

República de Cuba



Tesis de Doctorado

ESTABILIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO RECOMBINANTE PARA SU APLICACIÓN PARENTERAL

Héctor Jesús Santana Milián

Estabilización del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante para su aplicación parenteral (Tesis de Doctorado) / Héctor Jesús Santana Milián. – La Habana : Editorial Universitaria, 2016.

© **Autor:** Héctor Jesús Santana Milián.

Digitalización: Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba, 2015.

Calle 23 entre F y G, No. 564.

El Vedado, Ciudad de La Habana, CP 10400,

Cuba.

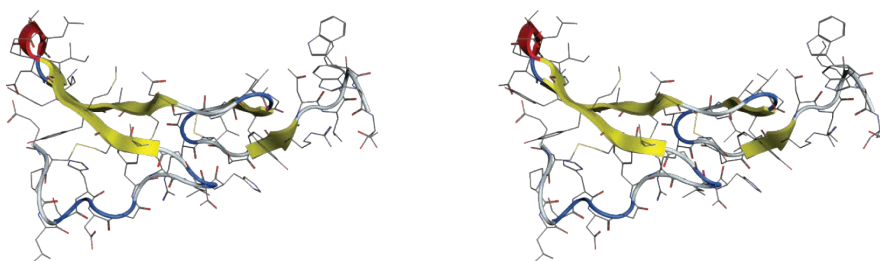
Email: torri@elibro.net

Página web: <http://eduniv.mes.edu.cu>



UNIVERSIDAD DE LA HABANA
INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**ESTABILIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO
HUMANO RECOMBINANTE PARA SU APLICACIÓN PARENTERAL**



Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Héctor Jesús Santana Milián

La Habana
2016

UNIVERSIDAD DE LA HABANA
INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

ESTABILIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO
HUMANO RECOMBINANTE PARA SU APLICACIÓN PARENTERAL

Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Autor: M. Sc. Héctor Jesús Santana Milián

Tutores:

Dr. C. Alejandro Beldarraín Iznaga

Dr. C. Rolando Páez Meireles

Asesor:

Dr. C. María Aurora Barrios Álvarez

La Habana

2016

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar, al Departamento de Desarrollo de Formulaciones del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), donde se desarrolló el trabajo de esta tesis. A mis tutores, Dr. C. Alejandro Beldarraín, Dr. C. Rolando Páez, y Dr. C. María Aurora Barrios por todo el esfuerzo y apoyo dedicado. A mi familia, en especial mi esposa Hortensia y mis hijas Ailena y Verena, sin cuya presencia este sueño no hubiese sido posible, gracias por siempre estar dispuestas para mí. Al Dr. C. Luis Javier González y a la Dr. C. Sonia González quienes, con su trabajo de revisión, mejoraron en gran medida la calidad del documento y sus análisis. A todos los Drs. que trabajaron como árbitros de este trabajo, gracias por sus recomendaciones. A todo el claustro de profesores del Doctorado Curricular en Ciencias Farmacéuticas del Instituto de Farmacia y Alimentos. Reconozco la ayuda de Haydeé Gerónimo y Yaima González en la realización de los ensayos de actividad biológica. Muchas gracias a Yairret García y Dayana García por la realización del análisis de cuantificación de la desamidación del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano Recombinante (EGFhr) por electroforesis. Agradezco la asistencia de Luis Ariel Espinosa y el Dr. C. Vladimir Besada por la realización de la espectrometría de masas del EGFhr. Gracias a Glay Chinaa por los análisis estructurales del EGFhr. Muchas gracias a la Dr. C. Rosangela Itri y a la Dr. C. Patricia Targon, de la Universidad de São Paulo, por la realización de los análisis de dicroísmo circular del EGFhr. Muchas gracias a todos los compañeros de la Dirección de Desarrollo Tecnológico y del CIGB por su ayuda desinteresada.

SÍNTESIS

En este trabajo de Tesis se investigó la estabilización del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGFhr) en una formulación parenteral, para utilizarla en el tratamiento de la cicatrización. La combinación de los ensayos de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, electroforesis en ausencia de dodecilsulfato de sodio, espectrometría de masas en modo de electronebulización, ELISA y ensayo de proliferación celular permiten una evaluación apropiada de la estabilidad del EGFhr. Las principales rutas de degradación del EGFhr identificadas fueron la desamidación de la Asn¹ y la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido. La mayor estabilidad química, coloidal y del plegamiento del EGFhr, durante la exposición a 50 ± 2 °C, se encontró a pH cercano a 7,0; en los tampones fosfato de sodio y Tris-HCl a 100 mM. La principal incompatibilidad de esta proteína se encontró con los azúcares reductores, los polisorbatos y el polietilenglicol, ya que incrementan la oxidación del EGFhr. No obstante, a pH 7,0 ocurrió la desamidación de la Asn¹ a una velocidad de 3,43 %/mes a 5 ± 3 °C, lo cual dificulta el logro de una formulación líquida estable a largo plazo. La combinación de la sacarosa (15 mg/mL) con la Dextrana 40 (5 mg/mL) en tampón fosfato de sodio a pH 7,0 y 10 mM permitió la estabilización del EGFhr durante la liofilización, y aumentó su estabilidad durante el almacenamiento a 50 ± 2 °C. Dicha formulación se puede liofilizar con facilidad a temperaturas del producto inferiores a $-30,8$ °C, durante el secado primario, alcanzando niveles de humedad residual menores del 5,0 %. El producto se reconstituye en menos de 20 s, dando lugar a una solución transparente con conteo de partículas subvisibles inferior a 3000, para partículas mayores o iguales a 10 μm , y a 50 para partículas mayores o iguales a 25 μm . Se demostró que el EGFhr en la formulación desarrollada mantiene la estabilidad durante las operaciones tecnológicas de mezclado, esterilización por filtración, liofilización, y simulación de la inyección. La evaluación en espectrometría de masas del EGFhr evidenció que la proteína liofilizada se mantiene intacta después de 15 días de almacenamiento a 50 ± 2 °C. La desamidación de la Asn¹ en la formulación liofilizada se reduce a medida que disminuye la humedad residual y la temperatura de almacenamiento, con 0,43 %/mes a 25 ± 2 °C para una humedad residual cercana al 3,0 %. El material de envase secundario (cartón con barniz ultravioleta (UV)) fue capaz de brindar una protección efectiva al producto, frente al efecto de la exposición a la luz blanca/UV. La formulación liofilizada fue estable durante al menos 2 años a 5 ± 3 °C, y 6 meses a 25 ± 2 °C. Después de su reconstitución con agua para inyectables o con solución salina fisiológica, el producto mantuvo la estabilidad física, química y biológica durante 24 h a 5 ± 3 °C. Estos resultados demuestran la factibilidad de la estabilización del EGFhr mediante la modulación de los factores extrínsecos a la proteína y de los parámetros de los procesos de formulación y liofilización.

Índice

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.1 LAS PROTEÍNAS	6
1.1.1 Estructura de las proteínas.....	6
1.1.2 Rutas de degradación química.....	7
1.1.3 Rutas de degradación física.....	8
1.2 ESTABILIDAD Y MECANISMOS DE ESTABILIZACIÓN EN FORMULACIONES ACUOSAS	10
1.2.1 Estabilidad de las proteínas en formulaciones acuosas	10
1.2.2 Mecanismos de estabilización en formulaciones acuosas	12
1.3 LIOFILIZACIÓN DE PROTEÍNAS	13
1.3.1 Proceso de liofilización.....	13
1.3.2 Liofilización de proteínas farmacéuticas.....	16
1.4 ESTABILIDAD Y ESTABILIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE PROTEÍNAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN ESTADO SÓLIDO.....	19
1.4.1 Factores que afectan la estabilidad de las proteínas en estado sólido	19
1.4.2 Características de los sistemas vítreos	21
1.4.3 Correlación de la movilidad molecular y la estabilidad de las proteínas.....	23
1.5 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	24
1.5.1 Aspectos de la biología del factor de crecimiento epidérmico	24
1.5.2 Características estructurales y relación estructura-función del factor de crecimiento epidérmico.....	25
1.5.3 Estabilidad del factor de crecimiento epidérmico	26
1.5.4 Formulaciones del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1 MATERIALES	32
2.1.1 Reactivos	32
2.1.2 Excipientes	32
2.1.3 Materiales de envase primario	32
2.1.4 Materiales de referencia y biológicos.....	32
2.1.5 Otros materiales.....	32

Índice

2.1.6 Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante	33
2.2 ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN FORZADA DEL EGFHR	33
2.2.1 Estrés por combinación de pH extremo y calor.....	33
2.2.2 Estrés por presencia de agente oxidante	33
2.2.3 Estrés por fotólisis	33
2.3 ESTABILIZACIÓN DEL EGFHR EN UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA	34
2.3.1 Preparación de formulaciones líquidas a escala de banco. Equipos y procedimientos	34
2.3.2 Influencia del pH en la solubilidad y estabilidad	34
2.3.3 Influencia de los tampones.....	35
2.3.4 Influencia de la concentración de proteína	35
2.3.5 Influencia de la fuerza iónica del medio.....	35
2.3.6 Influencia de los excipientes	35
2.3.7 Efecto de la temperatura en la velocidad de desamidación del EGFhr en solución acuosa	36
2.4 ESTABILIZACIÓN DEL EGFHR MEDIANTE LA LIOFILIZACIÓN	36
2.4.1 Influencia de los excipientes en la estabilidad durante la congelación y descongelación.....	36
2.4.2 Preparación de formulaciones liofilizadas a escala de banco. Equipos y procedimientos.....	36
2.4.3 Estudios de estabilidad para la selección de las formulaciones liofilizadas.....	37
2.4.4 Preparación de los lotes a escala piloto. Equipos y procedimientos	37
2.5 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL EGFHR DURANTE LAS OPERACIONES TECNOLÓGICAS.....	38
2.5.1 Efecto de la operación de mezclado	38
2.5.2 Efecto de la operación de esterilización por filtración	38
2.5.3 Efecto de las operaciones de liofilización y simulación de la inyección.....	39
2.6 ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN LIOFILIZADA DE EGFHR EN CONDICIONES DE ESTRÉS	39
2.6.1 Evaluación mediante ESI-MS de la estabilidad del EGFhr liofilizado en condiciones de estrés	39
2.6.2 Efecto de la humedad residual en la desamidación del EGFhr	39
2.6.3 Efecto de los materiales de envase en la fotoestabilidad de estrés del EGFhr liofilizado.....	39
2.7 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA	40
2.7.1 Estabilidad del formulado a granel	40
2.7.2 Estabilidad acelerada y de vida de estante de la formulación liofilizada	40
2.7.3 Estabilidad del reconstituído	41

Índice

2.8 ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS FORMULACIONES. INSTRUMENTOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	41
2.8.1 <i>Análisis térmico diferencial y de impedancia eléctrica</i>	41
2.8.2 <i>Liomicroscopía criogénica</i>	41
2.8.3 <i>Determinación del contenido de humedad residual de los liofilizados</i>	42
2.8.4 <i>Determinación de la temperatura de transición vítrea</i>	42
2.8.5 <i>Características organolépticas y tiempo de reconstitución</i>	42
2.8.6 <i>Conteo de partículas subvisibles</i>	43
2.8.7 <i>pH</i>	43
2.8.8 <i>Osmolaridad</i>	43
2.8.9 <i>Concentración de carbohidratos totales</i>	43
2.9 ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL EGFHR. INSTRUMENTOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	43
2.9.1 <i>Absorbancia a 280 nm</i>	43
2.9.2 <i>Concentración de proteínas por el método de Bradford</i>	44
2.9.3 <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio</i>	44
2.9.4 <i>Cuantificación de la desamidación mediante electroforesis en ausencia de SDS</i>	44
2.9.5 <i>Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa</i>	45
2.9.6 <i>Cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular</i>	45
2.9.7 <i>Desalado de las muestras</i>	45
2.9.8 <i>Hidrólisis ácida parcial de la proteína</i>	45
2.9.9 <i>Espectrometría de masas</i>	46
2.9.10 <i>Dispersión dinámica de la luz y potencial Z</i>	46
2.9.11 <i>Espectroscopía de dicroísmo circular en el UV lejano y estructura secundaria</i>	46
2.9.12 <i>Espectroscopía de fluorescencia intrínseca del triptófano</i>	47
2.10 ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA Y BIOLÓGICA DEL EGFHR. INSTRUMENTOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	47
2.10.1 <i>Ensayo inmunoenzimático en fase sólida</i>	47
2.10.2 <i>Ensayo de proliferación celular</i>	47
2.10.3 <i>Pirógenos</i>	48
2.10.4 <i>Seguridad general</i>	48
2.10.5 <i>Esterilidad</i>	49

Índice

2.11 METODOLOGÍAS DE CÁLCULO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	49
2.11.1 <i>Análisis cinéticos</i>	49
2.11.2 <i>Cálculo de las masas moleculares teóricas de las variantes de enlaces de disulfuro</i>	50
2.11.3 <i>Cálculos de estructura secundaria del EGFhr mediante modelación molecular</i>	50
2.11.4 <i>Evaluaciones estadísticas</i>	50
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1 ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN FORZADA DEL EGFHR EN SOLUCIÓN ACUOSA	52
3.1.1 <i>Estrés por combinación de pH extremo y calor</i>	52
3.1.2 <i>Estrés por presencia de agente oxidante y por fotólisis</i>	56
3.1.3 <i>Evaluación de las muestras de degradación forzada mediante los ensayos de ELISA y de proliferación celular</i>	58
3.2 ESTABILIZACIÓN DEL EGFHR EN UNA FORMULACIÓN LÍQUIDA	60
3.2.1 <i>Efecto del pH</i>	60
3.2.2 <i>Efecto del tipo de tampón</i>	63
3.2.3 <i>Efecto de la concentración de la proteína</i>	64
3.2.4 <i>Efecto de la fuerza iónica del medio</i>	64
3.2.5 <i>Compatibilidad del EGFhr con los excipientes para administración parenteral</i>	65
3.2.6 <i>Efecto de la temperatura de almacenamiento en la velocidad de desamidación del EGFhr en solución acuosa</i>	68
3.3 ESTABILIZACIÓN DEL EGFHR EN UNA FORMA FARMACÉUTICA LIOFILIZADA	70
3.3.1 <i>Efecto de la congelación-descongelación</i>	70
3.3.2 <i>Tamizado de excipientes para una formulación liofilizada</i>	72
3.3.3 <i>Efecto de la combinación de la sacarosa y la Dextrana 40 como excipientes</i>	75
3.4 EVALUACIÓN DE LAS OPERACIONES TECNOLÓGICAS Y CARACTERIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN DESARROLLADA	78
3.4.1 <i>Operaciones de formulación y esterilización</i>	78
3.4.2 <i>Caracterización de la formulación para el proceso de liofilización y ciclo empleado para la fabricación de lotes a escala piloto</i>	80
3.4.3 <i>Efecto de la humedad residual en la temperatura de transición vítrea</i>	82
3.4.4 <i>Tiempo de reconstitución y materia particulada</i>	83
3.4.5 <i>Efecto de los procesos de liofilización y simulación de la inyección en la estabilidad del EGFhr</i>	84

Índice

3.5 ESTABILIDAD DEL EGFHR LIOFILIZADO EN CONDICIONES DE ESTRÉS	87
3.5.1. <i>Evaluación mediante ESI-MS de la estabilidad en condiciones de estrés del EGFhr liofilizado</i>	87
3.5.2. <i>Efecto de la humedad residual del liofilizado en la velocidad de desamidación del EGFhr</i>	88
3.5.3 <i>Efecto de los materiales de envase en la fotoestabilidad en condiciones de estrés del EGFhr liofilizado</i>	90
3.6 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN LIOFILIZADA DE EGFHR.....	92
3.6.1 <i>Estabilidad del formulado a granel</i>	92
3.6.2 <i>Estabilidad acelerada y de vida de estante</i>	93
3.6.3 <i>Estabilidad del producto reconstituido</i>	96
4. CONCLUSIONES.....	98
5. RECOMENDACIONES	99
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
7. AUTOBIBLIOGRAFIA RELACIONADA DIRECTAMENTE CON LA TESIS.....	123
8. AUTOBIBLIOGRAFIA NO RELACIONADA DIRECTAMENTE CON LA TESIS.....	124
9. ANEXOS.....	127

Glosario de términos

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- ANOVA: Análisis de varianza, del inglés “Analysis of Variance”
- AI: Agua para inyectables
- ATD: Análisis térmico diferencial
- CD: Dicroísmo circular, del inglés “Circular Dichroism”
- CE₅₀: Concentración efectiva del 50 %
- CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- Después-Jeringa: Producto obtenido después de hacerlo pasar a través de una jeringa con su aguja acoplada
- DLS: Dispersión dinámica de la luz, del inglés “Dynamic Light Scattering”
- DSC: Calorimetría de barrido diferencial, del inglés “Differential Scanning Calorimetry”
- E_a: Energía de activación
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico, del inglés “Epidermal Growth Factor”
- EGFhr: Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante
- EGFhr₁₋₅₁/EGFhr₁₋₅₂: Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante con secuencia de aminoácidos del 1 al 51 y del 1 al 52, respectivamente
- ELISA: Ensayo inmunoenzimático en fase sólida, del inglés “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
- ESI-MS: Espectrometría de masas de tipo electronebulización, del inglés “ElectroSpray Ionisation-Mass Spectrometry”
- ICH: Conferencia Internacional de Armonización, del inglés “International Conference on Harmonisation”
- IFA: Ingrediente farmacéutico activo
- K_{obs}: Constante de velocidad de degradación observada
- Liof.-Reconstituido: Muestra líquida resultante de la reconstitución de un liofilizado
- ln: Logaritmo neperiano
- MRT: Material de referencia de trabajo
- m/z: Relación masa/carga de un ión
- P: Probabilidad
- PEG: Polietilenglicol

Glosario de términos

- Ph. Eur.: Farmacopea Europea, del inglés “European Pharmacopoeia”
- Pre-Liof.: Muestra líquida antes de someterla al proceso de liofilización
- M_M : Masa molar
- PVP: Polivinilpirrolidona
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, del inglés “Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography”
- rpm: Revoluciones por minuto
- SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio, del inglés “Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”
- SEC: Cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular, del inglés “Size-Exclusion-High Performance Liquid Chromatography”
- SSF: Solución Salina Fisiológica, NaCl 9 g/L
- S_x/S_y : Desviación estándar de la variable x/y
- t_0 : tiempo cero de incubación en estudios de estabilidad
- T_{eut} : Temperatura eutéctica
- T_f : Temperatura de fusión de un cristal
- TFA: Ácido trifluoroacético, del inglés “Trifluoroacetic Acid”
- T_{ic} : Temperatura de inicio de colapso
- T_g' : temperatura de transición vítrea de la solución concentrada al máximo por congelación
- T_g : Temperatura de transición vítrea
- trr: Tiempo de retención relativo
- TT: Tratamiento térmico durante la etapa de congelación del proceso de liofilización
- UI: Unidades internacionales
- UPD: Úlcera del pie diabético
- USP: Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica, del inglés “United States Pharmacopoeia”
- UV: Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

La úlcera del pie diabético (UPD) es una complicación significativa de la diabetes, con una incidencia anual de 3,0-4,0 % (Rankin y cols., 2015). En el 2013, 382 millones de personas padecían diabetes mellitus; y se espera que se incremente a 592 millones en el 2035 (Guariguata y cols., 2014). Se estima que hasta el 15,0 % de los pacientes diabéticos desarrolla UPD, y entre el 10,0 y el 30,0 % de los pacientes con UPD requerirán la amputación del miembro afectado (Aumiller y Dollahite, 2015). La tasa de mortalidad a los 5 años tras la amputación de una extremidad inferior, es de 50-60 % (Hinchliffe y cols., 2016). El costo promedio anual del tratamiento de la UPD, por paciente, es de 10 604 dólares americanos (Schirr-Bonnans y cols., 2016).

Debido a la pobre cicatrización de las UPD, en adición a la terapia estándar, que consiste en desbridamiento y cirugía, se ha propuesto el uso de tecnologías de avanzada y de tratamientos adyuvantes. Entre las tecnologías de avanzada destacan el uso de sustitutos de piel, de vendajes especializados (hidrocoloides, hidrogeles, películas adhesivas semipermeables), la terapia con oxígeno hiperbárico y los dispositivos de presión negativa, entre otros (Veves y cols., 2001; Boateng y cols., 2008; Game y cols., 2012; Yildirimer y cols., 2012). Entre los tratamientos adyuvantes se incluyen medicamentos tópicos con compuestos antimicrobianos y factores de crecimiento (Smiell y cols., 1999; Brem y cols., 2004; Hong y cols., 2006; Barrientos y cols., 2008). En su mayoría, estos productos se han estudiado solo en heridas pequeñas y de origen neuropático, y en muy pocos casos se ha demostrado su eficacia para el cierre de las UPD mediante ensayos clínicos aleatorios controlados. De ahí que la amputación siga siendo un resultado previsible para las UPD grandes y avanzadas, más aún en presencia de isquemia (Armstrong y cols., 2011; Blume y cols., 2011).

Uno de los tratamientos adyuvantes de las UPD es el uso del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que ejerce una potente actividad mitogénica sobre diversos tipos de células epiteliales, fibroblastos y hepatocitos, a través de su enlace a un receptor específico en la membrana celular con actividad tirosina quinasa (Bazley y Gullick, 2005). Este factor de crecimiento estimula la proliferación de los fibroblastos, queratinocitos y las células del endotelio vascular, que intervienen en el proceso de cicatrización (Brown y cols., 1989; Werner y Grose, 2003). Por sus potencialidades terapéuticas, el EGF humano (EGFh) se obtuvo por vía recombinante (EGFhr) mediante la expresión en levaduras y bacterias (Brake y cols., 1984; Cinza y cols., 1991; Yoon y cols., 1997; Razis y cols., 2008; Valdés y cols., 2009). Las principales aplicaciones de esta proteína se han dirigido al desarrollo de productos tópicos y orales (Ulubayram y cols., 2001; Wong y cols., 2001; Çelebi y cols., 2002; Kim y cols., 2002).

Introducción

La racionalidad para el uso del EGFhr en el tratamiento de las UPD radica en el déficit de factores de crecimiento (entre ellos el EGF) en las heridas de los pacientes diabéticos (Clark, 2008); y las acciones citoprotectoras, estimuladoras del crecimiento y promotoras de la cicatrización de dichos factores, entre ellas la angiogénesis (Grazul-Bilska y cols., 2003). Por otra parte, la biodisponibilidad del EGFhr en el tejido de las heridas es limitada por la presencia de proteasas en las heridas crónicas (Mast y Schultz, 1996; Saarialho-Kere, 1998; Trengove y cols., 1999). El uso clínico del EGFhr administrado por vía tópica ha sido poco efectivo, posiblemente debido a su baja biodisponibilidad local (Falanga, 1992; Falanga y cols., 1992).

La administración intralesional del EGFhr en las heridas crónicas incrementó su biodisponibilidad con respecto a las aplicaciones tópicas, y por consiguiente, favoreció una mayor formación de tejido de granulación y el cierre de las heridas. Varios ensayos clínicos han confirmado esta hipótesis (Berlanga y cols., 2003; Berlanga y cols., 2006; Fernandez-Montequín y cols., 2009). Además, la expresión del receptor de EGFh se desarrolla en forma de gradiente, desde las capas profundas de las heridas hacia las superficiales (Berlanga-Acosta, 2011; López-Saura y cols., 2011). La utilidad del EGFhr para la cicatrización de las UPD, mediante su administración intralesional, hace necesario la obtención de una formulación parenteral estable de EGFhr, que cumpla con los estándares vigentes exigidos por las entidades reguladoras de medicamentos. En toda la literatura revisada hasta la fecha no hay precedente con relación al desarrollo de una formulación parenteral estable de EGFhr.

Sin embargo, la obtención de tal formulación requiere del estudio y análisis de diversas variables y fenómenos moleculares. Por su estructura compleja, las proteínas son moléculas lábiles, susceptibles a procesos de inestabilización química (desamidación/isomerización, oxidación, hidrólisis), de desnaturalización, de adsorción a superficies y de agregación o precipitación (Carpenter y Manning, 2002; Capelle y cols., 2007; Manning y cols., 2010). Estos procesos son inducidos por el estrés generado durante la producción, formulación, almacenamiento y administración (Frokjaer y Otzen, 2005; Jiskoot y cols., 2012; Roberts, 2014). La estabilización de las proteínas permite que se alcancen los niveles de seguridad, de eficacia y de tiempo de vida útil para su uso como medicamentos (Weiss y cols., 2009; Manning y cols., 2010). De hecho, para lograr la comercialización efectiva de un medicamento es necesario garantizar su estabilidad, como mínimo, durante 24 meses en condiciones refrigeradas (5 ± 3 °C) (Chang y Hershenson, 2002).

En la actualidad, y pese a los progresos en el campo de las formulaciones de proteínas, aún no existe una vía simple para su desarrollo. Por ello, para lograr una preparación estable de las proteínas para la terapéutica, se deben tener en consideración varios factores importantes como temperatura, pH, tampones, concentración

Introducción

de la proteína, excipientes, fuerza iónica, y los fenómenos interfaciales, entre otros (Wang, 1999; Wang, 2000; Frokjaer y Otzen, 2005; Wang y cols., 2014). La mayoría de las proteínas presentan estabilidad limitada, particularmente en estado líquido (Wang, 1999). La liofilización es una alternativa de estabilización para las proteínas de interés farmacéutico, y en particular para las que tienen estabilidad reducida, debido a su estructura frágil (Arakawa y cols., 2001; Maltesen y Van De Weert, 2008). A su vez, la estabilización de las proteínas para la terapéutica continúa siendo un reto, y responde a las especificidades de cada molécula debido a sus diferencias estructurales tan grandes.

En particular, en el EGFhr hay muchos sitios potenciales de degradación. Se pueden identificar varios residuos de aminoácidos lábiles a la oxidación, la desamidación, y a la formación de succinimida y la isomerización. También se encuentran secuencias características de hidrólisis ácido/base, y la presencia de tres enlaces susceptibles al intercambio de enlaces disulfuro (Manning y cols., 1989). Varios estudios informan sobre la inestabilidad del EGFhr. Se ha encontrado la desamidación de la Asn¹, la formación de una succinimida estable en el Asp¹¹, la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido, la hidrólisis ácida del extremo N-terminal y la formación de β -Asp¹¹ (Koch y cols., 1984; Araki y cols., 1989; Besada y cols., 1990; Senderoff y cols., 1994). Varios autores han informado sobre la degradación proteolítica del extremo C-terminal del EGFhr (Araki y cols., 1989; Besada y cols., 1990; Playford y cols., 1995). Además, se informa que el EGFhr tiene una alta tendencia a la polimerización por intercambio disulfuro (Brake y cols., 1984). Algunos de los productos de degradación identificados mostraron disminución en la afinidad de enlace del EGFhr a su receptor y en su actividad mitogénica, o modificaciones en sus propiedades inmunológicas (Koch y cols., 1984; Heath y Merrifield, 1986; Araki y cols., 1989; Playford y cols., 1995).

Considerando los antecedentes planteados, surge el siguiente problema científico: no existe una formulación parenteral estable de EGFhr para el tratamiento de las UPD, por lo tanto resulta imprescindible estabilizar a esta proteína en una forma farmacéutica que cumpla los estándares regulatorios de calidad y seguridad. En consecuencia, la **hipótesis** del trabajo es la siguiente: “La modulación de los factores extrínsecos a la proteína, y el ajuste de los parámetros de los procesos tecnológicos, permitirán la estabilización del EGFhr en una formulación para su aplicación por vía parenteral”.

A partir de esta hipótesis, y para lograr su demostración, se planteó el siguiente **objetivo general del trabajo**:

-Desarrollar una formulación, para la aplicación parenteral del EGFhr, estable durante su fabricación, y almacenamiento por al menos dos años a 5 ± 3 °C.

Introducción

Los **objetivos específicos del trabajo** fueron:

1. Determinar mediante estudios de degradación forzada del EGFhr en solución acuosa, el carácter indicativo de estabilidad de los métodos analíticos y las principales rutas de degradación de la proteína.
2. Evaluar la estabilidad del EGFhr en una formulación líquida.
3. Estabilizar el EGFhr en una forma farmacéutica liofilizada para uso por vía parenteral.
4. Evaluar las operaciones tecnológicas y caracterizar la formulación desarrollada.
5. Evaluar la estabilidad de la formulación liofilizada durante el almacenamiento en condiciones de estrés de temperatura, de humedad residual y de fotólisis.
6. Realizar los estudios de estabilidad acelerada, de vida de estante y del reconstituido de la formulación liofilizada de EGFhr.

La **novedad científica** de este trabajo de tesis radica en que:

- Por primera vez se aportan datos necesarios para comprender cómo lograr la estabilización bioquímica del EGFhr: influencia del pH, los tampones, la fuerza iónica y la concentración de la proteína.
- Es la primera evaluación sistemática sobre la agregación y/o polimerización del EGFhr, evidenciando que la agregación se minimiza a pH cercano a 7,0 y que la fuerza iónica (0 a 2% m/v de NaCl) no influyó en la agregación a este pH.
- Se informa sobre la compatibilidad del EGFhr con un amplio grupo de excipientes y materiales que comúnmente se emplean en formulaciones parenterales.
- Se demuestra que el EGFhr puede ser estabilizado, mediante la liofilización, en una forma farmacéutica para administración parenteral.
- Se aportan datos de los parámetros críticos para el proceso de fabricación de la formulación desarrollada.

Este trabajo permitió contar con nuevos conocimientos teórico-prácticos sobre la estabilidad del EGFhr y sobre la influencia de parámetros como: pH, temperatura, tampones, excipientes, luz, fenómenos interfaciales, deshidratación, etc; que pueden afectar sus propiedades físico-químicas y biológicas. Estos conocimientos podrán emplearse en el desarrollo futuro de otras formulaciones que contengan esta proteína como ingrediente activo, por ejemplo en formulaciones de liberación modificada. En esto radica la **importancia teórica** de este trabajo, que corrobora además, la posibilidad de desarrollar formulaciones para administración parenteral basadas en péptidos y proteínas como ingredientes activos.

