

# Análise de interferon humano recombinante presente em formulações farmacêuticas

## Recombinant human interferon analysis in pharmaceutical formulations

Sinéa Mendes de Andrade<sup>1,\*</sup>

Manuela da Silva<sup>II</sup>

Filipe Soares Quirino da Silva<sup>I</sup>

### RESUMO

**Introdução:** Em virtude do interesse para o tratamento da hepatite, o processo de produção industrial do INF- $\alpha$  foi desenvolvido e aperfeiçoado ao longo dos últimos anos. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para caracterizar a estrutura molecular do INF- $\alpha$ 2b em formulações farmacêuticas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. **Método:** Inicialmente foi desenvolvido um método de cromatografia líquida baseado em fase reversa para promover a separação entre o INF- $\alpha$ 2b constituinte ativo e minoritário e a soro albumina humana, também componente presente nas formulações farmacêuticas, obtendo-se amostras com homogeneidade proteica, revelada por eletroforese. As amostras em solução foram submetidas à digestão com tripsina, levadas ao espectrômetro de massa MALDI-TOF. Para que fosse analisada a estrutura molecular, foi desenvolvido um procedimento baseado em imunoafinidade e cromatografia de gel filtração. **Resultados:** As amostras preparadas por estes métodos apresentaram homogeneidade proteica por eletroforese, sendo analisadas por dicróismo circular e fluorescência, o que demonstrou ter degradação da estrutura tridimensional. **Conclusões:** Esse trabalho fornece dados importantes que subsidiam o estabelecimento de um protocolo para a análise de INF- $\alpha$ 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.

**PALAVRAS-CHAVE:** Interferon-alfa; Proteínas; MALDI-TOF; Dicróismo Circular; Fluorescência

### ABSTRACT

**Introduction:** Due to the interest in the treatment of hepatitis, the industrial production process of INF- $\alpha$  has been developed and perfected over the last few years. **Objective:** The present work aimed to develop a protocol to characterize the molecular structure of INF- $\alpha$ 2b in pharmaceutical formulations by MALDI-TOF mass spectrometry. **Method:** Initially, a reversed-phase liquid chromatography method was developed to promote the separation of active and minor constituent INF- $\alpha$ 2b and human serum albumin, also present in the pharmaceutical formulations, to obtain samples with protein homogeneity revealed by electrophoresis. Samples were hydrolyzed with trypsin and submitted to MALDI-TOF. In order to analyze the molecular structure, a procedure based on immunoaffinity and gel filtration chromatography was developed. **Results:** Prepared samples by these methods showed protein homogeneity by SDS-PAGE, and were analyzed by circular dichroism and fluorescence, which showed three-dimensional structure degradation. **Conclusions:** This work provides important data that support the establishment of a protocol for the analysis of INF- $\alpha$ 2b in final product, which could replace the traditional peptide mapping by liquid chromatography, with the advantage of resulting in a larger amount of information about the structure of the biopharmaceutical.

<sup>I</sup> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>II</sup> Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\*E-mail: [sinea.mendes@incqs.fiocruz.br](mailto:sinea.mendes@incqs.fiocruz.br)



## INTRODUÇÃO

A infecção crônica causada pelo vírus da hepatite B atinge cerca de 240 milhões de pessoas mundialmente, sendo a principal causa de cirrose e carcinoma hepatocelular. Estima-se que 686.000 pessoas venham a morrer por ano em consequência da hepatite B crônica ou aguda<sup>1</sup>. O controle dessa doença envolve a vacinação de forma preventiva e o uso de antivirais, nos indivíduos infectados. Os medicamentos preconizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento das Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAVH), nesse caso, são interferon-alfa (INF $\alpha$ ), interferon-alfa peguilado, lamivudina, tenofovir, entecavir e adefovir<sup>2</sup>.

Os interferons são um grupo de proteínas da família das citocinas, produzidas pelo organismo como resposta a infecções virais, sendo classificados de acordo com suas sequências em tipo I, famílias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$ , e  $\vartheta$ , como exemplo. No caso das hepatites virais foi identificada a importância do INF- $\alpha$  como um fator que impede a replicação viral, contribuindo para o tratamento dessa doença<sup>3,4,5,6</sup>.

Em virtude do interesse para o tratamento da hepatite, o processo de produção industrial do INF- $\alpha$  foi desenvolvido e aperfeiçoado ao longo dos últimos anos. Em linhas gerais, o INF- $\alpha$  é produzido por superexpressão em células de *Escherichia coli*. Após a superexpressão, o INF- $\alpha$  é purificado utilizando-se combinação de vários métodos cromatográficos<sup>7</sup>.

Devido a sua estrutura proteica, o INF- $\alpha$  não é ativo 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 e presença de agentes antioxidantes, esta formulação deve garantir a estabilidade do INF durante seu prazo de validade<sup>8</sup>. O excipiente mais utilizado é soro albumina humana (SAH), tendo como função principal estabilizar o produto, impedindo a agregação das moléculas, evitando a perda da potência e a formação de anticorpos contra o biofármaco<sup>9,10</sup>.

A formulação básica de INF- $\alpha$  contém 1,5 mg de SAH por mL. Como a relação entre massa e atividade é de  $1,4 \times 10^8$  UI/mg<sup>11</sup>, dependendo da apresentação, cada mL de formulação contém uma determinada massa de INF- $\alpha$ . Na menor dose, conforme descrito na bula dos produtos, a formulação tem cerca de 20  $\mu$ g de INF- $\alpha$  e 1,5 mg de SAH. Pode-se observar que a menor razão molar é de 1 de INF- $\alpha$  para 24 da composição proteica final.

O controle de qualidade dos INF pode ser feito utilizando dois grupos de ensaios. O primeiro grupo, que abrange ensaios comuns a formas farmacêuticas líquidas para uso interno (injetável), é constituído por testes de volume médio, pH, inocuidade, esterilidade e endotoxinas bacterianas. Quando o produto final é apresentado como liofilizado, deve ser avaliada a umidade residual, importante para a estabilidade do produto<sup>12</sup>.

