



EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD QUÍMICA DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN DISTINTAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.

María Luisa Espinoza Miranda, Héctor Arrieta Mirassou, Alejandra Barbachano Torres, Irene Ruiz Flores, Oscar Guillermo Zúñiga González, Marcela Pérez Ambriz, Zarina López Villavicencio. Laboratorios Cryopharma S.A de C.V. Departamento de Investigación y Desarrollo de Biotecnología. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco C.P. 45640, investigacion-biotecnologia@grupoifaco.com

Palabras clave: Estabilidad química, Proteína recombinante, Electroforesis capilar

Introducción. Ciertas proteínas de uso terapéutico son susceptibles a procesos de degradación química como hidrólisis y deamidación (1,2). Los productos de degradación afectan la eficacia y seguridad de las mismas, por lo que, se deben estudiar las condiciones que eviten su generación (3). La Farmacopea Europea (FE) establece la electroforesis capilar (EC) como método de análisis de las variantes de carga (deamidados e hidrolizados) para las soluciones concentradas de la proteína en estudio y define los límites: 5.0% deamidados, 2.0% de cualquier otra impureza y 10.0% de la suma total de variantes de carga (4).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del pH, temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la estabilidad química de una proteína recombinante mediante EC.

Metodología. Se utilizó un diseño de experimentos multifactorial con los factores: pH (4 y 7); temperatura de almacenamiento: ambiente (25± 2°C), refrigeración (2-8°C) y congelación (<-70°C)); y tiempo de almacenamiento (0 y 4 días). La solución empleada en los experimentos del factor pH fue ajustada al pH correspondiente. Los tratamientos se hicieron con una solución de proteína preparada a 2 mg/mL y se realizaron por duplicado. Los productos de degradación se analizaron por EC y se identificaron por el tiempo de retención relativo (Trr) con respecto al pico principal (deamidados 1.05, hidrolizados 0.95). La cuantificación en porcentaje se determinó en función del área total de los picos. En el análisis de los datos se empleó un ANOVA, con $\alpha=0.05$.

Resultados. El ANOVA confirmó que el pH, la temperatura y el tiempo de almacenamiento tienen efecto significativo sobre la formación de hidrolizados y deamidados, asimismo la interacción de los tres factores ($p\text{value}=0.00$). A pH 7 se obtuvo un promedio de 3.18% de deamidados y 0.18% de hidrolizados, mientras que a pH 4 fue del 2.50% y 2.65%, respectivamente. El almacenamiento durante 4 días a temperatura ambiente y pH 4 favoreció la formación de hidrolizados mientras que a pH 7 la de deamidados. Si la proteína es congelada o refrigerada a pH 7 se tiene un promedio de 2.65% de deamidados y 0.18% de hidrolizados, mientras que a pH 4 de 2.59% y 0.74%, respectivamente. La EC (Fig. 1) mostró los deamidados, hidrolizados y una impureza que aparece a Trr

1.02; que ha sido reportada como Gln18 (3) cuyo nivel en todos los tratamientos fue menor al 2.0%.

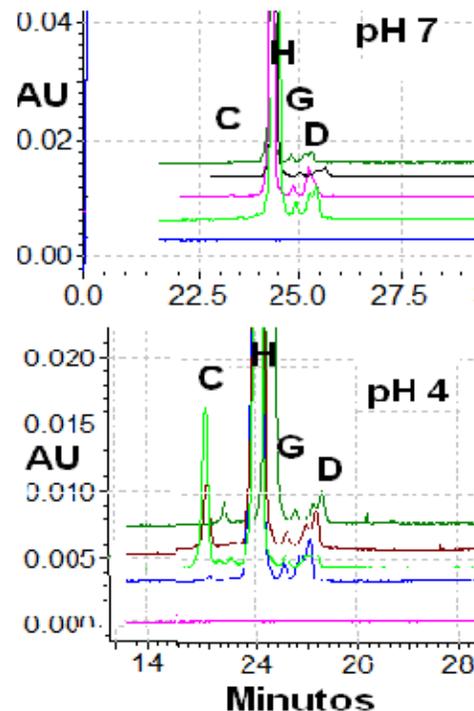


Fig. 1 Electroferogramas traslapados para las condiciones estudiadas pH, tiempo y temperatura de almacenamiento, C:hidrolizados, H: pico principal, G:impureza, D: deamidados, AU: Unidades de absorbancia.

Conclusiones. El pH, la temperatura y el tiempo de almacenamiento son factores críticos en la estabilidad química de la proteína recombinante en estudio, si se desea disminuir el porcentaje de formación de deamidados e hidrolizados se recomienda mantener el pH de las soluciones de la proteína cercano a 7 y en la medida de lo posible, congelar a -80°C.

Agradecimiento. A Laboratorios Cryopharma S.A. de C.V., por el financiamiento de esta investigación

- Bibliografía.**
1. Bewley T, Pearlman R (1993). En: *Stability and characterization of Protein and Peptide Drugs*. Wang Y, Pearlman R. Springer. U.S.A. 1-58.
 2. Wilhelmsen T, Skibeli V, Artzen F. (2010). *Procedia Chemistry* 2 : 34-45.
 3. Bayol A, Bristow A, Charton E, Girard M, Jongen P. (2004). *Pharmeuropa Bio.* 1: 35-45.
 4. Farmacopea Europea (2014). versión 8.0 Vol. II. 3277-3279.