Los resultados de este trabajo contienen además una **importancia práctica** significativa. Han permitido contar con un nuevo producto para el tratamiento de la UPD. La aplicación terapéutica del producto puede ser extendida a otros tipos de úlceras y a otras indicaciones clínicas. La terapia con este medicamento

Introducción

resulta una alternativa efectiva para prevenir la amputación de las extremidades de los pacientes con UPD de grados tres o cuatro, según la escala de Wagner, de tipo neuropáticas o isquémicas. Contar con este producto ha posibilitado satisfacer necesidades médicas no resueltas no solo en Cuba, sino también en numerosos países.

El producto desarrollado en el marco de este trabajo tiene un gran **impacto socioeconómico**. Al aplicar este nuevo medicamento se ha podido reducir la tasa de amputación de las extremidades de los pacientes con UPD en nuestro país, y todos los gastos asociados a este procedimiento quirúrgico, incluido el costo social de los pacientes que quedan discapacitados. La comercialización internacional del producto constituye una de las principales fuentes para la obtención de divisas con que cuenta la industria farmacéutica cubana en la actualidad.

Los resultados descritos en esta tesis se recogen en tres artículos científicos publicados en revistas internacionales (*Int J Pharm, Biologicals* y *PDA J Pharm Sci Technol*). Además, forman parte de un registro sanitario obtenido en Cuba y en más de 20 países.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Las proteínas

Las proteínas ejercen una amplia variedad de funciones en el organismo humano. Entre otras, catalizan reacciones, transportan otras moléculas, son parte de la defensa inmune, transmiten impulsos nerviosos y controlan el crecimiento del cuerpo (Stryer, 2008).

1.1.1 Estructura de las proteínas

La secuencia de aminoácidos de una proteína es conocida como su *estructura primaria*. La cadena principal de una proteína puede adoptar múltiples plegamientos conocidos como *estructura secundaria*. Las estructuras secundarias pueden ser helicoidales (hélices- α es la más común de estas) y extendidas (hojas- β). Las regiones de estructura secundaria se encuentran conectadas por lazos o giros de una gran variedad estructural, que se conocen como estructuras no regulares o no alfa-no beta (Stryer, 2008).

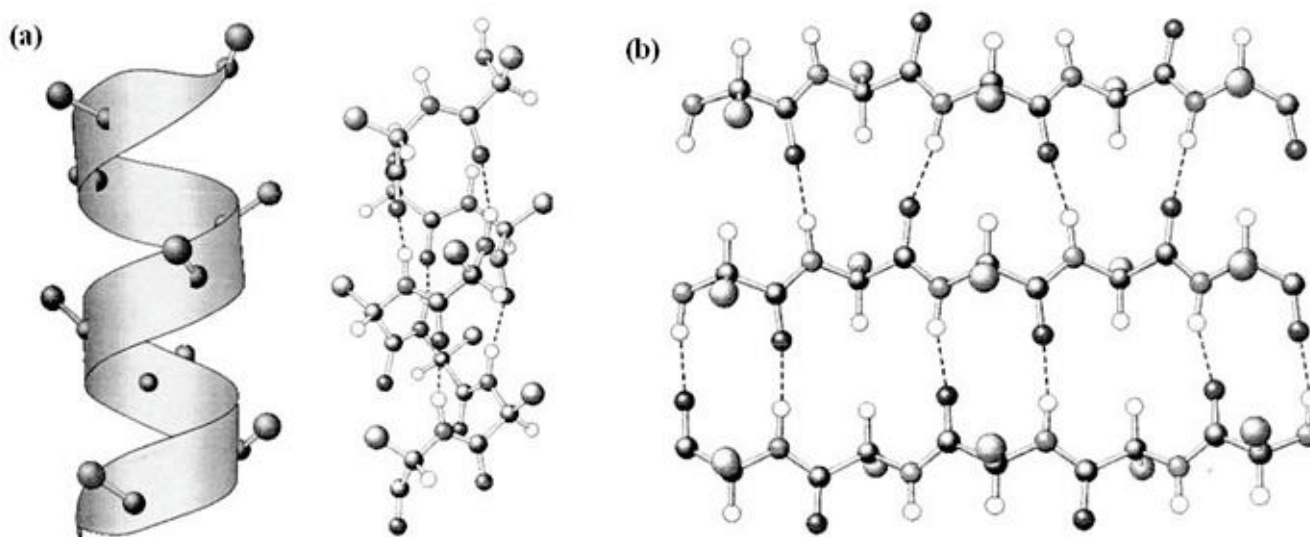


Figura 1.1. Ejemplos de estructura secundaria de las proteínas (a) hélices- α (izquierda: esquema, derecha: modelo molecular); y (b) hojas- β paralelas y anti paralelas mezcladas. Los enlaces de hidrógeno se muestran por líneas discontinuas. Reproducido de Stryer, 2008.

Las hélices- α (Figura 1.1 a) están formadas por giros del esqueleto de la proteína con las cadenas laterales de los aminoácidos orientadas hacia el exterior, y necesitan 3,6 monómeros para dar una vuelta completa. Los grupos amino de la hélice alfa forman enlaces por puente de hidrógeno con los grupos carbonilo localizados en posiciones $i-4$ y viceversa (carbonilos con los aminos en posición $i+4$). En las hojas- β , la cadena peptídica está extendida y los grupos donores y aceptores forman enlaces por puentes de hidrógeno con los residuos localizados en la hebra vecina (Figura 1.1 b). A diferencia de las hélices- α que es una estructura de carácter local, las hojas- β involucran el enlace de residuos distantes de la secuencia

de la proteína. Las distancias entre los carbonos alfa de dos residuos consecutivos en la secuencia es mayor en las hojas- β (0,35 nm *versus* 0,15 nm en las hélices- α), lo que da lugar a interacciones dipolares más débiles entre los enlaces peptídicos correspondientes. Las cadenas vecinas de hojas- β pueden ser orientadas en la misma dirección (paralelas) y en dirección opuesta (antiparalelas) (Stryer, 2008).

Se conoce como *estructura terciaria* de una proteína a la estructura tridimensional que adopta la cadena polipeptídica durante el proceso de plegamiento. En un sistema acuoso, el efecto hidrofóbico es la fuerza motriz del plegamiento, la proteína trata de colocar sus cadenas laterales hidrofóbicas en su interior mientras los residuos hidrofílicos tienden a orientarse hacia el exterior. Otras interacciones no covalentes también contribuyen al plegamiento como las electrostáticas, los puentes de hidrógeno y las de Van der Waals, etc. El balance de estas interacciones conduce a la formación de la estructura terciaria estable de las proteínas, la cual es esencial para su actividad biológica. Una proteína también puede estar constituida por más de una cadena polipeptídica. La *estructura cuaternaria* puede formarse por asociaciones de cadenas idénticas o diferentes para dar lugar al estado activo de la proteína (Stryer, 2008).

Las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas son de especial interés cuando se investiga la liofilización de proteínas. Las etapas de congelación y secado secundario son críticas, ya que pueden provocar la desnaturalización y perturbar los enlaces de hidrógeno esenciales entre la proteína y el agua que la rodea (Costantino y cols., 2000). Estos procesos también pueden provocar cambios en la estructura secundaria de las proteínas. Se considera que la estabilidad durante el almacenamiento se incrementa con la preservación de la estructura secundaria de la proteína nativa (Carpenter y cols., 1998). Por consiguiente, las evaluaciones de los cambios en las estructuras secundaria y terciaria pueden ser procedimientos valiosos para anticipar el efecto de los posibles factores estresantes en las formulaciones de proteínas.

1.1.2 Rutas de degradación química

Las características complejas de las proteínas anteriormente descritas (Sección 1.1.1) son la causa principal de la mayoría de las rutas de degradación. Es común discernir entre las inestabilidades químicas y las físicas. Cualquier cambio que implica la formación o ruptura de enlaces, y que da lugar a una nueva entidad química, es referido como una inestabilidad química. Las inestabilidades físicas, corresponden a cambios en las estructuras de orden superior, estructura secundaria o superior (Manning y cols., 1989). Las principales rutas de degradación química de las proteínas y péptidos se describen en la tabla 1.1.

Revisión bibliográfica

Tabla 1.1. Información general de las rutas de degradación química de las proteínas y péptidos

Inestabilidad química	Significado	Principales factores
Desamidación /isomerización	Los grupos amida de las cadenas laterales de la Asn o la Gln pueden ser hidrolizados, y formar un ácido carboxílico libre	Secuencia de aminoácidos, estructura tridimensional, pH, temperatura, tampones, fuerza iónica
Oxidación	Oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos Trp, Met, His, Tyr o Cys por el aire	Oxígeno (iones, radicales, peróxido), luz, tampones, temperatura, pH, metales, surfactantes, radicales libres
Hidrólisis	Ruptura del enlace peptídico que da lugar a la formación de fragmentos	pH, temperatura, tampones
Intercambio disulfuro	Intercambio de los puentes disulfuro existentes	Agentes reductores, pH, temperatura, tampones, metales, eliminadores de tioles
Racemización	Cambio en la configuración de los aminoácidos quirales	Catalizada tanto por ácidos como por bases
Eliminación-β	Parte de las cadenas laterales de los aminoácidos, ejemplo la Lys o la Phe pueden ser eliminadas	pH, temperatura, tampones, oxígeno (iones, radicales, peróxido)
Reacción de Maillard	Formación de una base de Schiff debido a la reacción entre el grupo amino libre, ejemplo la Lys, y los azúcares reductores	pH, temperatura, azúcares reductores (glucosa, lactosa, maltosa)

1.1.3 Rutas de degradación física

Desnaturalización y agregación

La desnaturalización es una alteración en el plegamiento global de la proteína. Afecta la estructura terciaria y, la mayoría de las veces, su estructura secundaria. En tanto que la desnaturalización irreversible es permanente, la reversible puede eliminarse cambiando ciertas propiedades de la preparación de proteínas, tales como la temperatura y el pH (Manning y cols., 1989). Cuando la agregación alcanza cierto umbral, los precipitados se hacen visibles. Por consiguiente, la precipitación es el equivalente macroscópico de la agregación. Usualmente, la desnaturalización en solución acuosa es una transición cooperativa entre el estado nativo y el desnaturalizado de las proteínas.

La temperatura o la condición a la cual el 50 % de las moléculas de proteínas se desnaturalizan es la temperatura del punto medio de transición, y generalmente es entre 40 y 80 °C (Wang, 1999). Durante la liofilización, la interrelación entre las diferentes conformaciones de la proteína se hace más compleja (Figura 1.2). Durante la congelación, la conformación nativa (N_{acuosa}) puede ser preservada, resultando en una proteína congelada no dañada ($N_{congelada}$). En presencia de agentes estabilizantes, la subsiguiente

eliminación del agua no ocasiona la desnaturalización y da lugar al estado seco nativo (N_{seca}). Durante la reconstitución, N_{seca} puede transformarse nuevamente en N_{acuosa} por la adición del agua. Las proteínas pueden desnaturalizarse por muchas rutas posibles, ya sea durante la congelación ($D_{congelada}$), la eliminación del agua (D_{seca}) o la reconstitución de la pastilla liofilizada ($D_{acuosa, irreversible}$) (Prestrelski y cols., 1993).

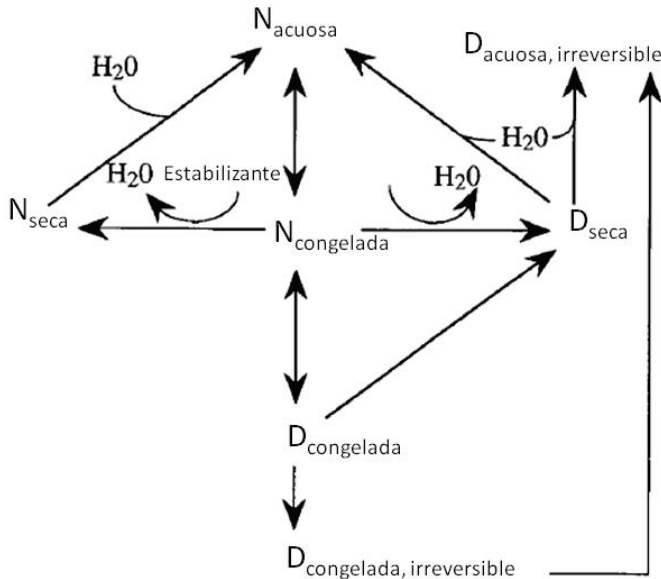


Figura 1.2. Representación esquemática de las rutas de desnaturalización y renaturalización durante la congelación y el secado de las proteínas. N (estado nativo) y D (estado desnaturalizado). Reproducido de Prestrelski y cols., 1993.

La fuerza impulsora de la agregación de las proteínas es la minimización de las interacciones termodinámicas desfavorables entre el solvente y los residuos hidrofóbicos expuestos después de la desnaturalización. La agregación puede ser inducida por agentes desencadenantes de tipo químico y físico, y conducir a la precipitación (Wang, 1999). Con respecto al estado nativo (N), el estado desnaturalizado (D) es frecuentemente insoluble y favorece la agregación (A) (Ecuación 1.1).



Es necesario tener presente que la agregación también puede surgir de un estado parcialmente desnaturalizado. Esto significa que la proteína no necesita estar desnaturalizada antes de la agregación (Vermeer y Norde, 2000).

Adsorción en superficies

Debido a que las proteínas presentan carácter anfifílico, tienden a adsorberse en las interfases, lo cual también puede ocasionar la desnaturalización. Por ejemplo, la insulina puede adsorberse a las superficies de las bombas de liberación, los contenedores de plástico y de vidrio y en la parte interior de las bolsas para administración intravenosa (Manning y cols., 1989). En el caso de las formulaciones inyectables debe adicionarse el estrés que provoca el paso a través de la jeringuilla y la aguja. Durante esta operación se favorecen los procesos de adsorción de la proteína en las interfases, debido al incremento del contacto sólido/líquido y aire/líquido en la superficie durante la salida del producto por la jeringuilla (Thomas y Geer, 2011).

1.2 Estabilidad y mecanismos de estabilización en formulaciones acuosas

1.2.1 Estabilidad de las proteínas en formulaciones acuosas

Se han realizado muchos esfuerzos para lograr la estabilización de los péptidos y las proteínas en solución, como el uso de tampones, iones metálicos o solventes orgánicos, y la eliminación del oxígeno.

Optimización de la estabilidad hidrolítica

La estabilidad de las proteínas depende del pH. El rango aceptable de pH para la administración intravenosa, lenta, es de 3,0-10,5 y de 4,0-9,0 para las otras rutas parenterales con el objetivo de minimizar las molestias en el sitio de inyección (Brazeau y cols., 1998). Por consiguiente, es importante estudiar la estabilidad en función del pH de una proteína en el rango de 3,0-10,0 con diferentes tampones en las etapas tempranas del desarrollo de una formulación (Cleland y cols., 1993; Jorgensen y cols., 2009). El pH, la composición y la concentración del tampón de la formulación afectan sustancialmente las rutas de degradación por hidrólisis, desamidación e isomerización (Li y cols., 1996). Los tampones también pueden actuar como eliminadores de radicales libres (Good y cols., 1966). Algunos son capaces de unirse directamente a las proteínas e incrementar la estabilidad de su plegamiento nativo (Manning y cols., 2010).

Un estudio documenta que el incremento de la fuerza iónica puede tener un efecto estabilizante o desestabilizante en las proteínas, en dependencia de la naturaleza de las interacciones carga-carga (Zheng y cols., 2009). Sin embargo, en otro estudio no se observó un efecto significativo de la fuerza iónica en la velocidad de desamidación o de hidrólisis en péptidos pequeños (Li y cols., 2000).

Los cosolventes como el polietilenglicol (PEG) de bajo peso molecular reducen la agregación de varios péptidos (Frokjaer y Otzen, 2005; Neelon y cols., 2005). La adición de solventes orgánicos disminuye la constante dieléctrica de una solución acuosa, y la reducción de la fuerza dieléctrica de los solventes da lugar a una reducción significativa de las velocidades de isomerización y desamidación. La degradación de las proteínas se puede disminuir mediante el uso de polialcoholes, incluido los alcoholes polihídricos y los carbohidratos (Wakankar y Borchardt, 2006).

Se informa sobre el efecto de la viscosidad de la solución en la velocidad de desamidación en algunos péptidos, utilizando varias concentraciones de glicerol y polivinilpirrolidona (PVP). Se demostró que el PVP a altas concentraciones reduce la velocidad de desamidación de la Asn en un hexapéptido. Sin embargo, no está claro si la disminución de la velocidad de desamidación se debe al incremento de la viscosidad o a la disminución de la constante dieléctrica de la solución por la alta concentración de PVP o a la combinación de los dos factores (Li y cols., 2000; Li y cols., 2002).

Optimización de la estabilidad oxidativa

La oxidación puede ser activada por valores específicos de pH y por la presencia de oxígeno, luz y/o iones metálicos. Por consiguiente, el daño oxidativo puede ser disminuido mediante la expulsión del oxígeno de la solución, ajustando los materiales de envase primario y secundario para proteger de la luz, y mediante el uso de antioxidantes en la formulación. Se elaboró una guía sobre el uso de excipientes para minimizar la degradación oxidativa, que incluye recomendaciones de sus concentraciones efectivas (Waterman y cols., 2002).

La modificación del grupo indol del Trp, el tiol de la Cys, el imidazol de la His, y la cadena lateral fenólica de la Tyr por las especies reactivas de oxígeno son más significativas a pH neutro y alcalino (Li y cols., 1995). En cambio, el grupo tioéter de la Met se puede oxidar rápidamente por ciertos reactivos a pH ácido (Manning y cols., 1989). El burbujeo de otro gas (nitrógeno, argón o helio) a través de la solución, puede ser un método efectivo para excluir el oxígeno. Para minimizar la oxidación por el aire debe evitarse la agitación violenta (Landi y Held, 1985). Los antioxidantes comúnmente se emplean para proteger los péptidos de la oxidación durante el procesamiento y formulación. Sin embargo, algunos antioxidantes, como el bisulfito pueden resultar problemáticos en las formulaciones de los péptidos y las proteínas (Li y cols., 1995). La Met, un aminoácido que contiene sulfuro, es oxidada a sulfóxido de Met por muchas especies reactivas de oxígeno más fácilmente que el péptido o la proteína, y por tanto puede actuar como antioxidante sacrificador (Levine y cols., 2000).

Otro método para reducir la oxidación por radicales libres es la inclusión de agentes quelantes, que inhiben la oxidación mediante la formación de complejos con las trazas de iones metálicos. El agente quelante que con más frecuencia se utiliza en las formulaciones de proteínas es el ácido etilendiaminotetracético (Parkins y Lashmar, 2000). Los agentes quelantes son efectivos en la estabilización de péptidos contra la oxidación. Sin embargo, no debe asumirse que la adición de cierto agente quelante será capaz de interactuar con todas las trazas de iones metálicos y eliminar completamente la oxidación. Bajo ciertas circunstancias, los agentes quelantes pueden incluso acelerar los procesos de oxidación (Tsai y cols., 1993; Li y cols., 1995). Los polialcoholes como el manitol, la trehalosa, la sacarosa y otros también son capaces de prevenir la oxidación de péptidos y proteínas (Li y cols., 1996).

Protección contra la reacción de intercambio disulfuro

La combinación de iones metálicos divalentes (Zn^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+}) con tampones específicos, como los de ácidos di- y tri-carboxílicos, puede proteger a los péptidos y las proteínas contra la reacción de intercambio disulfuro (Avanti y cols., 2011; Avanti y cols., 2012).

Inhibición de la dimerización, agregación y precipitación

La dimerización y agregación pueden involucrar el intercambio de enlaces covalentes, como los puentes disulfuro, o las fuerzas no covalentes como las interacciones hidrofóbicas. Los agregados pueden ser tanto solubles como insolubles. Las proteínas se pueden estabilizar en solución acuosa, contra la dimerización y agregación, mediante la optimización del pH y la fuerza iónica de la solución. Además, es posible prevenir la dimerización mediante la exclusión preferencial, utilizando azúcares, aminoácidos y/o polialcoholes; y mediante el uso de surfactantes. La concentración óptima requerida para proteger de la agregación a una proteína específica, debe ser evaluada de forma independiente para cada tipo de estrés (Manning y cols., 2010).

1.2.2 Mecanismos de estabilización en formulaciones acuosas

La estabilidad de las proteínas en estado líquido depende de numerosos factores como la temperatura, el pH, el tipo de tampón, la concentración del tampón, la presencia de agentes preservantes, los surfactantes y los cosolutos (Chi y cols., 2003). La estabilidad de las proteínas se puede incrementar mediante la adición de determinados excipientes a la formulación. Generalmente, el mismo mecanismo responsable de la estabilización de la proteína inducida por solutos en soluciones acuosas, es efectivo durante el paso de congelación (de ahí el nombre de “crioprotectores”). Este mecanismo se explica por la teoría de la interacción y la exclusión preferencial (Timasheff, 2002). Los estabilizantes de las proteínas como los polialcoholes son excluidos preferencialmente de la superficie de la proteína y el grado de exclusión es proporcional a la superficie de la proteína expuesta al solvente. Con el incremento del área superficial de la proteína durante la desnaturalización, también se incrementa la exclusión de los excipientes lo que conduce a un estado energéticamente desfavorable (Chi y cols., 2003). A su vez, los surfactantes inhiben competitivamente la adsorción de las proteínas en las interfases, y por consiguiente pueden ser empleados para la estabilización durante los pasos de congelación y liberación (Maa y cols., 1998).

La predicción de la estabilidad de las soluciones de proteínas muy concentradas es compleja. Generalmente hay que distinguir entre la estabilidad del plegamiento nativo, como la estructura secundaria y la terciaria; y la estabilidad coloidal, como la resistencia a la desnaturalización y agregación (Guo y cols., 2006). Un incremento en la concentración de la proteína debe tener un efecto positivo en la estabilidad del plegamiento nativo, ya que las proteínas, como otros cosolutos, son preferencialmente excluidas unas de la superficie de otras. Al mismo tiempo, la estabilidad coloidal disminuye, ya que las interacciones proteína-proteína se hacen más probables (Minton, 2000; Guo y cols., 2006).

1.3 Liofilización de proteínas

1.3.1 Proceso de liofilización

La liofilización es una operación unitaria empleada comúnmente como tecnología de secado en las industrias alimentaria y farmacéutica (Trappler, 2004). En 1976 se mencionó por primera vez (Rey, 1976). En 1999, Jennings dio la primera definición del término liofilización y enfatizó en la intención de estabilizar materiales sensibles al calor mediante la reducción de la cantidad de agua hasta un nivel que no permitiera el crecimiento biológico o las reacciones químicas (Jennings, 1999). La liofilización, en su forma más simple, se define como un proceso donde la solución que se secará se congela primero y concomitantemente el solvente es removido primero por sublimación (secado primario) y luego por desadsorción (secado secundario).

El proceso de liofilización se puede dividir en tres etapas principales: congelación, secado primario y secado secundario. Entre las etapas de congelación y las de secado se puede incluir una etapa adicional de “tratamiento térmico”. La figura 1.3 muestra el esquema de un proceso de liofilización típico. A continuación se describen los parámetros claves de cada etapa.

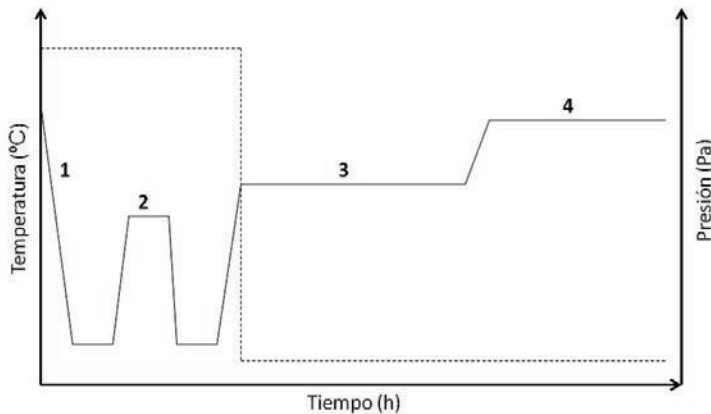


Figura 1.3. Representación de un ciclo de liofilización típico. Evolución de la temperatura (línea continua) y la presión (línea discontinua) durante las etapas del proceso:

1 = Congelación

2 = Tratamiento térmico (opcional)

3 = Secado primario

4 = Secado secundario

Congelación

Durante la etapa de congelación, la temperatura del sistema baja por debajo de su temperatura de transición de fase sólido-líquido. De este modo el solvente se separa del soluto (Jennings, 1999). La figura 1.4 muestra el comportamiento típico de un sistema amorfo durante el enfriamiento: al bajar la temperatura del sistema puede ocurrir la cristalización del solvente y del soluto y formar una mezcla eutéctica por debajo de la temperatura eutéctica (T_{eut} en la figura 1.4); o la cristalización del solvente solamente, y ocurrir la separación de fase y la formación de una fase de cristales de hielo y otra de solutos amorfos. En la separación de fases, se observa un incremento en la concentración de la solución remanente, conocido como “concentración por congelación”. La concentración por congelación continúa

con la reducción de la temperatura, hasta que la viscosidad del sistema excede un valor crítico, que define la temperatura de transición vítrea de la solución concentrada al máximo por congelación (T_g' en la figura 1.4). Por debajo de la T_g' , la fase amorfa es sólida y es conocida como un vidrio entre los intersticios de los cristales de hielo (Oetjen y Haseley, 2004).

Se considera que la etapa de congelación durante la liofilización es tan importante para la calidad del producto como las de secado, debido a su potencial efecto en la estabilidad de la proteína (Willemer, 1992). En ella, el parámetro clave es la velocidad de enfriamiento o velocidad de nucleación del hielo (Wang, 2000). En general, una velocidad de congelación más rápida forma cristales de hielo más pequeños (Eckhardt y cols., 1991; Wisniewski, 1998). En cambio la congelación lenta forma cristales de hielo más grandes debido a que el crecimiento de estos continúa después de la nucleación. La congelación lenta tiene el potencial de incrementar la tendencia de los sistemas para la separación de fases y prolongar el tiempo en el que la proteína esta en un estado de fluido altamente concentrado. En general, la habilidad para controlar la velocidad de congelación es limitada y se recomienda un valor intermedio (Tang y Pikal, 2004).

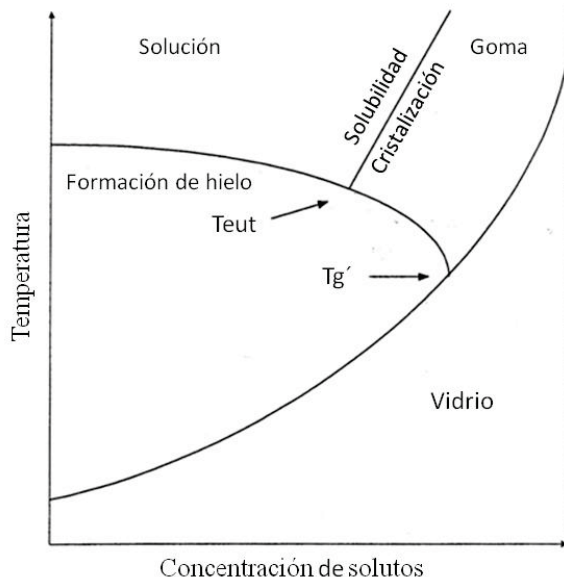


Figura 1.4. Diagrama de fase teórico que muestra la formación de hielo, la cristalización de solutos, el punto eutéctico y la transición vítrea durante la congelación de un sistema amorfo. Reproducido de Nail y cols., 2002; Wang, 2000.

Los cristales de hielo pequeños generarán poros pequeños, ya que los poros se originan a partir de la sublimación de los cristales de hielo. Durante el secado, el vapor de agua tiene que difundir a través de estos poros hacia el exterior de la pastilla. Los poros más pequeños oponen una mayor resistencia al flujo del vapor de agua que los poros más grandes, un fenómeno denominado resistencia de la capa seca, que disminuye la velocidad de sublimación y hace que el secado primario sea menos eficiente. Por el contrario, los poros más grandes reducen mucho la resistencia de la capa seca al vapor de agua y los procesos de secado primario son más eficientes. El tratamiento térmico se aplica en ocasiones para

incrementar el tamaño de los cristales de hielo formados durante el paso de congelación mediante la maduración de Ostwald, y así incrementar la eficiencia del secado primario. Sin embargo, los poros pequeños totalizan un área superficial específica más grande que los poros grandes, y el secado secundario es más eficiente (Bindschaedler, 1999).

Secado primario

Durante el secado primario, el solvente congelado se elimina del producto por sublimación. Este proceso se inicia con la disminución de la presión de la cámara hasta un nivel inferior a la presión del vapor de hielo a la temperatura del producto. La energía requerida para la transición de fase se proporciona mediante el ajuste de la temperatura de la platina. Debido a que la energía entregada es consumida en la sublimación, la temperatura resultante del producto es mucho más baja que la de la platina, usualmente se registran diferencias de hasta 30 °C. La temperatura del producto se aproxima a la temperatura de la platina al finalizar la etapa de sublimación, esta es una forma común de detectar el final del secado primario. Hay tres mecanismos responsables de la transferencia de calor de la platina a los viales: conducción, convección y radiación.

Para prevenir el colapso del producto, su temperatura durante el proceso debe mantenerse por debajo de la temperatura de inicio de colapso (T_{ic}). Cuando no se conoce la T_{ic} , pueden utilizarse como la máxima temperatura permisible del producto la T_g' en los sistemas amorfos o la T_{eut} en los sistemas cristalinos (Bindschaedler, 1999). Como por cada 1 °C que se incrementa la temperatura del producto, disminuye el tiempo de secado primario en aproximadamente un 13,0 % (Pikal, 1990), la temperatura de secado debe mantenerse tan alta como sea posible.