O segundo grupo de ensaios diz respeito às particularidades do INF- $\alpha$  quanto à natureza proteica do biofármaco. Esses ensaios variam de acordo com as monografias para o INF- $\alpha$  em cada farmacopeia. No Brasil, a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (FB) não

inclui monografia específica para INF- $\alpha$ . A FB também não apresenta recomendações gerais para produtos produzidos por DNA recombinante, diferentemente das farmacopeias internacionais<sup>13</sup>.

A *United States Pharmacopoeia* 39 (USP-39) não apresenta uma monografia específica para o INF- $\alpha$ . Por outro lado, a USP-39 recomenda uma série de requisitos que devem ser avaliados para caracterização de artigos derivados de biotecnologia e sugere métodos para essa avaliação, tais como análise de aminoácidos, eletroforese capilar, eletroforese em gel de poliacrilamida e ensaio de proteínas totais. 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<sup>14</sup>.

Como a USP-39, a Farmacopeia Europeia 8.0. ed. (FE)<sup>11</sup> também prescreve requisitos gerais para produtos de biotecnologia DNA recombinantes. A FE determina que o produto deva 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 da região N terminal, o mapa de peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Fase Reversa (CLAE-FR), o teor de proteína total e de proteínas contaminantes provenientes do sistema de expressão.

No final das recomendações gerais, a FE determina que nas monografias específicas sejam listados os ensaios aplicáveis a cada produto. A FE tem uma monografia específica para avaliar a matéria prima do INF- $\alpha$  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- $\alpha$  padrão e da amostra. Ambos, padrão e amostra, submetidos previamente a hidrólise com tripsina;
- Focalização isoeletrica - identifica degradações que alteram o ponto isoeletrico (pI) da proteína INF- $\alpha$ ;
- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódico (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 intrinsecamente relacionadas ao princípio ativo proteico. São agregados, formas oxidadas e produtos de hidrólise e;
- Potência - 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- $\alpha$  e estão classicamente colocadas como parâmetros de avaliação de alterações que podem implicar na ausência de eficácia, e/ou ainda na imunogenicidade do produto<sup>11</sup>.

O mapa de peptídeos por CLAE-FR é uma técnica de identidade que demanda essencialmente uma comparação entre hidrolisados de um padrão do INF- $\alpha$  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<sup>11</sup>.

A ausência de monografias para produto acabado nas farmacopeias dificulta as autoridades regulatórias em relação à exigência mínima de qualidade para esse tipo de produto<sup>11,12,13</sup>.

O efeito farmacológico das proteínas está relacionado à sua complexa estrutura molecular. Falhas na expressão da proteína, com modificações da estrutura primária e a desnaturação da estrutura tridimensional, por exemplo, podem levar a uma redução da afinidade aos receptores, diminuindo ou mesmo eliminando o efeito farmacológico. A degradação física, como perda da estrutura secundária e terciária, compromete a capacidade de ligação do INF- $\alpha$  ao receptor, comprometendo o seu efeito<sup>15,16,17</sup>. Por esse motivo, o desenvolvimento de métodos para avaliação do produto final é relevante, principalmente pela possibilidade de incorporação de metodologias mais novas, que avaliem detalhadamente a estrutura molecular do biofármaco.

Métodos espectroscópicos podem ser usados para avaliar o teor de proteína na preparação e fornecer informações sobre a estrutura molecular. A identidade pode ser determinada por espectrometria de massa e a estabilidade da estrutura tridimensional por dicroísmo circular e fluorescência<sup>18</sup>.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de buscar metodologias analíticas mais modernas e eficientes para o controle de qualidade do INF- $\alpha$  em formulações farmacêuticas, de maneira a se obter informação acerca da segurança, qualidade e eficácia do biofármaco que deem suporte para as ações de Vigilância Sanitária.

## MÉTODOS

### Amostras

Utilizaram-se amostras de INF- $\alpha$ 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  $10 \times 10^6$  UI/mL/frasco.

### Reagentes

Todas as soluções neste estudo foram preparadas com água ultrapura usando o sistema Milli-Q® (Millipore). Os reagentes foram fornecidos pela Sigma, GE, Bio-Rad e Merck, dentre outros. Os reagentes específicos a determinadas técnicas foram relacionados conforme

descrição dos procedimentos. O padrão de INF- $\alpha$ 2b Lote nº 3 utilizado foi fornecido pela Farmacopeia Europeia.

### Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

A CLAE-FR foi utilizada para separar o INF- $\alpha$ 2b da SAH 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<sub>vp</sub>, bomba LC-10 AD<sub>vp</sub>, válvula seletora de solvente Shimadzu FCV-10AL, auto injetor SIL-10AD<sub>vp</sub>, 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), mantida em temperatura ambiente. A fase móvel A consistiu de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA 0,1%) em água, fase móvel B de acetonitrila (ACN): TFA 0,1%, com gradiente descrito na FE<sup>19</sup>; fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de detecção 214 nm. Os dados foram processados utilizando Class - VP 6.13 SP2. O volume de injeção foi de 100  $\mu$ L.

### Digestão enzimática

A solução de tripsina (Promega V5228A) foi preparada dissolvendo 100  $\mu$ g em 100  $\mu$ L de ácido acético 50 mM (solução estoque 1,0  $\mu$ g/ $\mu$ L). Desta solução estoque, foram tomados 14  $\mu$ L e diluídos em 1 mL de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 50 mM, para o preparo de uma solução de trabalho de tripsina. Foi preparado um branco, com o tampão e demais reagentes e um padrão de INF- $\alpha$ 2b na concentração de 7  $\mu$ g/mL em tampão NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8,4. Esta concentração é a esperada para a amostra. As frações coletadas da CLAE-FR foram liofilizadas, e, posteriormente, adicionados 100  $\mu$ L de tampão NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8,4, homogeneizados em vórtex, acrescidos de 10  $\mu$ L da solução de trabalho de tripsina. As amostras permaneceram em Thermomixer®, com agitação a 37°C por 18 h. Na segunda etapa de digestão foram adicionados aos tubos mais 10  $\mu$ L da solução de trabalho de tripsina, com período de 4 horas em Thermomixer®, com agitação e temperatura de 37°C. A seguir amostra, padrão e branco foram submetidos ao procedimento de digestão<sup>20,21</sup>.

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

### Espectrometria de massa (EM)

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)<sup>22</sup>.

