise por tripsina do INF- α_{2b} e valores de massa observados no espectro de MALDI-TOF do hidrolisado do padrão de INF- α_{2b} da F.E.	62
Tabela 6:	Valores de massa observados no espectro de MALDI-TOF dos hidrolisados da coleta da CLAE-FR e da banda do gel mostrado na figura 25.	64

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros e métodos recomendados pela USP-33 para a avaliação de biomedicamentos	22
---------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AChC	Ácido alfa ciano para hidroxí cinâmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BSA	Do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
Ccd	Do inglês Charge-coupled device
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FG	Cromatografia líquida de alta eficiência - Filtração em Gel
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência – Fase Reversa
Da	Unidade de massa atômica Dalton
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	Do inglês <i>double stranded Ribonucleic acid</i>
eIF-2 α	Fator 2 α de iniciação eucariótico
eIF-3	Fator de iniciação de translação
EM	Espectrometria de Massa
EPO	Eritropoetina
F.B.	Farmacopéia Brasileira
F.E.	Farmacopéia Européia
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Glu-c	Do inglês <i>Endoproteinase Glu-C</i>
GBP	Do inglês <i>Guanylate binding protein</i>
GTP	Do inglês <i>Guanosine triphosphate</i>
GTPase	Do inglês <i>Guanosine triphosphatase</i>

HSA	Do inglês Human Serum Albumin
IEF	Do inglês <i>isoelectric focusing</i>
IL-1	Do inglês <i>interleukin-1</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INF	Interferon
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
INF- α R1	Receptor 1 do Interferon- α
INF- α R2 _c	Receptor 2 _c do Interferon- α
IP3K	Do inglês <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
IRF7	fator 7 de regulação do IFN
IRF9	fator 9 de regulação do INF
ISGF3	fator 3 de estimulação gênica do INF
ISREs	elemento de resposta estimulado ao INF
Jak/Stat	Do inglês <i>Janus kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
kDa	Do inglês <i>kilodaltons</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI TOF	Do inglês <i>Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
MAPK	Do inglês <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MDBK	Do inglês <i>Madin-Darby bovine kidney</i>
MEK/ERK	Do ingles MAPK <i>mitogen-activated protein kinases/ERK extracellular-signal regulated kinase</i>
MH ⁺	Peptídeo monoprotonado

MHC	Do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MM	Massa molecular
mPEG	Metoxi-PEG
M.S.	Ministério da Saúde
m/z	Razão massa carga
Mx	Família de proteínas antivirais citoplasmáticas
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
N.I.	Não informado
NMR	Do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
nPrOH	N-propanol
OMS	Organização Mundial da Saúde
P38	Proteína induzida pelo INF
P48	Proteína induzida pelo INF
P53	Proteína que ativa transcrição por interação com RNA polimerase II
P56	Proteína induzida pelo INF
P200	Proteína induzida pelo INF
PAGE	Gel de poliacrilamida
PB	Tampão fosfato
PDB	Do inglês <i>Protein Data Bank</i>
PDB	Programa Desenvolvimento Brasileiro
PEG	Poliétileno Glicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isoelétrico

PKR	Do ingles <i>double-stranded RNA-dependent protein kinase</i>
PM	Peso molecular
PMF	Do inglês <i>Peptide Mass Fingerprint</i>
pppA (2'p5'A)n	Oligopeptídeo ativador da RNase L
Proveme	Programa Nacional de verificação da Qualidade de Medicamentos
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Do Inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RNAdf	<i>Ribonucleic Acid</i> dupla fita
RNaseL	RNase latente
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida, com dodecil sulfato sódio.
sc-PEG	Succinimidil carbonato-Polietileno Glicol
ss-PEG	Succinimidil carbonato-Polietileno Glicol
STATs	Do inglês <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TFA	Ácido trifluoracético
TNF	Do ingles <i>Tumour Necrosis Factor</i>
Torr	Medida de pressão Torricelli
t _R	Tempo de retenção
TOF	Do inglês <i>Time of flight</i>
UI	Unidade internacional
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta e visível.

USP	Do inglês <i>United States Pharmacopoeia</i>
WHO	Do inglês <i>World Health Organization</i>
∅ (símbolo)	Diâmetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 Mecanismos de Ação das Proteínas Interferon	2
1.3 Classificação e Características Estruturais das Proteínas Interferon	5
1.3.1 Família da Proteínas Interferon alfa 2b (INF- α_{2b})	6
1.4 Biomedicamentos e a Vigilância Sanitária	7
1.5 Produção industrial das Proteínas Interferon	11
1.5.1 Estabelecimento de linhagem recombinante	11
1.5.2 Purificação do INF	12
1.5.3 Formulação do INF	14
1.5.4 Proteínas Interferons peguilados – PEG INFs	15
1.6 Controle de qualidade das proteínas INF- α_2	18
1.7 A espectroscopia de massa tipo MALDI-TOF	25
1.8 Princípio básico dos analisadores de massa por tempo de voo - TOF	28
2 OBJETIVO GERAL	35
2.1 Objetivos específicos	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 Locais de realização dos experimentos	36
3.2 Material	36
3.2.1 Amostras	36
3.2.2 Reagentes	36
3.3 Métodos	37

3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Filtração em Gel (CLAE-FG)	37
3.3.2 Determinação Quantitativa de Proteínas	39
3.3.3 Eletroforese de proteínas com dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	39
3.3.4 Uso de Membrana de imunoafinidade para remoção de HSA das amostras	40
3.3.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	40
3.3.6 Espectroscopia de Fluorescência	41
3.3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (CLAE-FR)	41
3.3.8 Digestão Enzimática	42
3.3.9 Espectrometria de massa	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Separação do INF dos demais componentes da formulação	44
4.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Filtração em Gel	44
4.1.2 Uso de Membrana de imunoafinidade para remoção de HSA das amostras	51
4.2 Avaliação da estrutura molecular do INF- α_{2b}	54
4.2.1 Dicroísmo Circular	54
4.2.2 Fluorescência	56
4.3 Separação do INF dos demais componentes da formulação por CLAE-FR	58
4.4 Análise do INF- α_{2b} por MALDI-TOF	61
5 DISCUSSÃO	65
5.1 Separação do INF dos demais componentes da formulação	65
5.2 Avaliação da estrutura molecular do INF- α_{2b}	66

6 CONCLUSÃO	69
7 PERSPECTIVAS	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O fenômeno de interferência viral foi descrito pela primeira vez em 1935 por Hoskins e Magrassi, independentemente. Eles observaram que ao injetar simultaneamente doses elevadas de duas cepas diferentes de vírus em macacos, a maioria dos animais sobrevivia. Aparentemente, o organismo produzia uma reação que bloqueava a infecção, a que denominaram então de reação de interferência. Na ocasião, não se conseguiu uma explicação para o fenômeno (FINTER, 1999).

Nas duas décadas seguintes vários pesquisadores tentaram entender o mecanismo da interferência, porém, só em 1957 é que o médico suíço Lindenmann e o virologista britânico Alick Isaacs conseguiram identificar uma proteína, produzida pelas células do hospedeiro, como a responsável pela interferência. Essa proteína foi denominada interferon (INF) (LINDENMANN, 2007; PESTKA, 2007).

Em virtude do uso corriqueiro, no presente trabalho será adotado o termo interferon no gênero masculino, embora se refira às proteínas.

Durante a década de 60 vários trabalhos confirmaram a natureza protéica do INF. Foi demonstrado também que células diferentes podem sintetizar INFs diferentes. Na ocasião, tais diferenças foram identificadas sorologicamente, ou seja, foram preparados soros que reconheciam especificamente um determinado INF (DORR, 1993).

O advento da engenharia genética permitiu elucidar as seqüências de aminoácidos dos INFs, confirmando as diferenças entre os genes que codificam os INFs. No começo da década de 80 foram iniciados estudos para produzir INFs utilizando a tecnologia de DNA recombinante. Em 1989 o INF- α_{2a} foi liberado para a comercialização nos EUA, com indicação clínica para tratamento de sarcoma de Kaposi e hepatite C, marcando o início do uso clínico sistemático desse tipo de biomedicamento (WALSH, 2003).

1.2 Mecanismos de Ação das Proteínas Interferon

Os INFs são os primeiros membros de uma família importante de proteínas biológicas regulatórias, são as chamadas citocinas, mediadoras de respostas homeostáticas celulares à infecção viral em mamíferos. As citocinas são produzidas em resposta a vírus e são secretadas para a circulação. Além de inibirem a replicação viral, agem de modo a proteger células não infectadas ativando um estado antiviral global, que tem efeitos pleiotrópicos em vários aspectos na fisiologia celular, como crescimento, motilidade e funções celulares (SEN, 2001).

Vários estudos comprovaram os diversos efeitos farmacológicos dos INFs Tipo I: antiviral, antiproliferativo, estimulador de atividade citotóxica de várias células do sistema imune, aumento da expressão de antígenos de superfície associados a tumores, estimulador de outras moléculas de superfície, tais como antígenos MHC Classe I, indução e/ou ativação de genes proapoptóticos e proteínas produtos desses genes, repressão de genes antiapoptóticos, modulação de diferenciação e atividade angiogênica (PETSKA, 2004).

A família α tem efeito contra algumas viroses importantes, principalmente hepatite A, B e C, e a família β tem efeito imunomodulador, sendo útil no tratamento da esclerose múltipla. A família γ tem efeito contra alguns tipos de câncer (DORR, 1993).

Os diferentes INFs do tipo I atuam da mesma forma. Eles se ligam a receptores de membrana nas células alvo, ativando uma cascata metabólica que leva à expressão de aproximadamente trezentas proteínas diferentes, com padrão de indução variável de acordo com o tipo celular e o tipo de INF. Estas mesmas proteínas podem ser induzidas por outros agentes como ácido ribonucléico-dupla fita (dsRNA), lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), ou infecção viral. As proteínas induzidas pelo INF são enzimas, proteínas de sinalização, quimiocinase, proteínas de apresentação de antígenos, fatores de transcrição, proteínas de choque térmico e proteínas apoptóticas (SEN, 2001; SADLER & WILLIAMS, 2008).

Na Figura 1 é apresentado um modelo do complexo receptor-INF tipo I, que consiste de um heterodímero, a cadeia 1 do receptor de INF- α (INF- α R1) e cadeia 2_c

do receptor de INF- α (INF- α R2_c). Após a complexação, inicia-se o sinal de transdução, por pré-associação com os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs). Os heterodímeros STATs associam-se com o fator 9 de regulação do INF (IRF9), para formar o fator 3 de estimulação gênica do INF (ISGF3). Este complexo desloca-se para o núcleo onde interagem com proteínas reguladoras de genes denominadas de elemento de resposta estimulado pelo INF (ISREs), que leva à indução ou ao aumento da expressão de genes específicos (TAKAOKA & YANAI, 2006).

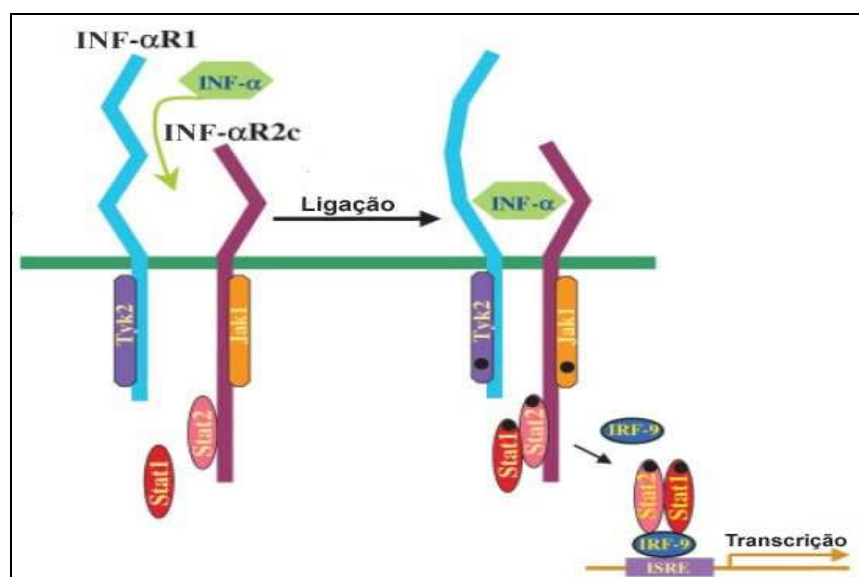


Figura 1: Modelo de complexo receptor para INF tipo I (Adaptado de PESTKA, 2004; SADLER & WILLIAMS, 2008)

Existem outras vias de sinalização que o INF tipo I pode induzir, ativadas independentemente ou em paralelo à via Janus cinase, JAK/STAT, como Fosfatidilinositol 3-cinase (IP3K), p38, MAPK (proteína cinase mitógeno ativada) e a via cinase regulada por sinal extracelular/cinase regulada por sinal extracelular/proteína mitógeno ativada/cinase regulada por sinal extracelular (MEK/ERK) (SADLER & WILLIAMS, 2008; BONJARDIM et al., 2009).

A formação do complexo INF-receptor desencadeia vários efeitos antivirais nas células e os principais mecanismos envolvidos são:

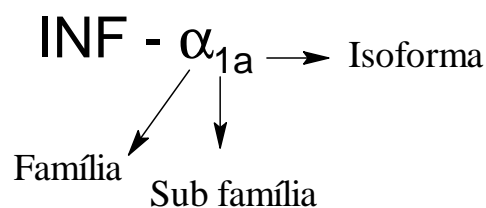
- Ligação do INF ao receptor com ativação da 2'-5' oligo nucleotídeo sintetase, expressa constitutivamente na célula como monômero inativo, tendo seus níveis aumentados após estimulada por RNA viral dupla fita. Esta enzima oligomeriza-se e forma um tetrâmero que sintetiza 2'-5' oligoadenilatos. Este tetrâmero quando ligado à ribonuclease (RNase latente), ativam-na, iniciando-se sua dimerização obtendo como produto uma potente endoribonuclease capaz de clivar RNAs indiscriminadamente (sejam virais ou celulares);
- Ativação por autofosforilação da proteína serina-treonina cinase (PKR), que uma vez ativada pode fosforilar proteínas celulares específicas, tais como o fator de iniciação eucariótico eIF-2 α . Esses eventos produzem a inibição global da síntese protéica bloqueando além da replicação viral, também a amplificação total da resposta celular estressada induzida pelo vírus;
- A proteína citoplasmática P56 liga-se ao complexo multimérico do eIF-3 via P48, bloqueando sua função na iniciação da síntese protéica;
- Proteínas Mx, são proteínas ligadas à guanosina trifosfato (GTP), com atividade GTPase intrínseca, e GBP; a proteína Mx também é descrita como um elemento que se polimeriza intracelularmente atingindo dimensões capazes de “englobar” capsídeos virais e direcioná-los para degradação;
- P200, proteínas fortemente induzidas por INF tipo I, assim como P53, cuja principal função é a indução da resposta apoptótica das células infectadas;
- Fatores reguladores de INF, o próprio INF induz a síntese de mais INF através de um *feedback* positivo mediado por fator 7 de regulação do INF (IRF7). Esta é parte de um mecanismo de ajuste da produção de IFN com relação à carga viral (SEN, 2001; CHELBI-ALIX, 2007; BONJARDIM et al., 2009).

A diversidade de atuação do INF tem como conseqüência falta de seletividade, responsável pelos efeitos adversos causados pelo uso dos INFs, que administrados com outras drogas, podem interagir inibindo a atividade do sistema enzimático citocromo P450, potencializando efeitos indesejáveis de toxicidade (STARK et al., 1998; ISLAM, et al., 2002).

Os níveis máximos de atividade antiviral dos INFs no soro são alcançados de 3 a 8 horas depois da administração, usualmente por via subcutânea, com tempo de meia vida de 3h30min. O efeito do INF persiste por cerca de três dias, possibilitando a administração da droga em dias alternados. Evidências demonstram que os INFs são depurados no rim por proteólise, não sendo detectados resíduos da droga na urina (DORR, 1993).

1.3 Classificação e Características Estruturais das Proteínas Interferon

A elucidação da seqüência primária dos INFs possibilitou a adoção de classificação sistemática. A classificação atual em tipo, família, subfamília e isoforma, baseia-se tanto no complexo receptor como em diversos outros fatores tais como: na homologia da seqüência, na especificidade do receptor, na locação cromossomial, nas suas propriedades físico-químicas e na sua estrutura (MALMGAARD, 2004). Os dois tipos de INFs presentes em humanos são chamados de I e II e mais recentemente foi descrito o tipo III (VILCEK, 2003). O tipo I e III são produzidos por células dendríticas plasmocitóides dentre outras (KOTENKO et al., 2003) e o tipo II é produzido por fibroblastos. Os tipos foram subclassificados em famílias representadas pelas letras α , β , γ , κ , λ . Em cada família há também a possibilidade de subfamílias representadas por números e de isoformas como mudanças pontuais das seqüências de aminoácidos. Um exemplo da nomenclatura usual de INFs (KONTSEK, 2003) é:



1.3.1 Família das Proteínas Interferon alfa 2b (INF- α_{2b})

Atualmente, o INF- α_{2b} é utilizado na terapêutica da hepatite viral (BRASIL, 2008). Segundo estimativas divulgadas pela World Health Organization (WHO), em 2007, 3% da população mundial encontrava-se contaminada pelo vírus da hepatite C, e 2 bilhões de pessoas infectadas pelo vírus da hepatite B, sendo que destas, 350.000.000 apresentavam infecção crônica de fígado. Estima-se que 600.000 pessoas venham a morrer por ano, em consequência da hepatite B crônica ou aguda (WHO, 2008).

A família α é constituída por proteínas homólogas e relacionadas, com perfil de atividade único (PESTKA, 2004). As isoformas do INF- α foram purificadas com homogeneidade satisfatória ao longo da década de setenta. Essas substâncias foram classificadas em duas subfamílias distintas: 1 (com 13 isoformas) e 2 (com 2 isoformas) (KONTSEK, 2003).

A subfamília 1 tem 165 aminoácidos na seqüência (apenas uma isoforma tem 166) enquanto a subfamília 2 tem 172 aminoácidos em sua seqüência. A massa molecular (MM) estimada para os INF- α é em torno de 19 kDa. A análise das várias isoformas, por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE), demonstra em alguns casos MM de até 27 kDa. A análise dessas mesmas isoformas por focalização isoelétrica (IEF) demonstra que os pontos isoelétricos (pI) variam de 5 até 6,5. Essas características de micro heterogeneidade se devem a presença de uma cadeia O-glicosídica. Foi relatada também heterogeneidade por ação proteolítica no C terminal (KLAUSS et al., 1997).

A homologia entre as isoformas é superior a 70%. Todas são proteínas com alto teor de leucina e ácido glutâmico, suas cisteínas são conservadas nas posições 1, 29, 98 e 138, formando duas pontes de sulfeto na forma ativa da proteína. As estruturas terciárias de todas são muito similares, com estruturas de alfa hélice e nenhuma estrutura beta, conforme estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) e heteronuclear (KLAUSS et al., 1997) e mostrada na figura a seguir

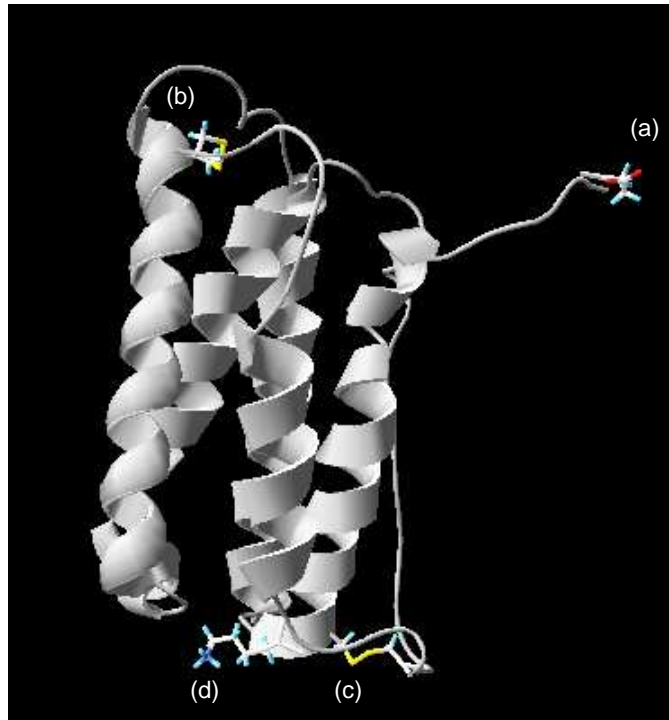


Figura 2: Estrutura tridimensional do $\text{INF-}\alpha_{2a}$, determinada por ressonância magnética nuclear em solução

Essa estrutura tridimensional do $\text{INF-}\alpha_{2a}$, determinada por ressonância magnética nuclear em solução (KLAUSS et al., 1997) mostra código de acesso no Protein Data Bank (PDB) 2HYM. (a) o C terminal da molécula (ácido glutâmico 165) (b) ponte dissulfeto $\text{C}_1\text{-C}_{98}$ (c) ponte dissulfeto $\text{C}_{29}\text{-C}_{138}$ (d) resíduo K_{23} ; No $\text{INF-}\alpha_{2b}$ esse resíduo é arginina. Figura gerada no Swiss PDB viewer 4.0.1, utilizando o modelo com código de acesso PDB 2HYM.

1.4 Biomedicamentos e a Vigilância Sanitária

A Constituição de 1988, art. 196, concebe saúde como direito de todos e dever do Estado que deve garanti-la, mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos (BRASIL, 1988).

Nesse sentido, considerando a saúde como um direito fundamental do ser humano e de responsabilidade do Estado, foi promulgada a Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes (BRASIL, 1990).

A Lei nº 8080/90, intitulada Lei Orgânica da Saúde, cria o Sistema Único de saúde em seu art. 4º e o define como o conjunto de ações e serviços de saúde, prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, da administração direta e indireta e das fundações mantidas pelo Poder Público. O Sistema Único de Saúde-SUS, no Capítulo I, em Objetivos e Atribuições, no art. 6º, estão incluídas em execução de ações, entre outras, a de Vigilância Sanitária, a de formulação da política de medicamentos, de equipamentos, de imunobiológicos e de outros insumos de interesse para a saúde e a participação na produção; o controle e a fiscalização de serviços, produtos e substâncias de interesse para a saúde (BRASIL, 1990).