El proceso se caracteriza por la velocidad de sublimación (v) (Bindschaedler, 1999; Nail y cols., 2002), que puede expresarse como:

$$v = \frac{A_p \times (P_p - P_0)}{R_p} \quad [1.2]$$

A_p es el área de la sección transversal del vial,

P_p es la presión de vapor del producto en el frente de sublimación,

P_0 es la presión de vapor parcial en el vial y

R_p es la resistencia de la capa seca del producto al flujo del vapor de agua.

La resistencia de la capa seca, que representa el 90 % de la resistencia total al flujo de vapor, y se incrementa progresivamente con el tiempo de secado, puede causar un incremento de la temperatura del producto hasta llegar al colapso de la pastilla (Adams y Irons, 1993). Sin embargo, al ocurrir el

microcolapso, estos pueden disminuir la resistencia de la capa seca del producto e incrementar la velocidad de sublimación (Overcashier y cols., 1999).

Secado secundario

Al finalizar la etapa de secado primario, en la pastilla liofilizada solamente queda agua no congelada. Esta agua no puede ser removida por sublimación, pero debe ser removida por desadsorción. Es por ello que durante el secado secundario se aplica una mayor energía al sistema. Para continuar promoviendo el proceso de secado, algunos autores aconsejan continuar disminuyendo la presión de la cámara, con el objetivo de incrementar el gradiente de concentración del vapor de agua del producto hacia sus alrededores.

Al inicio del secado secundario es importante tener presente que la temperatura de transición vítrea (T_g) del producto es función de la humedad residual. Debido a que la humedad residual del producto al finalizar el secado primario puede llegar a alcanzar hasta un 30 %, un incremento muy rápido en la temperatura de la platina puede causar que la temperatura del producto se eleve por encima de la temperatura de colapso y provocar el colapso de la pastilla (Franks, 2007). La humedad residual disminuye rápidamente durante las primeras horas del secado secundario y alcanza un nivel de equilibrio que depende únicamente de la temperatura de la platina y del área superficial específica de la pastilla. El contenido de humedad residual es independiente de la presión de la cámara o de la altura de la capa seca del producto (Pikal y cols., 1990).

1.3.2 Liofilización de proteínas farmacéuticas

Las proteínas son moléculas lábiles y complejas, sensibles a varias rutas de degradación. Debido a que para la viabilidad económica es deseable un tiempo de vida mínimo de 24 meses (Chang y Hershenson, 2002), con frecuencia la liofilización es el método de elección para desarrollar formulaciones biofarmacéuticas comerciales estables. Aproximadamente el 50 % de los biofármacos aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. y la Agencia Europea de Medicamentos son liofilizados (Costantino, 2004; Kasper y cols., 2013). Aunque la liofilización se utiliza para estabilizar productos lábiles, el propio proceso suele añadir estrés por congelación y secado que con frecuencia suelen ser dañinos para la estabilidad de las proteínas (Adams y Ramsay, 1996). De este modo, el desarrollo cuidadoso de una formulación y un ciclo de liofilización que estabilicen completamente al ingrediente activo, son críticos para el desarrollo de productos biofarmacéuticos (Costantino, 2004).

La formulación deberá proporcionar estabilidad durante la fabricación, la liofilización, el transporte, el almacenamiento, la reconstitución y la administración del producto a los pacientes. Las rutas de degradación de las proteínas son diversas y complejas. La presencia de pequeñas cantidades de productos

de degradación puede tener consecuencias severas como intermediarios para posteriores degradaciones (por ejemplo, especies oxidadas y desamidadas). Además, las especies agregadas pueden causar respuesta inmune. Por consiguiente, la formulación tiene que proporcionar la mayor estabilización posible (Randolph y Carpenter, 2007).

En principio, una formulación para liofilización está compuesta por estabilizantes de proteínas, llamados crio- y lio-protectores, estabilizantes específicos como antioxidantes o surfactantes, agentes de carga, agentes isotonzantes y el tampón (Wang, 2000; Costantino, 2004). Por lo general, la cantidad de sólidos en la formulación debe estar entre 2 y 10 % (m/v) de la solución antes de liofilizar, y combinar una masa suficiente para garantizar una pastilla estable, pero que permita un proceso tecnológico eficiente (Carpenter y cols., 1997; Hatley, 1997). La elección de los excipientes es gobernada por el nivel de estabilización requerido por la proteína específica. Además, debe tenerse presente la compatibilidad de la proteína con los excipientes y los materiales de los recipientes. También deben considerarse los aspectos regulatorios de los excipientes, la ruta de administración y la necesidad de una liberación modificada (Franks, 1998). Los componentes de una formulación liofilizada se detallan más adelante. Antes, se describen las situaciones de estrés provocadas por la liofilización.

Durante la congelación, la disminución de la temperatura puede causar desnaturalización fría. Como la solubilidad de los grupos hidrofóbicos en agua se incrementa con la disminución de la temperatura, disminuyen las interacciones hidrofóbicas intramoleculares que determinan la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas (Jaenicke y cols., 1990; Graziano y cols., 1997; Franks, 1998). Las proteínas oligoméricas frecuentemente muestran desnaturalización fría. Un factor que explica este fenómeno es que la asociación entre las subunidades está determinada, entre otras, por las interacciones hidrofóbicas (Jaenicke y cols., 1990; Wisniewski, 1998).

Otras inestabilidades ocurren por la formación de los cristales de hielo. Esta origina nuevas interfases que causan desnaturalización inducida por la superficie (Chang y cols., 1996b). Además, la proteína pudiera dañarse debido a la concentración por congelación de la fase amorfa remanente de la solución. Por ejemplo, el incremento múltiple de la fuerza iónica, de las especies desnaturizantes o del oxígeno disuelto, pueden ser dañinos para la estabilidad de la proteína (Wisniewski, 1998). La concentración relativa de los componentes de la formulación también puede cambiar, debido a la cristalización selectiva, causando, por ejemplo, cambios de pH o separación de fases.

Durante el secado, la proteína se somete a estrés por deshidratación. Debido a que el nivel de humedad residual alcanzado después de la liofilización generalmente es inferior que el contenido de agua en la capa de hidratación de la proteína, que es de 0,3 a 0,35 gramos por gramo de proteína (Kuhlman y cols., 1997;

Wang, 2000), un secado excesivo pudiera destruir el estado nativo y causar cambios en la estructura de la proteína (Valliere-Douglass y cols., 2015). Durante la liofilización y el posterior almacenamiento, se utilizan varios excipientes para estabilizar la proteína. Ellos se clasifican como crio- y lio-protectores de acuerdo con su propiedad para proteger la proteína durante la congelación y el secado, respectivamente. Aunque hay algunas proteínas que se pueden secar sin la adición de excipientes, la mayoría de los biofármacos necesitan crio- o lio-protectores, o ambos (Overcashier y cols., 1997).

Crio-protectores

El mecanismo más aceptado para la crio-protección es el de la exclusión preferencial. Ello significa que la interacción entre la proteína y el excipiente es termodinámicamente desfavorable, y provoca la acumulación de las moléculas de agua en la superficie de la proteína, la hidratación preferencial, y una estructura más compacta de la molécula, escondiendo el esqueleto hidrofóbico (Arakawa y cols., 1991; Timasheff, 1993; Timasheff, 1998). Otros mecanismos que proporcionan la estabilización durante la congelación son la modificación del tamaño de los cristales de hielo, la disminución de la tensión superficial y la restricción de la difusión de las moléculas reactantes debido al incremento de la viscosidad. Entre los crio-protectores comúnmente utilizados están los sacáridos, polímeros, aminoácidos o la propia proteína.

Lio-protectores

La lio-protección es mediada por dos mecanismos. En el primero, el lio-protector actúa como un sustituto del agua, formando enlaces de hidrógeno con los grupos hidrofílicos de la proteína durante la eliminación del agua; y es referido como la “teoría del remplazo del agua” (Crowe y cols., 1993a, b; Allison y cols., 1996; Allison y cols., 1998). Debido a que la interacción entre los carbohidratos y las proteínas necesariamente requiere que ambos estén en la misma fase amorfa, la cristalización con frecuencia tiene un efecto desestabilizante en las formulaciones sólidas de proteínas. Entre los excipientes estabilizantes mediante este mecanismo están los polialcoholes y los azúcares, en especial los disacáridos son los más utilizados puesto que con el incremento del peso molecular, el impedimento estérico hace cada vez más ineficiente la formación de enlaces de hidrógeno efectivos entre la proteína y el lio-protector (Carpenter y cols., 1997; Arakawa y cols., 2001).

Un segundo mecanismo que estabiliza las proteínas en estado sólido es la “vitricación”. La proteína y todas las posibles especies reaccionantes se inmovilizan en el estado vítreo donde la movilidad molecular disminuye. Entre los excipientes que comúnmente estabilizan mediante este mecanismo están los carbohidratos de alto peso molecular. La unión de un disacárido y un excipiente de alto peso molecular,

combinan la formación efectiva de enlaces de hidrógeno con una T_g del sistema suficientemente alta, con la cual se logra la estabilización. En contraste con esta teoría, Cicerone y cols. informan que la adición de un excipiente plastificante, como el glicerol a la fase amorfa, propicia un incremento de la estabilidad. Los autores expresan que la causa es el llenado de los huecos que dejan los formadores vítreos por los plastificantes pequeños. De esta manera disminuyen la dinámica vítrea rápida e incrementan la estabilidad (Cicerone y cols., 2003; Cicerone y Soles, 2004).

1.4 Estabilidad y estabilización de las formulaciones de proteínas durante el almacenamiento en estado sólido

Aunque las formulaciones pueden tener diferentes componentes (como se describió anteriormente), la premisa para la estabilización es la formación de una matriz vítrea en la cual la proteína se encuentre molecularmente dispersa. Los estabilizantes más comúnmente utilizados son los azúcares de bajo peso molecular o una mezcla de estos con un excipiente polimérico. Las propiedades de estos productos secos dependen de las características del estado amorfo quizás tanto como del propio comportamiento de la proteína (Pikal, 2004).

1.4.1 Factores que afectan la estabilidad de las proteínas en estado sólido

La estabilidad de las proteínas en estado sólido es influenciada por una variedad de factores. Estos pueden ser clasificados como factores extrínsecos e intrínsecos. Los factores intrínsecos relacionan la estructura de la proteína, como su secuencia primaria. Las condiciones de formulación, procesamiento y almacenamiento son considerados factores extrínsecos (Lai y Topp, 1999). Una vez logrado un desarrollo exitoso de la formulación y el proceso, al final del ciclo de liofilización se obtiene un producto seco estable. La estabilidad en estado sólido es gobernada por factores similares a la estabilidad durante el proceso de secado. Hay dos mecanismos por los que los excipientes se cree que estabilizan a las proteínas en estado amorfo.

La “teoría de remplazo del agua” plantea que la estabilización es resultado de la preservación de la estructura nativa en el estado seco, debido a los enlaces de hidrógeno entre el estabilizante y la proteína. La conformación nativa es termodinámicamente más estable y por tanto más resistente a la degradación durante el almacenamiento. Esta hipótesis ofrece una explicación termodinámica para el mecanismo de estabilización (Carpenter y Crowe, 1989; Crowe y cols., 1993a; Carpenter y cols., 1998).

Un segundo enfoque es la “hipótesis de vitrificación”, conocida también como mecanismo de la dinámica vítrea (Chang y cols., 2005b). Esta teoría propone que la estabilización es proporcionada por la inmovilización de las moléculas en el estado sólido, que suprime los movimientos globales, también conocidos como relajaciones de tipo α . Las relajaciones de tipo α ocurren principalmente por los

Revisión bibliográfica

movimientos de traslación y rotación. Como toda reacción de degradación es dependiente de algún tipo de movimiento molecular, de esta manera los procesos de degradación son cinéticamente inhibidos (Franks y cols., 1991; Slade y cols., 1991). Esta teoría ofrece una explicación cinética para el mecanismo de estabilización, contrario a la explicación termodinámica antes mencionada.

Varias investigaciones han analizado la validez de cada una de estas hipótesis. Algunas han encontrado una mejor predicción para la estabilidad durante el almacenamiento cuando asumen una preservación estructural (Chang y cols., 2005a; Chang y cols., 2005b), mientras otras encontraron una mejor correlación de la estabilidad con la movilidad molecular (Yoshioka y cols., 2003; Yoshioka y Aso, 2005; Shamblin y cols., 2006). Yoshioka y Aso encontraron contribución de los dos factores, termodinámicos y cinéticos. Ellos han indicado una ecuación que describe cuantitativamente esta relación (Yoshioka y Aso, 2005, 2007).

$$K = K_{act} \times \left(\frac{\alpha \times T \times \left(\frac{1}{\tau}\right)^\zeta}{1 + \alpha \times T \times \left(\frac{1}{\tau}\right)^\zeta} \right) \quad [1.3]$$

K es la constante de velocidad de la reacción de degradación,

K_{act} es la constante de velocidad sin restricción de difusión,

τ es la movilidad molecular,

α es una constante que describe el acoplamiento entre K y τ ,

T es la temperatura absoluta,

D es el coeficiente de difusión, y

ζ es un parámetro que representa el acoplamiento entre D y τ .

Algunos autores plantean que la dinámica local, evaluada por τ , es mejor para predecir la estabilidad que la movilidad global. Existen otros factores que afectan la estabilidad en estado sólido de las proteínas. El efecto de la temperatura en general es frecuentemente descrito por la Ley de Arrhenius.

$$K = A \times \exp\left(-\frac{E_a}{R \times T}\right) \quad [1.4]$$

A es una constante,

E_a es la energía de activación,

R es la constante de los gases y

Siempre que ocurren efectos secundarios tales como transiciones de fase, desnaturalización de la proteína o limitación de la difusión, se pueden observar desviaciones del comportamiento de Arrhenius (Stotz y cols., 2004). La desviación más prominente es la desnaturalización térmica irreversible causada por el incremento de la entropía. Este incremento favorece la formación de intermediarios desnaturalizados reversibles que se agregan debido a las interacciones intermoleculares. El efecto de la humedad residual

es fundamental, ya que el agua actúa como plastificante del estado amorfo, disminuye la T_g y por consiguiente incrementa la movilidad molecular. A su vez, el agua puede participar directamente en las reacciones de degradación como reactante (por ejemplo, hidrólisis) o como catalizador. Además, el agua puede servir como solvente o como medio de reacción (Stotz y cols., 2004).

Debido a que no existe definición de pH en estado sólido, el pH efectivo es definido como el pH de la solución antes de liofilizar o después de la reconstitución. Varios autores han reportado la correlación entre el pH y las reacciones de degradación física y química, como la agregación o la desamidación (Costantino y cols., 1994; Oliyai y Borchardt, 1994; Oliyai y cols., 1994).

1.4.2 Características de los sistemas vítreos

Un vidrio es un sólido amorfo que no tiene el orden de largo alcance característico de los sólidos cristalinos. El vidrio se forma al enfriar un líquido durante la transición vítrea. Se considera termodinámicamente inestable con respecto al estado sólido cristalino, debido a su mayor entropía configuracional. La figura 1.5 muestra un esquema de la entalpía frente a la temperatura e ilustra el comportamiento de un sistema formador de vidrios durante el enfriamiento: al enfriar el sistema desde la temperatura ambiente, el líquido experimenta un sobre-enfriamiento hasta un grado que depende de la pureza de la muestra. La muestra subenfriada se comporta como un líquido cuya viscosidad se incrementa con la disminución de la temperatura. Los solutos pueden cristalizar o solidificar como un sólido amorfo. El vidrio amorfo se forma al cruzar la T_g (Figura 1.5). La pendiente de la curva de entalpía cambia a la T_g , esta se clasifica como una transición de segundo orden. Por el contrario, un cristal se forma espontáneamente durante el enfriamiento a la temperatura de fusión T_f en la figura 1.5 (Hancock y Zografi, 1997).

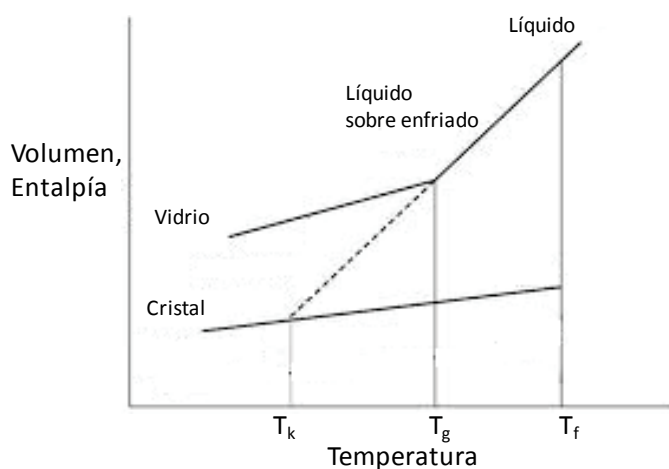


Figura 1.5. Representación esquemática de la variación de entalpía (o volumen) con la temperatura. Reproducido de Hancock y Zografi, 1997.

Debido a que el estado cristalino por lo general es más estable, la formación del estado vítreo es termodinámicamente desfavorable. Se formará un vidrio en lugar de un cristal, solo cuando la viscosidad

a la temperatura cercana a la de fusión es suficientemente alta como para impedir la cristalización. Una alta viscosidad puede ser causada por un bajo punto de fusión debido a un enrejado cristalino con poca estabilidad o por la adición de excipientes de alto peso molecular.

En estado líquido, el sistema está en equilibrio con sus alrededores, pero durante la solidificación, el sistema sale de este estado de equilibrio hacia el estado vítreo metaestable. De este modo el nivel absoluto de entalpía del vidrio no es fijo sino que depende de la forma de preparación del vidrio. Por ejemplo, la velocidad de enfriamiento influye en la velocidad con la cual el sistema pasa a través de la transición vítrea. Un vidrio preparado con una alta velocidad de enfriamiento presenta más defectos en la estructura vítrea que con una baja velocidad de enfriamiento, y por tanto tiene una mayor entalpía (Hancock y Zografi, 1997).

La extensión teórica de la curva de enfriamiento del líquido (línea discontinua en la figura 1.5) da lugar al estado de la entalpía del vidrio ideal o en equilibrio. En tal estado el vidrio está en equilibrio con sus alrededores y es el estado preferido hacia el cual el vidrio real se relaja (temperatura de Kauzmann, T_K en la figura 1.5). En algunas ocasiones se asocia con la temperatura de movilidad nula, la temperatura por debajo de la cual toda la movilidad cesa y está localizada aproximadamente a 50 °C por debajo de la T_g (Hancock y cols., 1995).

La viscosidad, la movilidad molecular y la fragilidad son los parámetros que caracterizan al estado vítreo. Este estado se caracteriza por una viscosidad mayor de 10^{12} Pa × s y tiempos de relajación tipo α más lentos de 100 s. La viscosidad y los movimientos moleculares están acoplados. Sin embargo, en ocasiones hay desviaciones de este acoplamiento (Pikal, 2004).

La movilidad molecular del sistema es impartida por los diferentes procesos de relajación. La “dinámica global” o “relajaciones tipo α ” son procesos en gran manera cooperativos; es decir, requieren del movimiento simultáneo de regiones relativamente grandes en el vidrio y por tanto acoplados a la viscosidad (Angell, 1995; Yu, 2001; Pikal, 2004). La transición vítrea dinámica es atribuida a las relajaciones tipo α , por debajo de la transición vítrea los movimientos se hacen cooperativos hasta tal grado que se hacen improbables que ocurran. Los tiempos de relajación estructural que se describen en la ecuación de Kohlrausch-Williams-Watts (KWW, ecuación 1.5), usualmente representan la constante de tiempo para los movimientos tipo α (Hancock y cols., 1995; Pikal, 2004).

$$\phi(t) = \exp(-t/\tau)^\beta \quad [1.5]$$

Donde $\phi(t)$ es el tiempo de relajación extendido en el momento t , τ es el tiempo de relajación molecular medio y β es una constante.

La “dinámica local” o “relajaciones tipo β ” antecede a los procesos tipo α y ocurre a bajas temperaturas, ellos son usualmente más débiles que las relajaciones tipo α . Esta es representativa de la dinámica rápida, es decir, movimientos más rápidos y localizados que relacionan partes específicas de la molécula más que a regiones completas del vidrio. Las dinámicas rápidas ocurren sobre un amplio rango de tiempo en cualquier lugar donde ocurran movimientos vibracionales y rotacionales. Algunos autores consideran que las “relajaciones tipo β ” son más relevantes para la estabilidad de las proteínas que las “relajaciones tipo α ” (Cicerone y cols., 2005).

1.4.3 Correlación de la movilidad molecular y la estabilidad de las proteínas

Con relación a la estabilidad de las proteínas en estado sólido, las dinámicas (procesos de relajación) son importantes, porque cualquier reacción, como la agregación, la oxidación o la reacción no enzimática de Browning requieren algún grado de movilidad (Pikal, 2004). En las proteínas farmacéuticas liofilizadas hay dos tipos de dinámicas relevantes para la estabilidad: la dinámica de la matriz amorfa y la dinámica interna de la proteína. Solo cuando la proteína está molecularmente dispersa en la matriz, existe un acoplamiento de los dos tipos de dinámicas. El acoplamiento es de suma importancia, porque es la premisa para retardar la degradación de las proteínas mediante el uso de excipientes.

Las reacciones de degradación de las proteínas se diferencian en aquellas que ocurren dentro de una molécula de proteína y las que son bimoleculares y por consiguiente dependientes de la difusión. El último tipo de reacción se afecta más por la movilidad molecular. Las reacciones donde la contribución de la movilidad molecular tiene poca importancia no se puede inhibir mediante la reducción de la movilidad molecular (Yoshioka y Aso, 2007). Es importante tener presente que las predicciones de la estabilidad a partir de los estudios acelerados (a altas temperaturas) no pueden ser conclusivos sin un conocimiento de la dependencia entre la movilidad molecular y la temperatura (Yoshioka y Aso, 2005).

Las investigaciones que analizan el impacto de la movilidad molecular en la estabilidad química y física, en su mayoría han considerado la “movilidad global”. Estas utilizan la diferencia de la temperatura de almacenamiento y la temperatura de transición vítrea ($T-T_g$) o evalúan el tiempo de relajación estructural. Se informa sobre el impacto de la movilidad molecular en las velocidades de degradación física (por ejemplo, la agregación) y químicas (por ejemplo, la desamidación de la Asn y la formación de succinimida/isomerización de Asp) (Sun y cols., 1998; Levine, 2002). También se sugirió una correlación entre movilidad y estabilidad, a partir de hallazgos en los cuales una mayor T_g de la formulación dio lugar a una mayor estabilidad. Sin embargo, en algunas ocasiones no se ha encontrado correlación entre el tiempo de relajación estructural y la velocidad de reacción (Chang y cols., 1996a; Davidson y Sun, 2001).

El movimiento molecular requerido para que una reacción ocurra, varía en dependencia del mecanismo de degradación. Se ha descrito sobre la correlación entre la reactividad y la “movilidad local” para varios productos farmacéuticos amorfos, aunque hay mucho menos reportes que para la correlación entre movilidad global y estabilidad (Yoshioka y cols., 2006). Sin embargo, mientras en muchos estudios se demuestra una posible relación entre la movilidad molecular y la estabilidad física y química; hay investigaciones donde no se pudo establecer una correlación aparente (Chang y cols., 1996a; Davidson y Sun, 2001).

En resumen, varios investigadores plantean una correlación entre la movilidad molecular y la estabilidad química y física. Sin embargo, la estabilidad de los productos farmacéuticos amorfos es determinada por los efectos relativos tanto de la movilidad molecular como de la barrera de E_a para las reacciones de degradación. Un incremento en la E_a reduce la importancia de la movilidad. El mecanismo de degradación también influye en la importancia de la movilidad para la estabilidad de las proteínas. La movilidad global es especialmente significativa en las reacciones bimoleculares; mientras la movilidad local es más esencial en degradaciones que incluyen movimientos de escalas más pequeñas. Es preciso recordar que la movilidad cambia mucho alrededor de la temperatura de transición vítrea. Por consiguiente, también puede cambiar la dependencia de la temperatura de las velocidades de reacción que son influenciadas por la movilidad molecular.

1.5 Factor de crecimiento epidérmico

1.5.1 Aspectos de la biología del factor de crecimiento epidérmico

El EGF es un potente activador de la mitosis. Es secretado al lumen gastrointestinal por las glándulas salivares y las glándulas de Brunner del duodeno (Heitz y cols., 1978). Está presente en varios tejidos y fluidos biológicos de muchas especies de mamíferos (Carpenter y Cohen, 1979). El EGFh se produce inicialmente como un precursor de 1 207 aminoácidos, y se procesa a la forma “madura” EGF_{h1-53} (Bell y cols., 1986). Es un miembro de la familia de factores de crecimiento de tipo polipeptídico, estructuralmente relacionados (Harris y cols., 2003). La respuesta biológica inducida por el EGF es mediada por su interacción con el receptor, el cual tiene actividad tirosina-quinasa (Bazley y Gullick, 2005). Las actividades biológicas incluyen: estimulación de la actividad de proteína quinasa; estimulación de la síntesis de los ácidos ribonucleico, desoxirribonucleico y proteínas; estimulación de la proliferación celular en una variedad de células; inhibición de la secreción de ácido gástrico; inhibición del intercambio Na^+/H^+ ; y activación de la síntesis de moléculas extracelulares (Yarden y Sliwkowski, 2001).

Debido a sus potencialidades terapéuticas, el EGFh se ha obtenido por vía recombinante a partir de su expresión extracelular al medio de cultivo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Brake y cols., 1984;

Cinza y cols., 1991; Valdés y cols., 2009). Además, se ha descrito sobre la expresión del EGFh en el periplasma de *Escherichia coli* (Razis y cols., 2008), y que su forma intracelular es insoluble (Yoon y cols., 1997). También se ha documentado su expresión extracelular en *Bacillus brevis* (Yamagata y cols., 1989) y en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Thomas y Walmsley, 2014).

1.5.2 Características estructurales y relación estructura-función del factor de crecimiento epidérmico

Los miembros de la familia del EGF están definidos por una secuencia característica de seis cisteínas dentro de una estructura primaria de 50-60 residuos de aminoácidos (Groenen y cols., 1994). El EGFh es un polipéptido de simple cadena de 53 aminoácidos, con una masa molar (M_M) de 6 216 g/mol, un punto isoeléctrico de 4,6 y no es N-glicosilado (Gregory y Willshire, 1975). Esta proteína presenta tres lazos comprendidos entre tres enlaces de disulfuro: lazo A (Cys⁶-Cys²⁰), lazo B (Cys¹⁴-Cys³¹) y lazo C (Cys³³-Cys⁴²) (Figura 1.6 a).

La estructura tridimensional del EGFh en solución se investigó a pH fisiológico, mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) multidimensional empleando la proteína marcada con ¹⁵N y ¹³C. Los resultados indican que el EGFh está dividido en dos dominios estructurales diferentes: un dominio N-terminal (residuos 1-32) y otro C-terminal (residuos 33-53). La figura 1.6 b presenta la superposición del esqueleto de las diez mejores estructuras obtenidas, y muestra que las coordenadas atómicas dentro de las regiones de la estructura secundaria están bien definidas. Las coordenadas de la estructura fueron depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB ID: 2KV4) (Huang y cols., 2010).

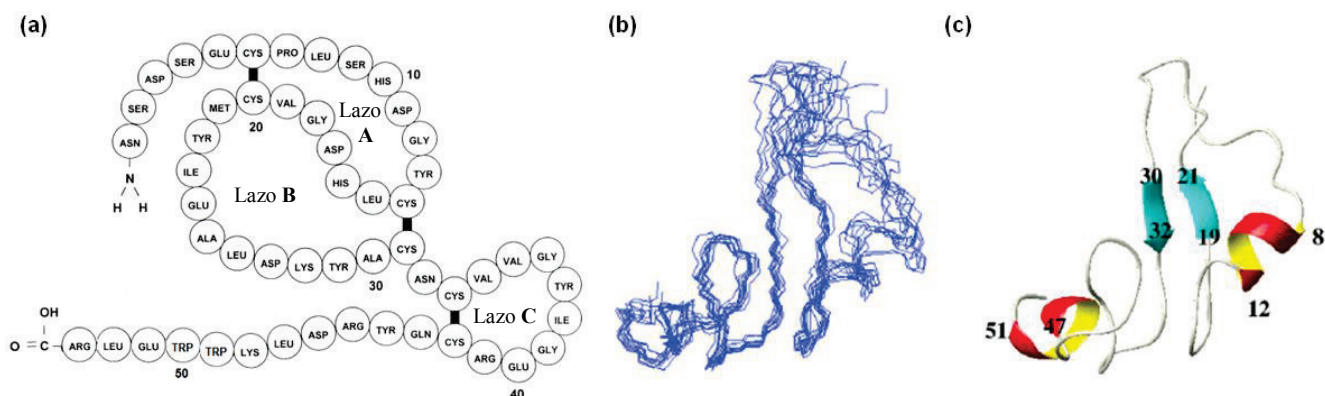


Figura 1.6. Estructura del EGFh. (a) Representación esquemática de la estructura primaria del EGFh. (b) Estructura tridimensional determinada por RMN a pH 6,8: conjunto de las diez estructuras finales de energía minimizada en estéreo, y (c) representación en cinta de los elementos de estructura secundaria (c). Reproducido de Huang y cols., 2010.

La figura 1.6 c muestra los elementos de la estructura secundaria del EGFh determinados a partir de las mediciones de RMN en solución a pH fisiológico. La estructura está compuesta por hojas beta

antiparalelas (residuos 19-21 y 30-32) y hélices alfa (residuos 8-12 y 47-51). El EGFhr en solución presenta cerca de un 30 % de estructura secundaria regular. La mayoría de los residuos del EGFhr no presentan enlaces de hidrógeno y están relativamente accesibles al solvente. El carácter en gran manera dinámico del plegamiento del EGFhr en solución se confirmó mediante experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio. La hélice alfa (Leu⁴⁷-Glu⁵¹) de la cola del extremo C-terminal está conectada con el “lazo de seis residuos” (Ile³⁸-Gln⁴³) mediante interacciones hidrofóbicas. La cadena lateral alifática de la Ile₃₈ del “lazo de seis residuos” interactúa con la Tyr⁴⁴, Leu⁴⁷ y Lys⁴⁸ para formar un núcleo hidrofóbico alrededor de la hélice C-terminal del EGFhr (Huang y cols., 2010).