A matriz utilizada no preparo das amostras foi ácido a-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 1.000 a 10.000 vezes mais moléculas de matriz que moléculas de peptídeo. À alíquota de 5  $\mu$ L da amostra previamente submetida à digestão, adicionou-se 5  $\mu$ L da matriz. Aplicou-se 0,5  $\mu$ L dessa mistura em um porta-amostras, que, após a secagem, se cristalizou<sup>22</sup>.



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 Brucker Daltonics. Os espectros foram processados no programa XACQ 4.0<sup>23</sup>.

#### Cromatografia líquida de alta eficiência de filtração em gel (CLAE-FG)

Esse experimento foi realizado no mesmo cromatógrafo utilizado na CLAE-FR. As condições específicas foram: a coluna Superdex® 75 GL (GE Healthcare) com a fase móvel tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, 5% propanol, fluxo: 0,4 mL/min, comprimento de onda de 214 nm, volume de 100 µL. A fração correspondente ao INF- $\alpha$ 2b foi coletada manualmente e concentrada em Speed-Vac<sup>®24,25</sup>.

#### Determinação quantitativa de proteínas

A determinação quantitativa de proteínas foi usada para acompanhar o teor nas frações coletadas dos métodos cromatográficos, que foi determinada pelo método de Bradford, utilizando o protocolo para determinação em microplacas<sup>26</sup>.

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

O SDS-PAGE foi usado para avaliar a homogeneidade proteica das frações coletadas dos procedimentos utilizando CLAE-FG e FR. Aliquotas de 10 mL das frações coletadas de CLAE-FG, adicionadas de 10 mL de solução de  $\beta$ -mercaptoetanol, foram aplicadas em gel concentrador de 5% e gel de acrilamida 15%, segundo Laemmli<sup>27</sup>, 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- $\alpha$ 2b<sup>28</sup>. Os géis obtidos foram digitalizados no densitômetro GS-800 Bio-Rad, com o auxílio do programa *Quantity One* (Bio-Rad). As massas moleculares de cada banda foram estimados comparativamente a padrões de baixa massa moleculares.

#### Uso de membrana de imunoafinidade para remoção de SAH das amostras

Procedimento com membrana de imunoafinidade foi empregado para diminuir a quantidade de SAH para facilitar a separação cromatográfica do INF- $\alpha$ 2b da SAH. Foi seguido o protocolo do fabricante<sup>29</sup>.

#### Espectroscopia de dicroísmo circular

A metodologia de espectroscopia de dicroísmo circular foi utilizada para avaliar a estrutura secundária do INF- $\alpha$ 2b a partir da purificação por imunoafinidade/gel filtração<sup>30</sup>. As frações coletadas de CLAE-FG, concentradas em Speed-Vac<sup>®</sup>, foram submetidas ao procedimento de diálise, utilizando membrana de *cut off* 10 kDa, contra tampão fosfato 10 mM, pH 7.4<sup>31</sup>. Um padrão de INF- $\alpha$ 2a da FE foi diluído com o tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, de maneira a obter concentração semelhante à da fração coletada. Os espectros foram obtidos no espectrômetro Jasco em células de quartzo de 1 cm.

#### 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<sup>®</sup>, submetidas ao procedimento de diálise, utilizando membrana de *cut off* 10 kDa, contra tampão fosfato 10 mM, pH 7.4. Os espectros foram obtidos pelo 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<sup>32</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Separação do INF- $\alpha$ 2b dos demais componentes da formulação por CLAE-FR

A CLAE-FR é uma técnica bastante utilizada na separação de proteínas, devido a sua elevada resolução. Nesse estudo foi possível separar o INF- $\alpha$ 2b da SAH com uma boa resolução (7,3), conforme mostrado na Figura 1(a), do perfil cromatográfico obtido da formulação de INF- $\alpha$ 2b. O pico cromatográfico referente à SAH, presente em excesso na amostra, apresentou tempo de retenção de 58,1 min. O segundo pico, identificado como INF- $\alpha$ 2b, apresenta tempo de retenção de 66,8 min, o que foi confirmado pela injeção do padrão da FE conforme mostrado na Figura 1(b). A CLAE-FR se mostrou eficiente para a separação INF- $\alpha$ 2b/SAH. A hidrofobicidade do INF- $\alpha$ 2b é superior à da SAH, como pode ser constatado nos cromatogramas da Figura 1(a) e (b), o que facilitou bastante a separação.

A homogeneidade proteica do pico de 66,8 min foi avaliada por SDS-PAGE das frações coletadas da CLAE-FR, apresentada na Figura 1(c). Foi observada uma banda com 19 kDa, que corresponde ao peso molecular do INF- $\alpha$ 2b. Além disso, há existência de bandas de pesos moleculares maiores do que o INF- $\alpha$ 2b, com 57 kDa. Na literatura, essas bandas são relacionadas a trimeros do INF- $\alpha$ 2b<sup>33,34</sup>. Esse resultado comprovou que o INF- $\alpha$ 2b se apresentava numa pureza adequada à caracterização por espectroscopia de massa.

#### Análise do INF- $\alpha$ 2b por EM

Inicialmente, para estabelecer a metodologia, foram usados padrões de INF- $\alpha$ 2b da FE e de SAH (Sigma) hidrolisados pela tripsina. Apesar dos picos coletados na CLAE-FR apresentarem pureza adequada, um padrão de SAH também foi preparado para EM (resultados não apresentados). O objetivo desse experimento foi determinar se havia uma contaminação por SAH que não tivesse sido detectada no SDS-PAGE.

Na Tabela são dadas as seqüências esperadas de aminoácidos dos peptídeos dessa digestão e as correspondentes massas monoisotópicas  $[M + H]^+$ , as teóricas e as observadas, de cada peptídeo, tanto para o padrão da FE quanto para a fração coletada de CLAE-FR.

Nessas condições, a cobertura de seqüência observada para o padrão de INF- $\alpha$ 2b foi de 72,7%. Foram observados peptídeos correspondentes a 120 do total de 165 aminoácidos no INF- $\alpha$ 2b.