O conceito de Vigilância Sanitária é definido nesta Lei como o conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo (BRASIL, 1990).

Em 27 de janeiro de 1999, a Lei nº 9.782, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) que veio substituir a Secretaria de Vigilância Sanitária e estabeleceu no art. 2º como algumas das suas competências, normalizar, controlar e fiscalizar produtos, substâncias e serviços de interesse para a saúde (BRASIL, 1999).

No âmbito da normalização realizada pela Anvisa, no que tange ao biomedicamento, é importante a Resolução RDC nº 210, de 4 de agosto de 2003, que determina a todos os fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no regulamento técnico das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, presentes nesta resolução (BRASIL, 2003). Neste contexto, merece ainda destaque a RDC nº 315, de 26 de outubro de 2005, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Registro, Alteração Pós-Registro e Revalidação de Registro dos Produtos Biológicos Terminados (BRASIL, 2005). Nesta mesma resolução são considerados vários medicamentos biológicos, incluindo os Biomedicamentos que são distinguidos como aqueles obtidos a partir de fluídos

biológicos ou de tecidos de origem animal e aqueles obtidos por procedimentos biotecnológicos.

A Resolução RDC Nº. 315 de 26/10/2005 estabelece pré-requisitos para o registro de biomedicamentos, determinados pela origem biológica do princípio ativo e pelas tecnologias de fabricação utilizadas. A documentação técnica de cada uma das etapas de produção de um biomedicamento deve ser encaminhada junto com a documentação de três lotes iniciais de produção (BRASIL, 2005).

Esta RDC Nº. 315 define o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que está inserido no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, como Laboratório responsável pelas análises laboratoriais para o registro, alteração ou revalidação de Produtos Biológicos Terminados; pela avaliação de conformidade dos métodos analíticos utilizados pelos produtores no processo de registro; e realização de análise prévia desses produtos (BRASIL, 2005).

Além da participação no processo de registro, o INCQS participa de programas de avaliação da qualidade de medicamentos disponíveis no mercado e distribuídos pelo Sistema Único de Saúde, como o Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos - PROVEME (ANVISA, 2004) e o Programa de Medicamentos Excepcionais (SILVA, 2000).

Em virtude dos medicamentos excepcionais encontrarem-se no âmbito dos produtos de tecnologia de ponta e essa característica se refletir em seus preços, bastante superiores a maioria dos produtos convencionais, o governo federal em 1982 criou o programa de medicamentos excepcionais, para garantir o fornecimento de produtos de alto valor agregado à população (SILVA, 2000). Do total de recursos aplicados em 2006, pelo governo federal na assistência farmacêutica (mais de R\$ 4,2 bilhões), um terço (R\$ 1,4 bilhão) foi investido no financiamento de medicamentos excepcionais, adquiridos e distribuídos pelas Secretarias de Saúde dos Estados (ASSISTÊNCIA, 2008).

Do total de medicamentos, cerca de 20 são biomedicamentos. Destes, quatro são medicamentos de alto custo ou uso continuado: imiglucerase (indicado para o tratamento da doença de Gaucher), eritropoetina (EPO), para insuficiência renal crônica, interferon alfa (INF- α , para hepatite C) e imunoglobulina, para imunodeficiências. Para esses quatro medicamentos, o investimento do governo

federal é de R\$ 500 milhões por ano. Esse valor demonstra a importância econômica dos biomedicamentos dentro do programa que prevê que todo o processo de absorção de novas tecnologias e medicamentos no SUS deve obedecer à relação “demanda X eficácia X custos” como forma de abranger o maior número possível de pacientes com a oferta de medicamentos comprovadamente eficazes e seguros e, ainda, utilizar os recursos públicos em saúde de forma responsável. Essa preocupação é importante, pois um grande número de novos biomedicamentos é lançado anualmente. A incorporação direta desses produtos poderia elevar de forma relevante os custos (BRASIL, 2006).

Seguindo a tendência de diminuição de custos, o Ministério da Saúde (MS) encarregou Bio-Manguinhos da produção dos biomedicamentos EPO e INF α . Esses medicamentos foram desenvolvidos pelo Centro de Imunologia Molecular (CIM) e o Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), em Cuba, respectivamente, e realizam o processo desde a manipulação genética, estabelecimento da linhagem celular, cultivo em larga escala das células e a purificação. Atualmente no Brasil são realizadas as etapas de envase e rotulagem, embora a transferência de tecnologia preveja a nacionalização de todas as etapas no Brasil (BIO-MANGUINHOS, 2008).

Antevendo a necessidade de sanar esta dependência externa, e visando colocar o Brasil como um dos principais países fornecedores de produtos biotecnológicos, foi assinado o decreto nº 6.041, em 08 de fevereiro de 2007, que instituiu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, criando o Comitê Nacional de Biossegurança (BRASIL, 2007).

O decreto objetiva em seu art. 1º estabelecer ambiente adequado para o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos inovadores, o estímulo à maior eficiência da estrutura produtiva nacional, o aumento da capacidade de inovação das empresas brasileiras, a absorção de tecnologias, a geração de negócios e a expansão das exportações. No seu parágrafo 1º define áreas setoriais priorizadas na Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, como objeto de programas específicos, contemplando como uma das diretrizes a área da saúde humana, em que estimula a geração e controle de tecnologias e a consequente produção nacional de produtos estratégicos.

Visa posicionar competitivamente a bioindústria brasileira na comunidade biotecnológica internacional, com potencial para gerar novos negócios, expandir suas exportações, integrar-se à cadeia de valor e estimular novas demandas por produtos e processos inovadores, levando em consideração as políticas de Saúde (BRASIL, 2007).

Incluídos como alvos nesta área estão produtos de proteínas recombinantes, como o INF- α_{2b} dentre outros, em que a absorção, transferência de tecnologias e geração de novos métodos e processos de produção visam à redução do impacto das importações na balança comercial brasileira (BRASIL, 2007).

De acordo com a Política de Desenvolvimento de Biotecnologia, que incentiva a implementação de tecnologias próprias pelos produtores nacionais, é justificado que seja proposto no INCQS o desenvolvimento de metodologias que garantam a eficácia, eficiência e a segurança de produtos de proteínas recombinantes.

1.5 Produção industrial das Proteínas Interferon

1.5.1 Estabelecimento de linhagem recombinante

O professor Pieter De Somer foi o primeiro a perceber o potencial terapêutico do INF e a necessidade de produção, propondo em 1962 essa linha de pesquisa na Universidade Católica de Louvain (Bélgica) (VILČEK, 2007). Na ocasião, ainda não havia a tecnologia do DNA recombinante, a produção de INF era feita em cultivos de células de mamíferos induzidas a secretar INF. Os indutores mais usados foram cadeias de RNA dupla fita. O material produzido era heterogêneo e impuro, mas foi importante para as etapas iniciais da pesquisa de INFs. O laboratório Glaxo chegou a realizar estudos clínicos com esse material, com resultados pouco satisfatórios (WALCH, 2003).

O advento do DNA recombinante, em 1980, tornou possível a produção de INFs específicos. Essa produção segue o esquema geral para a clonagem e super expressão de proteínas recombinantes. Primeiro é necessário preparar um plasmídeo com o gene que codifica o INF, uma marca de seleção, normalmente um gene que confere resistência a um determinado antibiótico. Para obter-se uma super

expressão é necessário utilizar um promotor adequado à célula, o que favorece a produção de RNA mensageiro. Também é importante utilizar os códons preferenciais para a célula de interesse, que aumenta o rendimento do INF formado (FATHALLAH & ESSAFI, 2007)

Para a produção em grande escala para fins farmacêuticos o plasmídeo do INF- α foi transfectado em vários sistemas de expressão diferentes. A expressão pode ser feita por *Escherichia coli* (WALCH, 2003) e *Pichia pastoris* (FATHALLAH & ESSAFI, 2007; SHI et al., 2007) entre outros. O INF produzido por essas linhagens possui boa atividade biológica, sendo que a deficiência da O-glicosilação nas isoformas onde ela estaria presente não influencia na atividade.

Por questão de custo, os INF- α para fins farmacêuticos são produzidos por linhagens de *E.coli*. A otimização das condições de cultivo levou o INF a ser produzido com rendimento de miligramas por litro de meio de cultura. Cerca de 30% do total de proteínas celulares corresponde a INF formado como um corpo de inclusão.

1.5.2 Purificação do INF

Após a super expressão do INF- α pelas células, o próximo passo é a purificação do material para a obtenção do INF- α em grau de pureza para uso farmacêutico. O processo de purificação deve remover os constituintes do meio de cultura, outras proteínas e componentes celulares. O uso de *E. coli* demanda um especial cuidado com a remoção da endotoxina, já que este microrganismo produz LPS.

A etapa inicial do processo de purificação é a solubilização do INF- α_{2b} . Após a fermentação as células sofrem lise, e os corpos de inclusão são separados por centrifugação. Os corpos de inclusão são ressolubilizados com o auxílio de tensoativos e purificados por uma seqüência de cromatografias industriais (WALCH, 2003).

O processo usado pela empresa Schering Plough é mostrado na Figura 3. Inicialmente, o INF- α é submetido a uma cromatografia de troca iônica que o separa de outras proteínas celulares. A fração recolhida da troca iônica é então submetida à

cromatografia de filtração em gel, para a remoção de agregados e outros componentes de elevada massa molecular.

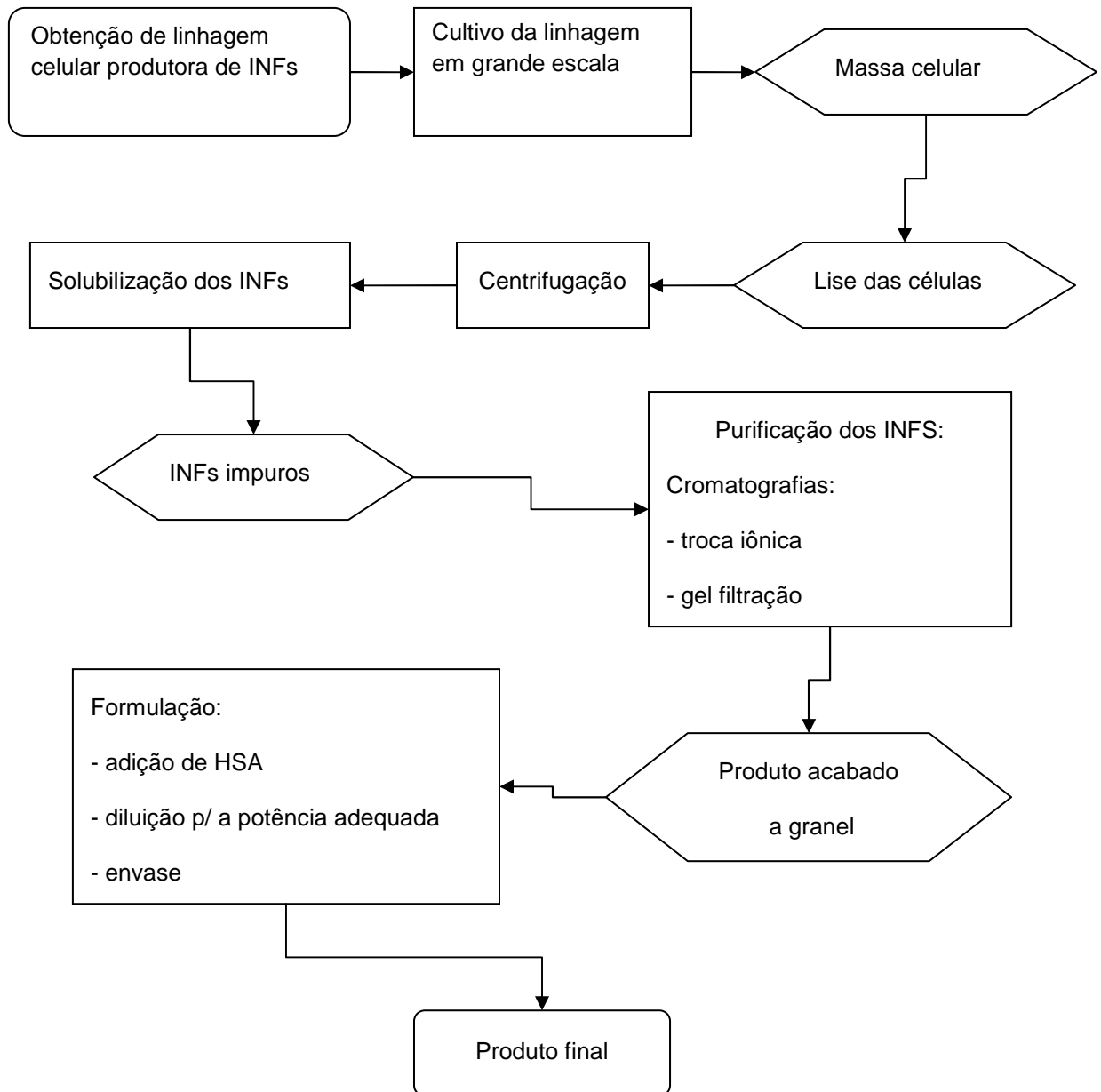


Figura 3: Fluxograma de obtenção industrial dos INFs- α_{2b}

1.5.3 Formulação do INF

Devido a sua estrutura protéica, os INFs não são ativos por via oral. Por isso, os produtos acabados a granel devem ser convertidos em uma fórmula adequada para administração por via injetável. Além das propriedades inerentes a produtos injetáveis, como pH, isotonicidade, apirogenicidade, antioxidantes, esta formulação deve garantir a estabilidade do INF durante seu prazo de validade (NÄRHI, 2005).

Vários componentes são adicionados à formulação para atingir os objetivos acima, como fosfato de sódio, manitol e dextran. O excipiente mais importante é a proteína soro albumina humana (HSA), que é bastante utilizada na formulação de biomedicamentos. Sua função principal é estabilizar o produto, impedindo a agregação das moléculas do biofármaco, evitando a perda da potência e a formação de anticorpos contra o biofármaco (RANDO et al., 2003; RUIZ & REYES, 2006). Outros excipientes com a finalidade de estabilização já foram testados, como a mistura de aminoácidos e surfactantes como o Tween, porém a maioria dos produtos ainda contém a HSA. A HSA é um hemoderivado, ou seja, é obtida a partir do processamento do plasma humano. Por esse motivo, ela apresenta irregularidade de composição, sendo também necessário o controle da presença de patógenos transmitidos pelo sangue em seus lotes.

Por esse motivo, na Comunidade Européia há uma diretriz para substituir tal uso da proteína HSA, porque sendo ela um hemoderivado não existe 100% de segurança em relação à transmissibilidade de prions veiculados por ela (JONGEN et al., 2005).

A formulação básica de INF- α_{2b} contém 1,5 mg de HSA por mL. Como a relação entre massa e atividade é de $1,4 \times 10^8$ UI/mg, dependendo da apresentação, cada mL de formulação contém uma determinada massa de INF- α_{2b} , conforme mostrado na Tabela 1. Pode se observar que a menor razão molar é de 1 de INF- α_{2b} para 24 da composição protéica final.

Alguns fabricantes liofilizam a formulação final.

Tabela 1: Composição de medicamentos a base de INF- α_{2b}

Componente	Massa/mL
INF- α_{2b}	20 μ g (1 nmol), 35 μ g (1,8 nmol) ou 71 μ g (3,7 nmol)
HSA	1,5 mg (23 nmols)
Outros	Fosfato de sódio, manitol e dextran

Nota: Os valores de nmols são aproximados.

1.5.4 Proteínas Interferons peguilados – PEG INFs

As características farmacológicas dos INFs- α determinam que elas sejam administradas por injeções em dias alternados, sendo essa uma das dificuldades do seu uso clínico. Os tratamentos podem durar de 6 meses a 1 ano dependendo do sorogrupo viral, da resposta sorológica do paciente e dos efeitos adversos apresentados (BRASIL, 2009; ZEUZEM, 2008).

Por causa disto, desenvolveram-se várias estratégias para aumentar a meia vida dos INFs; a maioria envolve a conjugação, ou seja, a formação de ligação covalente entre o INF e polietileno glicóis (PEGs). Os PEGs são polímeros hidrossolúveis de estrutura linear, eles aumentam a solubilidade dos INF em água ao mesmo tempo que impedem a sua depuração renal por proteases. Como os conjugados formados têm depuração muito mais lenta do que os INFs, eles aumentam a duração da atividade farmacológica dos INFs, como apresentado na Tabela 2. Outras vantagens da conjugação PEG INFs, além de aumentar as estabilidades física e térmica dos INFs, são reduzir a imunogenicidade, a antigenicidade e a toxicidade (WANG et al., 2002; KOZLOWSKI & HARRIS, 2001).

A reação de peguilação, que consiste na conjugação do PEG à proteína, requer a ativação prévia do polímero por conversão do grupo terminal hidroxil em algum outro grupo funcional capaz de reagir com os grupos funcionais disponíveis na superfície da estrutura molecular protéica. O procedimento usual é ativar grupos funcionais no polímero para que eles reajam com ϵ amino grupos de lisinas. Utiliza-

se o monofuncional metoxi-PEG (mPEG) porque não produz ligações cruzadas nem agregações (KOZLOWSKI & HARRIS, 2001).

A química de peguilação se divide em química de primeira e de segunda gerações. A de primeira geração é a que emprega PEGs lineares de massas moleculares menores do que 12 kDa. Exemplos de reagentes de primeira geração são: o succinimidil succinato-m-PEG (SS-PEG) e o succinimidil carbonato (SC-PEG), o diclorotriazina-PEG, o PEG tresilato, o PEG-benzotriazol carbonato, o PEGp-nitrofenil carbonato, o PEG triclorofenil carbonato e o PEGcarbonilimidazol (VERONESE, 2001).

Os reagentes citados, embora amplamente utilizados, apresentam desvantagens como: a geração de ligações fracas entre o PEG e a proteína, que resulta em substituições não seletivas; a ocorrência de reações colaterais; a dificuldade de remover a maioria dos contaminantes e, finalmente, a limitação à monometoxi-PEGs lineares de massas moleculares pequenas.

Na química de segunda geração, desenvolvida para eliminar as desvantagens da de primeira geração, duas cadeias de mPEG de 20 kDa são ligadas de modo a formar uma cadeia mPEG de 40 kDa ramificada. Um exemplo de reagente é o mPEG-propionaldeído que é muito seletivo para N-terminal, como mostrado na Figura 4. A conjugação de aldeídos é feita por meio de base de Schiff que, ao ser reduzida *in situ*, gera ligações amino secundárias estáveis entre PEG e INF (ROBERTS, 2002).

Como exemplos de produtos oriundos da química de peguilação, atualmente no mercado, temos o PegIntron (Schering-Plough, USA), que é o INF α_{2a} conjugado ao PEG de cadeia linear, de 12 kDa, e o Pegasys (Hoffman-Le Roche, Inc. USA), este de 40 kDa, de cadeia ramificada (DHALLUIN et al., 2005), cujas características estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2 Diferenças farmacocinéticas, químicas e estruturais entre INF peguilados (PEG-INFs)

Características	PEG- INF- α_{2a} (12 kDa)	PEG- INF- α_{2a} (40 kDa)
Estrutura do PEG	Pequena, linear de 12 KDa Monometoxi m-PEG	Duas cadeias de 20 kDa mPEG, ligadas para formar um grande mPEG 40 kDa ramificado
Conjugação do PEG	m-PEG ativado com carbonato de succinimidil (SC-PEG), podendo reagir com vários aminoácidos	m-PEG ativado com N-hidroxisuccinimida (PEG2-NHS) ligando a resíduos de lisina
Isômeros posicionais	13*	6
Ligação proteica	Principal isômero posicional (PEG 12 kDa ligado a Histidina) tem ligações carbonil uretano instáveis hidroliticamente.	Estabilidade na ligação da amida entre mPEG e lisinas na cadeia proteica
MonoPEGuilação	95%	95%
Estabilidade	Estocada como pó: deve ser reconstituído imediatamente antes da injeção	Estocada como solução, estável por no mínimo 2 anos
Meia-vida eliminação	~ 40h	80 h

Fonte: Tabela adaptada de FOSTER, 2004; *Cerca de 47% do total das espécies correspondem a peguilação na H₃₄

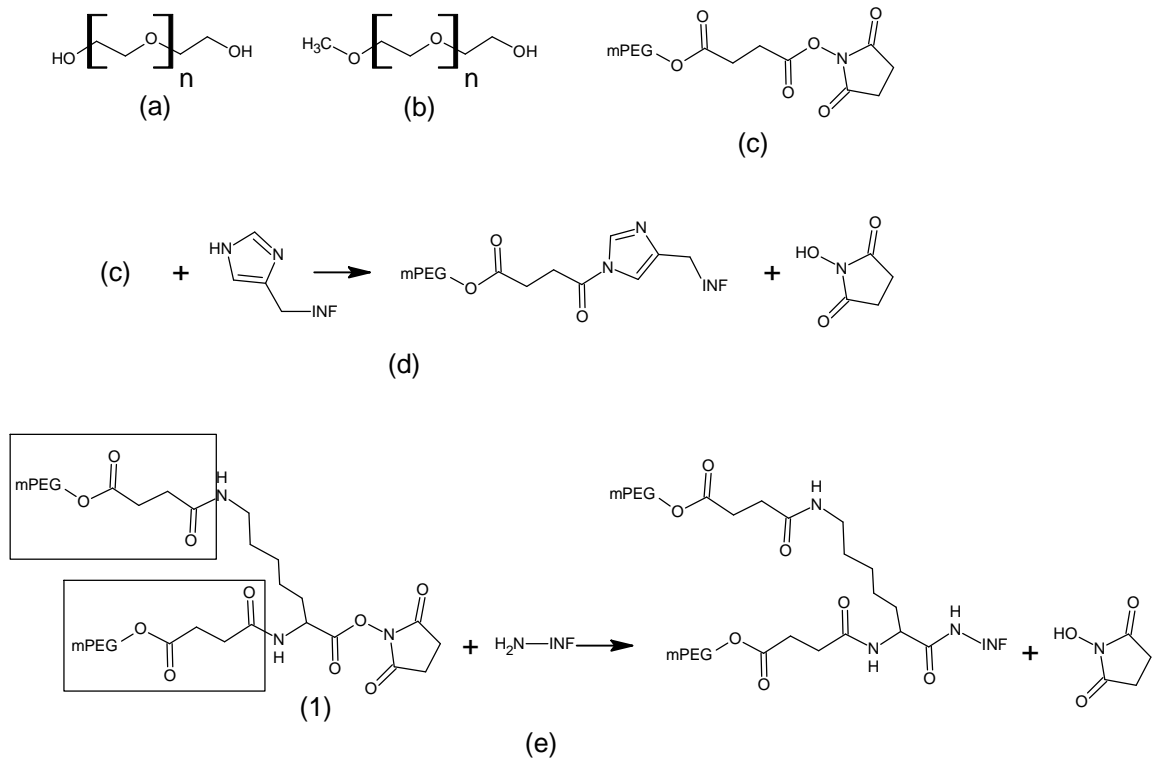


Figura 4: Química de conjugação $\text{INF-}\alpha_{2b}$ (a) Estrutura do PEG, (b) Estrutura do mPEG, (c) Succinil mPEG.

