

## **Título: Estudo de metodologias para separação e caracterização dos isômeros de posição da alfapeginterferona 2b**

Autor: Jéssica Yukie dos Reis Nagashima

### **RESUMO**

A hepatite C emergiu nas últimas décadas como uma das mais importantes causas de doença hepática crônica constituindo, atualmente, a principal indicação para transplante hepático. Sua transmissão pode ser feita pelo sangue infectado, por via sexual ou vertical (perinatal) e apresenta-se geralmente de forma assintomática. A verdadeira prevalência desta doença no mundo não é totalmente esclarecida e seu tratamento tem como objetivo inibir a replicação do ácido ribonucleico (RNA) viral de modo a controlar a doença hepática, evitando assim a progressão da infecção aguda para a crônica. O primeiro tratamento contra a hepatite C baseia-se no uso da alfainterferona, com eficácia atribuída às suas propriedades antivirais e imunomoduladoras, associada a ribavarina. Porém, esta citocina apresenta problemas que são intrínsecos das proteínas terapêuticas tais como: meia vida sanguínea curta, elevada imunogenicidade e elevada degradação. Para minimizar estes problemas, a alfainterferona passou por um aperfeiçoamento, que consiste em conjugar esta citocina ao polietilenoglicol (peguilação). Para este processo de peguilação é utilizada uma estrutura molecular polimérica com 48KDa, semelhante a um dendrímero com quatro ramificações de monometoxi-polietilenoglicol (mPEG). Esta conjugação proporciona uma melhora na farmacocinética da molécula e na eficácia da terapêutica. Outra vantagem obtida com este processo de conjugação é uma menor injúria do paciente, já que a alfapeginterferona é administrada apenas uma vez por semana. Este trabalho teve por objetivo caracterizar os isômeros de posição da nova molécula de alfapeginterferona que está sendo desenvolvida por Bio-Manguinhos em parceria com Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, de Cuba. A identificação dos possíveis isômeros de posição é de grande importância, visto que o processo de conjugação da proteína com o PEG ativado pode ocorrer em diferentes aminoácidos, especificamente em grupamentos  $\epsilon$ -amino das lisinas, podendo assim gerar até 11 isômeros de posição. Desta forma, de modo a identificar os possíveis sítios de peguilação, foram realizados diversos métodos analíticos tais como: cromatografia por troca iônica (IEX-HPLC), concentração e diafiltração, eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida (SDS-PAGE), avaliação da atividade biológica com células HEp, digestão enzimática (Lys-c e tripsina) e espectroscopia de massas (MALDI-TOF e SYNAPT UPLC ESIQTOF). Com isso, foi possível isolar três frações majoritárias com características de proteína, as quais possuem atividade biológica, onde a 1ª e 3ª frações estão dentro dos parâmetros de especificação estabelecidos, contudo a 2ª fração obtida possui atividade biológica reduzida o que pode ser justificável, pela diferença entre os locais de peguilação da molécula. Através da análise de espectrometria de massas foi possível confirmar a massa molar da proteína intacta (IFN- $\alpha$ ) e do composto conjugado (IFN-PEG) de aproximadamente 19,2KDa e 66,1KDa, respectivamente. Porém, para a identificação dos sítios de peguilação foi observado que a metodologia proposta neste estudo não foi capaz de obter resultados conclusivos, sendo necessário realizar estudos complementares.