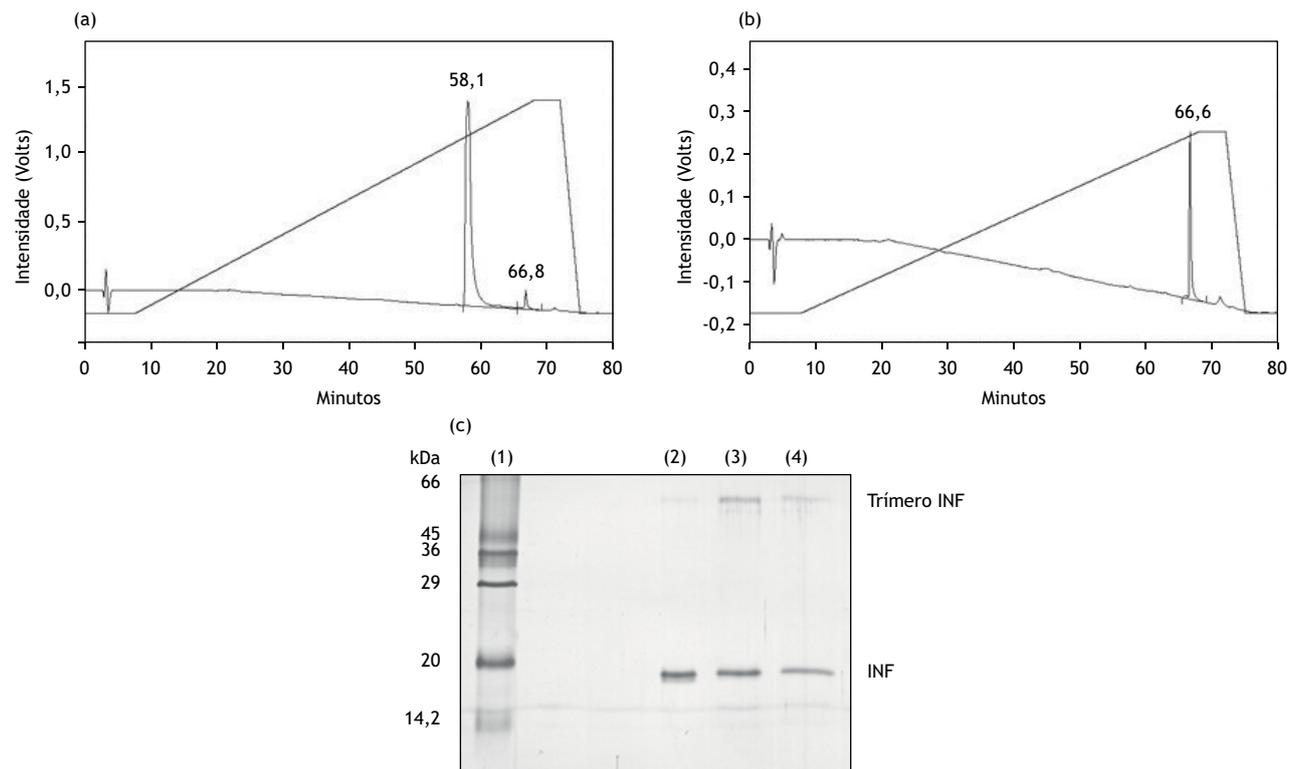


Figura 1. (a) Cromatograma da formulação de INF- $\alpha$ 2b; (b) Cromatograma do padrão de INF- $\alpha$ 2b FE. Experimentos realizados nas mesmas condições: 100  $\mu$ L de solução, 35  $\mu$ g/100  $\mu$ L, coluna ACE 3 C18-300, 250 mm C x 4,6 mm diâmetro, fase móvel A: TFA 0.1% em água, fase móvel B: acetonitrila: TFA 0.1%, com gradiente, fluxo de 1.0 mL/min,  $\lambda$  214 nm. A linha sobreposta mostra a concentração de fase B; (c) Análise de SDS-PAGE das frações coletadas da CLAE-FR em (a): (1) padrão de peso molecular; linhas (2), (3), e (4) frações coletadas de CLAE-FR, com tempo de retenção de 66 min.

Tabela. Sequências esperadas de aminoácidos dos peptídeos para a hidrólise triptica de INF- $\alpha$ 2b e as correspondentes massas monoisotópicas [M + H]<sup>+</sup>. A coluna das massas experimentais se refere aos valores observados nos espectros do padrão de INF- $\alpha$ 2b da FE e da fração coletada.

N <sup>1</sup>	Posição	Sequência de aa dos peptídeos	[M + H] <sup>+</sup> (Da) <sup>2</sup>				
			Teórica	P <sup>4</sup>	Ir <sup>3</sup> (%)	FC <sup>5</sup>	Ir <sup>3</sup> (%)
1	84-112	FYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMK	3902,6	n.o. <sup>6</sup>	-	n.o.	-
2	50-70	AETIPVLHEMIQQIFNLFSTK	2459,3	2459,2	4,5	n.o.	-
3	34-51	HDFGFPQEEFGNQFQKDR	-	2225,9	98,3	2225,9	100,0
4	34-49	HDFGFPQEEFGNQFQK	1954,8	1954,8	87,4	1954,8	33,7
5	150-162	SFSLSTNLQESLR	1481,7	1481,7	100	1481,7	71,4
6	71-83	DSSAAWDETLDDK	1450,6	1450,6	6,2	n.o.	-
7	1-12	CDLPQTHSLGSR	1313,6	1313,6	38,3	n.o.	-
8	135-144	YSPCAWEVVR	1209,5	1209,1 + 2116,9	51,4	1209 + 2116,3	44,9
9	14-22	TLMLLAQMR	1076,5	1076,5	81,5	1076,7	26,8
10	24-31	ISLFSLCK	910,5	910,6 + 2116,9	26,5	910,6 + 2116,3	14,3
11	113-120	EDSILAVR	902,4	902,6	9,5	901,9	19,5
12	126-131	ITLYLK	750,4	750,7	4,4	n.o.	-
13	145-149	AEIMR	619,3	n.o.	-	n.o.	-
14	122-125	YFQR	613,3	n.o.	-	n.o.	-

1N: Número do peptídeo; 2[M + H]<sup>+</sup> Teórica (MH<sup>+</sup>): obtida submetendo-se a sequência do INF- $\alpha$ 2b à ferramenta *PeptideMass* (www.expasy.org); 3Ir: intensidade relativa; 4 P: padrão FE; 5 FC: Massa observada na hidrólise da fração coletada; 6n.o.: não observado.