A segunda carboxila do succinato está ativada pela ligação a NHS (d) Acoplamento das histidinas do INF com succinil mPEG. (e) (1)PEG ramificado. Duas unidades de mPEG ligadas a um espaçador central de N hidroxi succinil Lisina. Essa molécula é acoplada diretamente às lisinas do $\text{INF-}\alpha_{2b}$.

1.6 Controle de qualidade das proteínas $\text{INF-}\alpha_2$

O controle de qualidade dos INFs pode ser feito utilizando dois grupos de ensaios. O primeiro grupo que abrange ensaios comuns a formas farmacêuticas líquidas para uso interno (injetável), são os testes de volume médio, pH, inocuidade, esterilidade e endotoxina. Quando o produto final é apresentado como liofilizado, deve ser avaliada a umidade residual, importante para a estabilidade do produto (WHO, 1988).

O segundo grupo de ensaios diz respeito às particularidades do INF- α_2 quanto à natureza protéica do biofármaco.

O efeito farmacológico das proteínas está relacionado à complexa estrutura molecular apresentada por estas moléculas. A desnaturação da estrutura tridimensional, por exemplo, pode levar a uma redução da afinidade aos receptores, diminuindo ou mesmo eliminando o efeito farmacológico. É necessária a realização de um ensaio biológico da potência do biofármaco (SCHELLEKENS, 2002).

Além disso, vários testes físico-químicos devem ser realizados para avaliar a pureza do INF- α_{2b} e a integridade de sua estrutura molecular. Diferentes ensaios podem ser utilizados para essa finalidade. Ainda não há um consenso sobre quais os ensaios devam ser aplicados em cada uma das etapas do processo produtivo.

Métodos de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), SDS-PAGE e eletroforese capilar, podem ser aplicados para avaliar a presença de outras proteínas, assim como de produtos de degradação do INF- α_2 , como sulfóxidos de metionina (CHIRINO & MIRE-SLUIJS, 2004).

Métodos espectroscópicos podem ser usados para avaliar o teor de proteína na preparação. Informação sobre a estrutura molecular também é fornecida por esses métodos, como a identidade por espectrometria de massa e a estabilidade da estrutura tridimensional por dicroísmo circular e fluorescência (QUALITY, 2010).

O efeito farmacológico de biofármacos depende da integridade de sua estrutura molecular. A degradação física, como perda da estrutura secundária e terciária, compromete a capacidade de ligação do INF- α_2 ao receptor, comprometendo o seu efeito (GILG et al., 1996; HERMELING et al., 2004; KALTASHOV et al., 2010).

O dicroísmo circular é uma técnica de espectroscopia ótica que se baseia na interação da luz ultravioleta plano polarizada com moléculas quirais em solução. A luz sofre um desvio característico, positivo ou negativo, dependendo da quiralidade da molécula.

No caso específico da análise de proteínas, os espectros de dicroísmo circular fornecem informações sobre a estrutura secundária. Cada tipo de estrutura secundária (alfa hélice, estrutura beta) gera um perfil de espectro característico, que é associado a um dos elementos de estrutura secundária presente. A derivação dos

espectros fornece também informações quantitativas desses elementos (KELLY et al., 2005).

O INF- α_{2b} apresenta estruturas secundárias predominantemente do tipo alfa hélice, como pode ser observado na Figura 5. Essas estruturas geram um espectro característico de dicroísmo circular (KIM et al., 2006).

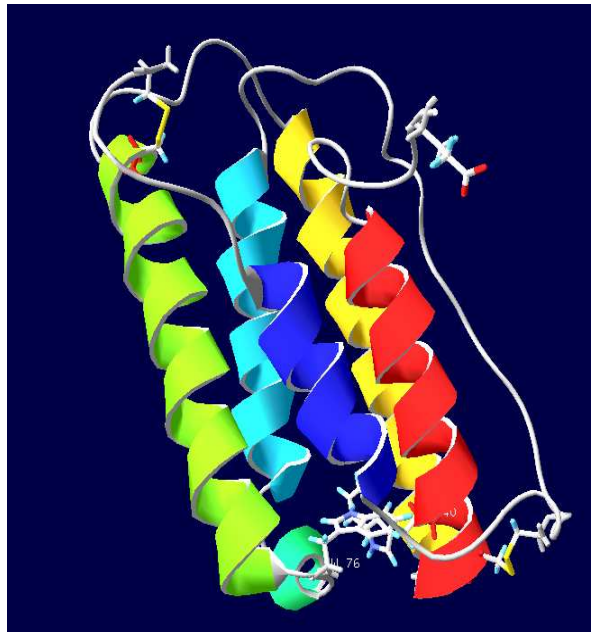


Figura 5: Vista da estrutura secundária do INF- α_{2a} .

As alfa hélices são apresentadas em cores diferentes, azul escuro (G₁₀-M₂₁), azul claro (T₅₂-L₆₆), verde claro (K₇₀-A₇₄), verde (E₇₈-I₁₀₀), amarelo (M₁₁₁-K₁₃₃), vermelho (P₁₃₇-E₁₅₉). Figura gerada no Swiss PDB viewer 4.0.1, utilizando o modelo com código de acesso PDB 2HYM.

A fluorescência é uma técnica que mede basicamente a magnitude e comprimento de onda de luz emitido devido a transições eletrônicas do estado excitado S₁ para o estado fundamental S₀ de uma molécula. Proteínas emitem fluorescência na faixa de 300-400nm devido à presença de aminoácidos aromáticos triptofano e tirosina. As mudanças no espectro de fluorescência de proteínas indicam modificações no ambiente no qual se encontram as cadeias laterais desses aminoácidos (FROKJAER & HOVGAARD, 2000). Utilizando-se o comprimento de

onda de excitação (λ_{ex}) 280 nm, podem-se observar as emissões referentes aos resíduos de tirosina e triptofano. Em 295 nm excita-se seletivamente os resíduos de triptofano, sendo que a fluorescência resultante deve-se ao ambiente onde se encontram as cadeias laterais desses aminoácidos.

A espectroscopia de fluorescência é utilizada para avaliar a estrutura terciária do INF- α_{2b} presente nas formulações. Esse biofármaco apresenta cinco tirosinas, nas posições 85, 89, 122, 129 e 135, além de dois triptofanos, nas posições 76 e 140, conforme é mostrado na Figura 6.

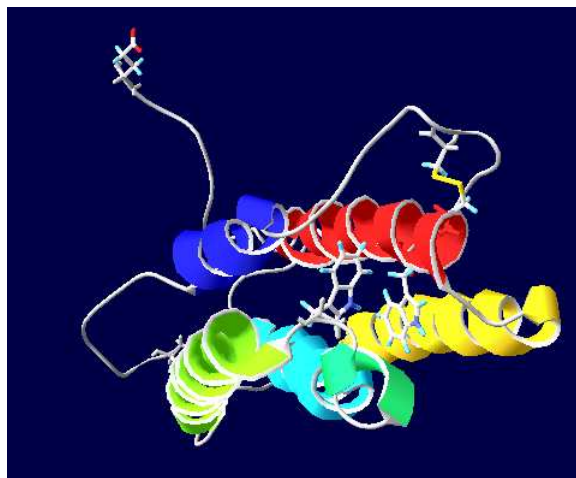


Figura 6: Vista da estrutura do INF- α_{2a} .

A Figura acima mostra com destaque para os dois resíduos de triptofano, nas posições 76 e 140. Figura gerada no Swiss PDB viewer 4.0.1, utilizando o modelo com código de acesso PDB 2HYM.

Na 4^a edição da Farmacopéia Brasileira (FB) não há monografia específica para INFs. A FB também não tem recomendações gerais para produtos produzidos por DNA recombinante (FARMACOPÉIA, 1988).

A United States Pharmacopoeia (USP) 33 recomenda uma série de requisitos que devem ser avaliados e sugere métodos para essa avaliação. No quadro 1 são enumerados os requisitos e as possíveis metodologias a serem utilizadas. Não há nessa farmacopéia uma monografia específica para INFs (THE UNITED, 2010).

Quadro 1: Parâmetros e métodos recomendados pela USP-33 para a avaliação de biomedicamentos (THE UNITED, 2010).

Critério a ser avaliado	Metodologia	Técnica sugerida
Pureza	Cromatografia	CLAE-FR, CLAE- TI e CLAE-FG
	Eletroforese	SDS PAGE e IEF
Teor do Biomedicamento	Espectrofotometria no UV/Vis	Reação específica para proteínas.
	Dosagem de proteínas	Kjedahl
	Seqüenciamento	Edman ou espectrometria de massa
Estrutura primária	Composição de aminoácidos	CLAE com derivatização.
	Mapa peptídico	CLAE

Vale notar que há indicações específicas sobre os ensaios aplicáveis a etapas intermediárias e ao produto final, ficando a critério do fabricante fazer avaliações durante ou no término do processo.

Como a USP-33, a Farmacopéia Européia (FE) 6. ed. (EUROPEAN, 2008), também prescreve requisitos gerais para produtos de biotecnologia DNA recombinantes. A FE 6. ed. determina que o produto deve ser caracterizado quanto a sua identidade, pureza, potência e estabilidade, utilizando métodos químicos, físicos, imunoquímicos e biológicos. Nenhum ensaio específico é apontado. Algumas metodologias são sugeridas para determinar a consistência de produção. Essas metodologias envolvem caracterizar a composição de aminoácidos, o sequenciamento N terminal, o mapa de peptídeos por CLAE-FR, o teor de proteína total e de proteínas contaminantes do sistema de expressão.

No final das recomendações gerais, a FE 6. ed. determina que nas monografias específicas sejam listados os ensaios aplicáveis a cada produto. A FE 6. ed. tem uma monografia específica para avaliar a matéria prima do. INF- α antes

do biomedicamento ser formulado. Essa monografia recomenda os seguintes ensaios:

- Mapa de peptídeos CLAE-FR: método de identificação da proteína por comparação entre cromatogramas de INF- α padrão e da amostra Ambos, padrão e amostra, submetidos previamente às hidrolises com tripsina;
- Focalização isoeétrica: identifica degradações que alteram o ponto isoeétrico (pI) da proteína INF- α ;
- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódio (SDS-PAGE): Conformidade com a massa molecular esperada em relação ao padrão e homogeneidade da proteína;
- Teor de proteínas;
- Proteínas relacionadas: são produtos de degradação do INF. Estas impurezas estão intrinsicamente relacionadas ao princípio ativo proteico. São agregados, formas oxidadas e produtos de hidrólise. Seu limite é de 3 %;
- Potência: é determinada pela medida de seu efeito de proteção celular contra o efeito citopático viral em células MDBK induzido pelo vírus da estomatite vesicular. A potência é comparada a uma preparação de padrão internacional, cujo resultado relaciona o produto à especificação, expresso em termos de unidades internacionais por miligrama de proteína.

As metodologias relacionadas fornecem informações quanto à pureza, identidade e potência do INF- α e estão classicamente colocadas como parâmetros de avaliação de alterações que podem implicar na ausência de eficácia, e/ou ainda na imunogenicidade do produto.

O mapa de peptídeos por CLAE-FR é uma técnica de identidade que demanda essencialmente uma comparação entre hidrolisados de um padrão do INF- α e da amostra. Trata-se também de uma técnica demorada, pois há a necessidade do uso de gradiente, o que leva a análises de até duas horas de duração para cada amostra.

Nos últimos anos a espectroscopia de massa aplicada à análise de biomoléculas avançou rapidamente. Dentre as várias metodologias desenvolvidas

destaca-se *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF). Como será discutido a seguir, essa técnica é rápida, de alta precisão e pode ser aplicada para avaliar a pureza, identidade e produtos de degradação de proteínas.

1.7 Espectrometria de massa MALDI-TOF

A espectrometria de massa (EM) é técnica fundamental nos laboratórios de análise química. Pode ser empregada em análises qualitativas, e em alguns casos quantitativas, de ampla gama de compostos. É sensível e passível de ser acoplada a outras técnicas como, por exemplo, a cromatografia (ANAS EL-ANEED et al., 2009).

As três principais etapas na análise por EM são a produção, a transmissão e a detecção de íons. A informação fornecida é a razão massa/carga (m/z) de moléculas intactas, de fragmentos de moléculas e de aglomerados iônicos. A EM molecular clássica requer que a amostra de interesse seja previamente volatilizada e então ionizada já na fase gasosa por algum agente ionizante, em geral por feixes de elétrons. Da fonte de ionização, isto é, a região onde os íons são gerados, os íons são guiados via uma série de lentes elétricas e/ou magnéticas para o detector. Para facilitar a transmissão dos íons para o detector, é necessário controlar a influência da pressão e da temperatura na mobilidade dos íons (energia cinética). Por essa razão, os espectrômetros de massa funcionam em vácuo, com pressão na faixa de 10^{-5} a 10^{-8} Torr. Uma das funções das pressões baixas é minimizar colisões dos íons do analito com as moléculas do gás residual presentes no interior do espectrômetro. As pressões baixas também garantem o bom desempenho dos espectrômetros, os detectores e as altas tensões aplicadas exigem pressões baixas para melhor rendimento de detecção e para evitar descargas elétricas, respectivamente. Um diagrama básico de um espectrômetro de massa é dado na Figura 7. Os modelos comerciais de espectrômetros de massa são muito variados, existem diversas configurações possíveis dos três componentes básicos, em função do tipo de cada componente, da finalidade de utilização dos espectrômetros e de diversos outros aspectos técnicos, como poder de resolução por exemplo (GLISH & VACHET, 2003).

A grande limitação da EM clássica é a dificuldade de volatilizar moléculas polares ou as termicamente lábeis sem provocar decomposição térmica. As técnicas de ionização branda (*soft ionization*) contornam esse problema (MANN et al., 2001; LIN et al., 2003).

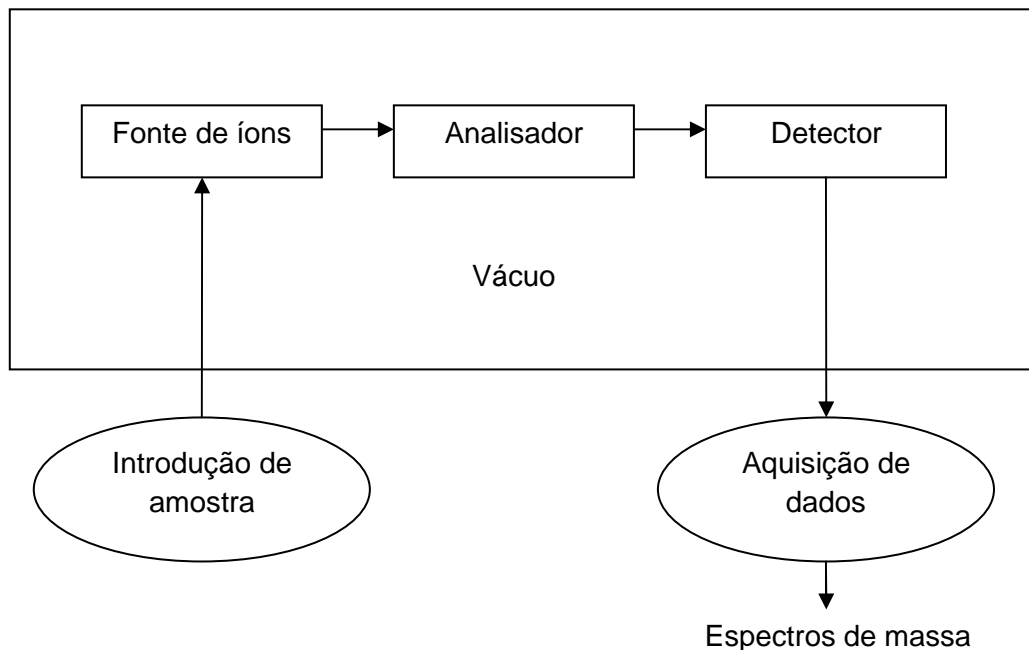


Figura 7: Componentes básicos de um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF.

O resultado da análise, na forma de espectro de massa ou tabela, fornece as relações de m/z versus abundâncias dos íons.

A espectrometria de massa MALDI-TOF foi introduzida independentemente em 1988 por Karas & Hillenkamp (1988) e Tanaka (1988), como um método de transferir moléculas termo lábeis grandes, intactas e ionizadas, para a fase gasosa.

MALDI-TOF é uma técnica de ionização branda e baseia-se na dessorção iônica induzida por laser e assistida por uma matriz constituída de moléculas pequenas, em geral um ácido orgânico fraco. As matrizes mais comuns são derivadas do ácido benzóico ou do ácido cinâmico. Resumidamente, a técnica consiste em misturar o analito de interesse com um grande excesso molar do composto da matriz. Uma solução dessa mistura é depositada sobre a superfície metálica do porta-amostra e deixada secar nas condições ambientais antes de ser inserida no espectrômetro de massa para análise da dessorção por laser. Essa técnica de preparação de amostra permite determinar rápida e precisamente a massa molecular de peptídeos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, polímeros

sintéticos ou outros produtos naturais com valores até centenas de kDa (HILLENKAMP, et al., 1991).

Em 1993, Henzel e colaboradores relataram o primeiro trabalho de identificação de proteínas, em que os peptídeos foram gerados a partir de digestão triptica e suas massas analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. Neste mesmo ano, algoritmos foram publicados e permitiram a correlação de dados obtidos na EM com seqüências depositadas em banco de dados (LIN et al., 2003).

Para dessorver moléculas não voláteis e termolábeis intactas, é necessário fornecer energia ao sistema de maneira tal que previna a decomposição térmica das moléculas do analito. Para isso, os lasers pulsados são ideais devido aos seus pulsos curtos de luz de alta intensidade. A espectrometria de massa por dessorção a laser (*Laser Desorption*, LD), precursora da técnica MALDI, irradia diretamente as moléculas com lasers para ionizá-las e transferi-las para a fase gasosa. No entanto, esse procedimento é limitado a materiais de massa molecular pequena, porque a energia molecular, ou seja, a técnica não é considerada de ionização branda. A incorporação de matriz superou esse problema. O mecanismo de como a matriz atua é complexo e ainda não completamente compreendido, supõe-se que a matriz exerça algumas funções como: i) a matriz absorve fortemente a luz laser em um comprimento de onda no qual o analito absorve apenas fracamente; ii) a relaxação térmica das moléculas excitadas da matriz leva a evaporação da matriz e, ao mesmo tempo, arrasta as moléculas do analito para a fase gasosa sem excitação e sem fragmentação; iii) a matriz reduz os contatos entre as moléculas do analito por meio das interações analito-matriz reduzindo desse modo a energia de dessorção; iv) a matriz age como agente protonante (na detecção de íons positivos) ou desprotonante (na detecção de íons negativos) tanto na fase solução/sólido ou na fase gasosa e é portanto essencial no processo de formação de íons. Todos esses efeitos são necessários e se combinam para fornecer alto rendimento iônico do analito intacto e, conseqüentemente, aumentam a sensibilidade. A sensibilidade é da ordem de sub-picomol (BAKHTIAR & NELSON, 2000).

Em experimentos MALDI são utilizados mais comumente lasers UV de N₂ de $\lambda = 337$ nm com comprimento de pulsos de aproximadamente 3 nanossegundos. A

excitação ocorre sobre uma área de $10^4 \mu\text{m}^2$ da amostra, com irradiações laser tipicamente na faixa de 10^6 a 10^7 W/cm^2 (BRUKER, 1995).

1.8 Princípio básico dos analisadores de massa por tempo de voo – TOF

Os lasers pulsados utilizados em MALDI são ideais para serem associados aos analisadores por tempo de voo, porque definem precisamente o instante de geração dos íons. As características típicas dos espectrômetros de massa por tempo de voo são: i) pode-se obter um espectro de massa em ampla faixa de massa em microssegundos; ii) em princípio, não há limite superior de massa para esse analisador; iii) pode-se alcançar grande sensibilidade devido a grande transmissão de íons; iv) a operação é simples e direta.

Em geral, os espectrômetros de massa TOF possuem dois modos de operação, modo linear e modo refletido.

O princípio do modo de operação linear é esquematizado na Figura 8.

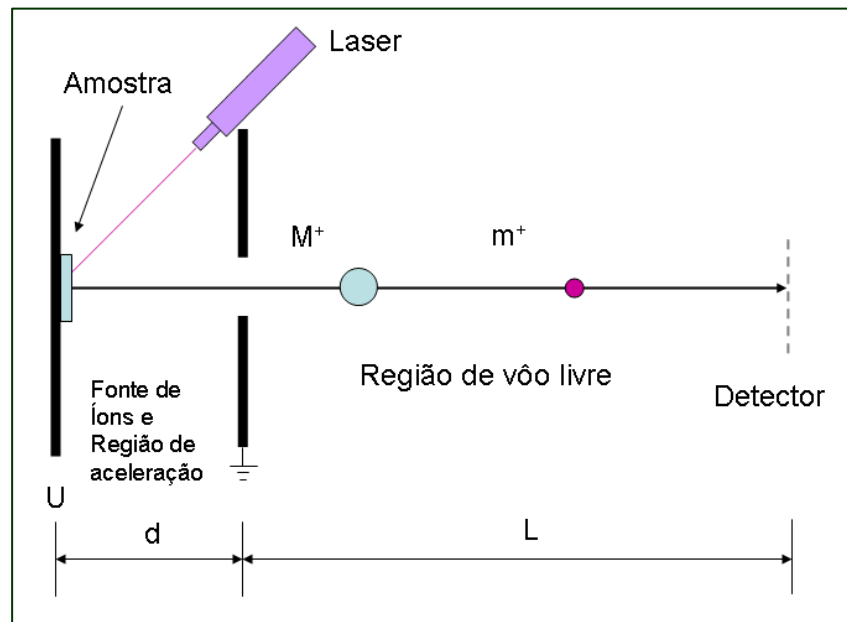


Figura 8: Esquema de operação do TOF linear.

