



ESTUDIO CON CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO PARA EL DESARROLLO DE FORMULACIONES DE PRODUCTOS BIOTECNOLOGICOS

Soria O. R¹., Rivera V²., Martinez M.², Paniagua J. F¹. **1.** Laboratorios Silanes Amores 1304 Col. Del Valle, CP 03100 México D.F. **2.** Instituto Bioclon S.A. de C.V. Calz. De Tlalpan No. 427 Col. Toriello Guerra. CP 14050 México D.F.

Calorimetría diferencial de barrido (CDB), Formulación, Biológicos.

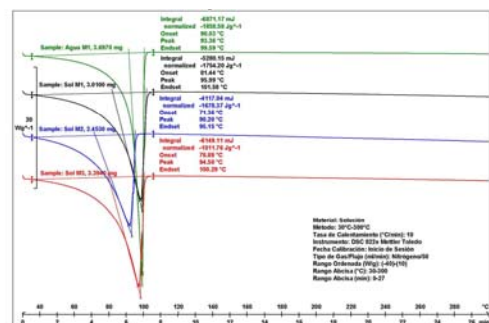
Introducción. La calorimetría diferencial de barrido (CDB) es considerada como la técnica más adecuada para estudiar la energética de las transiciones de plegamiento y desplegamiento de las proteínas. Esta técnica permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en las proteínas ácidos nucleicos y biomembranas (Privalov y Khechinashvili, 1974; Privalov y Potekhin 1986). La calorimetría diferencial de barrido registra de forma continua la capacidad calorífica aparente de una disolución de proteína o de cualquier macromolécula en función de la temperatura, obteniéndose lo que comúnmente se denomina termograma. En el cual se presenta un pico de absorción de calor correspondiente a un proceso o transición térmicamente inducida, por lo que, de acuerdo con el segundo principio de la termodinámica, corresponde a un proceso endotérmico. La información fundamental que proporciona la CDB es la capacidad calorífica relativa de un sistema en función de la temperatura. El procesamiento subsiguiente de esta magnitud nos puede proporcionar una caracterización termodinámica completa del proceso y proporcionar información de la capacidad calorífica parcial absoluta del compuesto de interés, (2) los parámetros termodinámicos globales (los cambios de entalpía $[\Delta H]$, de entropía $[\Delta S]$, de energía de Gibbs $[\Delta G]$ y de la capacidad calorífica $[\Delta Cp]$) asociados a la transición inducida por temperatura, y (3) la función de la partición y concomitantemente la población de los estados relevantes del sistema y sus parámetros termodinámicos. Como se describió anteriormente la CDB proporciona información relevante para el desarrollo de formulaciones de proteínas terapéuticas por lo que la aplicación específica del CDB en este trabajo es evaluar los efectos del pH y de los excipientes en la estabilidad térmica que promueve la agregación de proteínas. Lo que permite obtener formulaciones con una adecuada capacidad para mantener las condiciones óptimas del principio activo y así mantener atributos de calidad constante y consistente.

Metodología. El proceso de desarrollo consiste en cuatro etapas principalmente:

1. Desarrollo de formulaciones mediante estudios de solubilidad, estabilidad, desnaturalización y selección de excipientes según la ICH Q8.

2. Análisis de estabilidad térmica con equipos de CDB marca Mettler Toledo en un barrido de 30°C hasta 300°C usando una tasa de calentamiento de 10°C/min.
3. Análisis de resultados con el modelo de cinética generalizada de Avrami
4. Determinación de parámetros cinéticos de desnaturalización para la comparación de las diferentes condiciones de pH y diversos excipientes.

Resultados y discusión. El análisis por calorimetría diferencial de barrido permitió determinar el efecto del pH sobre la estabilidad térmica de las formulaciones en la cual se observó que existe una relación directamente proporcional entre la estabilidad térmica y la disminución de pH. Se observaron tres eventos térmicos, el primero a 70°C en el cual ocurre un cambio en la conformación de la proteína, debido a la desnaturalización no reversible y otros dos a los 90 y 105°C respectivamente. Con los resultados obtenidos se determinaron las condiciones óptimas para la formulación final del principio activo de un nuevo producto.



Conclusiones. Se determinó que existe una relación directamente proporcional entre la estabilidad y la disminución del pH. Se determinó que la mayor estabilidad para la formulación A es de 6.8, la B es de 7.0 y la C de 6.8, también se evaluó el efecto de los excipientes y sus concentraciones, en la estabilidad térmica de diversas formulaciones para una proteínas de 100KDa.

Bibliografía.

1. G. Barone, F. Catazano, P del Vecchio (1995), Differential scanning calorimetry as a tool to study protein-ligand interaction Pure & Appl. Chem. Vol 67 pp 1867-1872
2. Tim J. Ahern, Marck C. Manning, (1992) Stability of Protein Pharmaceuticals, Plenum Press, U.S. Vol 2.215-238
3. Freire, E. (1995) *Protein Stability and Folding* (Shirley, B., ed) Vol. 40, pp.191-21