Considerando que, devido à especificidade hidrolítica da tripsina, com a formação de aminoácidos livres e di/tripeptídeos que não são detectáveis nessas condições, o total de aminoácidos que poderíamos detectar com esse método é de 154, uma cobertura de 78% foi atingida, que é uma cobertura bastante elevada<sup>20</sup>.

Observações importantes podem ser feitas a partir dos resultados do padrão da FE. De acordo com a Tabela, os peptídeos 3 e 5

têm características em suas sequências que são correlacionadas ao aumento da ionização<sup>35</sup>. 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 que apresenta o sinal mais intenso em espectros de massa já publicados do INF- $\alpha$ 2b<sup>20,36</sup>.

Por outro lado, os peptídeos menos intensos têm características em suas sequências que reduzem a ionização<sup>35</sup>. Quanto ao



C terminal, o peptídeo 6 tem lisina, o peptídeo 7 tem arginina, além de cisteína no N terminal. Ambos possuem aspartatos como resíduos internos, sendo que 6 tem também um triptofano.

As pontes dissulfeto, ligações importantes para a estabilidade da estrutura tridimensional de proteínas, apresentam-se de forma correta, de acordo com os resultados. Outro ponto que foi observado nos espectros das amostras foi a conservação da ponte dissulfeto entre as cisteínas 29 e 138 ( $[M + H]^+$  2117,5), demonstrando que essa característica importante da estrutura do INF- $\alpha$ 2b está preservada no produto comercial analisado após as manipulações nos procedimentos realizados. Foi observado um pico intenso com  $MH^+$  de 2116,9. Esse valor corresponde à associação, via ponte dissulfeto, dos peptídeos 8 e 10. Como não foi utilizado redutor na preparação da amostra, parte da ponte de sulfeto se manteve e parte foi reduzida, formando os peptídeos 8 e 10.

Um pico intenso, com  $[M + H]^+$  igual a 2225,9, foi observado (peptídeo 3). Esse valor corresponde à massa de um peptídeo onde não ocorre hidrólise pela tripsina na sequência KDR. A perda desse sítio de hidrólise pela tripsina já foi observada anteriormente na análise do INF- $\alpha$ 2b<sup>20</sup>.

Houve uma coincidência dos peptídeos não observados com resultados preliminares da literatura, para a análise de INF- $\alpha$ 2b matéria-prima<sup>20</sup> e em análise do padrão da FE<sup>36</sup>.

A próxima etapa foi a análise do INF- $\alpha$ 2b presente nas formulações. O material coletado na CLAE-FR foi então submetido à hidrólise por tripsina e os peptídeos resultantes foram analisados por EM.

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.

A cobertura de sequência atingida com essa análise para as amostras das formulações farmacêuticas 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 sequência<sup>20</sup>.

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 sequência 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.

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

#### Avaliação da estrutura molecular do INF- $\alpha$ 2b

Para que pudessemos avaliar a estrutura molecular do INF- $\alpha$ 2b foi necessário desenvolver um método de separação SAH/INF- $\alpha$ 2b

não desnaturante. A CLAE-FR é considerada uma técnica desnaturante, com pH ácido e alta concentração de solvente orgânico, que muda a estrutura tridimensional durante a análise<sup>37</sup>. A técnica inicialmente testada para a separação foi a CLAE-FG. Esse tipo de cromatografia demonstrou ser adequada, devido à diferença de volume hidrodinâmico entre o INF e a SAH, 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 à neutralidade, o que minimiza a possibilidade de degradação do biofármaco durante o processo. O material coletado estaria nas condições adequadas para os experimentos de dicroísmo circular e fluorescência<sup>33</sup>.

#### CLAE-FG

A CLAE-FG é um método amplamente usado para análise de agregados em proteínas, sendo que vários parâmetros, como a coluna cromatográfica, concentração salina da fase móvel, uso de surfactante e modificadores orgânicos, podem ser otimizados para melhorar a separação<sup>38,39</sup>. Vários parâmetros foram testados para obter uma melhor separação do INF- $\alpha$ 2b da SAH, (resultados não mostrados). A melhor condição foi alcançada a partir da adição de 5% de n-propanol à fase móvel, com a função de diminuir as interações hidrofóbicas da formulação com a matriz que compõe a fase estacionária<sup>38,39</sup>.

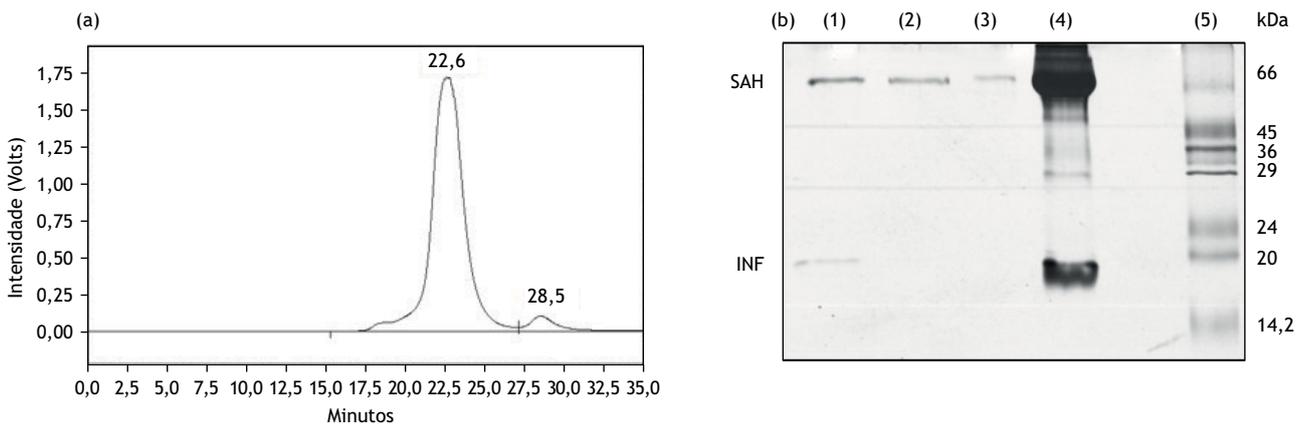
Nessas condições foi observada a maior diferença de tempo de retenção obtido até então entre o pico de SAH, presente em excesso, e o pico do INF- $\alpha$ 2b, sendo em torno de seis minutos, conforme pode ser visto na Figura 2(a). Por esse motivo o segundo pico foi coletado, concentrado e analisado por SDS-PAGE, para avaliar a homogeneidade proteica.