Essa é a configuração mais simples. No campo eletrostático criado na região d , distância entre a amostra no potencial U e a grade aceleradora aterrada, os íons que foram gerados pela incidência do feixe laser sobre a amostra são acelerados até atingirem uma energia cinética E . Supondo que todos os íons adquiram essa energia cinética (qU), eles entram na região mais longa L livre de campo elétrico e batem no detector posicionado no extremo oposto. A razão massa/carga dos íons pode então ser determinada a partir das medidas do tempo de vôo dos íons entre a amostra e o detector.

$$E = \frac{1}{2}mv^2 = qU$$

logo,

$$v = \sqrt{\frac{2qU}{m}}$$

e como velocidade é espaço sobre tempo, deduz-se facilmente que o tempo de vôo, $T = t_d + t_L$, é igual a:

$$T = (2d + L)\sqrt{\frac{m}{2qU}}$$

Onde m e q são a massa e a carga do íon, U é a tensão de aceleração, d e L são os comprimentos das regiões de aceleração e de vôo livre e t_d e t_L são, respectivamente, os tempos de vôo dos íons nas duas regiões. Essa é a equação mais simples do tempo de vôo, ela traduz a relação fundamental entre a razão massa-carga e o tempo de vôo de um íon, ou seja, o tempo de vôo de um íon é proporcional à raiz quadrada da sua razão massa carga. Considerando que a carga do íon é definida como $q = ze$, onde z é o número de cargas elementares e , a simples substituição de q por ze na última equação revela a notação m/z utilizada nos espectros de massa (COTTER, 1997).

O tempo de voo medido experimentalmente é sempre ligeiramente diferente do tempo de voo real devido a atrasos internos dos sistemas de aquisição de dados eletrônicos. No entanto, se os tempos de voo e as massas de dois íons forem conhecidos eles podem ser utilizados para obter uma função de calibração com duas constantes de calibração, que pode ser expressa como uma função linear (VESTAL, 2009).

A limitação prática de um espectrômetro de massa TOF linear é a pequena resolução em massa alcançável devido à distribuição de energia do pacote de íons gerado pelo feixe do laser. Para melhorar o desempenho, é adicionado um espelho eletrostático (ou *Reflectron*) aos espectrômetros de massa TOF. O *Reflectron* faz uso de um campo eletrostático para refletir íons através de um pequeno ângulo na direção de um segundo detector (*stop refletido*) como mostrado na Figura 9 (HILLENKAMP et al., 1991).

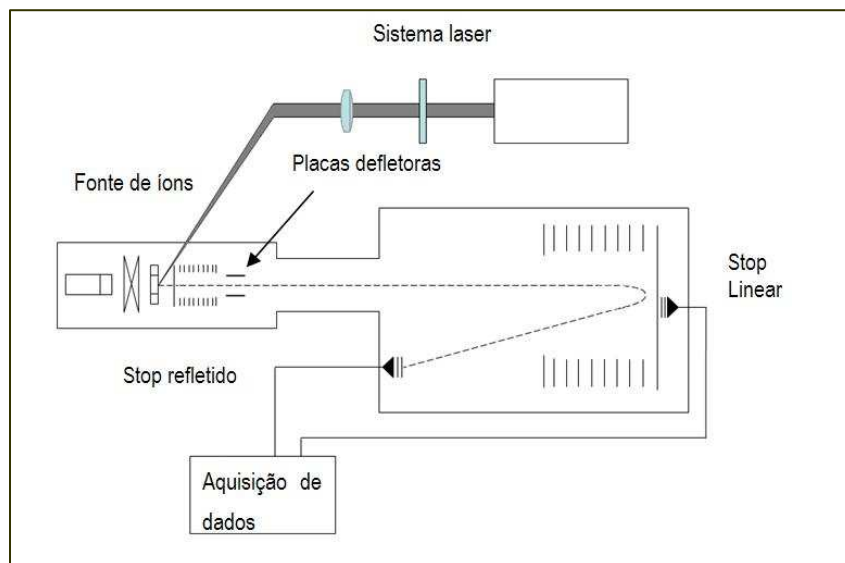


Figura 9: Diagrama do espectrômetro de massa Biflex III Bruker

Íons de mesma razão m/z , porém com energias cinéticas diferentes, penetram mais ou menos profundamente no refletor. Os íons com energias cinéticas maiores penetram mais profundamente, atrasando o seu tempo de chegada ao detector de íons refletidos em relação aos íons com energias cinéticas menor que são mais lentos e penetram menos profundamente. Esse efeito resulta no aumento da

resolução dos espectros TOF refletidos comparados com os espectros TOF lineares e aumenta a precisão das massas medidas.

O funcionamento do analisador por tempo de voo e as deduções das equações de tempo de voo são descritos em detalhes no trabalho de tese de doutorado de Ponciano (1996).

O modo de operação refletido é indicado para analisar massas menores do que 5 KDa. Nos dois modos de operação, linear e refletido, é possível obter também espectros de íons positivos ou de íons negativos, basta trocar a polaridade da tensão de extração U aplicada à amostra. A intensidade do feixe do laser é fixa, porém pode-se controlar com um atenuador a fluência ideal que incide sobre a amostra, de modo a obter bons espectros.

Os espectrômetros de massa MALDI-TOF comerciais tornaram-se ferramenta importante nos laboratório de bioquímica, sendo preponderantemente utilizados para analisar peptídeos e proteínas (TSARBOPOULOS et al., 1994). Na prática, para esse uso, o espectrômetro é calibrado com espectros de tempo de voo obtidos com uma mistura de peptídeos padrões. Pelo menos dois valores de massas conhecidas são atribuídos aos picos correspondentes a elas no espectro dos peptídeos padrões e o programa do espectrômetro calcula as constantes de calibração. Essa calibração é então aplicada aos espectros de amostras desconhecidas, obtidos nas mesmas condições do padrão.

Os íons detectados em MALDI são predominantemente monocarregado; embora o mecanismo da formação de íons permaneça incerto, supõe-se que a ionização seja de natureza essencialmente química, como a transferência de próton ou reação de cationização. A carga depende criticamente da combinação matriz-analito, porém não do número de grupos ácidos ou básicos da macromolécula. Isso sugere que uma interação mais complexa da matriz e com o analito seja responsável pela ionização, ao invés de uma simples reação química ácido-base. A ionização de moléculas orgânicas pequenas, incluindo moléculas de matriz, também podem ser devida à formação de íons moleculares radicais (KARAS & KRÜGER, 2003).

Especificamente para peptídeos e proteínas, os íons observados nos espectros MALDI são do tipo $[M + H]^+$. Deve-se notar que pelo fato das macromoléculas terem números grandes de átomos de carbono, a contribuição do

isótopo ¹³ de carbono passa a ser muito significativa; por isso, é fundamental selecionar corretamente o pico correspondente à massa monoisotópica. A massa molecular monoisotópica é calculada considerando apenas as massas atômicas dos isótopos mais abundantes. Para os elementos mais freqüentes nos compostos orgânicos, H, C, N, O, F, Si, P, S, Cl, Br e I, o isótopo mais leve é o mais abundante. Portanto, em um pacote de picos correspondentes a um peptídeo, o pico de menor massa é o monoisotópico. Vale notar que esse pico não é necessariamente o mais abundante, porque a medida que a massa molecular aumenta a contribuição do isótopo ¹³ do carbono fica mais evidente (COTTER, 1997).

O espectrômetro utilizado neste trabalho é o exibido na Figura 10.

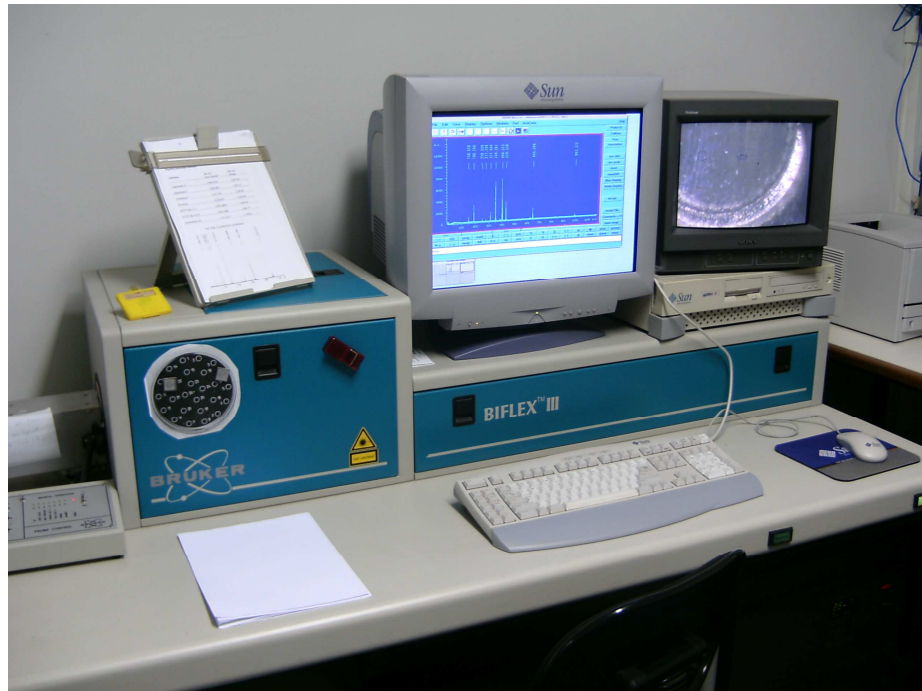


Figura 10: Espectrômetro de Massa Biflex III Bruke.

O porta-amostra é introduzido automaticamente por um sistema de abertura e fechamento de válvulas, que permite restaurar o vácuo rapidamente. A movimentação da amostra dentro do espectrômetro é realizada mediante posicionadores x-y totalmente controlados pelo computador (Figura 11). O porta-amostra consiste de uma peça de aço, cuja superfície plana é marcada com 26 posições para depositar as amostras. Utiliza-se normalmente de 0,3 a 0,5 μL da solução analito-matriz.

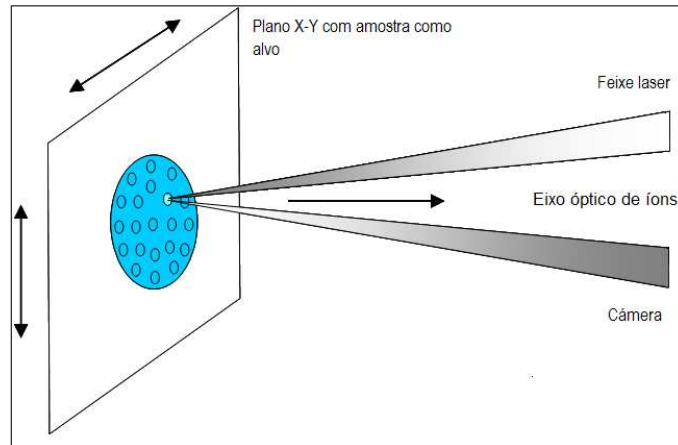


Figura 11: Esquema do movimento do porta-amostra.

O movimento é feito em um plano vertical de modo que a amostra a ser analisada fique posicionada no eixo do analisador.

Uma câmera de vídeo CCD no interior do espectrômetro permite observar a amostra com alta resolução ($< 10 \mu\text{m}$), cada posição de amostra de 2 mm de diâmetro é ampliada na tela de um monitor de 15 polegadas de forma que a imagem de aproximadamente metade da amostra ocupa toda a tela.

O espectrômetro de massa Biflex III possui um espelho eletrostático de dois estágios sem grades. Um refletor de dois estágios fornece poder de resolução maior do que um de um único estágio. A melhor resolução é alcançada mediante o desenho de um campo refletor duplo, onde os íons são retardados no primeiro estágio e são refletidos no segundo estágio.

As tensões do refletor são aplicadas com valores mais altos do que o potencial acelerador, com a finalidade de refletir os íons. No modo de operação por reflexão, todos os íons serão detectados no detector de íons refletidos (*stop refletido*) (BRUKER, 1995).

Portanto, os estudos bibliográficos mostram ser a espectrometria de massa MALDI-TOF uma técnica analítica sensível para a análise de interferon obtido por DNA recombinante em formulações farmacêuticas, sendo proposta juntamente com a digestão enzimática como abordagem dentro de um conjunto de metodologias.

Esse trabalho foi desenvolvido no sentido de buscar metodologias analíticas mais modernas, para implementar o controle de qualidade e caracterização

estrutural, de maneira que obtenhamos informação acerca da segurança, qualidade e eficácia do biofármaco que dêem suporte para as ações de Vigilância Sanitária.

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para caracterizar a estrutura molecular do INF- α_{2b} em formulações farmacêuticas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

2.1 Objetivos específicos

Desenvolver um método de cromatografia líquida para promover a separação entre o INF- α_{2b} constituinte ativo e minoritário e o soro albumina humana (HSA) também componente presente nas formulações;

Avaliar por métodos espectroscópicos se há degradação da estrutura tridimensional do INF- α_{2b} presente em formulações;

Identificar o INF- α_{2b} isolado por espectrometria de massa MALDI-TOF, visando obter a seqüência primária que permita caracterizar a sua estrutura para subsidiar o estabelecimento de um protocolo para a análise de INF- α_{2b} em produto final.

3 METODOLOGIA

3.1 Locais de realização dos experimentos

A realização da parte prática da dissertação deu-se em três laboratórios, a seguir:

- I. Laboratório de Produtos Biológicos - Departamento de Química - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-FIOCRUZ). Nesse laboratório foram realizadas as análises de eletroforese de proteínas, cromatografia de proteínas e espectroscopia de ultravioleta e fluorescência;
- II. Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no Laboratório de Esquistossomose Experimental, no Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz;
- III. As análises de espectrometria de massas foram feitas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

3.2 Material

3.2.1 Amostras

Utilizaram-se amostras de INF- α_{2b} , de um produtor nacional, adquiridas pela Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde, para o Programa Nacional de Controle de Hepatites Virais. Foram analisados lotes de formulação com potência de 10×10^6 UI/mL/frasco foram analisadas.

3.2.2 Reagentes

Os reagentes foram fornecidos pela Sigma, GE, Bio-rad e Merck, dentre outros. Os reagentes específicos a determinadas técnicas serão relacionados conforme forem descritos os procedimentos.

O padrão de INF- α_{2b} Lote nº 3 utilizado foi fornecido pela Farmacopéia Européia.

3.3 Métodos

3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Filtração em Gel (CLAE-FG)

A caracterização da proteína INF- α_{2b} presente nas formulações demandou separá-la da soro albumina humana (HSA) e dos demais componentes do produto. A técnica inicialmente testada para a separação foi a CLAE-FG. Esse tipo de cromatografia pareceu adequado, devido à diferença de volume hidrodinâmico entre o INF e a HSA, que, em princípio, possibilitaria a separação. Além disso, a análise se dá em condições pouco desnaturantes, com baixa concentração de solvente orgânico e pH próximo a neutralidade, o que minimiza a possibilidade de degradação do biofármaco durante o processo.

As colunas foram selecionadas pelo critério de faixa de fracionamento. Outro critério determinante foi considerar as diferentes fases estacionárias. As colunas TSK-GEL SWxl são de sílica inativada, enquanto a coluna Superdex 75 é de resina polimérica. Na literatura há relatos de diferenças de separação relacionadas às fases componentes de cada coluna (WINZOR, 2003). Por essa razão, testar diferentes colunas é uma alternativa para aperfeiçoar a separação.

Foram testadas as colunas TSK-GEL SWxl 2000, TSK-GEL SWxl 3000, Superdex® 75 HR 10/30, com as faixas de fracionamento para proteínas globulares descritas por seus fabricantes listadas na Tabela 3. As três colunas são de 30 cm de comprimento; as duas primeiras têm diâmetro (\varnothing) igual a 7,8 mm e foram utilizadas com fluxo de 0,6 mL/min, a coluna Superdex tem (\varnothing) igual 10,0 mm e foi utilizada com fluxo de 0,4 mL/min Além de variar as colunas, variou-se também os tampões utilizados como fase móvel, visto que ganhos de resolução podem ser alcançados com essa variação.

Tabela 3: Colunas de CLAE-FG e tampões testados para a separação INF α_{2b} HSA.

	Faixa (kDa) ¹	Tampão (mM)	pH
TSK-GEL SWxl 2000	5 – 150	PB 50	7,4
		PB 100	7,4
TSK-GEL SWxl 3000	10 – 500	PB 50	7,4
Superdex® 75 HR 10/30	3 – 70	PB 50	7,0
		PB 50 ; NaCl 150	7,0
		PB 50 ; NaCl 150; 5% nPrOH	7,0

1-Valores fornecidos pelos fabricantes das colunas

Em princípio a separação das proteínas INF- α_{2b} e HSA poderia ser alcançada em todas essas colunas, sendo necessário testar diversas condições para obter a melhor resolução entre INF- α_{2b} e HSA. Para avaliar a capacidade de separação de cada coluna, inicialmente elas foram calibradas com substâncias de proteínas padrões de massas moleculares conhecidas, para cada tampão. As proteínas substâncias utilizadas como padrões escolhidas para construir as curvas de calibração foram: Tireoglobulina (660 kDa), Imunoglobulina (155 kDa), Albumina Bovina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Insulina (5,8 kDa), Vitamina B₁₂ (1,35 kDa). O cálculo dos parâmetros estatísticos foram obtidos utilizando o programa Excel/análise de dados.

Esse experimento foi realizado no cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10 (Shimadzu), equipado com sistema controlador SCL-10A_{vp}, bomba LC-10 AD_{vp}, válvula seletora de solvente Shimadzu FCV-10AL, autoinjeter SIL-10AD_{vp}, resfriador de amostra, com temperatura de 8°C, e detector UV/VIS SPD 10A. Foram testadas diferentes colunas, com diferentes faixas de fracionamento por massa molecular, mantidas em temperatura ambiente. Diferentes tampões também foram avaliados, para melhorar a resolução entre o INF- α_{2b} e a HSA. Monitorou-se a corrida em comprimento de onda de 214 nm. O volume de injeção foi calculado na faixa de 0,1 a 1 % do volume interno para cada coluna. Parâmetros cromatográficos como fator de cauda e resolução, foram calculados usando o programa class VP (Shimadzu). A

fração correspondente ao INF foi coletada manualmente e concentrada em Speed Vac® (ŠTULÍK et al., 2003; THIEDE et al. 2005; JIN QIAN et al., 2008).

3.3.2 Determinação Quantitativa de Proteínas

A determinação quantitativa de proteínas foi usada para acompanhar o teor nas frações coletadas dos métodos cromatográficos. Foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando o protocolo para determinação em microplacas segundo a referência. O reagente de Bradford utilizado foi fornecido pela Sigma. Das frações correspondentes ao INF, coletadas da CLAE-FG, foram tomadas 3 alíquotas de 20 µL. Foi construída uma curva de calibração com 6 níveis de concentrações de soroalbumina bovina de 10 a 100,02 µg/mL, em triplicatas. Após adição do reagente e desenvolvimento da reação, as leituras das absorbâncias em comprimento de onda de 595 nm foram realizadas em leitor de micro-placas modelo 3550 (Bio-Rad).

3.3.3 Eletroforese de proteínas com dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE foi usado para avaliar a homogeneidade protéica das frações coletadas dos procedimentos de CLAE. Alíquotas de 10 mL das frações coletadas de CLAE-FG, adicionadas de 10 mL de solução de β-mercaptoetanol, foram aplicadas em gel concentrador de 5% e gel de acrilamida 15%, segundo Laemmli, (1970) e colocadas no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad), nas condições de corrida previstas em protocolo do fabricante. A coloração pela prata foi aplicada para evidenciar as bandas do INF (KAMP, CHOLL-PAPADOPOULOU & WITTMANN-LIEBOLD, 1997). Os géis obtidos foram digitalizados no densitômetro GS-800 Bio- Rad, com o auxílio do programa *Quantity One* (Bio-rad). As massa moleculares de cada banda foram estimados comparativamente a padrões de baixa massa moleculares.

Para obtenção dos peptídeos extraídos de gel, a ser utilizado na espectrometria de massa, a coloração com prata compatível foi segundo o protocolo de BLUM, BEIER, &GROSS (1987).

3.3.4 Uso de Membrana de imunoafinidade para remoção de HSA das amostras

Recentemente foram desenvolvidas membranas de imunoafinidade para a remoção de HSA de amostras de plasma. O objetivo desse procedimento é diminuir a quantidade de HSA para facilitar a detecção de proteínas plasmáticas minoritárias, visando estudos da proteômica (GREENOUGH et al., 2004).

O fundamento dessa técnica é a imobilização de fragmentos de anticorpos anti-HSA em agarose entrecruzada. Esses anticorpos não têm reatividade com outras proteínas humanas, ligando especificamente HSA. As amostras de plasma são misturadas com essa resina, e posteriormente submetidas a filtração em cartuchos acoplados a tubos de micro centrifuga. A fração eluída é depletada em HSA, que concentra-se na fração retida.

A imunoafinidade foi utilizada para reduzir a concentração da HSA nas formulações de INF- α_{2b} . A utilização do kit Vivapure® Anti HSA para depleção de Albumina Humana (Sartorius), seguiu o protocolo preconizado pelo fabricante. Esse kit é constituído de membrana com anticorpos anti HSA imobilizados, sendo necessários uma centrifuga e agitador para micro-tubos (GREENOUGH et al., 2004).