La relación estructura-función del EGF se ha estudiado empleando varias técnicas para identificar las regiones de la molécula implicadas en la unión al receptor y en la consiguiente señalización (Burgess y cols., 1988; Groenen y cols., 1994; McInnes y cols., 2000; Van Zoelen y cols., 2000; Nice y cols., 2002). Estos estudios demuestran que la mayoría de los residuos son necesarios para mantener la actividad biológica completa del EGF, aunque la eliminación del N-terminal (residuos 1-5) y del C-terminal (residuos 49-53) no tienen un efecto directo en la actividad biológica (Burgess y cols., 1988; Araki y cols., 1989; Calnan y cols., 2000). Los estudios de mutagénesis dirigida en el EGFhr permitieron identificar los residuos de Tyr¹³, Ile²³, Leu²⁶, Arg⁴¹ y Leu⁴⁷ como esenciales para su unión al receptor (Murray y cols., 1998). La determinación de la estructura cristalográfica del complejo EGFhr-receptor evidenció que los aminoácidos Tyr¹³, Leu¹⁵, Met²¹, Ile²³, y Leu⁴⁷ del EGFhr interactúan por fuerzas hidrofóbicas con el receptor. Además, la cadena lateral de la Arg⁴¹ del EGF forma un puente salino con el receptor (Ogiso y cols., 2002). Estudios con análogos sintéticos del EGF de ratón demuestran que los enlaces disulfuro Cys¹⁴-Cys³¹ y Cys³³-Cys⁴² son esenciales para el mantenimiento de la estructura terciaria y de la actividad biológica del EGF (Alewood y cols., 2005).

1.5.3 Estabilidad del factor de crecimiento epidérmico

El ambiente de la solución de las formulaciones de proteínas es de importancia primordial para su degradación química y física. Debido a la complejidad estructural de las proteínas se requiere de un grupo de técnicas fisicoquímicas y biológicas que brinden información complementaria sobre su estabilidad (Chirino y Mire-Sluis, 2004). La exposición a altas temperaturas es el método más ampliamente utilizado para degradar las proteínas terapéuticas, las cuales son típicamente almacenadas en condiciones refrigeradas (5 ± 3 °C) (Tonniss y cols., 2015). Con el incremento de la temperatura las proteínas pueden experimentar cambios en el plegamiento que posteriormente pudieran dar lugar a otras reacciones de degradación. Además, la difusión se hace más rápida a altas temperaturas, resultando en colisiones más

energéticas con otras moléculas de proteínas, y con otros componentes de la solución, por consiguiente favorece las reacciones de degradación química y la agregación. Se describe que el EGFhr a pH entre 6,0 y 8,0 comienza a desnaturalizarse a temperaturas por encima de 50 °C y que tiene una temperatura del punto medio de transición entre 70 y 85 °C (Kim y cols., 2014).

En las preparaciones de EGF aislado a partir de glándulas submaxilares de ratón se encontraron cuatro especies: el EGF₁₋₅₃, un EGF que difiere del anterior en la presencia de β -Asp¹ en lugar de Asn¹ (EGF₁₋₅₃ β -Asp¹), otra especie que difiere de la primera en la pérdida de la Asn¹ (EGF₂₋₅₃) y el EGF₁₋₅₁. El EGF₁₋₄₈ se aisló por cromatografía a partir de la digestión triptica del EGF₁₋₅₃. Las diferentes especies indujeron la apertura prematura de los ojos de ratones neonatos, pero el EGF₁₋₅₃ fue el único que tuvo la actividad inmunosupresora completa (Koch y cols., 1984). El subíndice al final del EGFhr indica los residuos del fragmento de EGFhr desde el N-terminal hacia el C-terminal.

Al examinar la estabilidad del EGFhr₁₋₅₃ en varias soluciones, este se degradó de modo espontáneo y de forma dependiente de la temperatura, y generó varios productos de degradación (Araki y cols., 1989). Sin embargo, el EGFhr₁₋₅₃ fue estable a -20 °C. El EGFhr₁₋₅₃ en tampón fosfato salino pH 7,2 dio lugar al producto de degradación β -Asp¹, cuya formación se favoreció con el incremento de la temperatura. En solución de ácido acético 0,1 N se favoreció la formación de los siguientes productos de degradación: EGFhr₄₋₅₃, y el EGFhr₁₋₅₃ modificado como Asp³-succinimida, β -Asp¹¹ y Asp¹¹-succinimida. También se observó la degradación enzimática en suero humano, que produjo EGFhr₁₋₅₂. Durante la incubación del EGFhr₁₋₅₃ en solución de pepsina/HCl se favoreció la formación del EGFhr₁₋₄₉ y el EGFhr₅₀₋₅₃. El EGFhr₁₋₄₈ se aisló por cromatografía a partir de digestión triptica del EGFhr₁₋₅₃, y se purificó EGFhr₁₋₅₀ y EGFhr₁₋₅₁ a partir de orina humana (Araki y cols., 1989).

Al evaluar la afinidad del enlace al receptor del EGFhr₁₋₅₃ y de los productos de degradación antes mencionados, se encontró una afinidad de unión más baja para el EGFhr₁₋₅₃ modificado como β -Asp¹¹ y Asp¹¹-succinimida, el EGFhr₁₋₄₉ y el EGFhr₁₋₄₈ con respecto al EGFhr₁₋₅₃ y a los otros productos de degradación aislados. Los mismos cuatro productos de degradación con afectación en la afinidad de enlace al receptor de EGF también tuvieron disminuida la actividad mitogénica con respecto al resto (Araki y cols., 1989). En el EGFhr₅₀₋₅₃ no se detectó ni actividad de unión al receptor ni actividad mitogénica.

El EGFhr₁₋₅₃ se degradó a EGFhr₁₋₄₉ y a EGFhr₁₋₄₆ cuando se incubó en solución de pepsina/HCl a pH menor que 4,0; pero la proporción de EGFhr₁₋₅₃ se incrementó a pH mayor que 4,0. El EGFhr₁₋₅₃ fue casi tres veces más potente que las formas tratadas con pepsina/HCl en el ensayo en cultivo de células de hepatocitos de rata. Además, en el modelo animal de daño gástrico en ratas tratadas con indometasina, tanto

el EGFhr₁₋₅₃ como el tratado con pepsina/HCl disminuyeron el daño gástrico en forma dosis dependiente. Sin embargo, la magnitud del daño fue de un modo significativo más baja en los animales que recibieron EGFhr₁₋₅₃ intacto comparado con los que recibieron el tratado con pepsina/HCl (Playford y cols., 1995).

La estabilidad en solución acuosa del EGFhr₁₋₄₈ se estudió mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC). En el estudio se aislaron tres productos de degradación que se caracterizaron mediante secuenciación de aminoácidos, espectrometría de masas en modo de ionización por electronebulización (ESI-MS) e isoelectroenfoque. Se identificó la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido (Figura 1.7 a). También se identificaron la desamidación de la Asn¹ para formar un residuo de ácido isoaspártico (β -Asp¹) y la conversión del Asp¹¹ a un grupo estable Asp¹¹-succinimida. Los mecanismos de reacción generalmente aceptados para la desamidación de la Asn y la formación de succinimida/isomerización del Asp se muestran en la figura 1.7 b (Senderoff y cols., 1994). Como resultado de la exposición del EGFhr a la luz fluorescente en solución acuosa se observó un incremento en la oxidación de la Met²¹ (Cini y cols., 1992; Senderoff y cols., 1994).

El efecto del pH en la estabilidad del EGFhr₁₋₄₈ se estudió a las temperaturas de 30; 4 y -20 °C. Se estudió en tampón citrato de sodio a pH (3,8-5,3) y en fosfato de sodio a pH (6,0-7,6). A la temperatura de 30 °C, la máxima estabilidad se encontró a pH cercano a 5,3. A esta temperatura, la principal ruta de degradación a pH mayor que 6,0 fue la desamidación de la Asn¹, que aumentó con el incremento del pH. A pH menor que 5,0, la principal ruta de degradación que contribuyó fue la formación de succinimida en el Asp¹¹, que se incrementó con la disminución del pH. La oxidación de la Met²¹ disminuyó ligeramente con el incremento del pH (Senderoff y cols., 1994).

A la temperatura de 4 °C, en general, los resultados siguieron la misma tendencia que a 30 °C. A 4 °C, la máxima estabilidad se encontró a pH 6,0. A esta temperatura, la oxidación de la Met²¹ pasó a ser una ruta de degradación más significativa con respecto a la desamidación de la Asn¹ y a la formación de succinimida en el Asp¹¹, que lo que fue a 30 °C. La estabilidad de la solución congelada a -20 °C mostró la máxima estabilidad del EGFhr₁₋₄₈ a pH mayor o igual que 5,0, que se mantuvo constante en este rango. A esta temperatura todas las rutas de degradación se enlentecieron y las rutas principales fueron la oxidación de la Met²¹ y la formación de succinimida en el Asp¹¹; la desamidación de la Asn¹ se suprimió (Senderoff y cols., 1994).

El efecto del pH en la estabilidad del EGFhr mediante RP-HPLC también se estudió en el tampón McIlvaine a pH entre 3,0 y 8,0 y temperaturas entre 25 y 60 °C. La máxima estabilidad se detectó a pH 5,6 para las temperaturas de 50 y 60 °C; mientras que para las temperaturas de 40, 37 y 25 °C se detectó a pH 7,2 (Yang y cols., 2005).

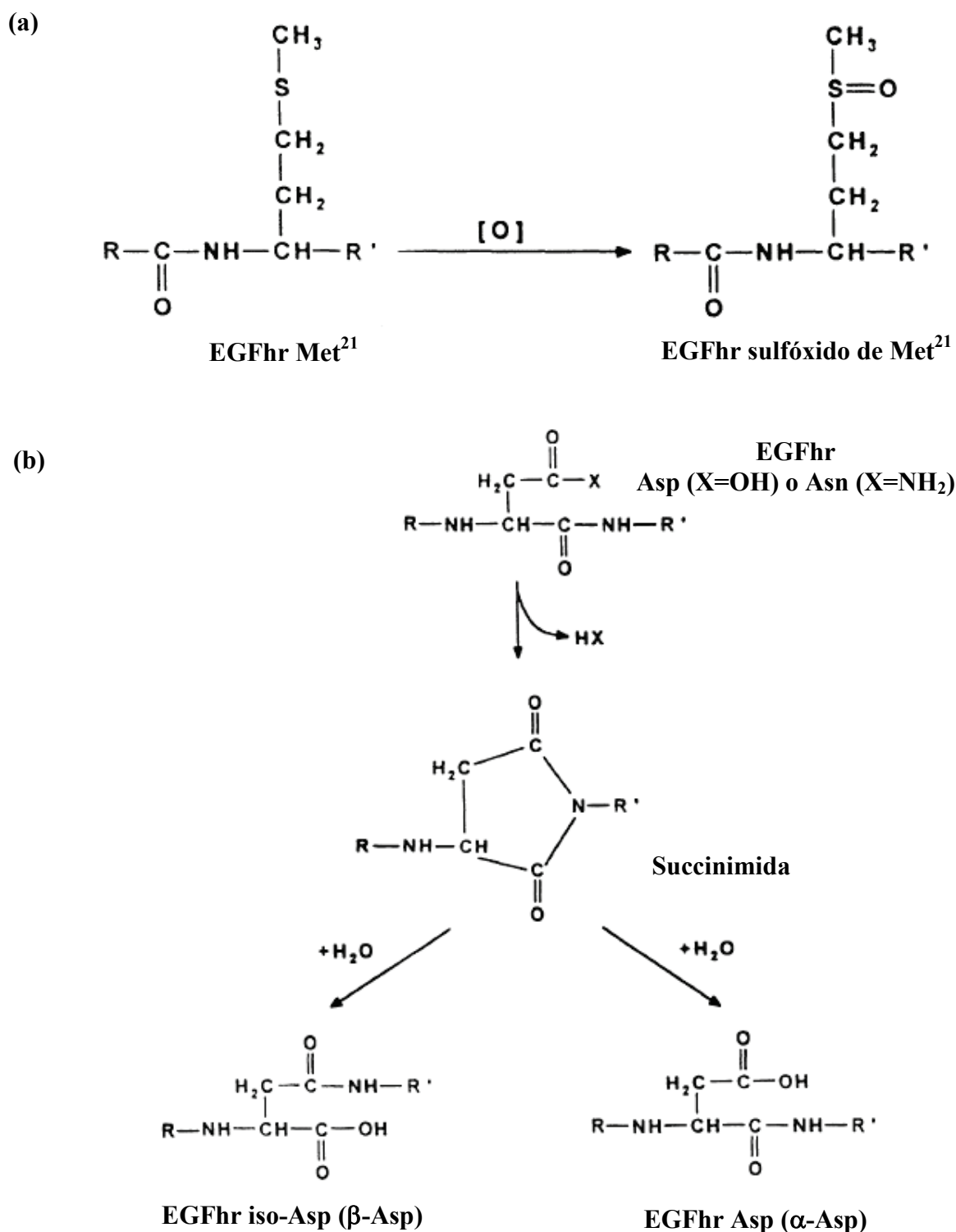


Figura 1.7. Representación esquemática de las principales rutas de degradación del EGFhr. (a) mecanismos de reacción para la formación de sulfóxido de Met; y (b) para la desamidación en la Asn, o la formación del intermediario succinimida, y la apertura de este ciclo para formar el α -Asp y el β -Asp. Reproducido de Senderoff y cols., 1994.

Revisión bibliográfica

Se ha descrito que según los resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), el EGFhr tiene una alta tendencia a la polimerización del monómero en dímeros y trímeros a través del intercambio disulfuro (Brake y cols., 1984), la cual puede modificar la actividad biológica o las propiedades inmunológicas (Heath y Merrifield, 1986). Al evaluar la adsorción del EGFhr, a concentraciones inferiores a 1,0 ng/mL, en tubos de ensayo de polietileno, poliestireno y de vidrio se apreció una reducción entre 15 y 40 % de la concentración inicial (Jørgensen y cols., 1999).

Al evaluar la influencia del estrés térmico a 70 °C en la agregación de un análogo del EGFhr, con 14 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal, mediante cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular (SEC), se encontró que el EGFhr fue vulnerable a la formación de dímeros y multímeros. Después de una hora a 70 °C, se encontraron cambios significativos en la composición de las estructuras secundaria del EGFhr, determinada mediante dicroísmo circular (CD), comparado con el control (no calentado). Se incrementó el contenido de hélices- α y disminuyó el de hojas- β antiparalelas (Lim y cols., 2014b).

El EGFhr producido en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, de La Habana, Cuba (CIGB) mediante su expresión extracelular en *Saccharomyces cerevisiae* se evaluó para confirmar su secuencia de aminoácidos y determinar la presencia de modificaciones post-traduccionales. Se detectó la presencia de dos componentes mayoritarios: un componente con secuencia de aminoácidos del 1 al 51 (EGFhr₁₋₅₁) con 5 947,9 g/mol, y otro con secuencia de aminoácidos del 1 al 52 (EGFhr₁₋₅₂) con 6 060,8 g/mol. Además, se aislaron dos componentes minoritarios que ocasionalmente aparecieron y que se identificaron como oxidación de la Met²¹ a sulfóxido del EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂. También se verificó la localización correcta de los tres enlaces disulfuro (Besada y cols., 1990).

A partir de la mezcla de EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂ que se obtiene en el CIGB, se purificaron las dos formas moleculares, por RP-HPLC, para comparar su actividad biológica con la molécula completa, el EGFhr₁₋₅₃. Se demostró que el EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂ son tan biológicamente activos como la molécula completa de EGFhr₁₋₅₃ en el ensayo *in vitro* de incorporación de timidina tritiada y en el ensayo *in vivo* de reducción del daño gástrico en ratas. Además, los autores demostraron que el EGFhr es estable en sistemas de infusión que emplean albúmina humana durante siete días a temperatura ambiente, sin pérdidas de la actividad biológica. La exposición a la luz tampoco afectó la actividad biológica (Calnan y cols., 2000).

Para evitar algunas de las modificaciones químicas o productos de degradación descritos se ha patentado el reemplazo del Asp¹¹ del EGFhr por un aminoácido diferente, preferiblemente por Glu; y el reemplazo de la Met²¹ por la Ile sin la disminución de su actividad biológica (Medina-Selby y Nascimento, 1992).

1.5.4 Formulaciones del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante

El EGFhr se ha formulado en preparaciones oftálmicas (Singh y Foster, 1987) y tópicas (Brown y cols., 1989) para una más rápida y mejor cicatrización de las heridas y quemaduras. Se han investigado diferentes bases para la liberación del EGFhr, en heridas abiertas, en formas de geles de pluronic F-127 y de carbopol (DiBiase y Rhodes, 1996). Un sistema semisólido de liberación de EGFhr basado en un gel de carbopol provocó un aumento significativo de la cicatrización de las heridas epiteliales de córnea (Sheardown y cols., 1997). Se ha descrito sobre la estabilización del EGFhr en formulaciones acuosas para preparaciones oftálmicas y tópicas. Aunque no se logró controlar completamente la desamidación del EGFhr, la mayor estabilidad química se encontró a pH neutro (tampón Tris-HCl) y al adicionar surfactantes no iónicos (0,01-0,1 % m/v) o polímeros (0,1 a 1,0 % m/v). En este estudio se emplearon surfactantes no iónicos (Tween 20 y Triton-X-100) para prevenir la agregación, determinada por absorbancia a 600 nm (Son y Kwon, 1995).

Se patentó una formulación líquida que contiene una cantidad farmacéuticamente efectiva de EGFhr y un metal catiónico, tal como el zinc, el cual es suficiente para prevenir la degradación de la proteína (Cini y Finkenaure, 1992). La inclusión en la formulación de EGFhr de un polímero de celulosa soluble en agua, preferiblemente metilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa, permitió estabilizar la proteína contra la pérdida de la actividad biológica (Finkenaure y Somerville, 1988).

Se han desarrollado una amplia variedad de apósitos para incrementar la eficacia del uso del EGFhr en la cicatrización (Yildirim y cols., 2012). Por ejemplo, los apósitos de esponjas formadas por ácido hialurónico y colágeno (Niiyama y Kuroyanagi, 2014; Sukumar y cols., 2014). Se ha descrito el desarrollo de películas finas de poliuretano que contienen EGFhr mediante el ensamblaje capa a capa (Kulkarni y cols., 2014). La preparación de parches electro-hilados con fibras de diámetro ultrafino que contienen EGFhr fueron biológicamente activos en ensayos *in vitro* con fibroblastos (Ji y cols., 2011). Los apósitos de quitosano cargados con EGFhr también retuvieron la actividad mitogénica *in vitro* del EGFhr (Tigü y Gümüşderelioğlu, 2008).

Para mejorar la liberación del EGFhr y lograr un uso más eficaz en la cicatrización de las heridas se han utilizado las nanotecnologías (Laurencin y Nair, 2014). La mayoría de estas formulaciones solo se han evaluado en estudios preclínicos. La administración local mediante atomización de formulaciones que emplean nanopartículas de ácido poliláctico coglicólico (Chu y cols., 2010), o micropartículas de ácido

poliláctico coglicólico-alginato (Gainza y cols., 2013) cargadas con EGFhr mostraron resultados preclínicos prometedores. Por otra parte, el uso tópico de formulaciones que emplean nanopartículas lipídicas cargadas con EGFhr, también ha mostrado resultados alentadores (Gainza y cols., 2014). La preparación de liposomas redispersables para liberación transdermal de EGFhr incrementó la penetración de la proteína en la piel (Yin y cols., 2014). El uso de liposomas multilamelares cargados con EGFhr en una formulación en gel evidenció resultados promisorios en la cicatrización de quemaduras (Değim y cols., 2011).

Otra estrategia abordada para mejorar la actividad farmacológica del EGFhr son los nanoconjugados (Hajimiri y cols., 2015). Se ha descrito que la conjugación química del EGFhr al PEG es un proceso eficiente y con elevada retención de la actividad biológica (Lee y Park, 2002). El uso de conjugados químicos EGFhr-dextrina mostró resultados alentadores en la cicatrización de heridas en ratas diabéticas (Hardwicke y cols., 2011). La conjugación de la protamina de bajo peso molecular al extremo N-terminal del EGFhr por técnicas de recombinación genética aceleró el cierre de las heridas en el modelo de ratas diabéticas (Choi y cols., 2012).

Un gran número de artículos científicos y patentes informan sobre formulaciones tópicas y oftálmicas de EGFhr. En los últimos años se informa sobre el desarrollo de una amplia variedad de apósitos, sistemas de liberación y nanoconjugados. Sin embargo, en toda la búsqueda de literatura realizada hasta la fecha, no se encontraron antecedentes sobre el desarrollo de una formulación para la administración parenteral del EGFhr.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en los ensayos fueron de calidad analítica, suministrados por Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o por AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemania).

2.1.2 Excipientes

En la tabla 2.1 se relacionan los excipientes utilizados en los experimentos de formulación y liofilización.

2.1.3 Materiales de envase primario

En la tabla 2.2 se relacionan los materiales de envase primario utilizados en los experimentos de formulación y liofilización.

2.1.4 Materiales de referencia y biológicos

En la tabla 2.3 se relacionan los materiales de referencia de trabajo (MRT) utilizados, los cuales fueron suministrados por el Departamento de Estabilidad y Materiales de Referencia de la Dirección de Calidad (CIGB, Cuba). El anticuerpo monoclonal contra EGfR CB-EGF.1 y el anticuerpo CB-EGF.2 conjugado a peroxidasa los suministró el Departamento de Anticuerpos Monoclonales de la Dirección de Producción (CIGB, Cuba). Ambos anticuerpos reconocen epítopos conformacionales (Freyre y cols., 1989).

2.1.5 Otros materiales

Para la realización de este trabajo fue necesario utilizar los materiales relacionados a continuación:

- Vasos de precipitado y probetas de vidrio de 50, 200, 500 y 1 000 mL (DURAN, Alemania).
- Barra magnética recubierta con politetrafluoroetileno (Brand, Alemania).
- Filtros de 25 mm de diámetro (6,2 cm² de área) con acople a jeringa de 0,2 µm de tamaño de poro de: acetato de celulosa, celulosa regenerada, poliéter sulfonas y fluoruro de polivinilo (Teknokroma, España).
- Jeringas desechables de 5, 10 y 20 mL (Fisher Scientific, EE.UU.).
- Cartuchos de filtración de 150 cm² de 0,45 + 0,2 µm de poliéter sulfonas, casetes tipo Hydrosart® de tamaño de poro de 2 000 g/mol y membranas estériles de nitrato de celulosa de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania).
- Cubetas de cuarzo (Hellma Analytics, Alemania).
- Agua para inyectables (AI) y solución salina fisiológica (NaCl 0,9 % m/v, SSF) (Quimefa, Cuba).
- Caja plegable de cartón ondulado de 220 g/m² con barniz ultravioleta (UV) (Durero Packaging, España)

Materiales y métodos

Tabla 2.1. Excipientes utilizados en los experimentos de formulación y liofilización

Excipiente	Descripción	Suministrador
Sacarosa	> 99 %, Farmacopea europea (Ph. Eur.)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemania)
Trehalosa.2H ₂ O	> 98 %, BioChemica	
Rafinosa.5H ₂ O		
Lactosa.H ₂ O	> 98 %, Ph. Eur.	
Glucosa	> 99 %, Ph. Eur.	
Fructosa	> 98,5 %, Ph. Eur./Farmacopea de EE.UU. (USP)	
Manitol	> 98 %, Ph. Eur./USP/Farmacopea Británica	
Sorbitol	> 97 %, Ph. Eur.	
Glicerol	> 99 %, Ph. Eur./USP	
Glicina	> 98,5 %, Ph. Eur./USP	
Alanina		
Leucina		
Histidina	> 98 %, Ph. Eur./USP	
Dextrana 40	> 98 %, Ph. Eur.	
PEG 6000	> 99 %, Ph. Eur./USP/ Farmacopea Británica	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Polisorbato 20	> 99,5 %, Ph. Eur.	
Polisorbato 80		
NaCl	> 99,5 %, Ph. Eur./USP/ Farmacopea Británica	
KCl	> 98 %, Ph. Eur.	
MgCl ₂ .6H ₂ O	> 98 %, Ph. Eur./USP/ Farmacopea Británica	

Tabla 2.2. Materiales de envase primario

Material	Descripción	Suministrador
Frasco de vidrio de 1 L	Vidrio de hidrolítico claro, clase I	DURAN Group GmbH, Alemania
Tapa de rosca	Polipropileno con rosca GL 45	
Bulbos 2R y 6R	Vidrio de hidrolítico claro, clase I	Nuova OMPI, Italia
Tapones para liofilización de 13 mm y 20 mm	Goma bromobutilo y siliconizados	Helvoet Pharma, Bélgica
Sellos de 13 mm y 20 mm	De aluminio y plástico tipo Flip-Off	

Tabla 2.3. Materiales de referencia de trabajo utilizados

Ensayos	Código del MRT	Otros datos
Ensayo de proliferación celular	EGFhr-10-0812	Calibrado contra el MR 91/530 (NIBSC, Reino Unido)
ELISA de EGFhr, RP-HPLC y SDS-PAGE	EGFhr-10-0812	Calibrado contra el MR 91/550 (NIBSC, Reino Unido)
Cuantificación de proteínas totales	BSA-06-1109	Albúmina de suero bovino
Cuantificación de carbohidratos totales	G-05-0406	Glucosa

2.1.6 Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante

El EGFhr expresado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se purificó como una mezcla de formas truncadas por el extremo C-terminal, EGFhr₁₋₅₁ y EGFhr₁₋₅₂ (CIGB, Cuba). Las preparaciones del ingrediente farmacéutico activo (IFA) de EGFhr utilizadas tenían pureza superior al 95,0 % medida en RP-HPLC y SDS-PAGE. Todas las preparaciones utilizadas eran estériles y apirogénicas, con actividad biológica específica en el rango de $1,5-5,0 \times 10^6$ unidades internacionales (UI)/mg. En los anexos 1 y 2 se presentan las caracterizaciones moleculares, por ESI-MS, realizadas al IFA de EGFhr utilizado en los diferentes estudios de este trabajo.

2.2 Estudios de degradación forzada del EGFhr

En los estudios de degradación forzada del EGFhr se empleó una concentración final de 500 µg/mL para los ensayos de electroforesis en ausencia de SDS y de SDS-PAGE. Para el resto de los ensayos se utilizó una concentración final de 100 µg/mL. Las muestras de EGFhr se envasaron en bulbos 2R y se cerraron con tapones y sellos de 13 mm (Tabla 2.2). Para los estudios de estabilidad las muestras se almacenaron en incubadoras KBF 115 (Binder, Alemania).

2.2.1 Estrés por combinación de pH extremo y calor

Se estudió en una solución de EGFhr en soluciones tampón a la concentración de 0,1 M y diferentes valores de pH. Para pH 3,0 se utilizó el tampón acetato de sodio, el fosfato de sodio para pH 7,0 y el borato de sodio para pH 9,0. Para el ensayo de electroforesis en ausencia de SDS los viales se incubaron a 50 ± 2 °C por un día. Para los ensayos de RP-HPLC, SDS-PAGE, ESI-MS, ELISA y el ensayo de proliferación celular, las muestras se incubaron durante cuatro días a la misma temperatura.

2.2.2 Estrés por presencia de agente oxidante

Se evaluó una solución de EGFhr a 100 µg/mL en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0). A esta solución se le adicionó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) hasta lograr una concentración final de 0,01 y 0,1 % (v/v). Como control del experimento se preparó una muestra bajo las mismas condiciones, pero no se le adicionó H₂O₂. Las muestras se incubaron a 25 ± 2 °C durante 30 min. A continuación, las muestras se evaluaron en los ensayos de RP-HPLC, ELISA y ensayo de proliferación celular.

2.2.3 Estrés por fotólisis

En este estudio también se utilizó una solución de EGFhr a 100 µg/mL en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0). La solución se dispensó a razón de 1,0 mL/bulbo 2R o 1,0 mL/cubeta de cuarzo. Después de tapadas, las muestras se expusieron, a 15 cm, a la irradiación de una lámpara UV modelo UVLS-24

(LTF Labortechnik GmbH and Co. KG, Alemania), que incluye la combinación de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm). La exposición se extendió por 24 h a 25 ± 2 °C y, como control del experimento, se expuso la misma muestra en viales cubiertos con papel de aluminio. A continuación, las muestras se evaluaron en los ensayos de RP-HPLC, ELISA y ensayo de proliferación celular.

2.3 Estabilización del EGFhr en una formulación líquida

2.3.1 Preparación de formulaciones líquidas a escala de banco. Equipos y procedimientos

Las formulaciones líquidas de EGFhr a escala de banco (25 mL) se prepararon siguiendo el diagrama de flujo de la figura 2.1. Se emplearon viales 2R con tapón de bromobutilo y sellos de aluminio y plástico de 13 mm (Tabla 2.2). Siguiendo el diagrama de flujo se prepararon las variantes para evaluar el efecto del pH, los tampones, la fuerza iónica, la concentración de la proteína, la presencia de excipientes y el efecto de la temperatura en la estabilidad del EGFhr en solución. Este mismo procedimiento se empleó para la etapa de preparación de las formulaciones de las variantes del estudio de tamizado de excipientes y de combinaciones de excipientes durante la liofilización a escala de banco.