O resultado do SDS-PAGE é mostrado na Figura 2(b). As frações coletadas apresentaram bandas correspondentes às massas moleculares da SAH e do INF- $\alpha$ 2b, demonstrando que a separação efetivamente não foi completa.

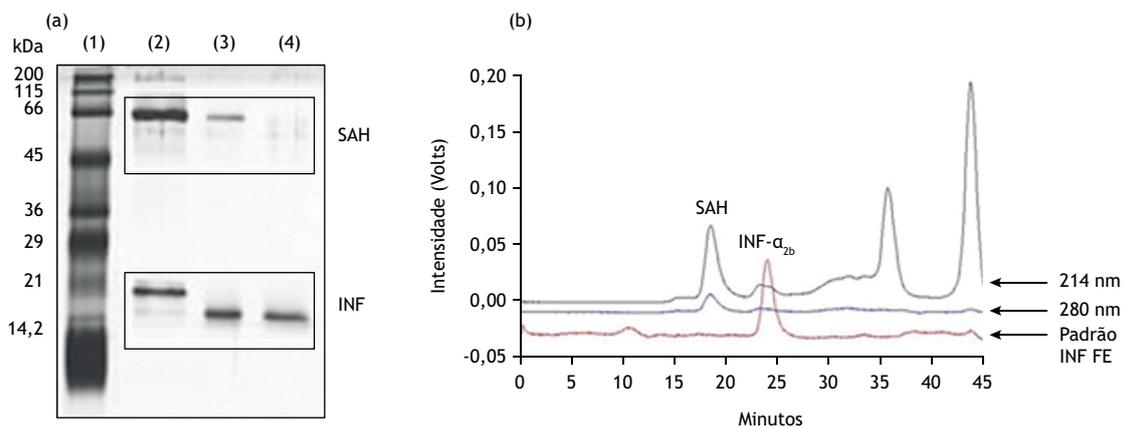
Apesar da separação obtida na CLAE-FG, o resultado do SDS-PAGE da fração correspondente ao INF- $\alpha$ 2b ainda apresentou contaminação por SAH. A dificuldade de melhorar a separação entre as duas proteínas poderia estar associada à pequena resolução atingida pela CLAE-FG e pela grande diferença de concentração entre ambas. Por isso optou-se por um processo que reduz a concentração de SAH nas amostras. Com menos SAH, a saturação dos sítios da coluna seria menor e a separação provavelmente melhor.

#### Uso de membrana de imunoafinidade para remoção de SAH das amostras

A submissão da formulação ao procedimento de imunoafinidade foi acompanhada por SDS-PAGE, conforme mostrado na Figura 3. Pode-se observar que o tratamento com a resina reduziu bastante a presença de SAH nas amostras, porém não eliminou completamente essa proteína. Provavelmente o grande excesso molar da SAH saturou completamente a resina, sendo que parte dessa proteína foi eluída junto com o INF- $\alpha$ 2b.



**Figura 2.** (a) Cromatograma da formulação de INF- $\alpha$ 2b obtido. Condições: coluna Superdex® 75 HR 10/30, 30 cm C x 10,0 mm diâmetro, fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, 5% propanol, fluxo: 0,4 mL/min,  $\lambda$  214 nm. (b) 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.



**Figura 3.** (a) Análise de SDS-PAGE de frações da formulação de INF- $\alpha$ 2b (1) padrão de massa molecular; (2) Formulação submetida à 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; (b) 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 diâmetro, fase móvel: tampão, PB, 50 mM, NaCl 150 mM, 5% propanol pH 6,9, fluxo: 0,4 mL/min, detector UV  $\lambda$ , 214 nm.

A partir desse resultado, foi feita a combinação dos procedimentos de imunoafinidade e CLAE-FG, o que possibilitou a obtenção do INF- $\alpha$ 2b puro a partir das formulações. As amostras preparadas dessa forma apresentaram homogeneidade proteica por SDS-PAGE, como pode ser visto na Figura 3(a).

### Dicroísmo circular

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- $\alpha$ 2b ao receptor, comprometendo o seu efeito<sup>15,16,17</sup>. Portanto, se fez necessária a avaliação dessa integridade, sendo que as técnicas de dicroísmo circular e fluorescência podem ser empregadas para esse fim<sup>40</sup>.

As frações coletadas do esquema de purificação imunoafinidade/gel filtração foram então analisadas por dicroísmo circular, sendo os resultados mostrados na Figura 4. O perfil do padrão foi semelhante ao descrito por outros autores para o INF- $\alpha$ 2b em pH 7,4<sup>31,32,41</sup>. 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<sup>30</sup>, como é o caso do INF- $\alpha$ 2b<sup>41</sup>.

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) foi mais intensa que a primeira (-7,87) (Figura 4).



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

### Fluorescência

Inicialmente, os espectros da fração coletada e do padrão da FE foram comparados, conforme a Figura 5. O padrão apresentou um espectro com máximos de emissão em 336 nm ( $\lambda_{ex}$  280 nm) e 333 nm ( $\lambda_{ex}$  295 nm). As frações coletadas apresentaram máximos de emissão em 338 nm ( $\lambda_{ex}$  280 nm) e 334 nm ( $\lambda_{ex}$  295 nm). Esses resultados demonstraram que o INF- $\alpha$ 2b presente nas formulações