3.3.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A metodologia de espectroscopia de dicroísmo circular foi utilizada para avaliar a estrutura secundária do INF- α_{2b} coletado do esquema de purificação imunoafinidade/gel filtração foram então analisadas por dicroísmo circular (KELLY et al., 2005). As frações coletadas de CLAE-FG, concentradas em Speed-Vac®, foram submetidas ao procedimento de diálise, utilizando membrana de cut off 10 kDa, contra tampão fosfato 10 mM, pH 7.4 (KIM et al., 2007). Um padrão de INF- α_{2a} da Farmacopéia Européia foi diluído com o tampão PB 10 mM, pH 7,4, de maneira a obter concentração semelhante a da fração coletada. Os espectros foram obtidos no espectrômetro JASCO em células de quartzo.

3.3.6 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar a estrutura terciária das frações coletadas de CLAE-FG. Estas frações coletadas, foram concentradas em Speed-Vac®, submetidas ao procedimento de diálise, utilizando membrana de cut off 10 kDa, contra tampão fosfato 10 mM, pH 7.4. Os espectros foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC, em células de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico, utilizando comprimentos de onda para excitação de 280 nm e 295 nm, com tamanho da fenda de 5,0 nm. A emissão foi lida de 200 nm até 400 nm. A leitura do tampão fosfato foi subtraída como branco (SHARMA & KALONIA, 2003).

3.3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (CLAE-FR)

Esse tipo de cromatografia tem como característica alta resolução possibilitada pela fase estacionária constituída de pequenas partículas da ordem de 5 µm de maneira que a cinética de troca entre as fases móvel e estacionária seja muito rápida. A eluição da amostra se dá através de aplicação de gradiente com concentração crescente de solvente orgânico (acetonitrila) adicionada de TFA 0,1% a uma solução aquosa com TFA 0,1%. A separação das proteínas ocorre devido suas hidrofobicidades. Esta modalidade de cromatografia é desnaturante, com pH ácido e alta concentração de solvente orgânico, o que desnatura o biofármaco durante a análise.

A CLAE-FG foi utilizada para separar o INF- α_{2b} da HSA e dos demais componentes da formulação. O experimento foi realizado no cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10 (Shimadzu), equipado com sistema controlador SCL-10A_{vp}, bomba LC-10 AD_{vp}, válvula seletora de solvente Shimadzu FCV-10AL, autoinjeter SIL-10AD_{vp}, resfriador de amostra, coletor de frações FRC-10A, e detector UV/VIS SPD 10A. A coluna utilizada foi ACE 3 C18-300 (250 mm x 4,6 mm), mantidos em temperatura ambiente. A fase móvel A consistiu de ácido trifluoroacético 0,1 % (TFA 0.1 %) em água, fase móvel B de acetonitrila: TFA 0,1%, com gradiente descrito na FE (INTERFERON, 2008). Fluxo de 1,0 mL/min, comprimento de onda de detecção

214 nm. Os dados foram processados utilizando Class –VP 6.13 SP2. O volume de injeção foi de 100 μ L.

3.3.8 Digestão Enzimática

A identificação ou confirmação de proteínas por espectrometria de massa MALDI-TOF é feita em geral após submeter a proteína de interesse à uma hidrólise enzimática. A razão principal deste procedimento é obter espectros de massas menores do que 5kDa; nesta faixa de massas é possível utilizar o espectrômetro de massa no modo de operação para íons refletidos e, portanto, determinar as massas observadas com maior precisão.

A solução de tripsina (Promega V5228A) foi preparada dissolvendo 100 μ g em 100 μ L de ácido acético 50 mM (solução estoque 1,0 μ g/ μ l). 14 μ L dessa solução estoque foram diluídos em 1 mL de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50mM, para o preparo de uma solução de trabalho de tripsina. As frações coletadas da CLAE-FR, foram liofilizadas, após foram adicionados 100 μ L de tampão NH_4HCO_3 pH 8,4, homogeneizados em vortex, acrescidos de 10 μ L da solução de trabalho de tripsina. Após, permaneceram em Thermomixer®, com agitação e temperatura de 37°C por 18h e então foram adicionados aos tubos 10 μ L da solução de trabalho de tripsina, com período de 4 horas em Thermomixer®, com agitação e temperatura de 37°C.

Foi preparado um padrão de INF- α_{2a} na concentração de 7 μ g/mL em tampão NH_4HCO_3 pH 8,4. Esta concentração é a esperada para a amostra, assim como um branco, tampão e demais reagentes. A seguir amostra, padrão e branco foram submetidos ao procedimento de digestão (TSARBOPOULOS et al., 1994; SIMPSON, 2003).

Para a excisão dos peptídeos do gel para submissão posterior à digestão, utilizamos o protocolo segundo Shevchenko et al., (1996).

Os tubos com os peptídeos foram guardados à -20°C para posterior análise por espectrometria de massa.

3.3.9 Espectrometria de massa

Para a identificação das amostras coletadas na CLAE-FR, foi utilizada a técnica *Peptide Mass Fingerprint* (PMF), com a espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI-TOF).

A matriz utilizada no preparo das amostras foi ácido α -ciano-p-hidroxicinâmico (ACHC). Foi preparada uma solução saturada dessa matriz em água, ACN (1:2) e TFA (0,2%). Essa solução foi misturada com solução dos peptídeos em partes iguais, de modo a ter a relação de 1000 a 10000 vezes mais moléculas de matriz que moléculas de peptídeo. À alíquota de 5 μ L da amostra previamente submetida à digestão, adicionou-se 5 μ L da matriz. Aplicou-se 0,5 μ L dessa mistura em um porta amostras, que após a secagem cristalizou.

Para a aquisição dos espectros o espectrômetro foi operado no modo refletido, com detecção para íons positivos. A calibração do equipamento foi feita com kit de peptídeos padrões da Bruker Daltonics. Os espectros foram processados no programa XACQ 4.0 (Bruker Daltonics).

4 RESULTADOS

4.1 Separação do INF dos demais componentes da formulação

4.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Filtração em Gel-(CLAE-FG)

Para este estudo foram feitas seis tentativas de separação das proteínas, numeradas de i a vi na ordem em que foram realizadas. Os resultados estão exibidos nas Figuras de 12 a 17; as condições de cada experimento e os tempos de retenção esperados e observados estão reunidos na Tabela 4.

O trabalho de separação das proteínas nas formulações foi realizado considerando as massas moleculares de 19 kDa para INF- α_{2b} e de 66 kDa HSA como base para calcular os tempos de retenção (t_R) de ambas nas diferentes condições utilizadas.

Tabela 4: Condições experimentais e os tempos de retenção esperados e observados nas seis tentativas de separação por CLAE-FG de INF e HSA na formulação.

Coluna	Fase móvel		Tempos de retenção t_R (min)		Figura	
	Tampão (mM)	pH	Esperados HSA / INF	Observados HSA / INF		
TSK-Gel 2000	SWxl	PB 50	7,4	11,7 / 13,4	10,5 / 13,1	10
		PB 100	7,4	11,7 / 13,4	11,6 / 14,5	11
TSK-Gel 3000	SWxl	PB 50	7,4	13,1 / 14,8	13,7 / 16,3	12
Superdex 75		PB 50	7,0	22,5 / 25,6	22,1 / 28,2	13
		PB 50 + NaCl	7,0	22,7 / 27,1	22,2 / 28,4	14
		PB 50 + NaCl + 5% nPrOH	7,0	23,1 / 27,2	22,6 / 28,5	15

- i) Na Figura 12(a) é mostrada a curva de calibração da coluna TSK-GEL SWxl 2000. A correlação entre o tempo de retenção (t_R) e o inverso log

da massa molecular ($r^2 = 0,997$) é considerada satisfatória. No cromatograma da formulação de INF, Figura 12(b), observa-se um pico principal (87,6 %), com 10,5 min, atribuído à HSA. A simetria desse pico é baixa (0,92), existem ombros com t_r de 8,98 e 9,56 min, que podem representar agregados de alta massa molecular. Observa-se um pico menor (9,8 %) em 13,1 min, atribuído a INF. A resolução entre esse pico e o primeiro é de 1,58, não há uma separação de linha de base entre os dois.

Essas condições não se mostraram adequadas para obter a separação INF- α_{2b} da HSA.

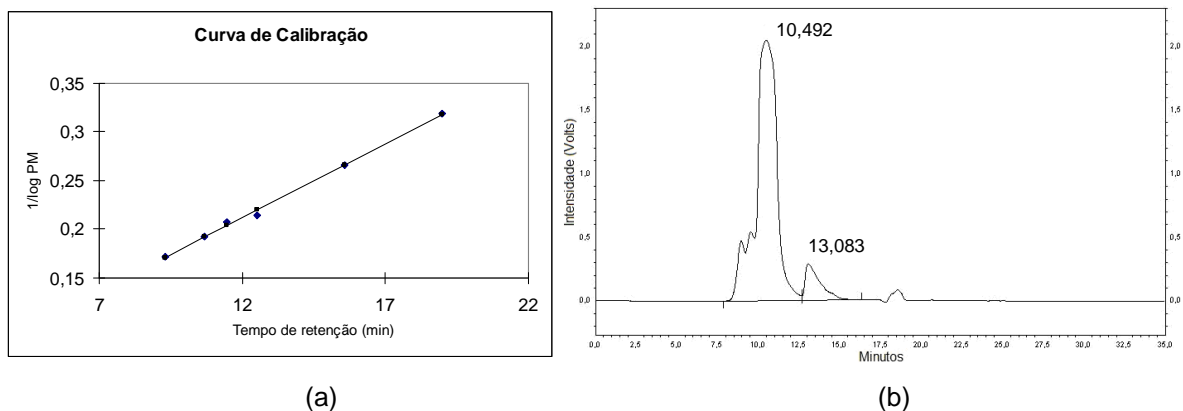


Figura 12: (a) Curva de calibração de massa molecular para a coluna TSK-GEL SWxl 2000 (b) Cromatograma da formulação de INF- α_{2b} obtido na coluna TSK-GEL SWxl 2000, (30 cm C x 7,8 mm \varnothing), fase móvel: tampão PB, 50 mM, pH 7,4; fluxo: 0,6 mL/min, λ 214 nm.

- ii) Para tentar melhorar a resolução, aumentou-se a força iônica do tampão fosfato para 100mM, a fim de reduzir interações eletrostáticas entre as proteínas e a fase estacionária (ARAKAWA, 2010).

Na Figura 13 (a) é mostrada a curva de calibração com o tampão fosfato para 100mM, a correlação ($r^2 = 0,997$) é similar a da curva anterior. O cromatograma é

mostrado na Figura 13 (b). Observa-se um pico principal (96 %), com $t_R = 11,6$ min, atribuído à HSA. A simetria desse pico é baixa (0,77), embora a separação dos ombros de menor t_R (9,3 e 10,3 min), tenha melhorado em relação ao primeiro experimento. Observa-se um pico menor (3,4 %) com t_R de 14,5 min, semelhante ao t_R do padrão de INF- α_{2b} (14,7 min) injetado nas mesmas condições. A resolução entre esse pico e o primeiro aumentou um pouco (2,06), mas esse pico continuou a aparecer na cauda de HSA, não sendo atingida uma resolução ideal entre as duas proteínas.

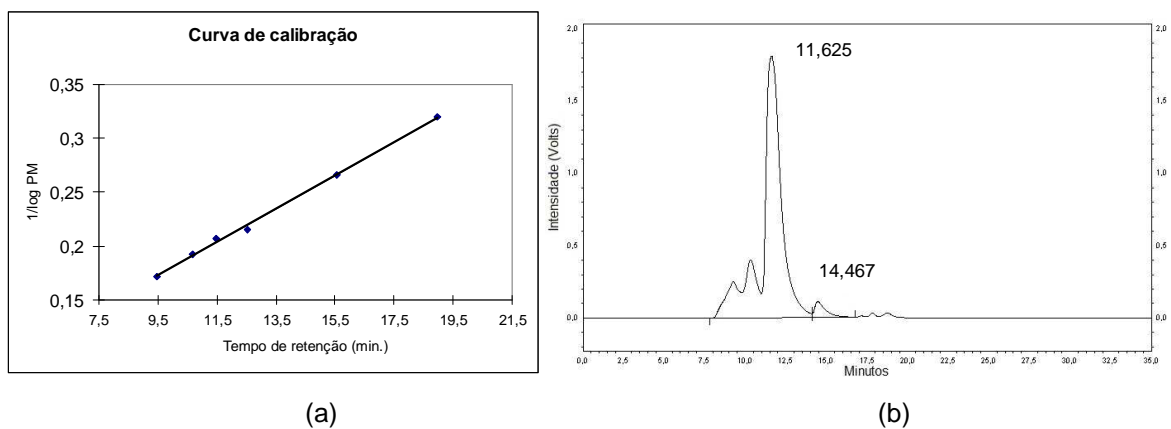


Figura 13: (a) Curva de calibração de massa molecular para a coluna TSK-GEL SWxl 2000 (b) Cromatograma da formulação de INF- α_{2b} obtido na coluna TSK-GEL SWxl 2000, (30 cm C x 7,8 mm \varnothing), fase móvel: tampão PB, 100 mM, pH 7,4; fluxo: 0,6 mL/min, λ 214 nm.

- iii) Para tentar melhorar a resolução optou-se por testar uma coluna com faixa de fracionamento maior, a TSK-GEL SWxl 3000. Essa coluna já havia sido anteriormente usada na análise de formulações de INF- α_{2b} que contem HSA (DIRESS, 2010). A curva de calibração da coluna TSK-GEL SWxl 3000 é mostrada na Figura 14 (a), a correlação obtida para essa coluna foi estatisticamente significativa, ($r^2 = 0,912$), porém com r^2 menor do que a coluna TSK-GEL SWxl 2000. O cromatograma da formulação de INF- α_{2b} é mostrado na Figura 14 (b). Observa-se um pico principal (79 %), com t_R de 13,7 min, atribuído a HSA. Observa-se também ombros com t_R de 9,45 e 12,10 min Esses ombros com t_R

menor que o pico principal representam agregados de massa molecular alta. Observa-se um pico menor (2,8 %) com t_R de 16,3 min. Esse valor é maior que o esperado para o INF- α_{2b} , porém a adição do padrão da FE levou a um aumento de sua intensidade. Dessa maneira, atribuiu-se esse pico a INF- α_{2b} . A resolução entre as duas proteínas permaneceu baixa, levando à necessidade de melhora do método de separação.

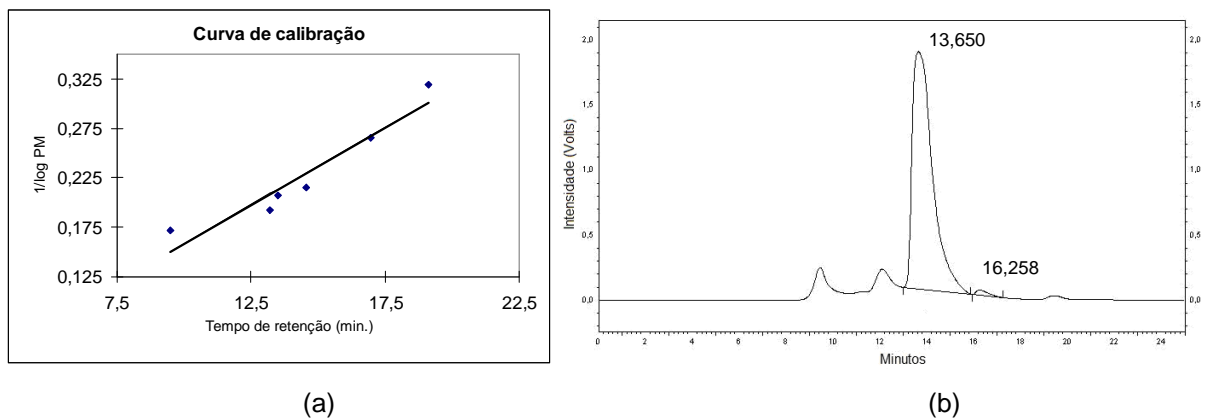


Figura 14: (a) Curva de calibração de peso molecular para a coluna TSK-GEL SWxl 3000 (b) Cromatograma da formulação de INF- α_{2b} obtido na coluna TSK-GEL SWxl 3000, (30 cm C x 7,8 mm \emptyset), fase móvel: tampão PB, 50 mM, pH 7,4; fluxo: 0,6 mL/min, λ 214 nm.

- iv) Optou-se por experimentar a coluna Superdex 75, por ela ter como característica a sua fase estacionária denominada sefarose, constituída de cadeias cruzadas dos polímeros naturais dextran e agarose. Esse tipo de fase estacionária tem um comportamento distinto das fases estacionárias baseadas em sílica, como a utilizada na TSK GEL SWxl (ARAKAWA, 2010). Há menos tendência a interações polares, e principalmente iônicas. Isso pode aumentar a seletividade, favorecendo a resolução entre as proteínas, melhorando a eficiência da separação (ARAKAWA, 2010).

A primeira análise com essa coluna foi feita com PB 50 mM, fase móvel com pequena força iônica. Devido ao limite de pressão da coluna, foi necessário trabalhar com fluxo de 0,4 mL/min, menor do que o utilizado para a coluna TSK-GEL.

A curva de calibração da coluna é mostrada na Figura 15 (a), obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,979. O cromatograma da formulação é mostrado na Figura 15 (b). A existência de ombros com t_R de 15,4 e 16,3 min demonstra a presença de agregados de massa molecular alta. O pico principal, largo e pouco simétrico, foi observado em 22,1 min. O segundo pico foi observado em 28,2 min foi atribuído a INF- α_{2b} , apesar de mais alto do que o esperado. A separação entre esse pico e o principal foi a melhor alcançada até então, mas ainda poderia ser incrementada.

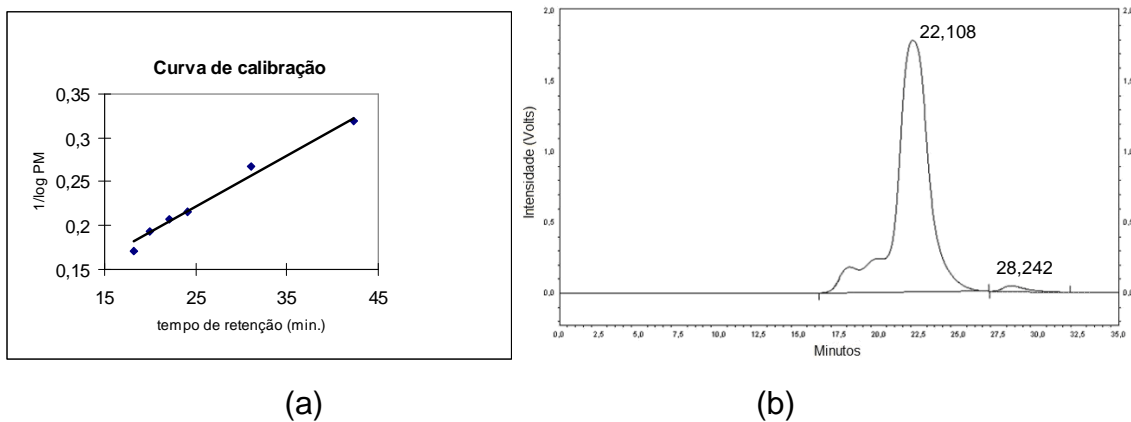


Figura 15: (a) Curva de calibração de peso molecular para a coluna Superdex® 75 b) Cromatograma da formulação de INF- α_{2b} obtido. Condições: coluna Superdex® 75 HR 10/30, 30 cm C x 10,0 mm \varnothing , fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, fluxo: 0,4 mL/min, λ 214 nm

- v) A alternativa testada para aumentar a resolução foi incrementar a força iônica da fase móvel, com a adição de cloreto de sódio. Esse sal que melhora a resolução em CLAE-FG, por reduzir as pontes de hidrogênio entre a proteína e a fase estacionária (ARAKAWA, 2010).

O resultado é mostrado na Figura 16. O acréscimo de NaCl melhorou um pouco a correlação, com $r^2 = 0,981$. São observados ombros de massa molecular

alta ($t_r = 18$ e 20 min), com pico principal em $22,2$ min. O pico do INF- α_{2b} foi observado em $28,4$ min. Houve um discreto aumento da separação entre esse pico e o pico da HSA. Em nova avaliação a resolução entre as duas proteínas ainda poderia ser melhorada.

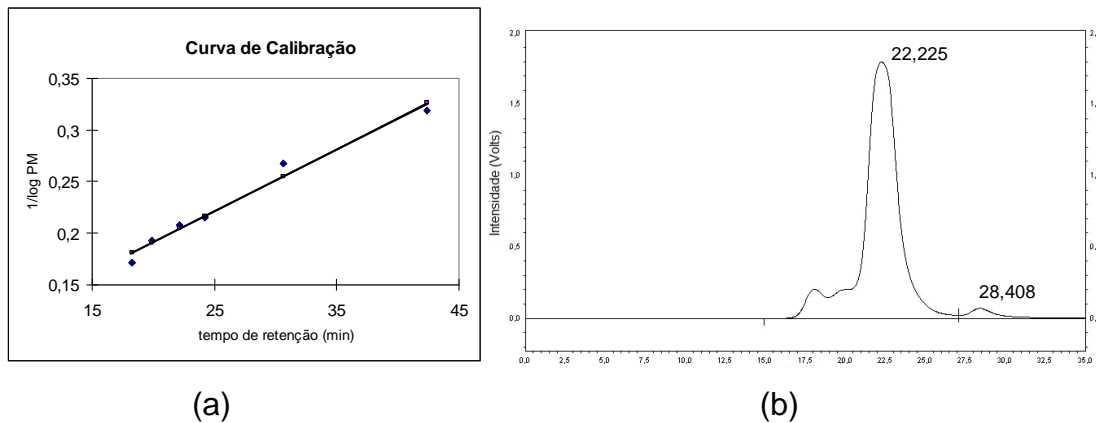


Figura 16: (a) Curva de calibração de peso molecular para a coluna Superdex® 75 b) Cromatograma da formulação de INF- α_{2b} obtido Condições: coluna Superdex® 75 HR 10/30, 30 cm C x 10,0 mm Ø, fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, fluxo: 0,4 mL/min, λ 214 nm.

- vi) Uma outra alternativa para tentar aumentar a separação foi adicionar um modificador orgânico à fase móvel. Foi adicionado 5% de n-propanol com a função de diminuir as interações hidrofóbicas da formulação com a matriz que compõe a fase estacionária (ARAKAWA, 2010).