2.3.2 Influencia del pH en la solubilidad y estabilidad

Solubilidad

El EGFhr se concentró hasta aproximadamente 10,0 mg/mL empleando un dispositivo de ultrafiltración Sartocon slice 200, con casetes Hydrosart® de 2 000 g/mol de tamaño de poro (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania). A continuación, a la solución concentrada se le cambió el tampón fosfato de sodio (10 mM, pH 7,0) por AI empleando el mismo dispositivo de ultrafiltración. Posteriormente, la solución concentrada se dispensó a 1,0 mL/vial. El producto se secó al vacío en un liofilizador Durastop (FTS Systems, EE.UU.) a una temperatura de 25 °C y una presión de 13,33 Pa durante 48 h. Después de secado el EGFhr, los viales se cerraron y sellaron. El producto se almacenó a -20 °C hasta que se midió la solubilidad. La influencia del pH en la solubilidad del EGFhr se evaluó tanto en tampón acetato de sodio (pH 3,0-6,0) como en fosfato de sodio (pH 7,0-8,0), a la concentración de 0,1 M. Se pesaron fracciones de 50 mg del polvo de EGFhr liofilizado, y se adicionaron a 333 μ L de las soluciones con diferentes valores de pH, para una concentración teórica de 150 mg/mL. Después de filtrar las muestras a través de filtros de 0,2 μ m de acetato de celulosa se midió la concentración de EGFhr por absorbancia a 280 nm.

Estabilidad

La influencia del pH en la estabilidad del EGFhr se evaluó en tampones: acetato de sodio (pH 3,0-5,0), fosfato de sodio (pH 6,0-8,0) y borato de sodio (pH 9,0-10,0), todos a una concentración final de 0,1 M. Las muestras destinadas a las evaluaciones en los ensayos de RP-HPLC y ELISA se diluyeron (1:50) hasta

Materiales y métodos

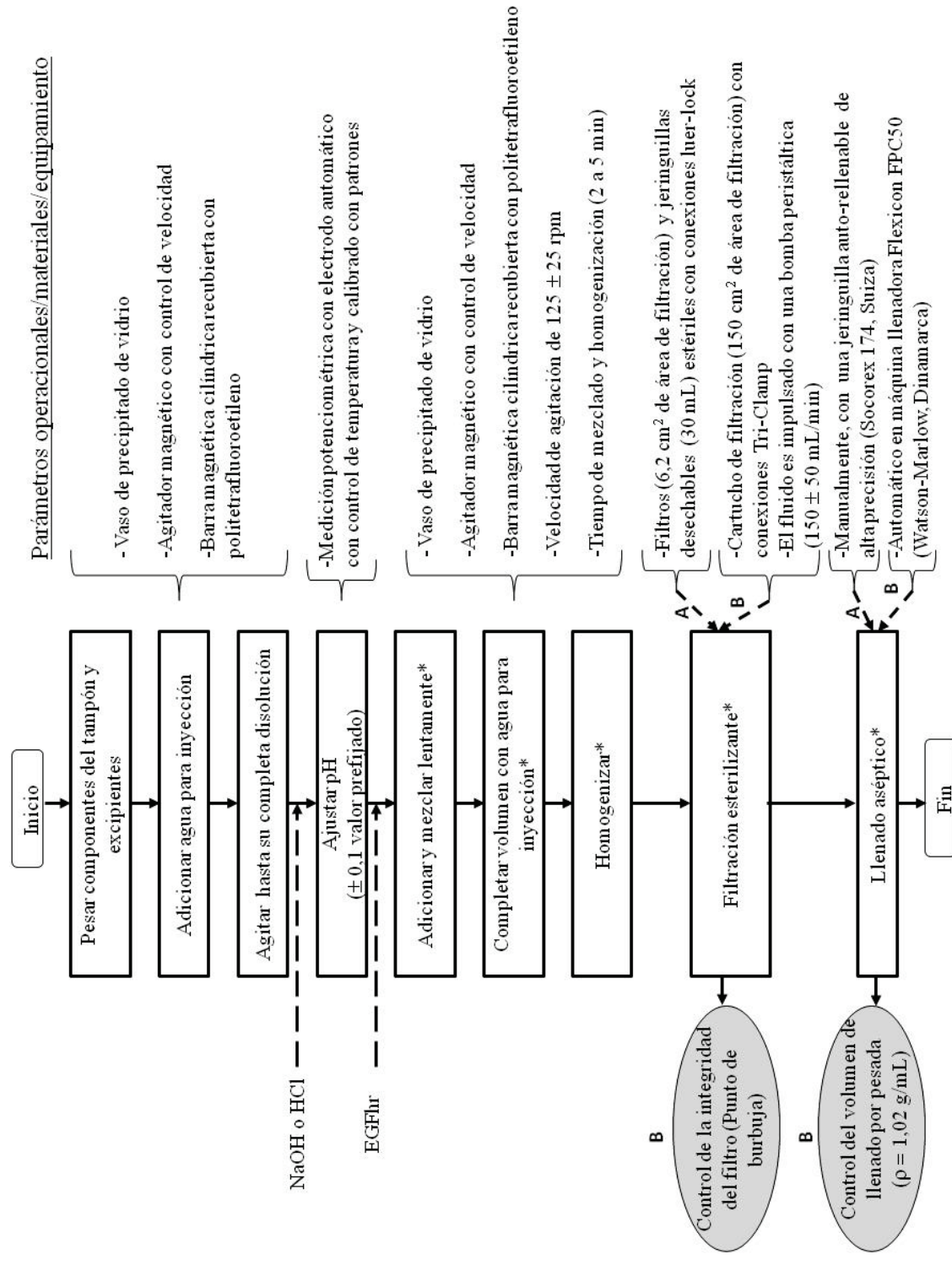


Figura 2.1. Diagrama de flujo de los procesos de formulación y llenado. Los parámetros operacionales, materiales y equipamiento para el proceso a escala de banco (25 mL) (A) y a escala piloto (800 mL) (B). Los controles (óvalos sombreados) solo aplican para el proceso a escala piloto. *Indican operaciones realizadas en área clase 100. rpm: revoluciones por minuto.

100 µg/mL a partir de una solución concentrada de EGFhr (5,0 mg/mL). Las muestras para los ensayos de SEC, CD, dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial Z se diluyeron (1:10) hasta 500 µg/mL. Para los ensayos de CD, DLS y potencial Z, las muestras se evaluaron recién preparadas.

Para los estudios de estabilidad, las muestras se almacenaron a 50 ± 2 °C en una incubadora KBF 115. En la evaluación del efecto del pH, las muestras se analizaron en RP-HPLC después de 3, 6 y 12 h (pH 9,0 y 10,0) y después de uno, dos y cuatro días (pH 3,0 a 8,0). Para las evaluaciones en SEC, las muestras se extrajeron después de cuatro días. La concentración de EGFhr se determinó mediante ELISA después del almacenamiento durante 2, 4, 12, 15, 21 y 30 días a la misma temperatura. La cinética de degradación se determinó en función del pH. En los estudios de estabilidad para evaluar la influencia de los tampones, fuerza iónica, concentración de proteína y presencia de excipientes, las muestras se extrajeron después de uno, tres, cinco y siete días para evaluarlas en RP-HPLC; y después de 7, 15 y 30 días para evaluarlas en ELISA.

2.3.3 Influencia de los tampones

Se evaluó una solución de EGFhr a 100 µg/mL en soluciones tampón a la concentración de 0,1 M y diferentes valores de pH. Para pH 6,0, la estabilidad del EGFhr se estudió en los tampones: acetato de sodio, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio e histidina-HCl; mientras que para pH 7,0 y 8,0 se estudió en los tampones fosfato de sodio, histidina-HCl y Tris-HCl. La cinética de degradación se determinó en función del pH y el tipo de tampón.

2.3.4 Influencia de la concentración de proteína

Una solución de EGFhr con concentración de 5,0 mg/mL se diluyó en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0) para lograr las concentraciones finales de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL. La cinética de degradación se determinó en función de la concentración de la proteína.

2.3.5 Influencia de la fuerza iónica del medio

Se determinó en una solución de EGFhr a 500 µg/mL en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0), que contenía diferentes concentraciones de NaCl (0,5, 1,0 y 2,0 % m/v). Como control se preparó una muestra sin NaCl. Además de los ensayos de RP-HPLC y ELISA, en este caso se evaluó la estabilidad a 50 ± 2 °C en SEC después de 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento. La cinética de degradación se determinó en función de la concentración de NaCl.

2.3.6 Influencia de los excipientes

Se evaluó la compatibilidad del EGFhr, 100 µg/mL, con los excipientes en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0). Los excipientes de tipo sacáridos (sacarosa, trehalosa, rafinosa, lactosa, glucosa y

fructosa) y polialcoholes (manitol, sorbitol y glicerol) se ensayaron al 10,0 %, m/v, los polímeros (Dextrana 40 y PEG 6000) al 5,0 %, los surfactantes (polosorbatos 20 y 80) al 0,05 %, los aminoácidos (glicina, alanina, leucina e histidina) al 2,0 % y las sales (NaCl, KCl y $MgCl_2$) al 1,0 %. Los excipientes incompatibles, que afectaron la estabilidad del EGFhr en un grado superior al control sin excipiente, también se estudiaron en tampón Tris-HCl al mismo valor de pH y concentración del tampón. Para determinar la interferencia de los excipientes en los ensayos de RP-HPLC y ELISA, para cada condición se preparó un placebo que contenía todos los componentes, excepto la proteína.

2.3.7 Efecto de la temperatura en la velocidad de desamidación del EGFhr en solución acuosa

Se estudió en una solución de EGFhr a 500 $\mu\text{g/mL}$ en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0). Las muestras en solución se almacenaron a 25 ± 2 , 37 ± 2 y 50 ± 2 °C en incubadoras KBF 115. Estas se extrajeron a predeterminados intervalos de tiempo, en dependencia de la temperatura, y se evaluaron por electroforesis en ausencia de SDS para determinar el porcentaje de desamidación (Sección 2.9.4).

2.4 Estabilización del EGFhr mediante la liofilización

2.4.1 Influencia de los excipientes en la estabilidad durante la congelación y descongelación

La estabilidad del EGFhr en presencia de los excipientes se evaluó después de tres ciclos de congelación a -20 °C y descongelación a 25 °C. Para este estudio se emplearon los mismos excipientes y métodos analíticos que en la sección 2.3.6. Los excipientes incompatibles, que afectaron la estabilidad del EGFhr en un grado superior al control que no contenía excipiente, también se estudiaron en tampón Tris-HCl al mismo valor de pH y concentración del tampón.

2.4.2 Preparación de formulaciones liofilizadas a escala de banco. Equipos y procedimientos

Las variantes de formulaciones acuosas para estudiar el efecto de excipientes o sus combinaciones en la estabilidad del EGFhr durante la liofilización y el almacenamiento del producto liofilizado, se prepararon siguiendo el diagrama de flujo que se mostró en la figura 2.1. Las formulaciones se prepararon con 75 $\mu\text{g/mL}$ de EGFhr, y contenían 2,0 % m/v de los excipientes individuales o de combinaciones de sacarosa-Dextrana 40, en tampón fosfato de sodio (0,01 M, pH 7,0). Como control negativo se preparó una solución de EGFhr a 75 $\mu\text{g/mL}$, sin excipientes, bajo las mismas condiciones. Las variantes se liofilizaron en un liofilizador de escala de banco (Edwards SMH15, Reino Unido) con condensador de capacidad de 8,0 kg de hielo.

Para la liofilización del EGFhr en presencia de distintos excipientes se requieren diferentes condiciones, por consiguiente se evaluaron dos procedimientos: (i) el que no emplea tratamiento térmico (Sin TT) y

Materiales y métodos

que comúnmente se ha utilizado para la liofilización de carbohidratos amorfos (por ejemplo, sacarosa, trehalosa o Dextrana 40) y (ii) otro que incluye un paso de tratamiento térmico (Con TT) para garantizar una máxima cristalización (por ejemplo, para el manitol o la glicina) (Tang y Pikal, 2004). La tabla 2.4 muestra los detalles de los dos procesos. Después de terminar el proceso de liofilización, los viales se cerraron dentro de la cámara de secado, y a continuación se sellan y almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de los estudios de caracterización y estabilidad.

Tabla 2.4. Ciclos de liofilización utilizados durante los experimentos de tamizado de excipientes para la estabilización del EGFhr

Etapa	Sin TT			Con TT (excipientes cristalinos ^a)		
	Temperatura de platina ($^{\circ}\text{C}$)	Presión de la cámara (Pa)	Tiempo (h)	Temperatura de platina ($^{\circ}\text{C}$)	Presión de la cámara (Pa)	Tiempo (h)
Congelación	$-45\text{ }^{\circ}\text{C}$	atmosférica	5	$-45\text{ }^{\circ}\text{C}$	atmosférica	2
				$-15\text{ }^{\circ}\text{C}$	atmosférica	2
				$-45\text{ }^{\circ}\text{C}$	atmosférica	5
Secado primario	$-30\text{ }^{\circ}\text{C}$	12,0	8	$-30\text{ }^{\circ}\text{C}$	12,0	8
Secado secundario	$25\text{ }^{\circ}\text{C}$	7,5	6	$25\text{ }^{\circ}\text{C}$	7,5	6

^aManitol y glicina

2.4.3 Estudios de estabilidad para la selección de las formulaciones liofilizadas

Las muestras controles, equivalentes al tiempo cero de incubación (t_0), se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los estudios de estabilidad de las muestras liofilizadas se realizaron a $50 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una incubadora KBF 115. Justo antes del análisis, las muestras liofilizadas se rehidrataron con AI a su volumen original.

Para estudiar el efecto de excipientes individuales, se evaluó la estabilidad del EGFhr en los ensayos de RP-HPLC y ELISA. Las muestras liofilizadas se analizaron en RP-HPLC después de incubadas durante 2, 4, 7, 15, 30, 45 y 60 días; y en ELISA después 7, 15, 30, 45 y 60 días. Para estudiar el efecto de las combinaciones de sacarosa-Dextrana 40, la estabilidad del EGFhr se evaluó en los ensayos de RP-HPLC, ELISA y ensayo de proliferación celular. En este estudio, en todos los ensayos, las muestras se analizaron después de incubadas durante 7, 15, 30, 45, 60 y 90 días. Como este fue el paso final para definir la composición de la formulación, también se incluyó el ensayo de proliferación celular.

2.4.4 Preparación de los lotes a escala piloto. Equipos y procedimientos

Los lotes para los estudios de estabilidad, preclínica y clínica se fabricaron a escala piloto (800 mL), siguiendo el diagrama de flujo que se mostró en la figura 2.1. En este caso, los procesos de formulación y llenado aséptico se ejecutaron en instalaciones que cumplieran con los estándares vigentes de buenas prácticas de

fabricación. Todos los procesos se llevaron a cabo en un área clase 100, bajo flujo laminar de techo, a 20 ± 4 °C y humedad relativa de 55 ± 15 %. Se fabricaron lotes a escala piloto a las presentaciones de 25, 75 y 250 µg de EGFhr/vial. La integridad del cartucho de filtración se determinó mediante la técnica del punto de burbujeo empleando el Sartocheck 4 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania).

Los lotes se llenaron a razón de 1,0 mL/vial en una máquina automática Flexicon FPC50, con precisión de ± 1 % del volumen de llenado (Watson-Marlow, Dinamarca). Esta misma máquina se utiliza para el retape de los viales. La etapa de liofilización se ejecutó en una máquina Edwards Kniese S-08 (Sussex, Reino Unido) con condensador de capacidad de 20 kg de hielo. La temperatura del producto se registró con ayuda de sensores tipo Pt-100 y la presión de la cámara a través de sensores de termo-conductividad tipo Pirani, integrados al equipo. La liofilizadora se encuentra en un área clase 100, en las instalaciones de producción del CIGB. Durante el proceso de liofilización se registró la temperatura del producto, del fluido, y del condensador y la presión de vacío de la cámara. Al finalizar el proceso, los viales se cerraron dentro de la cámara de secado, y a continuación se sellaron y almacenaron a 5 ± 3 °C hasta el momento de efectuar los estudios de caracterización y estabilidad. El ciclo empleado forma parte de los resultados del trabajo y se presenta en la sección 3.4.2 de Resultados y discusión.

2.5 Evaluación de la estabilidad del EGFhr durante las operaciones tecnológicas

2.5.1 Efecto de la operación de mezclado

Con el objetivo de evaluar el efecto de la agitación en la estabilidad del EGFhr durante la operación de mezclado con los excipientes seleccionados, el granel de la formulación (75 µg/mL de EGFhr, 15 mg/mL de sacarosa, 5 mg/mL de Dextrana 40 en tampón fosfato de sodio a 0,01 M, pH de 6,5 a 7,0) se sometió a agitación empleando una barra magnética y un agitador magnético de velocidad graduable (Ika Labortechnik, Alemania). La solución se agitó a velocidades de 100, 200 y 400 rpm. Para cada velocidad de agitación se extrajeron muestras al inicio y después de 15, 30, 45 y 60 min. Las muestras se analizaron en el ensayo de RP-HPLC.

2.5.2 Efecto de la operación de esterilización por filtración

El efecto del material del medio filtrante en la estabilidad del EGFhr durante la operación de filtración esterilizante, se evaluó en filtros de acetato de celulosa, celulosa regenerada, poliéter sulfonas y fluoruro de polivinilo. El sistema se ensambló mediante la conexión del filtro a una jeringuilla de 5,0 mL. Un volumen de 1,0 mL del formulado a granel que contenía 75 µg/mL de EGFhr se colocó en la jeringuilla, y se hizo pasar a través de los filtros. Todos los filtros fueron de geometría circular y con la misma área de la sección transversal

(6,2 cm²). Las muestras se evaluaron mediante RP-HPLC para determinar el recobrado del proceso, y la pureza del EGFhr después de la operación de filtración y del almacenamiento del filtrado durante siete días a 5 ± 3 °C.

2.5.3 Efecto de las operaciones de liofilización y simulación de la inyección

El efecto del proceso de liofilización se evaluó mediante la comparación de las características del EGFhr en la muestra antes de liofilizar (Pre-Liof.) con las de la liofilizada y reconstituida en su volumen original (Liof.-Reconstituido). El efecto general del proceso de inyección se evaluó mediante una simulación del mismo, se compararon las características del EGFhr en la muestra después de pasarla por el sistema jeringa y aguja (Después-Jeringa) con las de la muestra antes de pasarla por el sistema, el Liof.-Reconstituido. El liofilizado se reconstituyó con AI o con SSF, y la estabilidad se evaluó mediante RP-HPLC, SEC, fluorescencia intrínseca del Trp, CD, ELISA y ensayo de proliferación celular.

2.6 Estabilidad de la formulación liofilizada de EGFhr en condiciones de estrés

2.6.1 Evaluación mediante ESI-MS de la estabilidad del EGFhr liofilizado en condiciones de estrés

La estabilidad de la formulación liofilizada seleccionada conteniendo 75 µg/vial de EGFhr se evaluó después de exponer viales del producto durante 15 días a 50 ± 2 °C. Como control se evaluaron los mismos ensayos en el producto sin calentar. La estabilidad se evaluó mediante ESI-MS, determinando la masa molecular de la proteína intacta (Secciones 2.10.7 y 2.10.9) y la formación correcta de los enlaces disulfuro mediante la hidrólisis ácida parcial de la proteína (Secciones 2.10.7-2.10.9).

2.6.2 Efecto de la humedad residual en la desamidación del EGFhr

Para generar las muestras con diferentes valores de humedad residual, viales de la formulación liofilizada seleccionada que contenían 75 µg/vial de EGFhr, se destaparon y almacenaron a 25 ± 2 °C/ 60 ± 5 % de humedad relativa en una incubadora KBF 115 durante 5 y 10 min. A continuación, los viales fueron tapados y sellados nuevamente. El contenido de humedad residual de los grupos de muestras se determinó mediante el método de Karl Fischer (Sección 2.8.3). Las muestras liofilizadas con diferentes valores de humedad residual se almacenaron a 25 ± 2 , 37 ± 2 y 50 ± 2 °C en incubadoras KBF 115. Las muestras se extrajeron a predeterminados intervalos de tiempo, en dependencia de la temperatura y de la humedad residual, y se evaluaron por electroforesis en ausencia de SDS para determinar el porcentaje de desamidación (Sección 2.9.4).

2.6.3 Efecto de los materiales de envase en la fotoestabilidad de estrés del EGFhr liofilizado

La susceptibilidad a la exposición a la luz blanca/UV de la formulación liofilizada de EGFhr se evaluó en una fotocámara 424/CF (Nova EticaTM, Brasil), equipada con una lámpara fluorescente en el UV cercano (15 W) con distribución espectral entre 320 y 400 nm y varias lámparas de luz fluorescente blanca

(15 W). El experimento se realizó a 25 ± 2 °C/ 60 ± 5 % de humedad relativa según la opción 2 de la guía de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) (Q1B, 1996). Los grupos de tratamiento fueron:

- (i) En el envase primario: viales de vidrio de borosilicato neutro claro, calidad hidrolítica tipo I (6R), cerrados con tapones para liofilización de 20 mm de bromobutilo y sellados con sellos de aluminio y plástico Flip-Off de 20 mm.
- (ii) En el envase secundario: caja plegable de cartón ondulado de 220 g/m^2 con barniz UV.
- (iii) Control en la oscuridad: el producto en el envase primario se cubrió con papel de aluminio para evaluar la contribución de los cambios inducidos por la temperatura en los cambios totales.

Los grupos de muestras se expusieron por un máximo de tres días a las dos fuentes de luz. Esta condición proporcionó una iluminación general de 1,13 veces, como recomienda la guía ICH ($1,2 \times 10^6 \text{ lx} \times \text{h}$) para la luz blanca y de 4,25 veces, para la energía UV integrada ($200 \text{ W} \times \text{h/m}^2$). El contenido de los viales de las muestras de los grupos de tratamiento y el control (inicio, t_0) se reconstituyeron con AI, y seguidamente se evaluaron en los ensayos de características organolépticas, RP-HPLC, SEC, SDS-PAGE, ELISA y ensayo de proliferación celular.

2.7 Estudios de estabilidad de la formulación desarrollada

Para los estudios de estabilidad se siguieron las recomendaciones de las directrices generales de la ICH (Q1A(R2), 2003; Q1D, 2003; Q1E, 2003); y lo establecido en las regulaciones del Centro Nacional para el Control de la Calidad de los Medicamentos (Regulación 21, 2008; Regulación 16, 2012). La estabilidad del producto se evaluó en los ensayos de esterilidad, pirógenos, seguridad general, características organolépticas, pH, osmolaridad, humedad residual, RP-HPLC, SEC, SDS-PAGE, concentración de proteínas, ELISA y ensayo de proliferación celular. Los ensayos mencionados se validaron para el control de calidad y estudios de estabilidad (Gerónimo y cols., 2006; Moya y cols., 2011).

2.7.1 Estabilidad del formulado a granel

La estabilidad de tres lotes a escala piloto del granel (800 mL) de la formulación seleccionada, conteniendo 25 y 250 $\mu\text{g/mL}$ de EGFhr, se evaluó después de almacenar el producto durante siete días a 5 ± 3 °C. Los lotes se envasaron en frascos de vidrio de borosilicato y se cerraron con tapa de rosca (Tabla 2.2). Las muestras del granel de EGFhr se evaluaron al inicio (t_0) y después del almacenamiento.

2.7.2 Estabilidad acelerada y de vida de estante de la formulación liofilizada

Para los estudios de estabilidad acelerada y de vida de estante se emplearon tres lotes a escala piloto (800 viales/lote) de la formulación liofilizada de EGFhr para las dos presentaciones extremas, 25 y 250 $\mu\text{g/vial}$. En el estudio de estabilidad acelerada, las muestras se almacenaron a 25 ± 2 °C/ 60 ± 5 % de

humedad relativa en una incubadora KBF 115 y se analizaron en el momento de la liberación y después de tres y seis meses. Para el estudio de vida de estante, las muestras se colocaron en cámara fría con temperatura controlada de 5 ± 3 °C (sin control de la humedad relativa), y se analizaron periódicamente en el momento de la liberación y después de 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses.

2.7.3 Estabilidad del reconstituido

Los viales de la formulación liofilizada con 25 y 75 µg/vial de EGFhr, lotes producidos a escala piloto, se reconstituyeron bajo condiciones asépticas con 5,0 mL de AI o SSF. De esta forma se obtuvieron dos concentraciones: 5 y 15 µg/mL, que cubren el rango utilizado en la práctica clínica (Berlanga y cols., 2013; López-Saura y cols., 2013). Para t_0 , y como referencia, el contenido de los viales se resuspendió en 1,0 mL de AI y se analizó. Los viales reconstituídos con 5,0 mL de AI o SSF se analizaron después de almacenados durante 24 h a 5 ± 3 °C. Para cada presentación se utilizaron dos lotes frescos (con menos de tres meses de almacenamiento) y dos envejecidos (después de almacenado durante 20 a 24 meses a 5 ± 3 °C).

2.8 Ensayos de caracterización físico-química de las formulaciones. Instrumentos, técnicas y procedimientos

2.8.1 Análisis térmico diferencial y de impedancia eléctrica

Las evaluaciones de la formulación por análisis térmico diferencial (ATD) e impedancia eléctrica se realizaron en un equipo Lyotherm2 (Biopharma Technology Ltda, Reino Unido). La muestra se congeló por inmersión del bloque de enfriamiento/calentamiento en un recipiente con nitrógeno líquido, el calentamiento se inició una vez que se equilibraron las temperaturas del bloque, muestra y referencia. Las determinaciones se realizaron durante la etapa de calentamiento con el fin de evitar el error que puede ocasionar la determinación durante la congelación. Se reporta el valor medio de tres réplicas.

2.8.2 Liomicroscopía criogénica

Las muestras líquidas de las formulaciones se evaluaron en un liomicroscopio criogénico (Biopharma Technology Ltda, Reino Unido). Un volumen de 2 µL de las formulaciones se aplicó entre dos cubreobjetos en el conductor térmico y se selló dentro de la estación. Las muestras se enfriaron hasta -50 °C a una velocidad de 5,0 °C/min. A continuación, se inició un vacío dentro de la cámara que se mantuvo a aproximadamente 8,0 Pa. Posteriormente la muestra se calentó hasta 25 °C a 1,0 °C/min. Durante el experimento se registró la presión, con ayuda de un manómetro tipo Pirani, integrado al equipo. La temperatura a la cual se detectó el primer cambio estructural se denomina temperatura de

inicio de colapso (T_{ic}), y la temperatura a la cual se apreció un cambio estructural en todo el producto se denomina temperatura de colapso completo. El valor experimental fue el promedio de tres réplicas.

2.8.3 Determinación del contenido de humedad residual de los liofilizados

Se utilizó el método de titulación coulométrica de Karl Fischer, empleando un instrumento modelo TIM550 (Radiometer Analytical, Francia) y siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea de EE.UU (USP) (USP<921>, 2008). Se realizaron entre tres y cinco réplicas por muestra. Se reporta el valor medio de las determinaciones.

2.8.4 Determinación de la temperatura de transición vítrea

Se empleó un calorímetro diferencial de barrido (DSC), modelo MDSC 2920 (TA Instruments, EE.UU.), equipado con un accesorio de enfriamiento. Para la calibración se utilizó Indio “In” como estándar. Se pesaron $15 \pm 0,5$ mg de las muestras liofilizadas en cacerolas de aluminio, y se sellaron con tapas de aluminio, a las cuales se les abrieron agujeros para permitir que cualquier material volátil que evolucione de las muestras pueda escapar, y se colocaron en el equipo. Se calentaron las muestras bajo purga de nitrógeno, hasta pasar la T_g , a una velocidad de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sobre el rango de temperatura de 25 a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, la muestra se enfrió a aproximadamente $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se recalentó nuevamente a la misma velocidad y rango de temperatura para medir la T_g en el segundo barrido. La T_g reportada fue el valor de la temperatura en el punto medio de la inflexión del paso de la línea de base de la curva de DSC.

2.8.5 Características organolépticas y tiempo de reconstitución

La apariencia de la pastilla liofilizada se inspeccionó visualmente para detectar la presencia de partículas o cambio de color. El producto se observó en un gabinete de revisión con fondo blanco y negro, con lámpara fluorescente de 20 W (CIGB, Cuba). A continuación, el producto se reconstituyó con $5,0\text{ mL}$ de AI o SSF, en una cabina de bioseguridad, utilizando jeringuillas desechables estériles (Fisher Scientific, EE.UU.). El tiempo de reconstitución fue el transcurrido desde la adición del solvente hasta la obtención de una solución disuelta y clara. Después de la reconstitución, las muestras se inspeccionaron visualmente para detectar la presencia de partículas, y la transparencia o el cambio de color de la solución. La observación se realizó durante $5,0\text{ s}$ en el mismo gabinete de revisión descrito, girando la unidad en todos los sentidos sobre cada una de las superficies, blanca y negra. Se consideró aceptable una solución clara, incolora, sin residuos visibles como materia no disuelta. Se emplearon cinco viales por preparación, y para los estudios de estabilidad acelerada y de vida de estante 20 viales por lote en cada evaluación.

2.8.6 Conteo de partículas subvisibles

La concentración de partículas de tamaño mayor o igual que 10 y que 25 μm se determinó en un sistema de recuento electrónico de partículas, mediante el método de oscurecimiento de la luz, empleando un equipo KL-04 (RION Co. LTD., Japón). Los límites máximos aceptables de partículas fueron de 6 000 y de 600 por unidad de volumen para partículas mayor o igual que 10 μm y que 25 μm , respectivamente (USP<788>, 2008). Se tomaron siete viales del producto liofilizado y a cada vial se le inyectó 5,0 mL de AI, luego se colocaron 30 mL de la muestra reconstituída en la celda y se determinaron los conteos de partículas. Después de cada medición, para evitar la contaminación cruzada, el sistema se lavó con porciones de 5,0 mL de agua exenta de partículas.

2.8.7 pH

El pH se determinó empleando un medidor de pH calibrado, PHM220 (Radiometer Analytical, Francia) según se ha descrito (USP<791>, 2008). El valor experimental fue el promedio de tres réplicas.