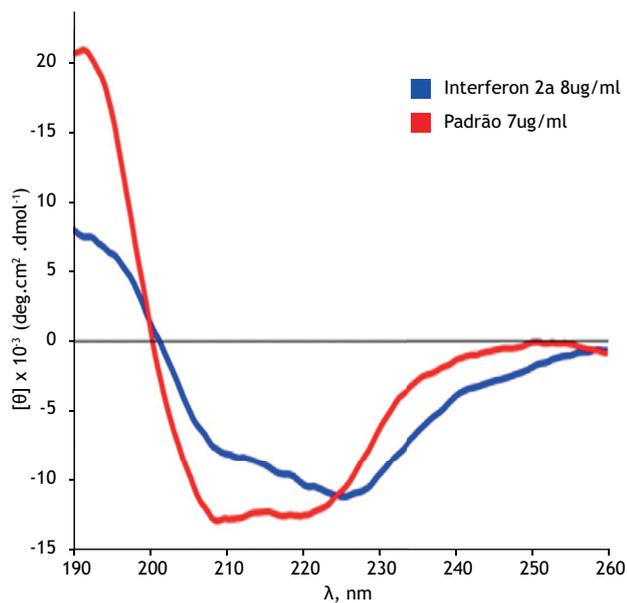


Figura 4. Espectros de dicroísmo circular do padrão de INF- $\alpha$ 2a da FE (7  $\mu$ g/mL) em vermelho, e da fração coletada da Imunoafinidade/CLAE-FG (8  $\mu$ g/mL) em azul. Amostras em tampão PB 10 mM, pH 7,4.

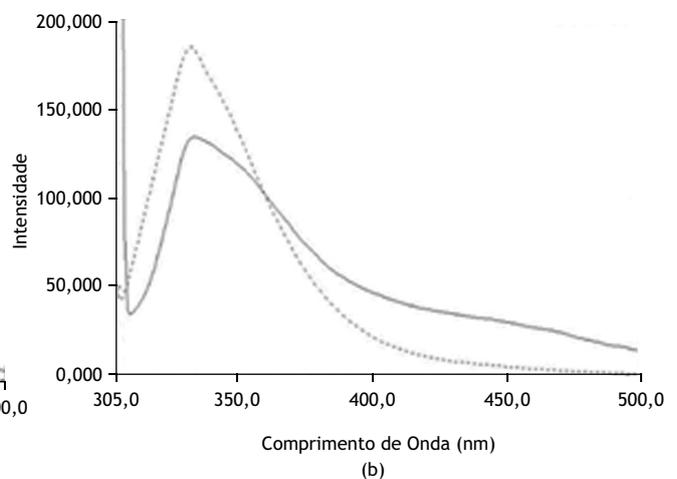
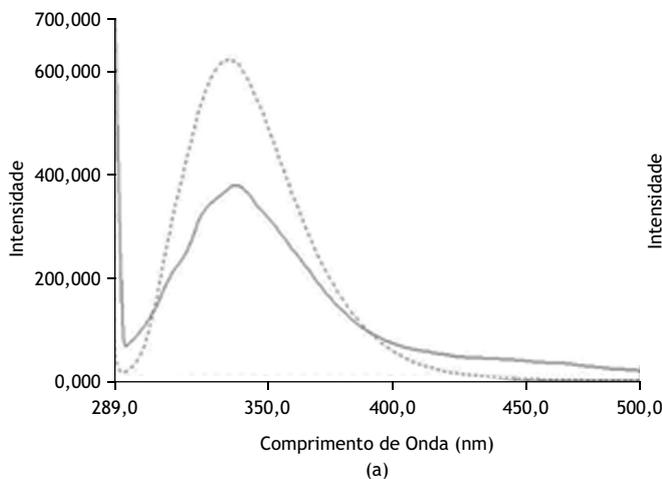


Figura 5. (a) Perfil de fluorescência do padrão de INF- $\alpha$ 2b da FE (traço pontilhado) e da fração coletada da CLAE-FG (traço normal). Excitação em 280 nm. (b) Perfil de fluorescência do padrão de INF- $\alpha$ 2b da FE (traço pontilhado) e da fração coletada da CLAE-FG (traço normal). Excitação em 295 nm. Amostras em tampão PB 10 mM, pH 7,4.

tem uma exposição das cadeias laterais maior que o padrão da FE, indicando a possibilidade de desnaturação da estrutura terciária<sup>31</sup>.

Outra informação importante que os espectros de fluorescência fornecem é a medida da intensidade da luz no  $\lambda_{ex}$ . 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 ( $\lambda_{ex}$  280 nm) e 280,6 ( $\lambda_{ex}$  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.

Os resultados da avaliação da estrutura tridimensional demonstraram que nas amostras houve desnaturação dessa estrutura.

De acordo com estudos apresentados por Qian<sup>37</sup>, a complexidade da estrutura proteica e as várias vias de agregação e degradação podem ser induzidas por alguns fatores. O presente estudo constatou a degradação física causada provavelmente pelos procedimentos usados para obtenção do INF- $\alpha$ 2b purificado, tais como mudança de temperatura, aumento da concentração de sal na composição do tampão e as várias etapas necessárias para obter volume suficiente para análise<sup>16,38</sup>.

### CONCLUSÕES

Nesse estudo a separação do INF- $\alpha$ 2b da SAH presente nas formulações foi realizada com método de CLAE-FR, resultando em uma excelente separação da SAH e possibilitando a análise por MALDI-TOF. A análise por MALDI-TOF do INF- $\alpha$ 2b permitiu atingir 45,5% de cobertura da sequência do biofármaco em formulações farmacêuticas.

Para que fosse avaliada a integridade da estrutura tridimensional do biofármaco foi necessário desenvolver um protocolo de separação do INF- $\alpha$ 2b dos demais componentes da formulação comercial, reduzindo-se inicialmente a SAH com um procedimento de imunoafinidade e completando a purificação com CLAE-FG e



SDS-PAGE. As frações obtidas foram analisadas por difração circular e fluorescência, o que permitiu a constatação da degradação da estrutura tridimensional.