A curva de calibração da coluna é mostrada na Figura 17 (a). A correlação obtida foi estatisticamente significativa ($r^2 = 0,995$).

Observa-se que houve diminuição expressiva da intensidade do ombro de massa molecular alta. A adição de modificador orgânico provocou a dissociação de agregados protéicos primariamente unidos por interação hidrofóbica (ARAKAWA, 2010).

Nessas condições foi observada a maior diferença de t_r obtido até então entre o pico principal e o pico do INF- α_{2b} , sendo em torno de seis minutos. Por esse motivo o segundo pico foi coletado, concentrado e analisado por SDS-PAGE, para

avaliar a homogeneidade protéica. Para efeito de comparação, os picos correspondentes ao INF- α_{2b} nas condições anteriores também foram analisados.

O resultado do SDS PAGE é mostrado na Figura 17 (c). As frações coletadas apresentaram bandas correspondentes às massas moleculares da HSA e do INF- α_{2b} , demonstrando que a separação efetivamente não foi completa.

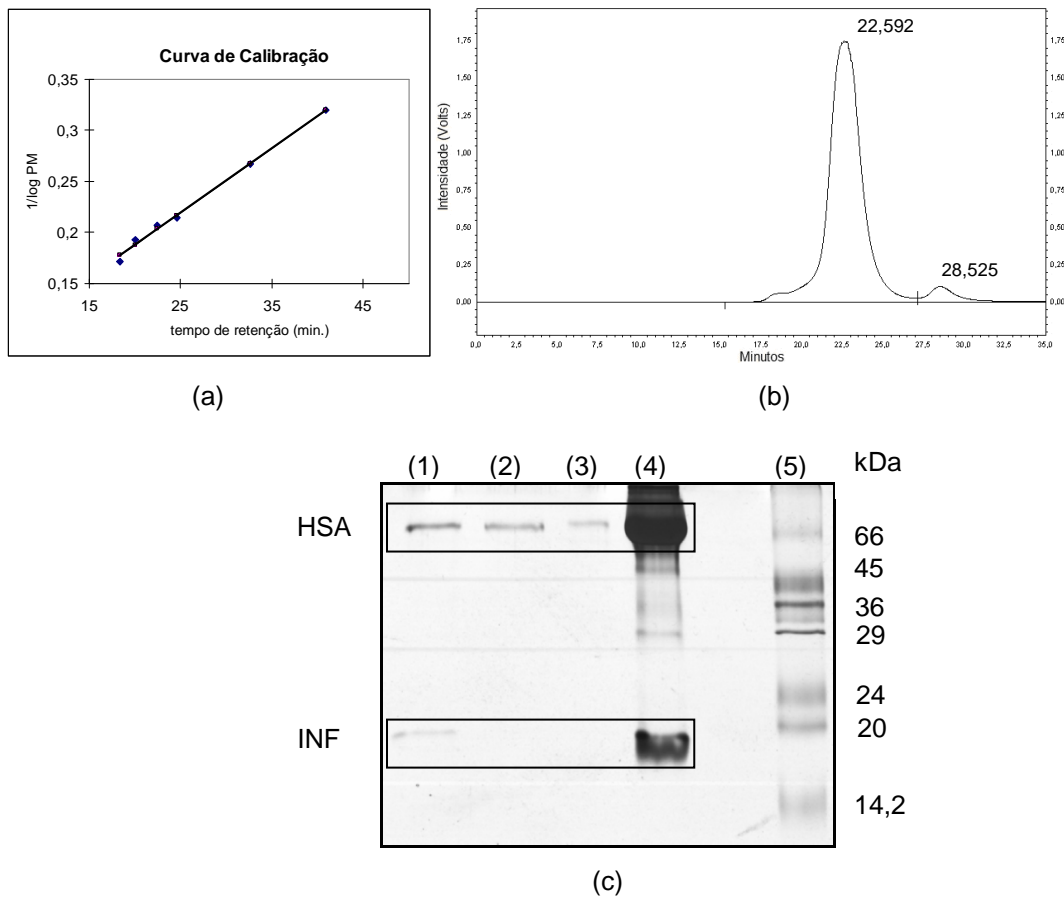


Figura 17: (a) Curva de calibração de peso molecular para a coluna Superdex® 75 (b) Cromatograma da formulação de INF- α_{2b} obtido. Condições: coluna Superdex® 75 HR 10/30, 30 cm C x 10,0 mm \varnothing , fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, 5% propanol, fluxo: 0,4 mL/min, λ 214 nm. (c) Análise por SDS-PAGE de frações coletadas, oriundas dos três sistemas testados, (1) Fração de 28 min, fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, nPrOH 5%, (2) Fração de 28 min, fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, (3) fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, (4) formulação, (5) padrão marcador de peso molecular.

A dificuldade de melhorar a separação entre as duas proteínas poderia estar associada à pequena resolução atingida pela CLAE-FG e pela grande diferença de molaridade entre ambas. Por isso optou-se por um processo que reduz a concentração de HSA nas amostras. Com menos HSA, a saturação dos sítios da coluna seria menor e a separação provavelmente melhor.

4.1.2 Uso de Membrana de imunoafinidade para remoção de HSA das amostras

Inicialmente a formulação foi submetida à imunoafinidade. A fração eluída foi então concentrada e posteriormente injetada na coluna Superdex 75. Foi obtido o cromatograma mostrado na Figura 18.

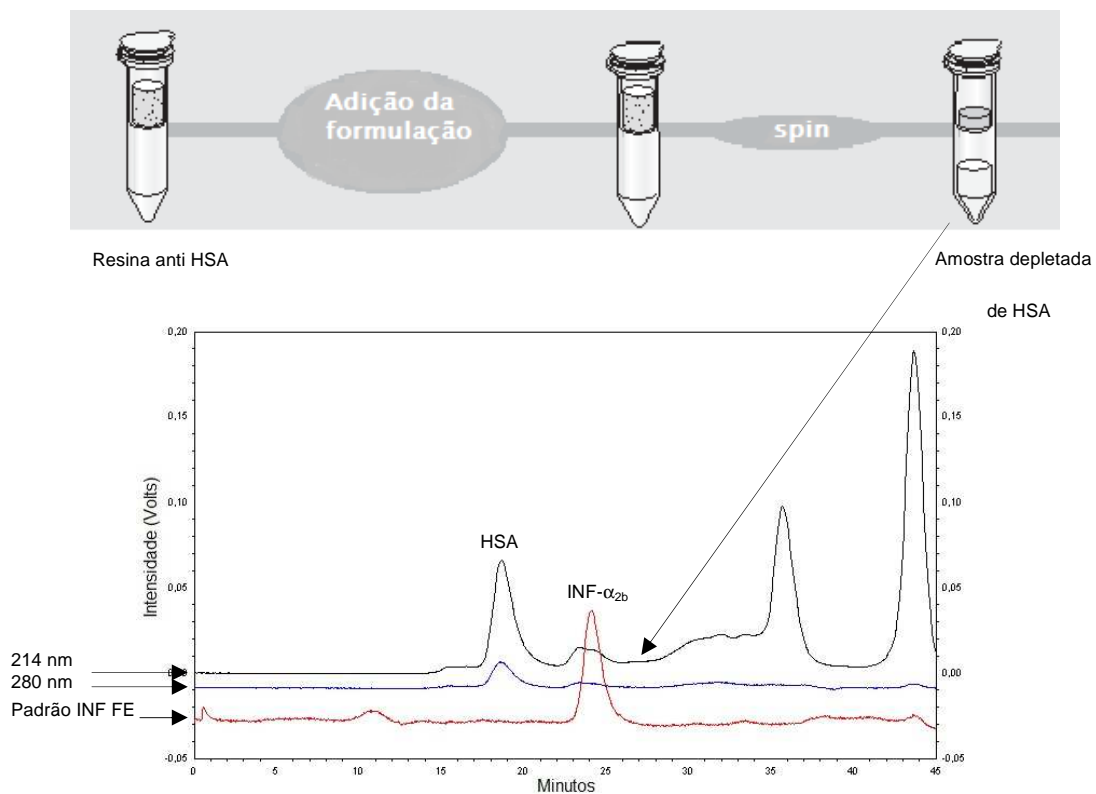


Figura 18: Perfil cromatográfico da fração coletada da membrana de imunoafinidade, e padrão de INF FE (vermelho), condições: coluna Superdex® 75 HR 10/30, 30 cm C x 10,0 mm Ø, fase móvel: tampão, PB, 50 mM, NaCl 150 mM, 5% propanol pH 6,9, fluxo: 0,4 mL/min, detector UV λ_1 214 nm (preto), e λ_2 280nm (azul).

A primeira característica no cromatograma da Figura 18 é a presença de vários picos que não ocorrem na análise da formulação nas mesmas condições. Além dos picos em t_R de 18,6 min e 23,5 min, que correspondem a HSA e o INF- α_{2b} respectivamente, foi observado também picos com tempos de retenção 35,7 e 43,7 min, provavelmente devido ao tampão utilizado no kit para a lavagem da resina. Esses picos não têm absorção em 280 nm, demonstrando não se tratar de proteínas.

A intensidade do pico da HSA sofreu uma grande redução, diminuindo sua altura da intensidade de 1,75V (Figura 18) para 0,05V (redução de 97,1%). A variação de intensidade do pico de INF- α_{2b} foi pequena, sendo comparável nos dois cromatogramas. Houve um deslocamento dos dois picos para um t_R menor, talvez pela menor saturação da fase estacionária pela resina.

A submissão da formulação ao procedimento de imunoafinidade foi acompanhada por SDS-PAGE, conforme mostrado na Figura 19. Pode-se observar que o tratamento com a resina reduziu bastante a presença de HSA nas amostras, porém não eliminou completamente essa proteína. Provavelmente o grande excesso molar da HSA saturou completamente a resina, sendo que parte dessa proteína fosse eluída junto com o INF- α_{2b} .

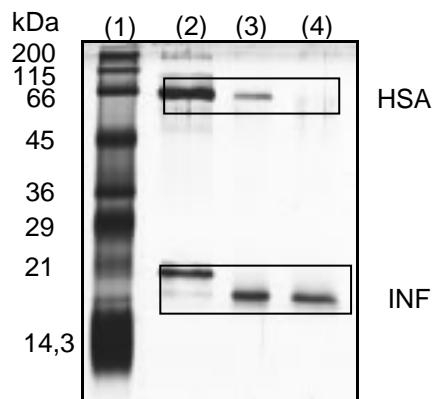


Figura 19: Análise de SDS PAGE de frações da formulação de INF- α_{2b} (1) padrão de massa molecular; (2) Formulação submetida a imunoafinidade (3) Fração correspondente ao pico de 28 min coletada de coluna Superdex 75 (4) Fração da coleta de coluna Superdex 75, a partir da injeção da amostra obtida por imunoafinidade.

Após diversas tentativas de metodologias, a combinação dos procedimentos de imunoafinidade e CLAE-FG possibilitou a obtenção do INF- α_{2b} puro a partir das formulações, possibilitando a caracterização da estrutura molecular do biofármaco.

4.2 Avaliação da estrutura molecular do INF- α_{2b}

O efeito farmacológico de biofarmacos depende da integridade de sua estrutura molecular. A degradação física, como perda da estrutura secundária e terciária, compromete a capacidade de ligação do INF- α_2 ao receptor, comprometendo o seu efeito (GILG et al., 1996; HERMELING et al., 2004; KALTASHOV et al., 2010). Portanto, se fez necessária a avaliação dessa integridade através da análise por dicroísmo circular e fluorescência.

As amostras preparadas por imunoafinidade e CLAE-FG apresentaram homogeneidade protéica por eletroforese; foram analisadas por dicroísmo circular e fluorescência o que resultou na constatação da degradação da estrutura tridimensional.

4.2.1 Dicroísmo Circular

As frações coletadas do esquema de purificação imunoafinidade/gel filtração foram então analisadas por dicroísmo circular. Também foi preparada uma amostra do padrão da Farmacopéia Européia, numa concentração semelhante a da fração coletada.

Os resultados da análise são mostrados na Figura 20. O perfil do padrão foi semelhante ao descrito por outros autores para o INF- α_{2b} em pH 7,4 (SHARMA & KALONIA, 2003; KIM et al., 2007; JOHNSTON et al., 2010). Aparecem bandas em 209 nm (-12,81) e 219,4 nm (-11,56), com intensidade menor. Esse perfil é característico de proteínas que apresentam alfa hélices (KELLY, JESS & PRICE, 2005).

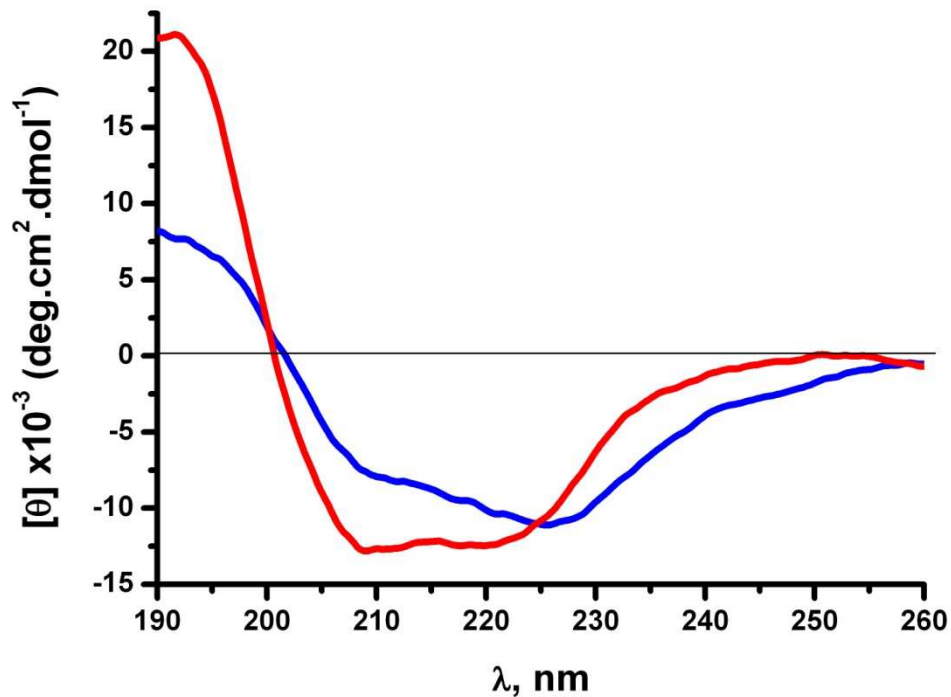


Figura 20: Espectros de dicroísmo circular do padrão de INF- α_{2a} da F.E (7 $\mu\text{g/mL}$) em vermelho, e da fração coletada da Imunoafinidade/CLAE-FG (8 $\mu\text{g/mL}$) em azul. Amostras em tampão PB 10 mM, pH 7,4.

A fração coletada mostrou um perfil distinto do padrão. A intensidade do desvio da luz diminuiu, houve um desvio das bandas negativas para comprimentos de onda maiores, respectivamente 209,8 nm e 225,6 nm. Além disso, houve uma inversão da intensidade das bandas, sendo que a segunda banda (-11,11) é mais intensa que a primeira (-7,87).

Esses resultados indicam que há uma perda de estrutura secundária do INF- α_{2b} presente nas formulações. Para complementar esses dados, as amostras também foram avaliadas por fluorescência.

4.2.2 Fluorescência

As frações coletadas do esquema de purificação imunoafinidade/gel filtração foram então analisadas por fluorescência.

Inicialmente, os espectros da fração coletada e do padrão da Farmacopéia Européia foram comparados, conforme a Figura 21. O padrão apresentou um espectro com máximos de emissão em 336 nm (λ_{ex} 280 nm) e 333nm (λ_{ex} 295 nm). As frações coletadas apresentaram máximos de emissão em 338 nm (λ_{ex} 280 nm) e 334 nm (λ_{ex} 295 nm). Esses resultados demonstraram que o INF- α_{2b} presente nas formulações tem uma exposição das cadeias laterais maior que o padrão da FE.

Outra informação importante que os espectros de fluorescência fornecem é a medida da intensidade da luz no λ_{ex} . Essa medida é proporcional ao espalhamento de luz, fenômeno que ocorre devido à presença de agregados em solução. O padrão teve uma intensidade de 674,8 (λ_{ex} 280 nm) e 280,6 (λ_{ex} 295 nm). Nos dois comprimentos as frações coletadas apresentaram uma intensidade de 1015,6 que está na faixa de saturação do detector do fluorímetro. Esse resultado demonstra que a agregação das amostras é elevada, o que não é observado no padrão.

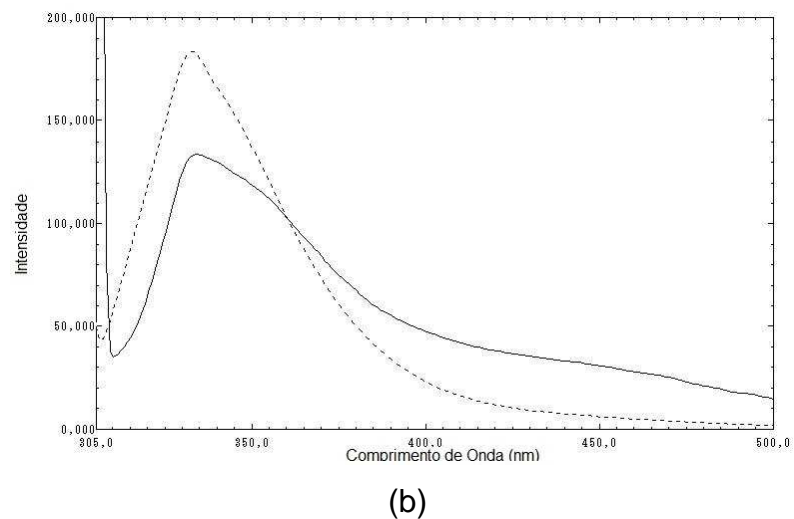
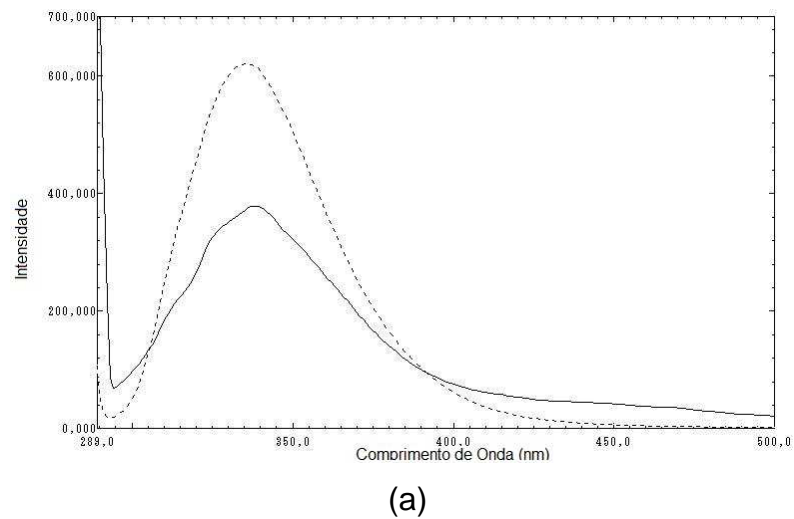


Figura 21: (a) Perfil de fluorescência do padrão de INF- α_{2b} da FE (traço pontilhado) e da fração coletada da CLAE-FG (traço normal). Excitação em 280 nm. (b) Perfil de fluorescência do padrão de INF- α_{2b} da FE (traço pontilhado) e da fração coletada da CLAE-FG (traço normal). Excitação em 295 nm. Amostras em tampão PB 10 mM, pH 7,4.

Por outro lado, as frações oriundas do procedimento Imunoafinidade/CLAE-FG quando submetidos à espectrometria de massa MALDI-TOF, não geraram espectros. Portanto, para prosseguir no estudo, foi necessário desenvolver outro método de separação cromatográfica por fase reversa.

4.3 Separação do INF- α_{2b} dos demais componentes da formulação por CLAE-FR

Na Figura 22 é mostrado o perfil cromatográfico obtido por CLAE-FR, da formulação de INF- α_{2b} . O tempo de retenção do primeiro pico em 58,1 min foi identificado como HSA, devido ao seu alto percentual (94,7 %). Esse pico apresenta fator de capacidade de 16,1 e fator de cauda a 10% de 1,86 %. O segundo pico identificado como INF- α_{2b} , apresenta tempo de retenção de 66,9 min, fator de capacidade de 18,6, fator de cauda a 10 % de 1,87 %. A resolução entre ambos foi de 7,3, demonstrando que nessa técnica uma ótima separação foi atingida.

Portanto, a cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (CLAE-FR) foi a técnica alternativa escolhida para a separação do INF- α_{2b} dos demais componentes presente nas formulações.

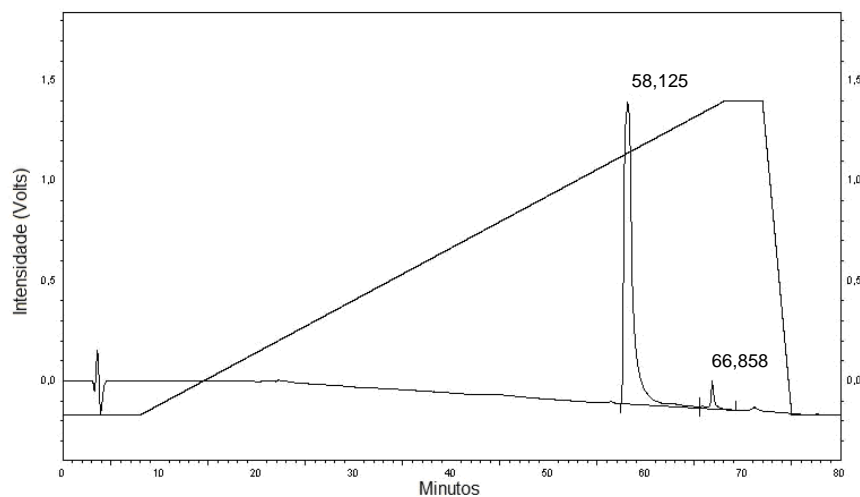


Figura 22: Cromatograma da formulação de INF- α_{2b} obtido por CLAE-FR. Condições: coluna ACE 3 C18-300, 250 mm C x 4,6 mm \varnothing , fase móvel A TFA 0.1 % em água, fase móvel B acetonitrila:TFA 0.1%, com gradiente, fluxo de 1.0 mL/min, λ 214 nm. A linha sobreposta mostra a concentração de fase B.