2.8.8 Osmolaridad

La osmolaridad se determinó mediante la técnica del punto de congelación, utilizando un semimicro osmómetro, modelo K-7400 (Knauer, Alemania). Como referencia se utilizó un patrón de 290 mOsm/kg suministrado por el fabricante y AI como control. Para la medición se añadieron 150 μL de cada muestra a la celda de vidrio del equipo. Se evaluaron tres réplicas por muestra.

2.8.9 Concentración de carbohidratos totales

La concentración de carbohidratos totales se determinó de forma espectrofotométrica, mediante la reacción de la antrona, según se ha descrito (Umbreit y Burris, 1960). Las lecturas de absorbancia de las muestras y patrones fue a 585 nm en un espectrofotómetro modelo Ultrospec 3 300 pro (Amersham-Pharmacia Biotech, Suecia). Como referencia para la cuantificación, las muestras se ensayaron en paralelo con una curva de concentraciones de un MRT de glucosa (Tabla 2.3). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.9 Ensayos de caracterización físico-química del EGFhr. Instrumentos, técnicas y procedimientos

2.9.1 Absorbancia a 280 nm

La concentración de EGFhr se determinó por el método de absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción másico ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 30,9 \text{ mL/mg} \times \text{cm}$) determinado en el tampón acetato de sodio (0,1 M, pH 5,6) (Carpenter y Cohen, 1979). Para las mediciones de absorbancia, las muestras se transfirieron a cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso (Hellma Analitics, Alemania). La lectura de

absorbancia se realizó en un espectrofotómetro U-3300 (Hitachi, Japón). Se realizaron tres réplicas por muestra.

2.9.2 Concentración de proteínas por el método de Bradford

La concentración de EGFhr se determinó por el método de Bradford según se ha descrito (Bradford, 1976), utilizando el reactivo suministrado por la firma comercial (Bio-Rad, EE.UU.). Como referencia para la cuantificación, las muestras se evaluaron en paralelo con una curva de concentraciones de un MRT de albúmina de suero bovino (Tabla 2.3). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.9.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio

Para la SDS-PAGE se empleó el sistema de solución tampón Tris/tricina, según el método descrito (Schägger y von Jagow, 1987). Se analizaron 10 µg de proteína de cada muestra por triplicado. Las muestras se prepararon en el tampón de ensayo (Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, 2,0 % m/v de SDS, 5,0 % v/v de glicerol, 0,33 M de ditioneitol, 25 % v/v de β-mercaptoetanol y 0,005 % m/v de bromofenol azul). Las muestras se calentaron durante 15 min a 95 °C. La corrida se realizó a 40 V hasta que las muestras abandonaron el gel concentrador y a partir de entonces a 90 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. Las bandas de proteínas se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie coloidal (Invitrogen Ltd., Reino Unido). Los geles se registraron en un densitómetro Modelo GS-800 (Bio-Rad, EE.UU.). Esta imagen se procesó para determinar el porcentaje de pureza mediante el programa Melanie, v5.02 (GeneBio, Suiza). Se utilizó un patrón de M_M compuesto por: aprotinina (6 511 g/mol), lisozima (14 300 g/mol), inhibidor de tripsina de soya (20 100 g/mol), anhidrasa carbónica (29 000 g/mol), ovoalbúmina (43 500 g/mol), albúmina de suero bovino (67 000 g/mol) y β-galactosidasa (116 300 g/mol).

2.9.4 Cuantificación de la desamidación mediante electroforesis en ausencia de SDS

Para la electroforesis de proteínas en ausencia de SDS se empleó el sistema de solución tampón histidina/MOPS, según el método descrito (Ramos y cols., 2011). Se analizaron 6 µg de proteína de cada muestra por triplicado. Las muestras se prepararon en el tampón de ensayo: histidina/HCl 0,15 M, pH 5,0 que contenía 5,0 % v/v de glicerol y 0,005 % m/v de bromofenol azul. El experimento duró aproximadamente 45 min, a 25 °C y corriente constante de 20 mA. La corrida se interrumpió cuando el bromofenol azul alcanzó el extremo inferior del gel. Los geles se tiñeron siguiendo el procedimiento de tinción con Coomassie (Neuhoff y cols., 1988). Los geles se registraron en un densitómetro Modelo GS-800 (Bio-Rad, EE.UU.). Las imágenes se analizaron con el programa Melanie, v5.02 (GeneBio, Suiza). Después de la detección automática, la región considerada para la cuantificación se editó manualmente hasta la línea de fondo del gel. El porcentaje de pureza se calculó a partir del volumen

óptico de la banda. Como control de EGFhr desamidado en la Asn¹ se utilizó una preparación que se obtuvo por el mismo proceso que el EGFhr expresado en *Saccharomyces cerevisiae*, pero donde el codón de la Asn¹ se cambió por mutagénesis dirigida por uno de Asp (Investigaciones Biomédicas, CIGB).

2.9.5 Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa

Se empleó un sistema compuesto por dos bombas L-7100, un detector de arreglo de diodo D-7455, un horno L-7350 y una interfaz D-7000 (Merck-Hitachi, Alemania). Las especies se separaron en una columna de poro amplio (C₈) (5 µm, 250 × 4,6 mm) Vydac (Hesperia, EE.UU.). Los solventes y gradientes fueron: A, 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA) acuoso; B, 0,05 % TFA en acetonitrilo (20 a 40 % de B en 28 min). La velocidad de flujo fue de 1,0 mL/min y la temperatura de trabajo de 34 ± 2 °C. La señal se detectó a 226 nm. Se evaluaron dos réplicas por muestra. Los datos se analizaron y procesaron con ayuda del programa Multi HSM v4.1 (Merck-Hitachi, Alemania). Los picos se seleccionaron de forma manual y la integración fue valle a valle. El tiempo de retención relativo (trr) se calculó por la expresión:

$$\text{trr} = [(\text{tiempo de retención del EGFhr modificado})/(\text{tiempo de retención del EGFhr}_{1-52})] \quad [2.1]$$

2.9.6 Cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular

La separación en SEC fue en el mismo sistema descrito utilizando una columna Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia). Las condiciones cromatográficas fueron: 0,1 M NaPO₄/0,5 M arginina-HCl a pH 6,5 como fase móvil, la velocidad de flujo fue constante entre 0,4 y 0,5 mL/min, y la temperatura de trabajo de 25 ± 2 °C. La señal se detectó a 280 nm y la corrida duró entre 45 y 55 min. Se evaluaron dos réplicas por muestra. La M_M se determinó a partir de un patrón de M_M (Bio-Rad, EE.UU.), compuesto por tiroglobulina de bovino (670 000 g/mol), gammaglobulina de bovino (158 000 g/mol), ovoalbúmina (44 000 g/mol), mioglobina de caballo (17 000 g/mol) y vitamina B-12 (1 350 g/mol).

2.9.7 Desalado de las muestras

De las diferentes muestras, el volumen correspondiente a 50 µg de EGFhr se diluyó con 1 mL de una solución acuosa de ácido fórmico al 0,2 % v/v. Luego, se desaló empleando cartuchos Sep-Pak® Light C8 (Waters, EE.UU.) activados y equilibrados según las instrucciones del fabricante. La proteína retenida en la columna se lavó con 3,0 mL de una solución acuosa de ácido fórmico 0,2 % v/v, y se eluyó en un volumen de 1,0 mL de una solución de acetonitrilo al 60 % en agua que contenía ácido fórmico al 1,0 % v/v.

2.9.8 Hidrólisis ácida parcial de la proteína

El volumen correspondiente a 50 µg de EGFhr se concentró junto con 50 µL de una solución de cloruro de guanidinio 6,0 M en una centrifuga evaporadora a vacío "Speed vac" (Savant, EE.UU.). Seguidamente,

la muestra se disolvió en 50 μL de ácido clorhídrico 0,03 M. La solución se transfirió a un vial de cristal (Pierce, EE.UU.), se eliminó el aire por evacuación al vacío y se calentó durante 9 h, la temperatura se mantuvo constante a 104 $^{\circ}\text{C}$ en una estufa (Mettler, Alemania). El hidrolizado se desaló empleando una microcolumna ZipTip C18 (Millipore, EE.UU.), equilibrada según las instrucciones del fabricante. Los péptidos fueron eluidos en tres μL de acetonitrilo al 60 % en agua para inyección que contenía 1,0 % v/v de ácido fórmico, se aplicaron en un microcapilar de borosilicato recubierto de un material conductor (Thermo Scientific, EE.UU.) y se analizaron en ESI-MS (Besada y cols., 1990).

2.9.9 Espectrometría de masas

Los espectros ESI-MS se obtuvieron en un espectrómetro de configuración híbrida ortogonal QTOF-2 (Micromass, Reino Unido) con fuente de ionización por electronebulización. El analizador se calibró empleando una mezcla de sales de yoduros de sodio y de cesio (Sigma, EE.UU.) como referencia en un rango amplio de M_M (50-2 000 g/mol). Los espectros ESI-MS se obtuvieron al aplicar un voltaje de 900 y 35 V en el capilar y en el cono de entrada del espectrómetro de masas, respectivamente.

2.9.10 Dispersión dinámica de la luz y potencial Z

Las determinaciones de las distribuciones de tamaño de partículas se realizaron en un Nano Zetasizer (Malvern Instruments, Reino Unido). El potencial Z de la proteína se midió en el mismo instrumento. Las dos mediciones se realizaron empleando cubetas desechables de pequeño volumen a 25 ± 2 $^{\circ}\text{C}$. El valor experimental fue el promedio de tres réplicas para cada ensayo. Las muestras contenían 0,5 mg/mL de EGFhr en tampón acetato de sodio (pH 4,0-5,0) y en fosfato de sodio (pH 6,0-8,0). Para el análisis de los datos se empleó el programa DTS v5.10. El diámetro hidrodinámico de las especies principales presentes en la solución, evaluado por la distribución por volumen, se estimó mediante análisis multimodal a partir de la distribución de tamaños por intensidad.

2.9.11 Espectroscopía de dicroísmo circular en el UV lejano y estructura secundaria

Los espectros de CD en el UV lejano (190-250 nm) se colectaron en un espectropolarímetro (Jasco Inc., Japón) utilizando una celda de cuarzo. Todos los espectros se colectaron después de cuatro corridas de acumulación a una concentración de EGFhr de 50 μM . El efecto del fondo se eliminó después de suavizar la señal mediante la técnica de filtración de la transformada rápida de Fourier, y de la substracción de los espectros de los tampones. El contenido de estructura secundaria se calculó a partir de la deconvolución de los espectros de CD mediante el programa CONTINLL (Provencher y Glöckner, 1981; Sreerama y cols., 2000).

2.9.12 Espectroscopía de fluorescencia intrínseca del triptófano

La fluorescencia intrínseca del triptófano en las muestras de EGFhr se estudió en un espectrofluorímetro LS 50 (Perkin Elmer, EE.UU.) empleando cubetas de cuarzo. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm, y los espectros de emisión se colectaron entre 305 y 405 nm. La abertura para el paso de la luz para la excitación y emisión se fijó a dos nm, y la velocidad de barrido para la colección de los espectros a 100 nm/min. Los espectros de los blancos se sustrajeron a los de las muestras correspondientes, y se utilizó el promedio de la acumulación de tres barridos. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

2.10 Ensayos de caracterización inmunoquímica y biológica del EGFhr. Instrumentos, técnicas y procedimientos

2.10.1 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida

Este método permite la cuantificación del EGFhr mediante un ELISA tipo sandwich de dos sitios (Freyre y cols., 1989; Vázquez y cols., 1990). En este ensayo, el EGFhr es reconocido por un anticuerpo monoclonal de captura (CB-EGF.1) unido a una superficie sólida y por otro anticuerpo monoclonal (CB-EGF.2) de revelado unido covalentemente a la enzima peroxidasa, cuya presencia se determina por la adición del sustrato de la enzima. La lectura de las absorbancias se realizó a 492 nm en un lector de placas Sensident Scan (Merck, Alemania). Como referencia para la cuantificación, las muestras se evaluaron en paralelo con una curva de concentraciones (entre 10,0 y 0,32 ng/mL) de un MRT (Tabla 2.3). Se evaluaron dos réplicas en forma de curvas para el MRT y las muestras. El recobrado por ELISA después de la liofilización se calculó usando la expresión 2.2:

$$\text{Recobrado (\%)} = \frac{\text{Concentración de EGFhr por ELISA después de la liofilización}}{\text{Concentración de EGFhr por ELISA antes de la liofilización}} \times 100 \quad [2.2]$$

Las curvas dosis-respuesta se construyeron directamente al graficar los valores de absorbancia a 492 nm frente al logaritmo de la concentración de EGFhr.

2.10.2 Ensayo de proliferación celular

Este ensayo se basa en la propiedad del EGFhr para estimular la proliferación de las células de la línea BALB/c 3T3 A31 de fibroblastos de ratón (ECACC, Reino Unido). Se sembraron $1,5 \times 10^3$ células/pocillo en medio DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium) (Gibco BRL, EE.UU.), que contenía 5,0 % v/v de suero fetal bovino (Gibco BRL, EE.UU.). La siembra se realizó a 100 µL/pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar, EE.UU.), y la incubación a 25 ± 2 °C durante 24 h. A continuación, las células se lavaron e incubaron con medio DMEN durante 24 h para que las células alcancen un estado quiescente.

Materiales y métodos

Posteriormente se adicionan diferentes concentraciones del MRT y de las muestras problema de EGFhr (diluidas en DMEM), y se incubó la placa otras 24 h. Las células viables se tiñieron con cristal violeta, y las absorbancias a 578 nm se leyeron en un lector de microplacas Sensident Scan (Merck, Alemania). Los resultados se expresaron en UI/mL, por comparación con el MRT (Tabla 2.3). La actividad biológica del EGFhr se calculó procesando las lecturas de absorbancia a 578 nm, a través de un programa estadístico de líneas paralelas (Finney, 1964). El valor reportado fue la media geométrica de 3-5 ensayos independientes. El recobrado de la actividad biológica después de la liofilización se calculó utilizando la expresión 2.3:

$$\text{Recobrado (\%)} = \frac{\text{Actividad biológica del EGFhr después de la liofilización}}{\text{Actividad biológica del EGFhr antes de la liofilización}} \times 100 \quad [2.3]$$

El cálculo del porcentaje de máxima estimulación del EGFhr en las muestras, a una concentración prefijada (Ci), se realizó a partir de las lecturas de absorbancia a 578 nm (A), mediante la ecuación 2.4:

$$\% \text{ estimulación máxima (Ci)} = \frac{A(Ci) - A(\text{blanco})}{A(10 \text{ ng/mL}) - A(\text{blanco})} \times 100 \quad [2.4]$$

Donde A (Ci) es la absorbancia de la muestra con concentración Ci de EGFhr, A (blanco) es la absorbancia de la muestra sin EGFhr, y A (10 ng/mL) es la absorbancia de la muestra con la máxima concentración de EGFhr evaluada en la curva. Las curvas dosis-respuesta se construyeron al graficar el porcentaje de estimulación máxima frente al logaritmo de la concentración de EGFhr. Los valores de la concentración efectiva al 50 % (CE₅₀) se calcularon a partir de las curvas dosis-respuesta mediante el análisis de regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism, v5.02 (GraphPad Software Inc., EE.UU.).

La actividad específica del EGFhr en ensayo de proliferación celular es definida por la expresión 2.5:

$$\text{Actividad específica (UI/mg)} = \frac{\text{Ensayo de proliferación celular (UI/mL)}}{\text{Concentración teórica de EGFhr (mg/mL)}} \quad [2.5]$$

2.10.3 Pirógenos

La prueba se realizó según se ha descrito (USP<151>, 2008), en conejos (línea Chinchilla Bastards, macho) utilizando una dosis de 10 µg de EGFhr/kg de peso del animal.

2.10.4 Seguridad general

La toxicidad anormal se evaluó según el procedimiento descrito (Ph.Eur.<2.6.9>, 2003), en ratones macho de la línea NMRI y en curieles albinos Hartley utilizando dosis única de la formulación con 25 o 75 µg de EGFhr/animal.

2.10.5 Esterilidad

La prueba se realizó por el método de filtración por membrana según se ha descrito (USP<71>, 2008). La prueba se basó en la filtración de la formulación que se evalúa a través de membranas estériles de nitrato de celulosa de 0,45 µm. Se utilizó un volumen de 20 mL de muestra. Una membrana se incubó en un medio fluido de tioglicolato a 30-35 °C y la otra en caldo de triptona de soya a 20-25 °C por no menos de 14 días. El contenido de los dos recipientes se examinó regularmente para detectar signos de crecimiento microbiano (desarrollo de turbidez o crecimiento sobre la superficie) durante los 14 días. La prueba de esterilidad solo fue satisfactoria cuando no se observó crecimiento microbiano.

2.11 Metodologías de cálculo y análisis estadísticos

2.11.1 Análisis cinéticos

Para los análisis cinéticos, primero se calculó el porcentaje de EGFhr remanente determinado por los diferentes ensayos según la ecuación 2.6. Los ensayos utilizados fueron el área determinada por RP-HPLC y SEC; la concentración de EGFhr por ELISA y la actividad biológica en ensayo de proliferación celular.

$$\text{EGFhr remanente (\%)} = \frac{\text{Valor del ensayo de EGFhr en el tiempo de incubación } t}{\text{Valor del ensayo de EGFhr en el inicio } (t_0)} \times 100 \quad [2.6]$$

La constante de velocidad de la reacción de degradación observada (K_{obs}), se determinó a partir de la ecuación 2.7, graficando el logaritmo neperiano (\ln) del porcentaje de EGFhr remanente frente al tiempo (proceso de primer orden). Los valores de K_{obs} coinciden con las pendientes de las líneas rectas para cada condición evaluada. Los análisis cinéticos de los estudios se presentan en los anexos del 4 al 9 y 11.

$$\ln [\text{EGFhr remanente (\%)}] = - K_{\text{obs}} \times t \quad [2.7]$$

A partir de los valores de los porcentajes de desamidación (según la ecuación 2.8) en función del tiempo se determinó mediante ajuste de regresión lineal la pendiente de la recta. El valor de la pendiente coincide con la K_{obs} de desamidación (Asn^1). Los análisis cinéticos de desamidación del EGFhr se presentan en el anexo 12.

$$\% \text{ EGFhr-Desamidado } (\text{Asn}^1) = \frac{\text{Volumen de la mancha correspondiente al EGFhr-Desamidado}}{\text{Sumatoria de los volúmenes de todas las manchas detectadas}} \times 100 \quad [2.8]$$

2.11.2 Cálculo de las masas moleculares teóricas de las variantes de enlaces de disulfuro

Las masas moleculares monoisotópicas teóricas de los iones multicargados de cada una de las variantes peptídicas originadas por la formación de enlaces de disulfuro incorrectos se calcularon mediante el programa MassLynx v3.5 (Micromass, Reino Unido). Para dicho propósito primeramente se obtuvo la composición elemental de cada uno de los péptidos detectados durante la hidrólisis ácida parcial de la molécula y se consideraron todas las posibles combinaciones de enlaces de disulfuro entre los péptidos que contienen residuos de cisteínas. También se consideró que la formación de cada uno de estos enlaces conlleva a la pérdida de dos átomos de hidrógeno. Además, se buscaron posibilidades que implicasen la formación de tioles libres al no enlazarse dos residuos de cisteínas. La composición elemental de cada una de las variantes se calculó con el programa Scrambling (CIGB, Cuba).

2.11.3 Cálculos de estructura secundaria del EGFhr mediante modelación molecular

Las estructuras secundaria del EGFhr se asignaron a partir de la estructura cristalográfica del complejo EGFhr-Receptor PDB ID: 1IVO (Ogiso y cols., 2002). El contenido de estructura secundaria se calculó con el programa WHAT_IF (Vriend, 1990). La metodología de los índices de corrimientos químicos también se utilizó para calcular la estructura secundaria del EGFhr (Wishart y Sykes, 1994), para lo cual se emplearon los datos de los corrimientos químicos informados para esta proteína a pH fisiológico (Huang y cols., 2010). Para estos cálculos de estructura secundaria se utilizó el programa CSI 2.0 (Hafsa y Wishart, 2014).

2.11.4 Evaluaciones estadísticas

Para el análisis de correlación entre los ensayos de proliferación celular y ELISA se utilizaron los resultados de las muestras evaluadas en los estudios de estrés. La correlación se evaluó con el método de las puntuaciones estandarizadas, haciendo las transformaciones que aparecen en las ecuaciones 2.9 y 2.10. Finalmente se calculó el coeficiente de correlación de Pearson mediante la ecuación 2.11.

$$Z_x = (X - \bar{X})/S_x \quad [2.9]$$

$$Z_y = (Y - \bar{Y})/S_y \quad [2.10]$$

$$r_{xy} = (\sum Z_x \times Z_y) / N \quad [2.11]$$

Donde X y Y son los resultados de proliferación celular y ELISA,

\bar{X} y \bar{Y} los valores medio,

S_x y S_y las desviaciones estándar, y

N el número de determinaciones.

Materiales y métodos

Esta función examina cada pareja de mediciones (una de ELISA y la otra de proliferación celular) para determinar si existe alguna relación con el movimiento de las variables.

Los cálculos de las K_{obs} fueron realizados mediante análisis de regresión lineal, empleando el programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft, EE.UU.). Los valores de la K_{obs} fueron considerados estadísticamente diferentes, cuando el intervalo de confianza del 95 % de la muestra de referencia no contiene el valor estimado de la muestra a comparar, y el intervalo de confianza del 95 % de la muestra a comparar no contiene el valor estimado de la muestra de referencia.

Los resultados de los ensayos cuantitativos del estudio de fotoestabilidad se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphic Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., EE.UU.). Las diferencias fueron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Los datos de estabilidad acelerada y de vida de estante se analizaron mediante técnicas de regresión, para conocer si las variaciones de los parámetros fueron estadísticamente significativas o no (Sanford y Bon, 1997). Primero se calcularon las pendientes para cada lote. A continuación, para conocer si las pendientes de una misma presentación eran o no estadísticamente diferentes (el nivel de significación fue de 0,25), se compararon las pendientes de los lotes de una misma presentación. Cuando no se detectaron diferencias entre las pendientes se realizó una prueba para determinar si los interceptos eran diferentes o no. Cuando las pendientes no fueron diferentes pero los interceptos sí, las regresiones se agruparon para obtener una regresión de pendiente común. Cuando ni las pendientes ni los interceptos fueron estadísticamente diferentes, se agruparon las regresiones para obtener una regresión con pendiente común e intercepto común. A continuación, se compararon la regresión de pendiente común y la de pendiente común e intercepto común para cada presentación, siguiendo los mismos procedimientos utilizados para la comparación de los lotes. El último paso fue la investigación de la significación de las pendientes de regresión común ($\alpha = 0,05$). En todos los casos se asumió un modelo cinético de primer orden. Para estos análisis de regresión se empleó el programa DegTest (Registro 1486-2004 del Centro Nacional de Derechos de Autor, Cuba).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudios de degradación forzada del EGFhr en solución acuosa

Los estudios de estrés se realizaron para conocer el perfil de degradación de la molécula, establecer las mejores condiciones de almacenamiento y evaluar el carácter indicativo de estabilidad de los métodos analíticos. Las condiciones de estrés aplicadas fueron la combinación de valores extremos de pH y calor, la presencia de agente oxidante y la fotólisis.

3.1.1 Estrés por combinación de pH extremo y calor

En general, el análisis por RP-HPLC se considera un buen método para la detección de los cambios químicos en los péptidos y las proteínas (Atanu Kumar, 2012). En particular, se plantea que el RP-HPLC es un método indicativo de la estabilidad química del EGFhr (Araki y cols., 1989; Senderoff y cols., 1994).

El perfil de RP-HPLC del EGFhr utilizado como muestra control presenta dos especies (Figura 3.1), que se corresponden con el EGFhr₁₋₅₁ con trr de 0,80, y el EGFhr₁₋₅₂ con trr de 1,0 (Besada y cols., 1990; Anexo 2). Los perfiles de RP-HPLC de las muestras calentadas durante cuatro días a 50 °C a diferentes valores de pH muestran nuevas señales que se corresponden con la aparición de productos de degradación del EGFhr, esto evidencia que esta proteína es muy sensible a la degradación después de la exposición a 50 °C en solución a pH tanto ácido como básico, e incluso a pH neutro. Los niveles de degradación, según el pH, fueron: pH 9,0 > pH 3,0 > pH 7,0. En el anexo 3 se muestran los valores de los porcentajes de EGFhr₁₋₅₁, EGFhr₁₋₅₂ y de los productos de degradación presentes en cada muestra, determinados por RP-HPLC antes y después de los tratamientos de estrés.

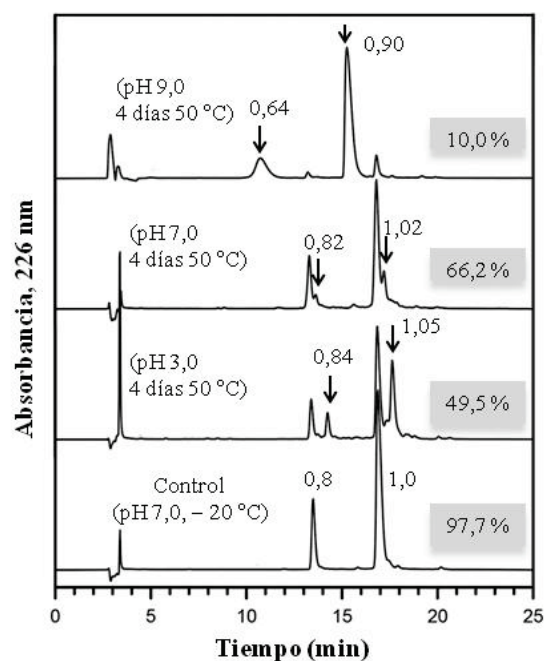


Figura 3.1. Perfiles de RP-HPLC del EGFhr después de la aplicación del estrés por combinación de pH extremo y calor. Las especies se separaron en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrilo/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min. Las flechas indican la aparición o el incremento de señal de algunas fracciones con respecto al control con su correspondiente valor de trr. En los cromatogramas se muestran entre paréntesis las condiciones de estrés empleadas. Encima de cada cromatograma y sombreado se presentan los porcentajes de EGFhr no modificado remanente.

Resultados y discusión

La SDS-PAGE se utilizó para determinar la agregación y la fragmentación del EGFhr en función del pH después de la exposición a 50 °C. En este ensayo, en la muestra incubada a pH 3,0 (carrilera 3 en las figuras 3.2 a y b) se detectó una disminución en la intensidad de la señal de la banda de EGFhr comparado con la muestra control (pH 7,0; -20 °C) que aparece en la carrilera 6, tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Figura 3.2 a y b). En las muestras a pH 7,0 y 9,0 después de calentadas no se detectaron cambios en comparación con el grupo control, tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Figura 3.2). En las condiciones evaluadas no se detectó la formación de agregados.

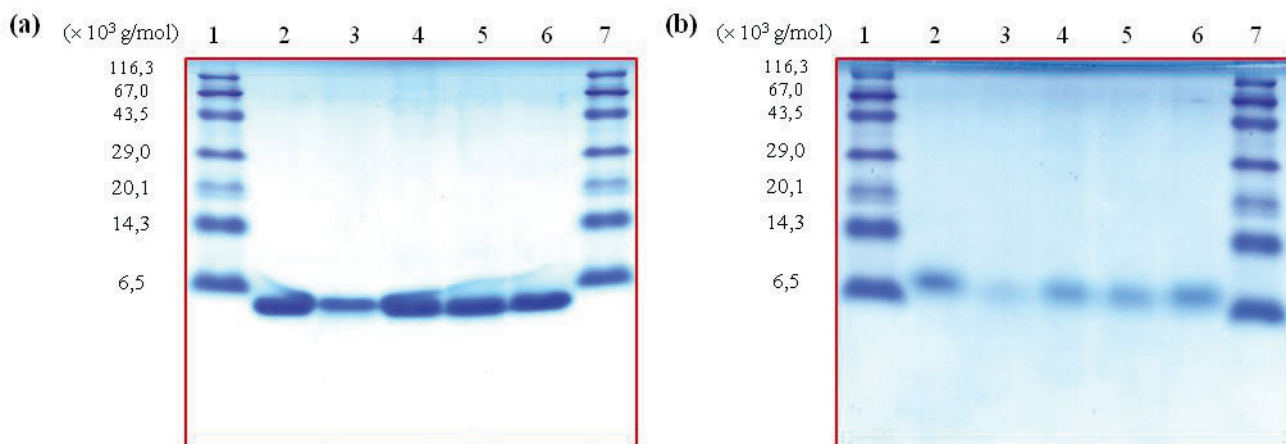


Figura 3.2. Patrones de SDS-PAGE del EGFhr después de la aplicación del estrés por combinación de pH extremo y calor. (a) Condiciones reductoras, y (b) condiciones no reductoras. Las especies se separaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 16,5 % en el sistema tampón Tris-tricina. La detección se realizó mediante tinción con azul de Coomassie. Carriles 1 y 7: marcador de M_M ; carriles 2 y 6: Control (pH 7,0; -20 °C); carril 3: pH 3,0; carril 4: pH 7,0 y carril 5: pH 9,0. Las muestras de los carriles 3, 4 y 5 fueron calentadas durante cuatro días a 50 ± 2 °C.

Se ha descrito que la aplicación de la electroforesis en ausencia de SDS permite la separación de las especies desamidadas y no desamidadas del EGFhr (Koch y cols., 1984). En el método utilizado en este estudio se empleó un sistema de solución tampón histidina/MOPS en el rango de pH (5,0-5,5) (Ramos y cols., 2011), cercano al punto isoeléctrico del EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂ (4,4), el cual acentúa las diferencias en carga eléctrica entre las especies desamidadas y no desamidadas y un aumento en la resolución de ambas especies (Yassel Ramos, CIGB, Octubre 2015, comunicación personal).