Esse estudo forneceu dados importantes que subsidiam o estabelecimento de um protocolo para a análise de INF-  $\alpha$ 2b em produto final, que poderá substituir o mapa de peptídeos tradicional por cromatografia líquida, com a vantagem de fornecer 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 à 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-  $\alpha$ 2b e seu uso crônico justificam a adoção de técnicas como o MALDI-TOF.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Hepatitis B: fact sheet. 2016[acesso 2016 Dec 5]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
2. Ministério da Saúde (BR). Protocolo clínico e diretrizes da hepatite viral crônica b e coinfeções. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2011.
3. Pestka, S. The Interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn [Review]. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20047-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700004200>
4. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004;202(1):8-32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
5. Sen GS. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55(1):255-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.255>
6. Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):559-68. <https://doi.org/10.1038/nri2314>
7. Walsh G. Biopharmaceuticals, biochemistry and biotechnology. 2nd ed. London: Wiley; 2003.
8. Närhi M, Nordström K. Manufacturing, regulatory and commercial challenges of biopharmaceuticals production: a Finnish perspective. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;59(3):397-405. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.11.006>
9. Ruiz L, Reyes N, Duany L, Franco A, Aroche K, Hardy Rando E. Long-term stabilization of recombinant human interferon alpha 2b in aqueous solution without serum albumin. *Int J Pharm.* 2003;264(1-2):57-72. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00388-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00388-0)
10. Ruiz L, Aroche K, Reyes N. Aggregation of recombinant human interferon alpha 2b in solution: technical note. *AAPS PharmSciTech.* 2006;7(4):99. <https://doi.org/10.1208/pt070499>
11. European Pharmacopoeia 8.0. Strasbourg: Council of Europe; 2014.
12. World Health Organization. WHO Expert Committee on biological standardization: thirty-eighth report. Geneva: World Health Organization;1988. (World Health Organ Tech Rep Series, 771). Requirements for human interferon made by recombinant DNA techniques, p. 33
13. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília, DF: Anvisa; 2010.
14. United States Pharmacopeia. 39nd ed. Rockville: United States Pharmacopeia; 2016.
15. Gilg D, Riedl B, Zier A, Zimmermann MF. Analytical methods for the characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an example. *Pharm Acta Helv.* 1996;71(6):383-94. [https://doi.org/10.1016/S0031-6865\(96\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0031-6865(96)00048-9)
16. Hermeling S, Crommelin DJ, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res.* 2004;21(6):897-903. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000029275.41323.a6>
17. Kaltashov IA, Bobst CE, Abzalimov RR, Berkowitz SA, Houde D. Conformation and dynamics of biopharmaceuticals: transition of mass spectrometry-based tools from academe to industry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010;21(3):323-37. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.10.013>
18. Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/ biological products. In: United States Pharmacopoeia. 33 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia; 2010.
19. In: European Pharmacopoeia 8.0. v. 2. Strasbourg: Council of Europe; 2015. Interferon alfa-2 concentrated solution, p. 2150-3.
20. Tsarbopoulos A, Karas M, Strupat K, Pramanik BN, Nagabhushan TL, Hillenkamp F. Comparative mapping of recombinant proteins and glycoproteins by plasma desorption and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 1994;66(13):2062-70. <https://doi.org/10.1021/ac00085a022>
21. Simpson RJ. Proteins and proteomics: a laboratory manual. New York: Cold Spring Laboratory; 2003.
22. Zhou GH, Luo GA, Cao YC, Zhu MS, Zhu MS. Study on the quality of recombinant proteins using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *World J Gastroenterol.* 1999;5(3):235-40. <https://doi.org/10.3748/wjg.v5.i3.235>
23. Bruker. User guide to the Flex III, Maldi-TOF Mass Spectrometers. Bremen: Analytical Systems; 1995. p. 1.12-4.
24. Stulík K, Pacáková V, Tichá M. Some potentialities and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography. *J Biochem Biophys Methods.* 2003;56(1-3):1-13. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00053-8)



25. Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005;35(3):237-47. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.08.015>
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Natur*. 1970;227(5259):680-5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
28. Kamp RM, Choll-Papadopoulou T, Wittmann-Liebold B, editors. *Protein structure analysis: preparation, characterization, and microsequencing*. Berlin: Springer; 1997.
29. Greenough C, Jenkins RE, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Park BK, Pennington SR. A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma. *Proteomics*. 2004;4(10):3107-11. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300815>
30. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1751(2):119-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
31. Kim HH, Lee YM, Suh JK, Song NW. Photodegradation mechanism and reaction kinetics of recombinant human interferon-alpha2a. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6(2):171-80. <https://doi.org/10.1039/B614971E>
32. Sharma VK, Kalonia DS. Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon-alpha2a: possible implications in protein stability. *Pharm Res*. 2003;20(11):1721-9. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000003367.62900.0f>
33. Silva MMCG, Lamarre B, Cerasoli E, Rakowska P, Hills A, Bailey MJA et al. Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceuticals: Interferon alfa-2 case study. *Biologicals*. 2008;36(6):383-92. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2008.06.003>
34. Hermeling S, Schellekens H, Maas C, Gebbink MF, Crommelin DJ, Jiskoot W. Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wild-type and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation. *J Pharm Sci*. 2006;95(5):1084-96. <https://doi.org/10.1002/jps.20599>
35. Yang D, Ramkissoon K, Hamlett E, Giddings MC. High-accuracy peptide mass fingerprinting using peak intensity data with machine learning. *J Proteome Res*. 2008;7(1):62-9. <https://doi.org/10.1021/pr070088g>
36. Cindrić M, Galić N, Vuletić M, Klarić M, Drevenkar V. Evaluation of recombinant human interferon alpha-2b structure and stability by in-gel tryptic digestion, H/D exchange and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40(3):781-7. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.10.024>
37. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res* 2010;27(4):544-75. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>
38. Qian J, Tang Q, Cronin B, Markovich R, Rustum A. 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. *J Chromatogr A*. 2008;1194(1):48-56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.04>
39. Arakawa T, Ejima D, Li T, Philo JS. The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci*. 2010;99(4):1674-92. <https://doi.org/10.1002/jps.21974>
40. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals. *Int J Pharm*. 2005;289(1-2):1-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.014>
41. Johnston MJW, Nemr K, Hefford MA. Influence of bovine serum albumin on the secondary structure of interferon alpha 2b as determined by far UV circular dichroism spectropolarimetry. *Biologicals*. 2010;38(2):314-20. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.010>

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao INCQS/Fiocruz pela motivação em desenvolver este estudo, à Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/RJ) por disponibilizar o equipamento espectrômetro de massa MALDI TOF, à orientação da Dra. Cássia Ribeiro Ponciano (PUC/RJ) pela sua importante contribuição ao presente estudo, e a Celso Romero, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), por sua ajuda com a parte experimental, assim como pela análise dos resultados.

#### Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).