Para confirmar se o pico de 66,9 min era INF- α_{2b} , foi injetado um padrão da FE conforme mostrado na Figura 23. O tempo de retenção do padrão foi de 66,7 min, confirmando o pico observado no cromatograma da formulação como de INF- α_{2b} .

Na aplicação do gradiente de fase móvel B, acetonitrila, observou-se que a HSA foi liberada quando a concentração do solvente orgânico atingiu 50 %, enquanto que para o INF- α_{2b} , o mesmo ocorreu em 59 %.

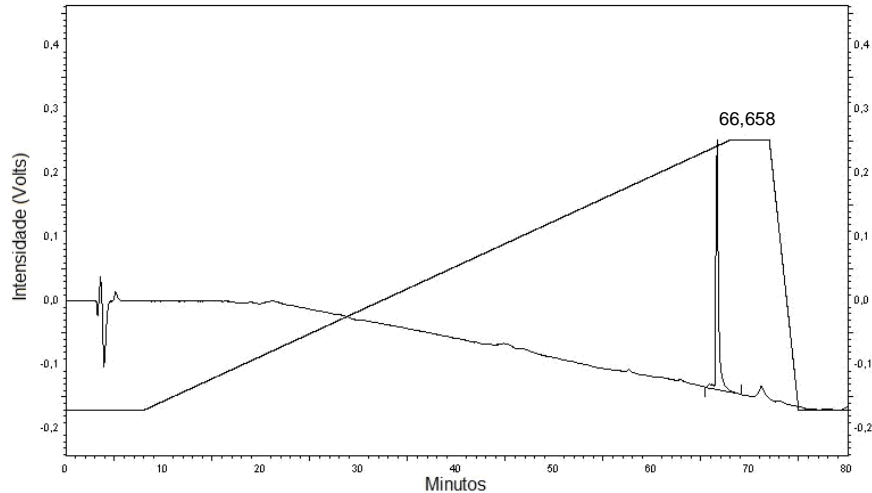


Figura 23: Cromatograma do padrão de INF- α_{2b} FE 100 μ L de solução 35 μ g/100 μ L Condições: coluna ACE 3 C18-300, 250 mm C x 4,6 mm \varnothing , fase móvel A: TFA 0.1 % em água, fase móvel B : acetonitrila:TFA 0.1%, com gradiente, fluxo de 1.0 mL/min, λ 214 nm. A linha sobreposta mostra a concentração de fase B.

A homogeneidade protéica do pico de 66,9 min foi avaliada por SDS-PAGE. Foi observada uma banda com 19 kDa, que corresponde ao peso molecular do INF- α_{2b} . Além disso, há existência de bandas de peso moleculares maiores do que o INF- α_{2b} , com 57 kDa, (Figura 24). Na literatura, essas bandas são relacionadas a trímeros do INF (SILVA et al., 2008; HERMELING et al., 2006).

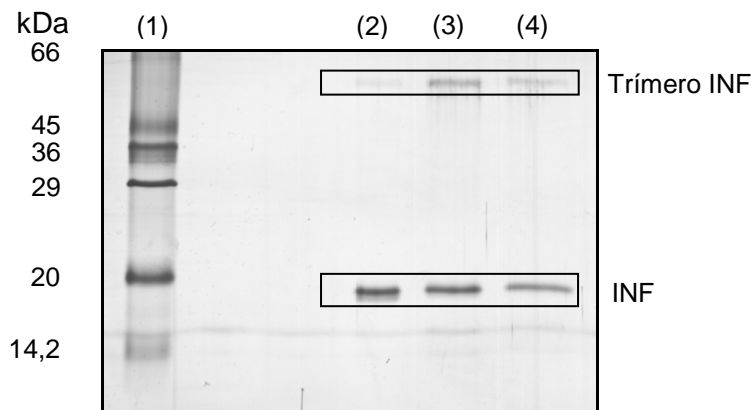


Figura 24: Análise de SDS PAGE das frações coletadas da CLAE-FR (1) padrão de peso molecular; linhas (2), (3), e (4) frações coletadas de CLAE-FR.

As frações obtidas por esta metodologia não foram submetidas ao dicroísmo circular e à fluorescência devido ao caráter desnaturante do procedimento, com perda da estrutura terciária.

O INF- α_{2b} obtido por esse procedimento foi posteriormente analisado por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, como mostrado a seguir.

4.4 Análise do INF- α_{2b} por MALDI-TOF

Inicialmente, para estabelecer a metodologia, foram usados padrões de INF- α_{2b} da FE e de HSA (Sigma). As misturas dos peptídeos resultantes das hidrólises com cada uma das enzimas foram então analisadas por MALDI-TOF.

A decisão de hidrolisar também a proteína HSA padrão foi para determinar os seus peptídeos gerados pelas hidrólises e poder identificá-los, porque eles poderiam ser contaminações potenciais possíveis nos espectros de massas das amostras de INF isolados das formulações. Espectro não apresentado neste trabalho.

As análises MALDI dos padrões de ambas as proteínas deram ótimos resultados, quase todos os peptídeos esperados foram observados. A mesma metodologia e condições foram então utilizadas para a análise das frações coletadas da CLAE FR.

O espectro de massa dos peptídeos resultantes da hidrólise trípica do INF- α_{2b} padrão da FE é mostrado na Figura 25. Na tabela 5 são dadas as seqüências de aminoácidos dos peptídeos que se espera dessa digestão e as correspondentes massas monoisotópicas $[M + H]^+$, as teóricas e as observadas, de cada peptídeo. A maioria dos peptídeos com $[M + H]^+$ maior do que 500 Da foi observada.

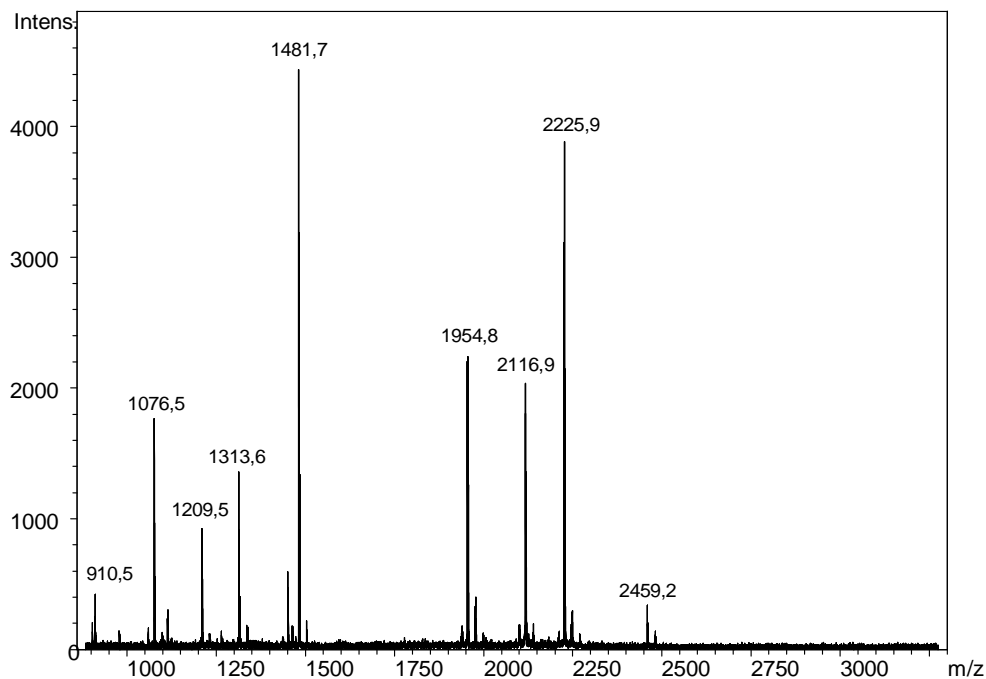


Figura 25: Espectro de massa MALDI-TOF do padrão FE de INF- α_{2b} submetido à digestão trípica.

Tabela 5: Seqüências de aminoácidos dos peptídeos previstos para a hidrólise triptica de INF- α_{2b} e as correspondentes massas monoisotópicas $[M + H]^+$. A coluna das massas experimentais se refere aos valores observados no espectro MALDI-TOF do padrão de INF- α_{2b} da FE hidrolisado.

N ¹	posição	Seqüência de aa dos peptídeos	$[M + H]^+$ (Da) ²		I _r ³ (%)
			Teórica	Experimental	
1	84-112	FYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMK	3302,6	n.o. ⁴	-
2	50-70	AETIPVLHEMIQQIFNLFSTK	2459,3	2459,2	4,5
3	34-51	HDFGFPQEEFGNQFQKDR	-	2225,9	98,3
4	34-49	HDFGFPQEEFGNQFQK	1954,8	1954,8	87,4
5	150-162	SFSLSTNLQESLR	1481,7	1481,7	100
6	71-83	DSSAAWDETLDDK	1450,6	1450,6	6,2
7	1-12	CDLPQTHSLGSR	1313,6	1313,6	38,3
8	135-144	YSPCAWEVVR	1209,5	1209,1 + 2116,9	51,4
9	14-22	TLMLLAQMR	1076,5	1076,5	81,5
10	24-31	ISLFSCLK	910,5	910,6 + 2116,9	26,5
11	113-120	EDSILAVR	902,4	902,6	9,5
12	126-131	ITLYLK	750,4	750,7	4,4
13	145-149	AEIMR	619,3	n.o.	-
14	122-125	YFQR	613,3	n.o.	-

1-N: Número do peptídeo; 2- $[M + H]^+$ Teórica (MH⁺): obtida submetendo-se a seqüência do INF- α_{2b} a ferramenta *PeptideMass* (www.expasy.org); 3-I_r: intensidade relativa; 4-n.o.: não observado.

O peptídeo 1, de massa maior, não foi observado. Como não foi utilizado redutor no preparo da amostra, esse peptídeo deve ter a sua massa somada a massa do peptídeo 7, resultando em valor de massa mais elevado do que a faixa de massa que foi analisada. Tentativas de observar o peptídeo em modo linear não tiveram sucesso.

Um pico intenso, com $[M + H]^+$ igual a 2225,9 foi observado (peptídeo 3). Esse valor corresponde a massa de um peptídeo onde não ocorre hidrólise pela tripsina na seqüência KDR. A perda desse sítio de hidrólise pela tripsina já foi observado por outros autores na análise do INF- α_{2b} (TSARTOPOULOS et al., 1994).

Foi observado um pico intenso com MH⁺ de 2116,9. Esse valor corresponde a associação, via ponte disulfeto, dos peptídeos 8 e 10. Como não foi utilizado redutor na preparação da amostra, parte ponte de sulfeto se manteve e parte foi reduzida, formando os peptídeos 8 e 10.

Nessas condições a cobertura de seqüência observada para o INF- α_{2b} foi de 72,7%, sendo observados peptídeos correspondentes a 120 do total de 165 aminoácidos presentes no INF- α_{2b} . Se considerarmos que o total de aminoácidos que poderíamos detectar com esse método é de 154, uma cobertura de 78% foi atingida.

A próxima etapa foi a análise do INF- α_{2b} presente nas formulações. O material coletado na CLAE-FR foi então submetido a hidrólise por tripsina e os peptídeos resultantes foram analisados por MALDI-TOF. Também submetemos as bandas correspondentes ao INF- α_{2b} , presentes no gel mostrado na Figura 24, a hidrólise por tripsina, para verificar os peptídeos formados nos dois casos.

O espectro de massa obtido dos peptídeos é apresentada na Figura 26 e os resultados das análises são mostrados na Tabela 6. As massas que não foram identificadas no padrão, correspondentes aos peptídeos 1, 13 e 14, também não foram identificadas nos espectros das amostras.

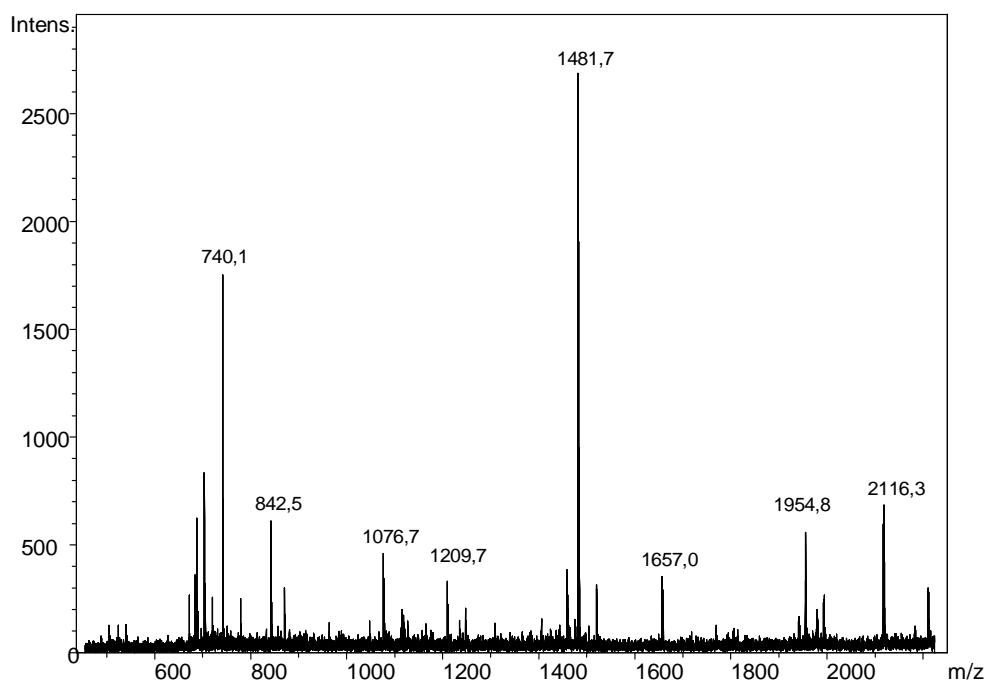


Figura 26: Espectro de MALDI-TOF dos hidrolisados da coleta CLAE-FR.

Tabela 6: Valores de massa observados no espectro de MALDI-TOF dos hidrolisados da coleta da CLAE-FR e da banda do gel mostrado na Figura 24.

N	Mt (Da)	Mo ¹ (Da)	Ir ¹ (%)	Mo ² (Da)	Ir ² (%)
1	3302,6	n.o.	-	n.o. ³	-
2	2459,3	n.o.	-	n.o.	-
3	-	2225,9	100	n.o.	-
4	1954,8	1954,8	33,7	1954,8	24,1
5	1481,7	1481,7	71,4	1481,7	100
6	1450,6	n.o.	-	n.o.	-
7	1313,6	n.o.	-	n.o.	-
8	1209,5	1209,7 + 2116,3	44,9	n.o.	-
9	1076,5	1076,7	26,8	1076,5	37,4
10	910,5	910,6 + 2116,3	14,3	n.o.	-
11	902,4	901,9	19,5	902,6	8,7
12	750,4	n.o.	-	n.o.	-
13	619,3	n.o.	-	n.o.	-
14	613,3	n.o.	-	n.o.	-

N: Número do peptídeo; Mo¹: Massa observada na hidrólise da fração coletada; Mo²: Massa observada na hidrólise da banda do gel; Ir¹: Intensidade relativa observada na hidrólise da fração coletada; Ir²: Intensidade relativa observada na hidrólise da banda do gel; n.o.: não observado.

Os peptídeos 2, 6 e 12, menos intensos no espectro padrão, não foram observados nos espectros das amostras. Da mesma forma, o peptídeo 7 não foi observado nas amostras.

No espectro obtido do hidrolisado da banda do gel (Figura 24), também não foram detectados os peptídeos 3, 8 e 10. A cobertura de seqüência atingida com essa análise foi de 34,5%, sendo identificados 57 aminoácidos em um total de 165. Partindo-se da possibilidade de detecção de 154 aminoácidos, chegou-se a 37% de cobertura de seqüência.

Os peptídeos mais intensos observados no padrão, 3, 4, 5, 8, 9 e 10, também foram observados na amostra preparada a partir da hidrólise da coleta da fase reversa. A cobertura de seqüência alcançada com a 45,5%, sendo identificados 75 aminoácidos em 165. Partindo da possibilidade de detecção de 154 aminoácidos, chegaríamos a 48,7% de cobertura.

5 DISCUSSÃO

5.1 Separação do INF dos demais componentes da formulação

A metodologia inicialmente usada para a separação do INF da HSA presente na formulação foi a CLAE-FG. Essas proteínas apresentam diferenças em seus volumes hidrodinâmicos, que a princípio proporcionariam a separação por esta modalidade de cromatografia. Além disso, o INF- α_{2b} seria obtido em condições nativas, pH neutro, favorecendo as análises de caracterização a serem executadas posteriormente (DIRESS et al., 2010).

A otimização da CLAE-FG seguiu a estratégia clássica utilizada nesse caso, modificando-se a fase estacionária, concentração salina e composição orgânica da fase móvel (ARAKAWA et al., 2010; QIAN et al., 2008). É interessante destacar que a adição de nPrOH à fase móvel levou à redução dos agregados presentes, pelo rompimento de agregados não covalentes (KAMBERI et al., 2004).

Em todas as condições testadas a correlação entre o t_R e o inverso do log da massa molecular foi estatisticamente significativa. Entretanto, uma resolução adequada entre o INF- α_{2b} e a HSA não foi alcançada, devido a grande desproporção molar entre as duas proteínas.

A grande diferença de concentração entre o INF- α_{2b} e a HSA presentes na formulação, fez com que se utiliza-se membranas de imunoafinidade, onde a HSA é especificamente imobilizada e o INF isolado.

A separação por CLAE-FG com subsequente depleção por membrana foi a primeira tentativa, com vistas a isolar o INF- α_{2b} da HSA. A fração resultante ainda exibiu a HSA como observa-se especificamente na linha 2 no gel de SDS-PAGE apresentado na Figura 19, não satisfazendo o parâmetro de homogeneidade protéica.

A alternativa seguinte foi primeiro submeter a formulação à membrana de imunoafinidade e em seguida o eluído concentrado ser submetido a CLAE-FG. No perfil cromatográfico foi observada uma redução expressiva da HSA em termos de intensidade da ordem de 97,1 %, enquanto que a variação de intensidade do pico de INF- α_{2b} foi pequena, como mostrado na Figura 18 (LEE & LEE, 2004). Portanto com

a remoção seletiva da HSA, tornou possível a separação das duas proteínas por CLAE-FG, quando ambas estão em proporção semelhante. Foi observado o deslocamento dos dois picos para um t_R menor como mostrado na Figura 18, talvez pela menor saturação da fase estacionária pela resina (ŠTULÍK et al., 2003). Nesta abordagem os resultados foram satisfatórios quanto à homogeneidade protéica evidenciados na linha 4 no gel SDS-PAGE na Figura 19.

Ao submetermos a amostra purificada por imunoafinidade e CLAE-FG ao processo de digestão e posterior análise por espectrometria de massa MALDI-TOF, resultados compatíveis com a identificação dos fragmentos trípticos do INF- α_{2b} não foram obtidos. Portanto, com base nestes resultados houve a necessidade de testar outro método de cromatografia. Desta forma, o uso da CLAE-FR foi a próxima abordagem para obtenção do INF- α_{2b} isolado da formulação (RUIZ et al., 2005; SILVA et al., 2008).

A CLAE-FR se mostrou uma boa alternativa para a separação INF- α_{2b} /HSA. A hidrofobicidade do INF- α_{2b} é superior a da HSA, como pode ser constatado no cromatograma da Figura 22, o que facilitou bastante na separação. Por outro lado essa técnica é desnaturante, por isso não foram feitos experimentos de dicroísmo circular e fluorescência com o material coletado (SILVA et al., 2009). Esse material foi o único que apresentou trímeros de INF- α_{2b} , possivelmente por degradação durante a separação, verificado por SDS-PAGE conforme apresentado na Figura 24 (RUIZ et al., 2006; SILVA et al., 2008).

5.2 Avaliação da estrutura molecular do INF- α_{2b}

A avaliação da estrutura tridimensional do INF- α_{2b} por dicroísmo circular e fluorescência demonstrou que há uma perda parcial da estrutura tridimensional na amostra analisada. As variações observadas foram menores que as descritas na literatura em condições desnaturantes (SHARMA & KALONIA, 2003).

Essa perda foi mais evidente na avaliação do espectro de dicroísmo, que demonstrou perda parcial da estrutura de alfa hélice natural do INF- α_{2b} , de acordo com a Figura 20 (BELDARRAÍN et al. 2001).

O deslocamento do λ_{em} da fluorescência, que foi maior com a excitação em 280 nm do que em 295 nm, demonstrou que houve uma maior exposição das cadeias laterais das tirosinas que dos triptofanos como mostrado na Figura 21(a) e (b). Os dois triptofanos do INF- α_{2b} se encontram em um ambiente bastante hidrofóbico, e talvez a agregação tenha impedido uma maior exposição das cadeias laterais à água (KIM et al., 2006).

A grande intensidade do espalhamento de luz mostrou que o INF- α_{2b} estava fortemente agregado (HERMELING et al., 2005). Possivelmente essa agregação impediu a hidrólise pela tripsina, já que as amostras não apresentaram picos nos espectros de MALDI-TOF.

A abordagem inicial para a avaliação do INF- α_{2b} por MALDI-TOF foi a hidrólise do padrão da FE por tripsina e a aquisição dos espectros. Esse resultado foi importante para analisar o perfil do espectro de massa obtido. Além disso os peptídeos gerados pela hidrólise do HSA padrão e posteriormente identificados, demonstrou não existir contaminações nos espectros de massas das amostras de INF isolados das formulações.

A maioria dos peptídeos esperados foi detectada e são apresentados na Figura 25. As maiores dificuldades foram os peptídeos que se encontravam nos limites da análise por método refletido. O peptídeo 1, de maior massa, mostrado na Tabela 5, se encontra no limite superior para a detecção por esse modo. Esse peptídeo também não foi detectado na análise de INF- α_{2b} matéria prima (TSARBOPOULOS et al., 1994) e em análise anterior do padrão da FE (CINDRIC et al., 2006). Os peptídeos 13 e 14 se encontram no limite inferior, pois na região de massa baixa ocorre interferência da matriz.