Para evitar la formación de otros productos de degradación más allá de la desamidación, las muestras en este ensayo se calentaron solamente durante un día a 50 °C. En la figura 3.3 se observa el predominio de la formación de especies básicas a pH 3,0 (banda marcada con el asterisco en el carril 3) la cual pudiera estar relacionada con la formación de un Asp-succinimida en el EGFhr debido a que esta modificación se favorece a pH ácido. En cambio, a pH 7,0 y 9,0 predominó la formación de especies ácidas en el EGFhr

Resultados y discusión

(carriles 4 y 5). A pH 7,0 y 9,0 se favoreció la intensificación de la banda con mayor migración. Esta banda fue identificada como el EGFhr desamidado en la Asn¹, por tener la misma migración que un material de referencia de un EGFhr mutado con Asp¹. Estos resultados se corresponden con los publicados para el EGFhr₁₋₄₈ en solución acuosa, donde a pH ácido predominó la formación de Asp¹¹-succinimida que es una especie básica, y a pH neutro y básico la desamidación de la Asn¹ que es una especie ácida (Senderoff y cols., 1994).

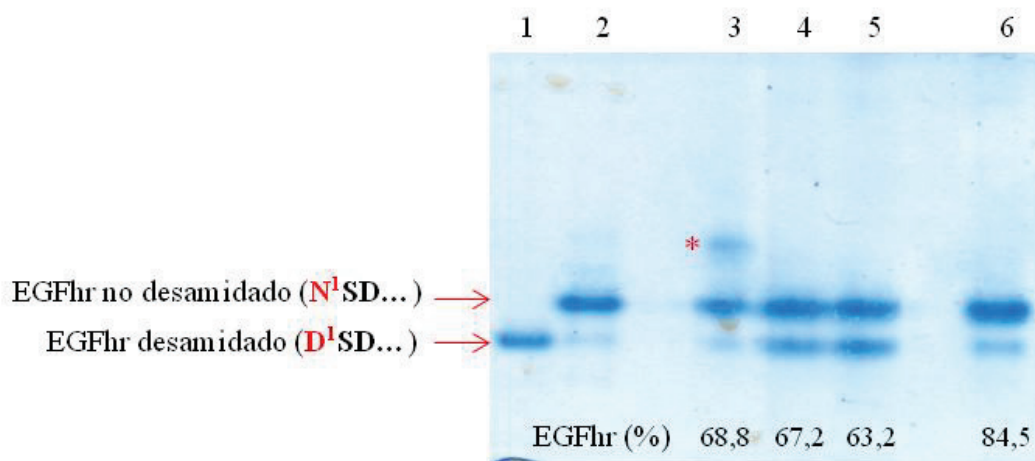


Figura 3.3. Patrones de electroforesis en ausencia de SDS empleando un gel de acrilamida/bisacrilamida al 20 % en el sistema tampón histidina/MOPS. La detección se realizó mediante tinción con azul de Coomassie. Carril 1: patrón de EGFhr desamidado; carril 2: patrón de EGFhr no desamidado; carril 3: pH 3,0; carril 4: pH 7,0; carril 5: pH 9,0 y carril 6: control (pH 7,0; -20 °C). Las muestras de los carriles 3, 4 y 5 fueron calentadas durante un día a 50 ± 2 °C. Se emplearon condiciones no reductoras. Debajo de las carrileras de las muestras estresadas y del control se presentan los porcentajes de EGFhr no modificado remanente. *Denota la formación de especies ácidas.

El porcentaje de la banda correspondiente al EGFhr no desamidado en las muestras a pH 3,0, 7,0 y 9,0 después de un día a 50 °C se redujo considerablemente en relación con el control no calentado, lo que evidencia que esta molécula es muy sensible a la degradación en solución acuosa en un amplio rango de pH (Figura 3.3).

Se describió que la alta tendencia a la polimerización por intercambio de los enlaces disulfuro es una de las principales rutas de degradación del EGFhr (Brake y cols., 1984). En este trabajo se determinó la formación correcta de los enlaces disulfuro a partir de una hidrólisis ácida de la proteína y se analizó por ESI-MS. Las muestras sometidas a estrés por combinación de pH extremo y calor se evaluaron por esta técnica para detectar posibles cambios en los enlaces por puente disulfuro en el EGFhr. Los espectros ESI-MS de las muestras calentadas durante cuatro días a 50 ± 2 °C con valores de pH de 3,0, 7,0 y 9,0 fueron muy similares a los de la muestra control (pH 7,0; -20 °C) (Figura 3.4).

Resultados y discusión

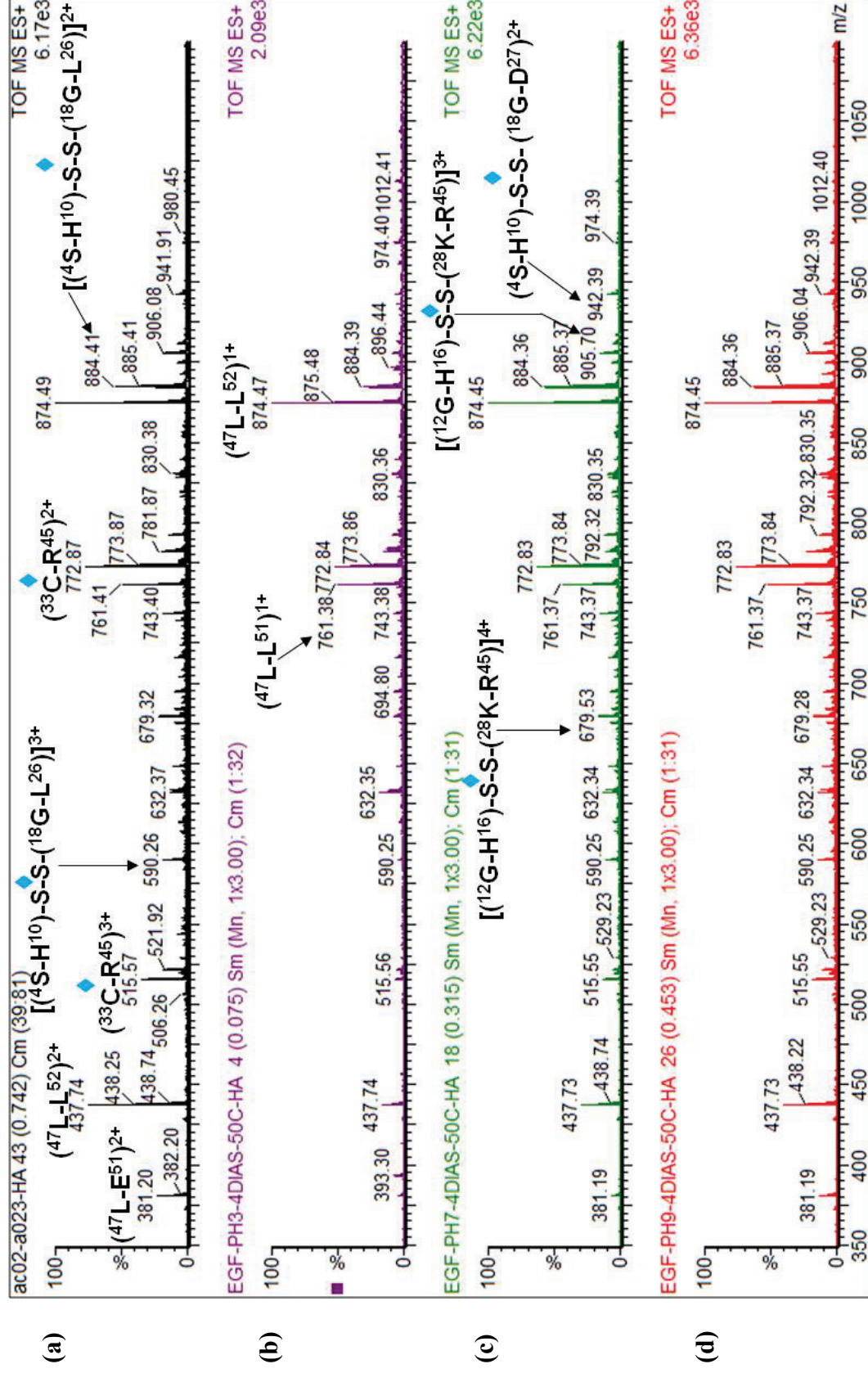


Figura 3.4. Espectros ESI-MS (350-1 100 m/z) correspondientes a la hidrólisis ácida parcial de las muestras del EGFhr después del estrés por combinación de pH extremo y exposición durante 4 días a 50 ± 2 °C. (a) control (pH 7.0; -20 °C), (b) pH 3.0, (c) pH 7.0 y (d) pH 9.0. En el espectro ESI-MS de los péptidos generados, se indican marcados con rombo los iones correspondientes a los péptidos que contienen las cisteínas unidas por enlaces disulfuro.

Resultados y discusión

Los iones con relación masa/carga (m/z) 884,10 y 942,39 de los péptidos $[(^4\text{S-H}^{10})\text{-S-S-}(^{18}\text{G-L}^{26})]^{2+}$ y $[(^4\text{S-H}^{10})\text{-S-S-}(^{18}\text{G-D}^{27})]^{2+}$ se corresponden con las señales asignadas a dos péptidos ($^4\text{S-H}^{10}$) con ($^{18}\text{G-L}^{26}$) y ($^4\text{S-H}^{10}$) con ($^{18}\text{G-D}^{27}$), respectivamente, enlazados mediante un enlace disulfuro intermolecular entre las Cys⁶-Cys²⁰. El ión m/z 679,53 del péptido $[(^{12}\text{G-H}^{16})\text{-S-S-}(^{28}\text{K-R}^{45})]^{4+}$ se asignó a los péptidos enlazados mediante un enlace disulfuro intermolecular que une a las Cys¹⁴-Cys³¹, y además contiene un enlace disulfuro intramolecular que une a las Cys³³-Cys⁴². El ión m/z 772,87 del péptido $[^{33}\text{C-R}^{45}]^{2+}$ se corresponde con un enlace disulfuro intramolecular entre las Cys³³-Cys⁴². En los espectros ESI-MS de la figura 3.4 se observa que las muestras de EGFhr después del estrés por pH y calor mantiene la formación correcta de los enlaces disulfuro intramoleculares esperados (Cys⁶-Cys²⁰, Cys¹⁴-Cys³¹ y Cys³³-Cys⁴²).

Con el objetivo de verificar la presencia de especies minoritarias de enlaces de disulfuro incorrectamente formados, que potencialmente pudieran estar presentes en las muestras de EGFhr sometidas a estrés por combinación de pH extremo y calor, se calculó la composición elemental de todos los péptidos que se pudieran formar por enlaces de disulfuro entre los residuos de cisteínas de la molécula. Consideramos solo las especies que se generan mediante cortes específicos por la hidrólisis ácida parcial (extremos N y C terminal de Asp, Glu, Asn y Gln). Posteriormente, se buscaron exhaustivamente todas las variantes peptídicas en el espectro ESI-MS de la hidrólisis ácida parcial de las muestras. Este análisis cualitativo se realizó con el programa Scrambler (CIGB, Cuba), el cual modela las distribuciones isotópicas de los péptidos a partir de su composición elemental. La presencia de cada una de estas señales, se buscó minuciosamente en el espectro ESI-MS después de magnificar adecuadamente cada una de las regiones en que se deberían detectar las distintas especies multicargadas, y no se detectó señal alguna que coincidiera con las m/z y las distribuciones isotópicas predichas para los enlaces de disulfuro incorrectamente formados. Los análisis por ESI-MS permiten afirmar que el EGFhr mantiene la formación correcta de los enlaces disulfuro intramoleculares esperados.

Los resultados de este estudio no concuerdan con los reportados por Brake y cols. (1989), se informa sobre una alta tendencia a la polimerización del EGFhr por intercambio de enlaces disulfuro. En dicha investigación los autores se basaron únicamente en los resultados de SDS-PAGE. Los resultados de este trabajo demuestran mediante la combinación de las técnicas de SDS-PAGE y ESI-MS que el EGFhr no presenta tal tendencia a la polimerización, y que mantiene la formación correcta de los enlaces disulfuro aún después de tratamientos drásticos de estrés.

3.1.2 Estrés por presencia de agente oxidante y por fotólisis

En la secuencia de aminoácidos del EGFhr existen varios residuos oxidables y fotosensibles: His, Trp, Met, Phe, Tyr y Cys (Michaeli y Feitelson, 1997). Se conoce que los residuos Tyr¹³, His¹⁶ y Tyr³⁷ son esenciales para la unión del EGF a su receptor (Lu y cols., 2001). Por otro lado, se comunica sobre la fotooxidación del EGFhr (Cini y cols., 1992), y la detección por RP-HPLC de la oxidación del EGFhr₁₋₄₈, dada por una elevada sensibilidad hacia la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido (Senderoff y cols., 1994). En los estudios de caracterización del IFA de EGFhr obtenido en el CIGB también se ha detectado la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido en RP-HPLC, y caracterizado por ESI-MS (Besada y cols., 1990; Anexo 2).

En estudios de degradación forzada se ha descrito el empleo del H₂O₂ a concentraciones de hasta el 3,0 % (v/v) para censar la tendencia de los medicamentos a la oxidación (Blessy y cols., 2014). Los perfiles cromatográficos de RP-HPLC muestran una rápida degradación del EGFhr en presencia de H₂O₂, la degradación se incrementó de manera proporcional a la concentración de H₂O₂ a 25 °C (Figura 3.5 a). Los principales productos de degradación eluyeron a menor trr que las especies no modificadas. En este caso a trr de 0,71 y 0,93 para el EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂, respectivamente. En la literatura se indica que los péptidos y proteínas que contienen Met oxidada son más hidrofílicos en su comportamiento en RP-HPLC que sus análogos no modificados (Zybailov y cols., 2009), lo cual sugiere que estas especies pudieran corresponderse con la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido para el EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂. Además, estas fracciones después de reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina se aislaron en RP-HPLC y fueron caracterizadas mediante ESI-MS/MS (Anexo 2). La señal del espectro ESI-MS correspondiente al péptido N-terminal (Asn¹-Lys²⁸)³⁺ se detectó a una m/z de 1115,16, que permite inferir un incremento de 16 g/mol de su masa molecular, lo que pudiera asignarse a la incorporación de un átomo de oxígeno en la cadena lateral de la Met. Al analizar dicha especie en ESI-MS/MS se detectó, a partir del ion precursor y otros fragmentos, una pérdida de masa de 64 g/mol (–CH₃SOH), la cual es muy específica de péptidos que contienen un residuo de sulfóxido de Met, lo que corrobora que este péptido está oxidado (Besada y cols., 1990).

Una forma común de evaluar la susceptibilidad a la fotodegradación de las proteínas es la exposición directa a la luz blanca/UV (Blessy y cols., 2014). En la figura 3.5 b se muestra el perfil de RP-HPLC para la muestra de EGFhr después de la exposición a la radiación UV en cubetas de cuarzo. Se observa que desaparecieron las señales del EGFhr, lo que indica una degradación extensiva de la proteína. Al comparar el perfil cromatográfico de la muestra de EGFhr expuesta a radiación UV en viales de vidrio de borosilicato, con el del control en la oscuridad; el perfil cromatográfico de la primera incrementó notablemente las señales de los productos de degradación con trr de 0,71 y de 0,93. Estas se corresponden

Resultados y discusión

con la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido para el EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂, respectivamente. En el perfil también aparecen nuevos picos minoritarios a mayores tiempos de retención que el del EGFhr₁₋₅₂. Los resultados evidenciaron que el vidrio de borosilicato posee una elevada propiedad protectora frente al paso de la radiación UV, por lo que evita la degradación extensiva del EGFhr.

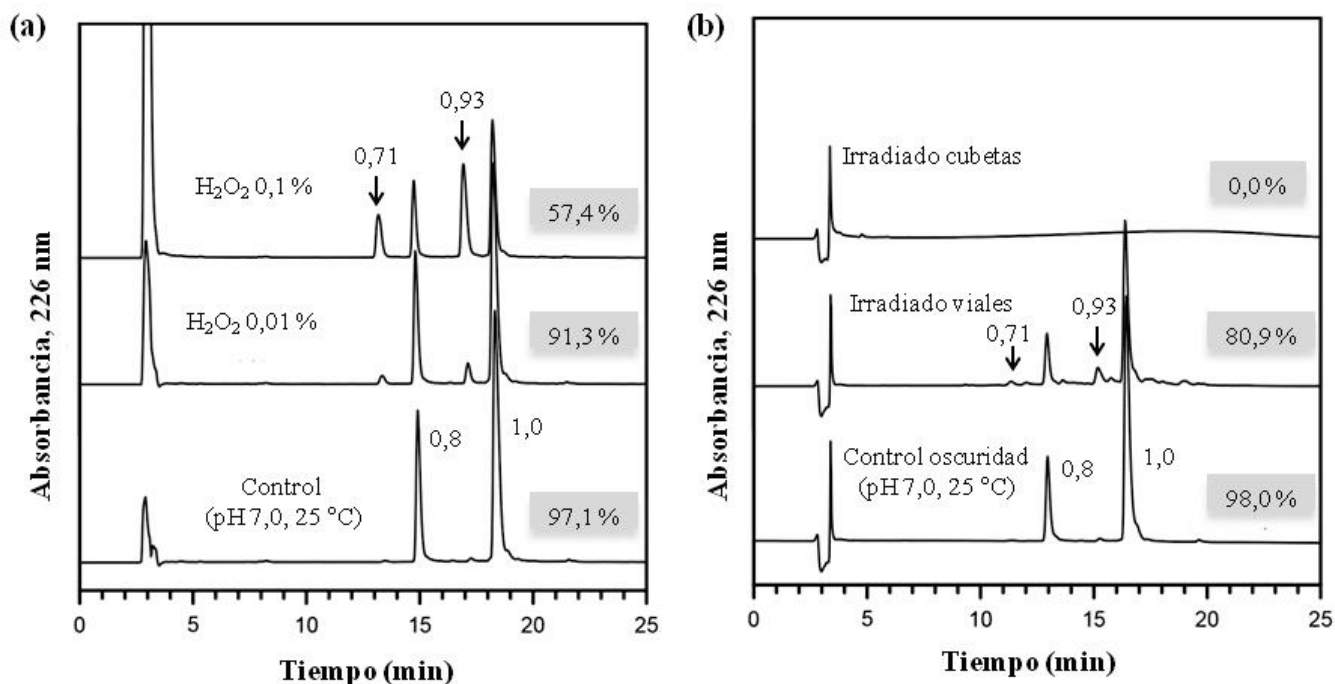


Figura 3.5. Efecto de la presencia de agente oxidante, y de la acción de la fotólisis en la estabilidad del EGFhr. **(a)** Perfiles en RP-HPLC del EGFhr después de la aplicación del estrés por la presencia de H₂O₂ (0,01 y 0,1 %) durante 30 min a 25 ± 2 °C. **(b)** Perfiles en RP-HPLC después de la exposición a UV 254/365 nm durante 24 h a 25 ± 2 °C. Las especies se separaron en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrilo/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min. Las flechas indican la aparición o el incremento de la señal de las fracciones con respecto al control con su correspondiente valor de trr. Encima de cada cromatograma y sombreado se presentan los porcentajes de EGFhr no modificado remanente.

En el anexo 3 se muestran los valores de los porcentajes de EGFhr₁₋₅₁, EGFhr₁₋₅₂ y de los productos de degradación presentes en cada muestra al ser evaluados en RP-HPLC, antes y después de la exposición a las condiciones de estrés por la presencia de agente oxidante y por la fotólisis. En los cromatogramas, se aprecia una notable disminución en el porcentaje de las señales del EGFhr, acompañada por el incremento de las señales asignadas a la oxidación del EGFhr a sulfóxido de Met. Los resultados corroboran que el RP-HPLC es un método indicativo de estabilidad.

3.1.3 Evaluación de las muestras de degradación forzada mediante los ensayos de ELISA y de proliferación celular

El ELISA tipo sandwich con el cual se evaluó la estabilidad del EGFhr detecta cambios en el plegamiento de la proteína, debido a que los anticuerpos CB-EGF.1 y CB-EGF.2 reconocen epitopos conformacionales, y por consiguiente al EGFhr correctamente plegado (Freyre y cols., 1989; Infante y cols., 2014). El ensayo de proliferación celular del EGFhr se considera un ensayo de actividad funcional para esta proteína, debido a que los eventos de proliferación celular resultan imprescindibles para el proceso de cicatrización de las heridas.

En la figura 3.6 a se muestran los resultados de las evaluaciones en los ensayos de ELISA y de proliferación celular de las muestras que se utilizaron en los estudios de degradación forzada del EGFhr. Las principales afectaciones en los dos ensayos se observaron después de la exposición a pH 3,0 y 9,0 durante cuatro días a 50 °C; y después de la irradiación con UV en cubeta de cuarzo. Estos resultados están en concordancia con los ensayos físico-químicos anteriores: RP-HPLC, SDS-PAGE y electroforesis en ausencia de SDS, en los cuales se detectó la aparición de nuevas especies con tales muestras.

No se observan afectaciones en relación con el control no tratado en las muestras sometidas a estrés por exposición a H₂O₂, ni cuando la exposición a radiación UV se realizó en viales de vidrio, como indican los resultados de ELISA y de proliferación celular (Figura 3.6 a). En esas condiciones, el único cambio físico-químico detectado fue el incremento de la señal en RP-HPLC correspondiente a la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido, se puede concluir que dicha ruta de degradación no tiene relevancia para el reconocimiento inmunológico del EGFhr por ELISA, ni para la actividad biológica.

La figura 3.6 b muestra una correlación entre los resultados del ELISA y de proliferación celular para las muestras evaluadas en el estudio de estrés, como lo evidencia el valor del coeficiente de correlación de Pearson de 0,98. Al mapear los epitopos que reconocen los dos anticuerpos utilizados en el ELISA de EGFhr, se encontró que los aminoácidos críticos para el reconocimiento por el anticuerpo monoclonal CB-EGF.1 fueron: Pro⁷, Leu⁸, Ser⁹, Asp¹¹, Gly¹², Tyr¹³; en tanto que para el CB-EGF.2 fueron: Tyr²², Ile²³, Leu²⁶, Asp²⁷, Lys²⁸ (Infante y cols., 2014). Los dos anticuerpos inhiben la activación del receptor de EGF en ensayos de inhibición de la fosforilación inducida por el ligando. Los epitopos identificados para los dos anticuerpos se solapan con la superficie de interacción EGF/receptor, y proporcionan una racionalidad estructural para la neutralización de los efectos biológicos del EGFhr. Estos datos justifican la correlación estadística entre el ELISA y el ensayo de proliferación celular (Figura 3.6 b).

Resultados y discusión

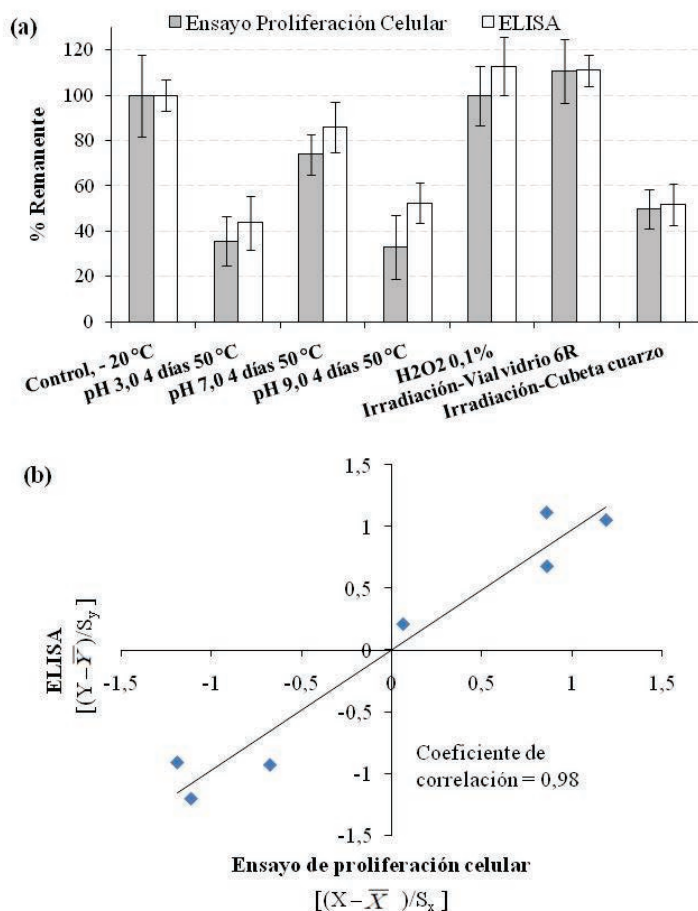


Figura 3.6. Efecto de condiciones de estrés en la estabilidad del EGFhr mediante ELISA y ensayo de proliferación celular. **(a)** Porcentaje de EGFhr remanente después de aplicar las condiciones de estrés*. **(b)** Análisis de correlación entre los resultados del ensayo de proliferación celular y los de ELISA para las muestras evaluadas en condiciones de estrés. En esta figura se grafica como variable X (ensayo de proliferación celular) la expresión 2.9 y como variable Y (ELISA) la expresión 2.10 que aparecen debajo de los títulos de los ejes entre corchetes.

*El EGFhr remanente fue calculado como los valores de los ensayos después del tratamiento dividido por los valores de la muestra control (pH 7,0; -20 °C) y multiplicados por 100.

El hecho de que los epitopos identificados para los anticuerpos empleados en el ELISA no incluyan la Met²¹ del EGFhr explica por qué no se encontraron afectaciones de las muestras en los resultados del ELISA donde se observó la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido (por ejemplo, en presencia de H₂O₂). La Met²¹ en el EGFhr se encuentra expuesta al solvente (Ogiso y cols., 2002; Huang y cols., 2010). Esta localización hace que su oxidación hacia sulfóxido no deba provocar alteraciones apreciables en la estabilidad del plegamiento de esta proteína, y en consecuencia no termine afectando su actividad biológica. Si estuviera en el interior de la proteína plegada, en un entorno hidrofóbico, la Met²¹ oxidada (a sulfóxido) dejaría de satisfacer dos enlaces por puentes de hidrógeno (8,38-20,92 kJ/mol por cada puente) con respecto al estado desnaturalizado. Ello reduciría significativamente la estabilidad del plegamiento de la proteína, y provocaría cambios conformacionales que pudieran afectar su actividad biológica (Stryer, 2008). Además, el residuo Met²¹ se encuentra parcialmente expuesto (en particular el átomo S^δ también establece contactos con grupos polares) en la estructura del complejo con el receptor (Ogiso y cols., 2002). Esto sugiere que la oxidación no afectaría apreciablemente la superficie de contacto con el receptor. En tal sentido, el reemplazo de la Met²¹ por el residuo Ile mediante mutagénesis dirigida no provocó alteraciones en la actividad biológica del EGFhr (Medina-Selby y Nascimento, 1992).

Resultados y discusión

Mediante los estudios de estrés en solución acuosa se demostró que el EGFhr se degrada con facilidad durante la exposición a 50 °C, a H₂O₂ y a la radiación UV. Las principales rutas de degradación a pH 7,0 fueron la desamidación de la Asn¹ y la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido. La combinación de los ensayos de RP-HPLC, electroforesis, ESI-MS, ELISA y ensayo de proliferación celular permiten evaluar apropiadamente la estabilidad del EGFhr.

3.2 Estabilización del EGFhr en una formulación líquida

Entre los factores del ambiente de la solución que rodea la proteína son importantes para preservar la estabilidad: el pH, el tipo de tampón, la fuerza iónica, la concentración de la proteína y los excipientes (Manning y cols., 2010). Los estudios de estabilidad en solución acuosa se realizaron a 50 °C, una temperatura inferior a la cual comienza a desnaturalizarse el EGFhr (Kim y cols., 2014). En los resultados del estudio de estrés se observaron cambios en la respuesta de los ensayos con el EGFhr expuesto a esta temperatura. La evaluación de los factores de la solución, extrínsecos a la proteína, tiene gran importancia para el desarrollo de formulaciones estables.

3.2.1 Efecto del pH

El efecto del pH en la solubilidad del EGFhr se evaluó mediante la cuantificación por absorbancia a 280 nm, de la proteína soluble después de la filtración de la solución. La solubilidad del EGFhr aumentó con el incremento del pH en el rango entre 4,0 y 8,0, con valores máximo a pH entre 6,0 y 8,0 (Figura 3.7 a). Estos resultados son consistentes con el incremento esperado en la solubilidad de las proteínas al alejarse el pH de la solución de su punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico para el EGFhr₁₋₄₈ es 4,55 (Senderoff y cols., 1994).

Los datos experimentales de los ensayos de RP-HPLC y ELISA demostraron una relación lineal entre el ln de la concentración remanente y el tiempo, lo que indica una cinética de primer orden (Anexo 4). El perfil de pH de estabilidad del EGFhr por RP-HPLC y ELISA se obtuvo al graficar los valores de la K_{obs} en función del pH (Figura 3.7 b). La degradación del EGFhr a 50 °C se catalizó a valores de pH inferiores a 6,0 y superiores a 8,0, como muestran los resultados del RP-HPLC y el ELISA. La máxima estabilidad del EGFhr estuvo en el rango de pH entre 6,0 y 8,0, con el valor óptimo cercano a 7,0. La K_{obs} del EGFhr obtenida por ELISA fue menor que por RP-HPLC (Figura 3.7 b). En los estudios de estrés previos se evidenció que algunos de los productos de degradación del EGFhr que se observan en RP-HPLC no se detectan en el ELISA.