Outra informação importante foi a intensidade dos peptídeos observados. Esse parâmetro é influenciado por vários fatores, sendo a seqüência o mais importante. Os peptídeos 3 e 5 têm características em suas seqüências que são correlacionadas ao aumento da ionização (YANG et al., 2008). Ambos têm arginina no C terminal, sendo que o peptídeo 3 tem também histidina no N terminal. É importante destacar que o peptídeo 5 é o mais intenso em espectros já publicados do INF- α_{2b} (TSARBOPOULOS et al, 1994, CINDRIC et al., 2006).

Por outro lado os peptídeos menos intensos têm características em suas seqüências que reduzem a ionização (YANG et al., 2008). Quanto ao C terminal, o peptídeo 6 tem lisina, o peptídeo 7 tem arginina, sendo que o 7 também tem cisteína no N terminal. Ambos possuem aspartatos como resíduos internos, sendo que 6 tem também um triptofano.

Na análise da formulação de acordo com a Figura 26 e Tabela 6, os peptídeos menos intensos não foram detectados. As perdas inerentes à manipulação provavelmente reduziram a concentração do material, fazendo com que apenas os peptídeos com maior ionização fossem detectados.

Outro ponto que foi observado nos espectros das amostras foi a conservação da ponte disulfeto entre as cisteínas 29 e 138 ($[M + H]^+$ 2117,5), demonstrando que essa característica importante da estrutura do INF- α_{2b} está preservada no produto comercial analisado após as manipulações nos procedimentos realizados.

A cobertura da seqüência é um parâmetro que deverá ser melhorado. A cobertura alcançada de 48,7% é bastante adequada para a identificação do INF- α_{2b} , porém se tratando de um biofármaco esse valor deve se aproximar de 100%. O caminho para melhorar essa cobertura é hidrolisar parte da amostra com Glu-C, e comparar os peptídeos observados com os formados pela hidrólise trípica.

6 CONCLUSÃO

A etapa mais crítica para o desenvolvimento do trabalho foi a separação do INF- α_{2b} da HSA. Várias condições foram testadas para se obter essa separação em condições não desnaturantes, sendo necessário desenvolver um protocolo de separação do INF- α_{2b} dos demais componentes da formulação comercial desse biofármaco, reduzindo-se inicialmente a HSA com um procedimento de imunoafinidade, e completando a purificação com CLAE-FG.

As frações obtidas por esse método foram analisadas por dicroísmo circular e fluorescência, o que permitiu a constatação da degradação da estrutura tridimensional. A avaliação do espalhamento de luz no comprimento de onda de excitação demonstrou que havia uma elevada agregação do material. Essas frações não puderam ser analisadas por MALDI-TOF.

A técnica que conseguiu uma separação em uma única corrida foi a CLAE-FR, possibilitando a análise do INF- α_{2b} por MALDI-TOF. Portanto, esta foi a técnica de escolha para alcançar a separação.

Um método de CLAE-FR foi desenvolvido para a separação do INF- α_{2b} dos demais componentes da formulação. Foi obtida uma excelente separação da HSA que possibilitou a análise por MALDI-TOF.

A análise por MALDI-TOF do INF- α_{2b} presente nas formulações permitiu atingir 45,5% de cobertura da seqüência da proteína. Também foi observado que a ponte dissulfeto, entre as cisteínas 52-161, da estrutura estava adequada.

Esse estudo fornece dados importantes que subsidiam o estabelecimento de um protocolo para a análise de INF- α_{2b} em produto final, que poderá substituir o mapa de peptídeos tradicional por cromatografia líquida, com a vantagem de resultar em um maior número de informações sobre a estrutura molecular do biofármaco.

A implementação da análise por MALDI-TOF na rotina é cara, principalmente devido ao custo de aquisição do equipamento. Isso poderia ser uma restrição a adoção desse método em compêndios oficiais. Por outro lado, do ponto de vista sanitário, o maior conhecimento sobre o produto é importante, pois ajuda a garantir sua efetividade e reduzir o risco em seu uso. Além disso, o alto valor agregado do INF- α_{2b} e seu uso crônico justifica a adoção de técnicas como o MALDI-TOF.

7 PERSPECTIVAS

Dar continuidade a este estudo aumentando a cobertura da seqüência. A abordagem a ser utilizada é a hidrólise de parte da amostra com Glu-C, e comparar os peptídeos observados com os formados pela hidrólise trípica.

Estabelecer um protocolo para a análise de INF- α_{2b} em produto final, que poderia substituir o mapa de peptídeos tradicional por cromatografia líquida, com a vantagem de resultar em um maior número de informações sobre a estrutura molecular do biofármaco.

Propor ao Departamento de Imunologia, a avaliação da atividade biológica das frações obtidas pelo protocolo com a finalidade de comprovar a manutenção da estrutura terciária, necessária à eficácia do produto.

Propor à Farmacopéia Brasileira a inclusão da monografia de interferon α_{2b} DNA recombinante com o método de espectrometria de massa MALDI-TOF como técnica sensível para caracterizar o biofármaco.

REFERÊNCIAS

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Diretrizes:** Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos – PROVEME. [Brasília]:

ANVISA, 2004. 28 p. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/inspecao/fiscalizacao/proveme/manual_proveme.pdf>. Acesso em: 26 maio 2008.

ANAS EL-ANEED; COHEN A.; BANOUB, J., Mass Spectrometry Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analysers, **Applied Spectroscopy Reviews**, [S.l.], v. 44, p. 210-230, 2009.

ARAKAWA, T. et al., Review, The Critical role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 99, p. 1674-1692, 2010.

ASSISTÊNCIA **Farmacêutica no Ministério da Saúde**. Disponível em: <http://200.198.201.69/institucional/conselho/resumo/22_291105_pol_af_ms-2005.ppt>. Acesso em: 27 maio 2008.

BAKHTIAR, R.; NELSON, R. W., Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, **Biochemical Pharmacology**, [S.l.], v. 59, p. 891-905, 2000.

BELDARRAÍN, A., et al., Purification and conformational properties of a human interferon $\alpha 2b$ produced in *Escherichia coli*, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S.l.], v. 33, p. 173-182, 2001.

BIOMANGUINHOS. **Biofármacos**. Rio de Janeiro. 2008. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys///start.htm?sid=198>>. Acesso em: 02 jun 2008.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, **Electrophoresis**, [S.l.], v. 8, p. 93-99, 1987.

BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.; KRONN, E.G., Interferons: Signaling, antiviral and viral evasion, **Immunology Letters**, [S.l.], v. 122, p. 1-11, 2009.

BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Decreto nº 6.041, de 08 de fevereiro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 fev. 2007, seção I, pág 1.

BRASIL. Lei nº 8.080/90, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990, seção I, pág 18055.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 27 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999, seção I, pág 1.

BRASIL. Portaria nº 2.577/GM, de 27 de outubro de 2006. Aprovar o componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional, como parte da Política Nacional de Assistência Farmacêutica do Sistema Único de Saúde, conforme termos constantes do Anexo I a esta Portaria; **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, 13 nov. 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 210, de 4 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico da Boas Práticas para a fabricação de medicamentos, conforme o anexo I da presente resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 ago. 2003. Seção 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/210_03rdc.pdf>. Acesso em: 26 maio 2008.

BRASIL. Resolução RDC nº 315, de 26 de outubro de 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Registro, Alteração Pós-Registro e Revalidação de Registro de Produtos Biológicos Terminados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 out. 2005. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 12 maio 2008.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**:artigo 196. Brasília, DF, Senado, 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constitui%C3%A7ao.htm>. Acesso em: 12 maio 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Hepatites Virais: O Brasil está atento. Brasília, 2008. Hepatites virais : o Brasil está atento / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008. 60 p. : il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL, Tratamento Clínico da Hepatite B e Coinfeccoes Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfeccoes, **MINISTERIO DA SAUDE**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais, 2009.

BRUKER, Analytical Systems Inc. **User Guide to the Flex III, Maldi-TOF Mass spectrometers**, p. 1.12-1.14, jul 1995.

CHELBY-ALIX, M. K.; WIETZERBIN, J., Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. **Biochimie**, [S.l.], v. 89, p. 713–718, 2007.

CHIRINO, A. J. & MIRE-SLUIS, A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. **Nature biotechnology**, [S.l.], v. 22, n. 11, nov. 2004.

CINDRIČ, M. et al., Evaluation of recombinant human interferon α -2b structure and stability by in gel tryptic digestion, H/D exchange and mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.l.], v. 40, p. 781-87, 2006.

CINDRIČ, M.; Vuletič, M., Characterization of interferon α -2b by liquid chromatography and mass spectrometry techniques. **Journal of Separation Sciences**, [S.l.], v. 26, p. 1263-68, 2003.

CINDRIC, M. et al., Evaluation of recombinant human interferon α -2b structure and stability by in-gel tryptic digestion, H/D exchange and mass spectrometry, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.l.], v. 40, p. 781-787, 2006.

COTTER, R.J., **Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research**, American Chemical Society, Washington, DC, 1997.

DHALLUIN, C. et al., Structural and Biophysical Characterization of the 40 kDa PEG-Interferon- α_{2a} and Its Individual Posionat Isomers. **Bioconjugate Chemistry**, [S.I.], v. 16, p. 504-517, 2005.

DIRESS, A. et al., Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-s products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays, **Journal of Chromatography A**, [S.I.], v. 1217, p. 3297-3306, 2010.

DORR, R.T., Interferon- α in Malignant and viral Diseases A Review. **Drugs**: [S.I.], v. 45, n.2, p.177-211, 1993.

EUROPEAN pharmacopoeia. 6. ed. Ed Strasbourg: Council of Europe, 2008. 1 CD-ROM.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo. Atheneu, 1988.

FATHALLAH, D.M.; ESSAFI, i.R., Codon optimization to improve the production yield of recombinant human interferon α by pichia pastoris. **journal of biotechnology**, [S.I.], v. 131, n. 2, p. S7, 2007. Supplement 1.

FINTER, N.B., Is there life without Interferon? **In: INTERFERON: The dawn of recombinant protein drug**. New York, Springer, p. 1–14, 1999.

FOSTER, G.R., Review article: Pegylated interferons: chemical and clinical differences. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [S.I.], v. 20, p. 825-830, 2004.

FROKJAER, S; HOVGAARD, L., (Ed.) **Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins**, London, Taylor & francis, 2000, 238p.

GILG, D. et al., Analytical methods for the characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an example, **PHARMACEUTICA ACTA HELVETIAE**, [S.I.], v. 71, p. 383-394, 1996.

GLISH, G.L.; VACHET, R.W., THE BASICS OF MASS SPECTROMETRY IN THE TWENTY-FIRST CENTURY, **Nature Reviews**, [s.l.], v. 2, p. 140-150, 2003.

GREENOUGH, C. et al., A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma. **Proteomics**, [S.l.], v. 4, p. 3107-3111, 2004.

HENZEL, W.J. et al., Identifying Proteins from Two-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide Fragments in Protein Sequence Databases, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 90, p. 5011-5015, 1993.

HERMELING, S. et al., Structure-Immunogenicity relationships of Therapeutic Proteins, **Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 21, p. 897-903, 2004.

HERMELING, S. et al., Structural characterization and immunogenicity I wild-type and immune tolerant mice of degraded recombinant human interferon Alpha 2b. **Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 22, n.12, p. 1997-2006, 2005.

HERMELING, S. et al., Antibody Response to Aggregated Human Interferon Alpha2b in Wild-type and Transgenic Immune Tolerant Mice Depends on type and Level of Aggregation, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 95, p. 1084-1096, 2006.

HILLENKAMP, F. et al., Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass spectrometry of Biopolymers, **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 63, p. 1193A-1203A, 1991.

INTERFERON Alfa-2 concentrated solution. In: EUROPEAN pharmacopoeia 6.0. v. 2. Strasbourg: Council of Europe, 2008. p. 2150-2153.

ISLAM, M., et al., Differential Effect of INF- α -2b on the Cytochrome P450 Enzyme System: A Potential Basis of INF Toxicity and Its Modulation by Other Drugs, **Clinical Cancer Research**, [S.l.], v.8, p. 2480-2487, 2002.

JIN QIAN et al., Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of Human Serum Albumin in a lyophilized formulation of Interferon alfa-2b, **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1194, p. 48-56, 2008.

JONES, C., Applications of Nuclear Magnetic Resonance, Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy to the Characterization of Biological Products, **Biologicals**, [S.I.], v. 21, p. 119-124, 1993.

JONGEN, M.J.M.P et al., High performance anion exchange chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to determine erythropoietin in pharmaceutical products. **Journal of Chromatography A**, [S.I.], v. 1078, p 113-119, 2005.

JOHNSTON, M.J.W.; NEMR, K.; HEFFORD, M.A., Influence of bovine serum albumin on the secondary structure of interferon alpha 2b as determined by far UV circular dichroism spectropolarimetry, **Biologicals**, [S.I.], v. 38, p. 314-320, 2010.

JUNGBLUT, P.R. et al., Peptide Mass Fingerprinting, **Methods**, [S.I.], v 35, p. 237-247, 2005.

KAMBERI, M. et al., Analysis of non-covalent aggregation of synthetic hPTH (1-34) by size-exclusion chromatography and the importance of suppression of non-specific interactions for a precise quantitation, **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences** [S.I.], v. 810, p. 151-155, 2004.

KALTASHOV, I.A. et al., Conformation and Dynamics of Biopharmaceuticals: Transition of Mass Spectrometry-Based Tools from Academe to Industry, **Journal of The American Society Mass spectrometry**, [S.I.], v. 21, p. 323-337, 2010.

KAMP, R.M.; CHOLL-PAPADOPOULOU, T.; WITTMANN-LIEBOLD, B., (Eds.) **Protein Structure Analysis: Preparation, Characterization, and Microsequencing**, Berlin. Springer-Verlag, 1997.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 Da, **Analytical Chemistry**, [S.I.], v. 60, p. 2299-2301, 1988.

KARAS, M.; KRUGER, R. Ion Formation in MALDI: the Cluster Ionization Mechanism. **Chemical Reviews**, [S.I.], v. 103, n. 2, 2003.

KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N.C., How to study proteins by circular dichroism, **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.I.], v. 1751, p. 119-139, 2005.

KIM, H.H. et al., Photodegradation mechanism and reaction kinetics of recombinant human interferon- α 2a. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.I.], v. 6, p. 171-180, 2007.

KLAUS, W. et al., The three-dimensional high resolution structure of human interferon α -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. **Journal of Molecular Biology**, [S.I.], v. 274, p. 661-675, 1997.

KONTSEK, P.; VASCONCELOS, G.K.; KONTSEKOVA, E.; The human Interferon system: Characterization and classification after discovery of novel members. **Acta Virologica**, [S.I.], v. 47, p. 201-215, 2003.

KOTENKO, S.V. et al., INF- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex, **Nature Immunology**, [S.I.], v. 4, p. 69-77, 2003.

KOZLOWSKI, A.; HARRIS, J.M., Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. **Journal of Controlled Release**, [S.I.], v. 72, p. 217-224, 2001.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4, **Nature**, [S.I.], v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, W.C.; LEE, K.H., Application of affinity chromatography in proteomics, **Analytical Biochemistry**, [S.I.], v. 324, p. 1-10, 2004.

LIN, D.; TABB, D. L.; YATES III, J. R., Large-scale protein identification using mass spectrometry, **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.I.], v. 1646, p. 1-10, 2003.

LINDENMANN, J., 50 years ago: How prepared were our minds?. **Biochimie**, [S.I.], v. 89, p. 719-720, 2007.

MALMGAARD, L., Induction and Regulation of INFs During Viral Infections, **Journal of Interferon & Cytokine Research**, [S.I.], v. 24, p. 439-454, 2004.

MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A., Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, [S.I.], v. 70, p. 437-473, 2001.

NÄRHI, M.; NORDSTRÖM, K., Manufacturing, regulatory and commercial challenges of biopharmaceuticals production: a Finnish perspective. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. [S.l.], v. 59, p. 397-405, 2005.

PESTKA, S.; The Interferons: 50 Years after Their Discovery, There Is Much More to Learn, **Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 282, p. 20047-20051, 2007.

PESTKA, S., et al., Interleukin – 10 and Related Cytokines and Receptors, **Annual Review of Immunology**, [S.l.], v. 22, p. 929-979, 2004.

PILAR, L.Q., et al., Immunochromatography removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its análisis by capillary electrophoresis, **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1153, p. 227-234, 2007.

PONCIANO, C.R., **Desenvolvimento de espectrômetros de massa por tempo de voo para PDMS e MALDI**. Tese (Doutorado em Química Analítica), Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 1996.

QIAN, J. et al., Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of Human Serum Albumin in a lyophilized formulation of Interferon alfa-2b. **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1194, p. 48-56, 2008.

QUALITY of Biotechnological Products: Stability testing of biotechnological/ biological products. In: the United States Pharmacopoeia. 33.ed. Rockville: The United States Pharmacopoeia Convention, 2010. 1 cd-rom.

RANDO, E.H. et al., Long Term stabilization of recombinant human interferon α 2b in aqueous solution without serum albumin. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 264, p. 57-72, 2003.

RICKER, R.D.; SANDOVAL, L.A., Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules, **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 743, p. 43-50, 1996.

ROBERTS, M.J.; BENTLEY, M.D.; HARRIS, J.M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 54, p. 459-476, 2002.

RUIZ, L. et al., Long-term stabilization of recombinant human interferon α 2b in aqueous solution without serum albumin, **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 264, p. 57-72, 2003.

RUIZ, L.; REYES, N., L.; AROCHE, K. Aggregation of recombinant human interferon alpha 2b in Solution: Technical note. **AAPS PharmSciTech**, [S.l.], v. 7, n. 4, Article 99, 2006.

SADLER, J. S., WILLIAMS, B. R. G., **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 559–569, 2008.

SCHELLEKENS, H.; Bioequivalence and the Immunogenicity of Biopharmaceuticals, **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.l.], v.1, p. 457-462, 2002.

SHEVCHENKO, A. et al., Mass Spectrometry Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 68, p. 850-858, 1996.

SEN, G.C., Viruses and Interferons, **Annual Review of Microbiology**, [S.l.], v. 55, p. 255-281, 2001.

SHARMA, V.K.; KALONIA, D.S., Temperature – and pH – Induced Multiple Partially Unfolded States of Recombinant Human Interferon- α 2a: Possibly Implications in Protein Stability, **Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 20, n. 11, p. 1721 – 1729, 2003.

SHI, L.; WANG, D.; CHAN, W., Efficient expression and purification of human interferon alpha 2b in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Protein Expression and purification**, [S.l.], v. 54, n 2, p. 220-226, 2007.

SILVA, R. C. S., Medicamentos excepcionais no âmbito da assistência farmacêutica no Brasil. 2000. 215f. **Dissertação** (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública; Rio de Janeiro, 2000.

SILVA, M.M.C.G. et al., Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceuticals: Interferon alfa-2 case study, **Biologicals**, [S.l.], v. 36, p. 383-392, 2008.

SILVA, L.M. et al., Validation of an RP-LC Method for the Determination of Interferon- α 2a in Pharmaceutical Formulations, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [S.I.], v. 32, p. 370-382, 2009.

SIMPSON, R.J., **Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual**, New York, Cold Spring Laboratory Press, 2003.

STARK, G. R. et al., How cells respond to Interferon. **Annual Review of Biochemistry**, [S.I.], v. 67, p. 227-64, 1998.

ŠTULÍK, K.; PACÁKOVÁ, V.; TICHÁ, M., Some potentialities and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography. Review. **Journal of biochemical and Biophysical Methods**, [S.I.], v. 56, p. 1-13, 2003.

TAKAOKA, A; YANAI, H., Interferon signalling network in innate defence. **Cellular Microbiology**, [S.I.], v. 8, p. 907-922, 2006,

TANAKA, K. et al., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100.000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S.I.], v. 2, p. 151-153, 1988.

THE UNITED States Pharmacopoeia. 33.ed. Rockville: The United States Pharmacopoeia Convention, 2010. 1 cd-rom.

THIEDE, B. et al., Peptide mass fingerprinting, **Methods**, [S.I.], v. 35, p. 237-247, 2005.

TSARBOPOULOS, A. et al., Comparative Mapping of Recombinant Proteins and Glycoproteins by Plasma Desorption and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, [S.I.], v. 66, n. 13, jul. 1994.

VERONESE, F.M., peptide and protein, Pegylation: A review of problems and solutions. **Biomaterials**, [S.I.], v. 22, p. 405-417, 2001.

VESTAL, M.L., Modern MALDI time-of-Light mass spectrometry, **Journal of Mass Spectrometry**, [S.I.], v. 44, p. 303–317, 2009.

VILČEK, J., My fifty Years with Interferon. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, [S.l.], v. 27, p. 535-541, 2007.

VILČEK, J., Novel interferons, **Nature Immunology**, [S.l.], v. 4, p. 8-9, 2003.

WALSH, G., Biopharmaceuticals, Biochemistry and Biotechnology. 2.ed. England. Wiley. p. 551, 2003.

WANG, YU-SEN, et al., Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. **Advanced Drug Delivery Review**, [S.l.], v. 54, p. 547-570, 2002.

WHO. Hepatitis B, factsheet n. 204, revised aug 2008.
Site: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/print.html>
Acesso em : 02/05/2010

WHO. Annex 7, REQUIREMENTS FOR HUMAN INTERFERON MADE BY RECOMBINANT DNA TECHNIQUES, (Requirements for Biological Substances N° 41). In: **World Health Organization** Technical report series, n. 771, p. 158-180, 1988.

WINZOR, D.J., Analytical exclusion chromatography. Review. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, [S.l.], v. 56, p. 15-52, 2003.

YANG, D. et al., High-Accuracy Peptide Mass Fingerprinting Using Peak Intensity Data with Machine Learning. **Journal of Proteome Research**, [S.l.], v. 7, p. 62-69, 2008.

ZEUZEM, S., Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: Current and future perspectives. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, [S.l.], v. 5, p. 610-622, 2008.

ZHOU, L.F. et al., Preparation and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferona 2b fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, [S.l.], v. 67, n. 02, p. 301-308, 2007.