El efecto del pH en la estructura secundaria del EGFhr se estudió mediante CD en la región del UV lejano (Figura 3.7 c). Todos los espectros (en condiciones ácidas y básicas) mostraron un perfil característico de formas plegadas. La banda del espectro por encima de 225 nm se produce básicamente por la aquiralidad generada por los tres puentes disulfuro intramoleculares, así como por las cadenas laterales de los aminoácidos

Resultados y discusión

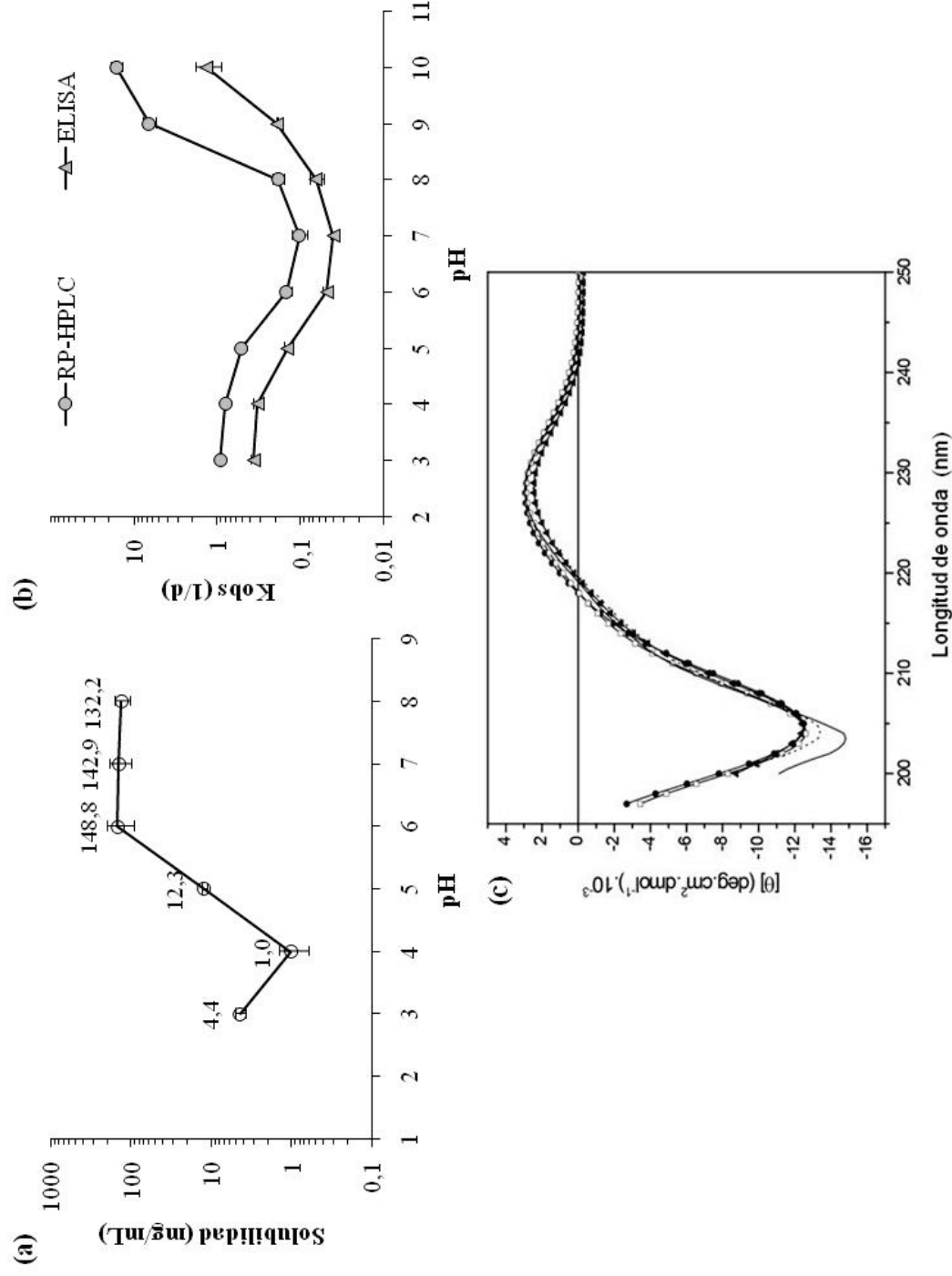


Figura 3.7. Estabilidad del EGFhr en solución acuosa en función del pH. (a) Perfil de pH-solubilidad del EGFhr determinado por absorbancia a 280 nm. (b) Perfil de pH-estabilidad del EGFhr a 50 °C por el método de RP-HPLC y ELISA. Se utilizaron diferentes valores de pH a una concentración final de 100 mM en los tampones acetato de sodio (pH 3,0-5,6), fosfato de sodio (pH 6,0-8,0) y borato de sodio (pH 9,0-10,0). (c) Espectros de CD del EGFhr en solución acuosa a pH 3,6 (---), pH 5,6 (▲), pH 6,0 (□), pH 7,0 (—) y pH 8,0 (●).

Resultados y discusión

aromáticos Trp y Tyr. La forma del espectro de CD por debajo de 225 nm indica la presencia de estructuras no alfa-no beta y de hojas- β . La presencia de un mínimo alrededor de 200 nm está asociada, principalmente, con las transiciones encontradas en las estructuras no alfa-no beta (Sreerama y Woody, 1993). Estos perfiles son similares a los descritos para el EGFh (Murray y cols., 1998).

El contenido de estructura secundaria en el EGFhr en solución a pH 7,0 se calculó a partir de la deconvolución del espectro de CD (Tabla 3.1). Las estructuras fueron consistentes con un mínimo negativo en el espectro alrededor de los 200 nm. Los resultados de los espectros con el programa CONTINLL mostraron una diferencia cuadrática media entre las curvas experimental y calculada menor del 2,0 %. Los valores de estructura secundaria para el EGFhr por CD fueron consistentes con los calculados a partir de la estructura cristalográfica del complejo EGFhr-Receptor PDB ID: 1IVO (Ogiso y cols., 2002); y empleando los datos de los corrimientos químicos informados para esta proteína a pH fisiológico (Huang y cols., 2010) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. *Contenido de estructuras secundarias del EGFhr*

Método de cálculo	Hoja beta (%)	Hélice alfa (%)	Otras (%)
Deconvolución del espectro de CD a pH 7,0	36	7	57
Modelación molecular a partir de la estructura cristalográfica PDB ID: 1IVO	27	6	67
Modelación molecular a partir de los corrimientos químicos en RMN	30	8	62

Al comparar los espectros de CD de las muestras a diferentes valores de pH con la de pH 7,0 (forma nativa) se puede notar una pequeña variación alrededor de 200 nm (202-204 nm). No obstante, todos los espectros muestran un plegamiento de estructura secundaria muy similar al encontrado en la forma nativa (Figura 3.7 c). Los resultados indican que el EGFhr es estable en un rango de pH extenso, y mantiene la estructura secundaria muy similar a la nativa.

La SEC es una técnica relevante para el análisis de agregados durante el desarrollo de proteínas farmacéuticas (Philo, 2009). El efecto del pH de la solución en la agregación del EGFhr se estudió por SEC y DLS. Debido a que el EGFhr se unió inespecíficamente a la matriz de la columna, la separación en SEC se realizó en presencia de arginina, como se sugirió para estos casos (Ejima y cols., 2005). Los cromatogramas de la figura 3.8 a muestran el efecto del pH en la agregación del EGFhr después de cuatro días de exposición a 50 °C. La población principal de moléculas de EGFhr (M_M de 6 216 g/mol) eluyó aproximadamente a 37,5 min, el cual se corresponde con el monómero de la proteína con una M_M de 6 190 g/mol, determinada a partir de la curva de calibración. Las poblaciones que eluyeron a menores

Resultados y discusión

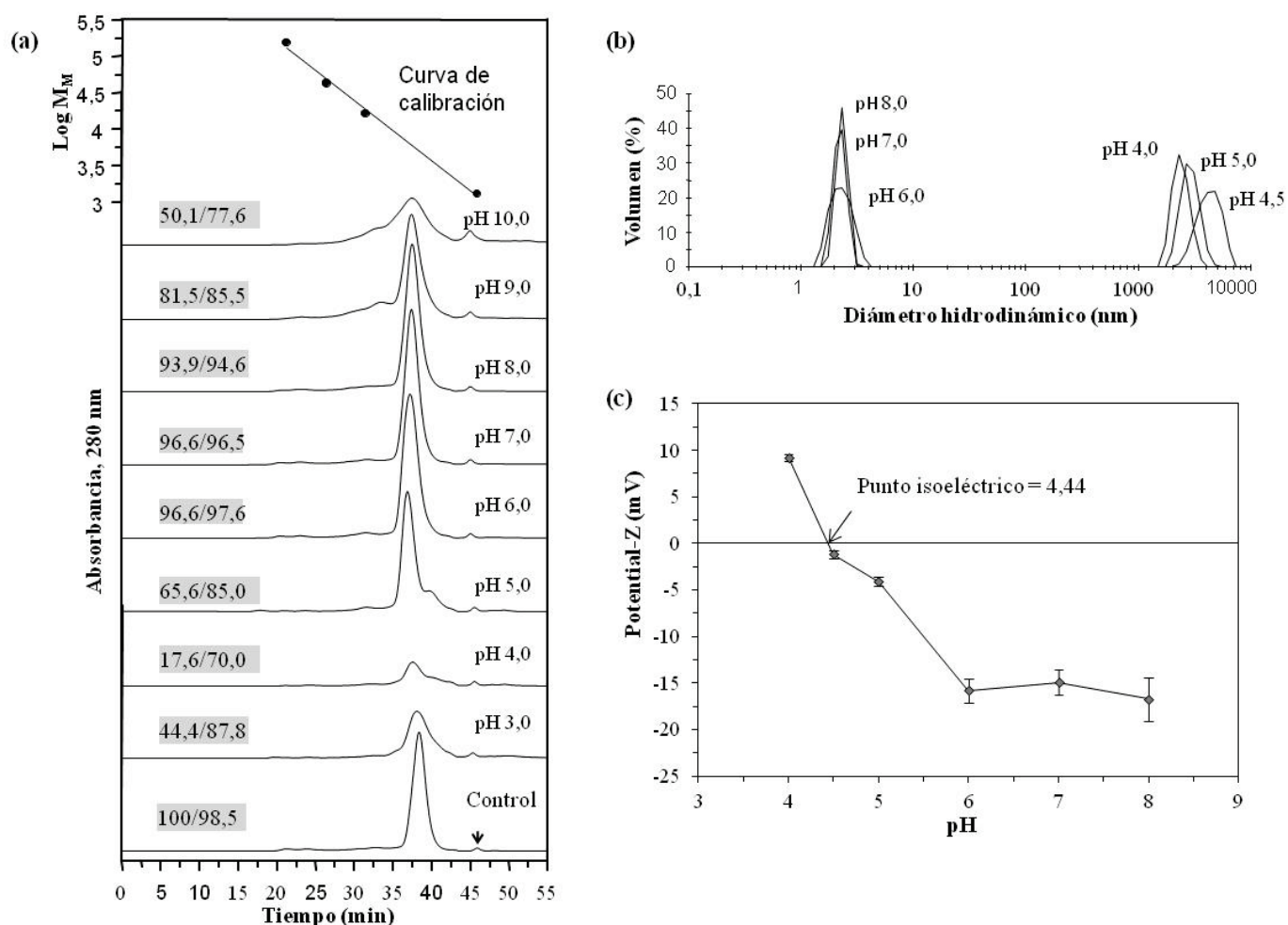


Figura 3.8. Estabilidad coloidal del EGFhr en función del pH de la solución. **(a)** Perfiles cromatográficos en SEC del EGFhr a diferentes valores de pH después de cuatro días de incubación a 50 ± 2 °C. Los perfiles también muestran los porcentajes de recobrado*/pureza, en ese mismo orden, encima de cada cromatograma y sombreado. Los volúmenes totales aplicados fueron los mismos para todas las muestras. Las especies se separaron en una columna Superdex 75 empleando como fase móvil el tampón 0,1 M NaPO_4 /0,5 M arginina-HCl a pH 6,5 y a una velocidad de flujo constante de 0,4 mL/min. La flecha indica la señal correspondiente al tampón de las muestras. Se inserta la curva de calibración derivada de los marcadores de M_M . **(b)** Distribución de tamaño de partículas por DLS en función del pH. **(c)** Potencial Z en dependencia del pH.

*El recobrado (%) de EGFhr mediante SEC se calculó como la relación entre el área del pico principal después de cuatro días de almacenamiento a 50 ± 2 °C y el área del pico principal de la muestra control (no tratada) y multiplicado por 100.

Resultados y discusión

tiempos de retención representan agregados de la proteína, mientras que las que eluyeron a mayores tiempos representan variantes truncadas. Tres tipos de comportamientos pueden ser identificados: (i) soluciones estables en el rango de pH entre 6,0 y 8,0 que muestran perfiles cromatográficos muy similares a la muestra no calentada, con recobrados de pureza y masa superiores al 93,9 %; (ii) formación de oligómeros solubles en el rango de pH entre 9,0 y 10,0 con una disminución significativa de la pureza y el recobrado de la masa (de 50,1 a 85,5 %), y (iii) formación de variantes truncadas del EGFhr y pérdida significativa del recobrado de la masa de la proteína en el rango de pH entre 3,0 y 5,0 (de 17,6 a 65,6 %).

Es conocido que la SEC presenta limitaciones debido a interacciones potenciales entre los agregados y la fase estacionaria, o la posible formación de monómeros a partir de agregados reversibles durante la dilución de la muestra con la fase móvil. Por consiguiente, es importante comprobar la fiabilidad de los resultados de los perfiles cromatográficos comparándolos con los obtenidos empleando técnicas ortogonales (Carpenter y cols., 2010). Para dicho propósito, las muestras en el rango de pH entre 4,0 y 8,0 fueron analizadas mediante DLS, la cual proporciona información significativa con relación al tamaño de los agregados. Los resultados de DLS, normalizados por el volumen de las partículas dispersantes en el rango de pH entre 4,0 y 5,0 evidenciaron que el EGFhr mayormente se encontraba formando agregados grandes (Figura 3.8 b). Por el contrario, para las muestras en el rango de pH entre 6,0 y 8,0 se encontró que la mayoría de las especies estaban formando partículas de tamaño entre 2,0 y 3,0 nm, las cuales pueden atribuirse a la estructura monomérica del EGFhr. Los resultados del estado de agregación del EGFhr por SEC y durante la evaluación *in situ* por DLS estuvieron en concordancia razonable.

Al mismo conjunto de muestras utilizadas para las medidas por DLS le fue medido el potencial Z, figura 3.8 c. El punto isoeléctrico a partir de los resultados del potencial Z fue de 4,44. Este resultado es consistente con el valor de 4,55 reportado para el EGFhr₁₋₄₈ (Senderoff y cols., 1994). Por consiguiente, el potencial Z del EGFhr fue positivo para valores de pH inferiores a 4,44 y negativo para valores superiores. Los mayores valores modulares del potencial Z se alcanzaron a pH por encima de 6,0. Las muestras que presentaron los valores más bajos de potencial Z correlacionaron con la presencia de agregados de alto peso molecular; mientras que las que tuvieron los valores modulares más altos correlacionaron con la presencia en solución de partículas de tamaño entre 2,0 y 3,0 nm, que pueden ser atribuibles al monómero de EGFhr (Figura 3.8 b y c). Estos resultados sugieren que los procesos de agregación del EGFhr, en el rango de pH entre 4,0 y 5,0; son mediados probablemente por interacciones electrostáticas (Roberts y cols., 2011). El control de la agregación es una preocupación durante la producción, purificación y formulación de proteínas terapéuticas (Roberts y cols., 2011), y el pH de la solución se considera uno de los factores más importantes para controlar dicha agregación (Wang, 2005).

Resultados y discusión

Se seleccionó el rango de pH entre 6,0 y 8,0 para futuros estudios de estabilización del EGFhr en una formulación parenteral. En este rango de pH se favorecen al mismo tiempo la estabilidad química, coloidal y el plegamiento correcto de esta proteína, como evidenciaron los resultados de RP-HPLC, ELISA, solubilidad, CD, SEC, DLS y potencial Z.

3.2.2 Efecto del tipo de tampón

Un factor importante en la estabilidad en solución de proteínas y péptidos es la catálisis de los tampones en los diferentes procesos de degradación (Bell, 1997). La estabilidad en solución del EGFhr se estudió en diferentes tampones en el rango de pH entre 6,0 y 8,0. Los valores de K_{obs} , para las combinaciones de tampón y pH, se muestran en la figura 3.9, los cálculos de las K_{obs} aparecen en el anexo 5.

A pH 6,0 el tampón histidina mostró un marcado incremento de la K_{obs} con respecto a los otros tampones evaluados. La mayor estabilidad del EGFhr se observó a pH 7,0 en los tampones fosfato de sodio y Tris-HCl, con los valores más bajos de la K_{obs} en RP-HPLC. Los valores de las K_{obs} para el EGFhr en los diferentes pH y tampones no mostraron diferencias significativas en el ELISA. La magnitud en la cual una proteína particular puede ser estabilizada o desestabilizada por una combinación de tampones y pH depende de muchos factores. Un factor influyente puede ser la interacción entre los grupos ionizables de los iones tampón (según su pKa) y las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas (Ugwu y Apte, 2004). Esta pudiera ser la razón por la cual se obtuvieron valores de K_{obs} tan altos para el EGFhr en el tampón histidina a altas temperaturas.

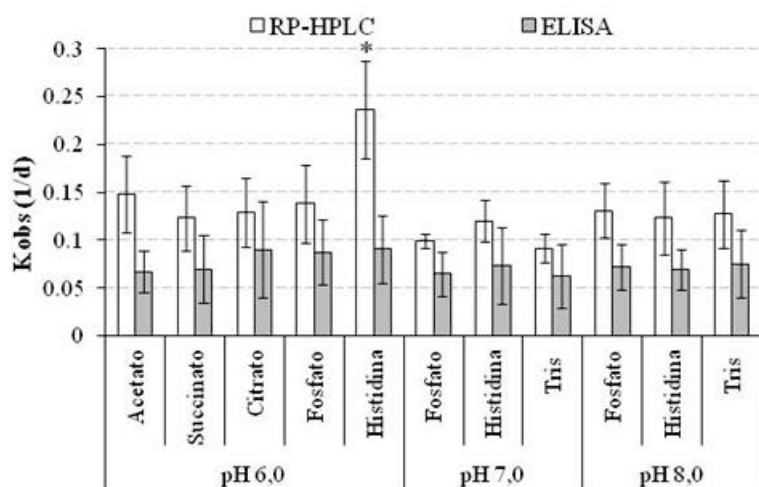


Figura 3.9. Valores de la K_{obs} del EGFhr en función del pH y el tipo de tampón durante el almacenamiento a 50 ± 2 °C. La estabilidad de la proteína se evaluó mediante RP-HPLC y ELISA. La barra de error representa el intervalo de confianza del 95 %. *Denota diferencias significativas.

Aunque los tampones fosfato y Tris a pH 7,0 mostraron resultados similares, el tampón fosfato de sodio fue seleccionado para futuros estudios debido a las siguientes razones. Primero, a pH 7,0 el tampón Tris tiene una capacidad tampón más baja que el fosfato (pKa del Tris 8,06 y pKa del fosfato 7,20). Segundo, el tampón Tris tiene valores de $\delta pKa/\delta T$ relativamente altos ($-0,028/^{\circ}C$) con respecto al fosfato

Resultados y discusión

($-0,0028/^{\circ}\text{C}$) (Beynan y Easterby, 1996). Además, el tampón fosfato es más económico que el Tris y mucho más utilizado en formulaciones de proteínas.

3.2.3 Efecto de la concentración de la proteína

Un factor clave en la estabilidad en solución de proteínas y péptidos es su concentración (Frokjaer y Otzen, 2005; Wang, 2005). En el anexo 6 se muestran los cálculos de las K_{obs} . La figura 3.10 muestra los resultados del efecto de la concentración de EGFhr en su estabilidad, evaluada mediante los ensayos de RP-HPLC y ELISA. Los resultados indican que la concentración de EGFhr en el rango entre 25 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ no tuvo un efecto significativo en su constante de degradación. En este estudio, como en otros previamente mostrados, se encontraron mayores valores de K_{obs} en RP-HPLC que en ELISA.

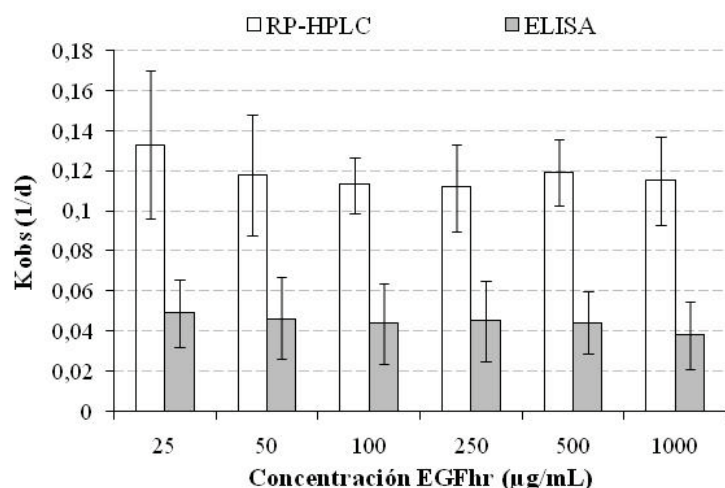


Figura 3.10. Valores de la K_{obs} del EGFhr en función de la concentración de la proteína en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0) durante el almacenamiento a 50 ± 2 $^{\circ}\text{C}$. La estabilidad de la proteína se evaluó mediante RP-HPLC y ELISA. La barra de error representa el intervalo de confianza del 95 %.

3.2.4 Efecto de la fuerza iónica del medio

La fuerza iónica es considerada un factor importante que modula la estabilidad coloidal y la agregación de las proteínas, y que también puede afectar las rutas de degradación química (Manning y cols., 2010). Además, la modulación de la fuerza iónica, mediante la variación de la concentración de NaCl, constituye una de las vías más utilizadas para ajustar la osmolaridad de las formulaciones parenterales. El efecto de la fuerza iónica en la estabilidad del EGFhr se evaluó en tampón fosfato de sodio a pH 7,0 y 50 $^{\circ}\text{C}$, mediante los ensayos de RP-HPLC, SEC y ELISA. Los valores de K_{obs} , para las concentraciones de NaCl son mostrados en la figura 3.11 a y los cálculos de las K_{obs} aparecen en el anexo 7.

La estabilidad del EGFhr no mostró variaciones significativas para las concentraciones de NaCl empleadas, con valores de K_{obs} similares para las concentraciones de NaCl en cada uno de los ensayos evaluados. Como muestra la figura 3.11 b, la fuerza iónica, modulada por la concentración de NaCl, no influyó en los perfiles cromatográficos del EGFhr en SEC bajo las condiciones estudiadas. Es de destacar

Resultados y discusión

la elevada estabilidad del EGFhr a pH cercano al fisiológico frente a la agregación a 50 °C, como evidencian los resultados de SEC.

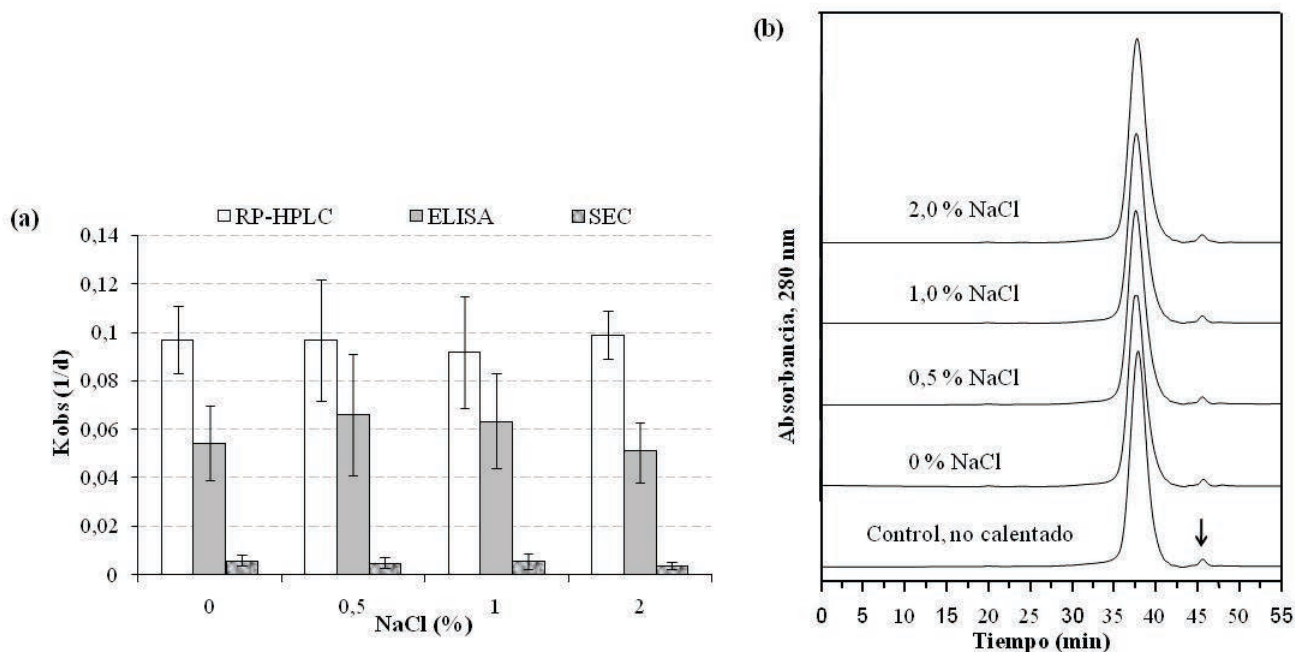


Figura 3.11. Efecto de la fuerza iónica en la estabilidad del EGFhr en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0) durante la exposición a 50 ± 2 °C. (a) Valores de las K_{obs} mediante RP-HPLC, ELISA y SEC en función de la concentración de NaCl. La barra de error representa el intervalo de confianza del 95 %. (b) Perfiles cromatográficos en SEC a diferentes concentraciones de NaCl, después de 21 días de incubación a 50 ± 2 °C. Las especies se separaron en una columna Superdex 75 empleando como fase móvil el tampón 0,1 M NaPO_4 /0,5 M arginina-HCl a pH 6,5 y a un flujo constante de 0,4 mL/min. La flecha indica la señal correspondiente al tampón de las muestras.

3.2.5 Compatibilidad del EGFhr con los excipientes para administración parenteral

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los excipientes sobre la estabilidad del EGFhr en solución acuosa. Para la selección de los excipientes (azúcares, polioles, aminoácidos, polímeros, surfactantes y sales) y su concentración se consideró su presencia en estudios de formulaciones de proteínas (Wang, 2000; Manning y cols., 2010). El desempeño de los excipientes se evaluó en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0) a 50 °C. El estudio de estabilidad acelerada es uno de los métodos más apropiados para evaluar rápida y exactamente la estabilidad química de las formas farmacéuticas. Este procedimiento es apropiado para determinar oxidación, hidrólisis, reacción con impurezas reactivas de excipientes y desnaturalización de las proteínas (Kenneth y Roger, 2005). Se consideraron incompatibles aquellos excipientes que su intervalo de confianza del 95 % no contienen el valor estimado para el tampón (control sin excipientes), y el intervalo de confianza del 95 % del tampón (control sin excipientes) no contiene el valor estimado de la muestra del excipiente a comparar.

Resultados y discusión

La evaluación del efecto de los excipientes en la estabilidad del EGFhr durante la exposición a 50 °C indicó su incompatibilidad con tres sacáridos, un polímero y una sal (Figura 3.12), los cálculos de los valores de las K_{obs} se muestran en el anexo 8. Los azúcares reductores (lactosa, glucosa y fructosa) afectaron la estabilidad del EGFhr después del estrés por exposición a 50 °C, como indican los resultados de RP-HPLC y ELISA. Los azúcares reductores pueden reaccionar con los residuos de Lys y Arg de las proteínas para formar aductos de carbohidratos mediante la reacción de Maillard (Chuyen, 1998). También se describe sobre la oxidación de las proteínas por la presencia de trazas de peróxido en el PEG (Kumar y Kalonia, 2006). Sin embargo, los resultados de la cuantificación del EGFhr mediante el ELISA no se afectaron en la muestra en presencia de PEG. Este resultado es coherente con los del estudio de estrés, donde se demostró que el ELISA empleado no detecta la presencia de la Met²¹ oxidada a sulfóxido en el EGFhr (Sección 3.1.3).

La solución de EGFhr en tampón fosfato de sodio, en presencia de $MgCl_2$, cambió del aspecto claro a opalescente. Este cambio de aspecto estuvo asociado a una afectación de la estabilidad del EGFhr como indican los resultados de RP-HPLC y ELISA (Figura 3.12). Los fosfatos forman sales insolubles con los metales bivalentes como el Mg^{2+} , y precipitan (Wazer y Callis, 1958). La adición de $MgCl_2$ a la solución de EGFhr en presencia de fosfato pudiera inducir la formación del precipitado a altas temperaturas. La captura de la proteína por los precipitados pudiera ser la causa de la afectación en los resultados observados en RP-HPLC y ELISA.

Para determinar la influencia del tampón fosfato de sodio en los resultados de incompatibilidad del EGFhr, los excipientes que resultaron incompatibles en fosfato de sodio también fueron evaluados en el tampón Tris-HCl (Figura 3.12). Se siguió el mismo criterio de comparación que el utilizado para evaluar la compatibilidad en el tampón fosfato de sodio. Después de la incubación a 50 °C, la presencia de los azúcares reductores (lactosa, glucosa y fructosa) también afectó la estabilidad del EGFhr por los dos ensayos (RP-HPLC y ELISA), en este caso en el tampón Tris-HCl. El EGFhr estuvo más afectado por los azúcares reductores en tampón fosfato que en tampón Tris. En el caso del PEG el efecto del tampón fue contrario, el EGFhr se afectó más en tampón Tris que en fosfato, incluso en los resultados de ELISA (Figura 3.12). La presencia del $MgCl_2$ en tampón Tris no provocó cambio en la apariencia de la solución de EGFhr, y no afectó la estabilidad del EGFhr como indican los resultados de RP-HPLC y ELISA. Los resultados, de conjunto, indican un efecto de interacción entre los excipientes y el tipo de tampón. Sin embargo, la mayoría de los excipientes que tuvieron un efecto negativo para la estabilidad del EGFhr en tampón fosfato de sodio, lo mantuvieron en Tris-HCl.

Resultados y discusión

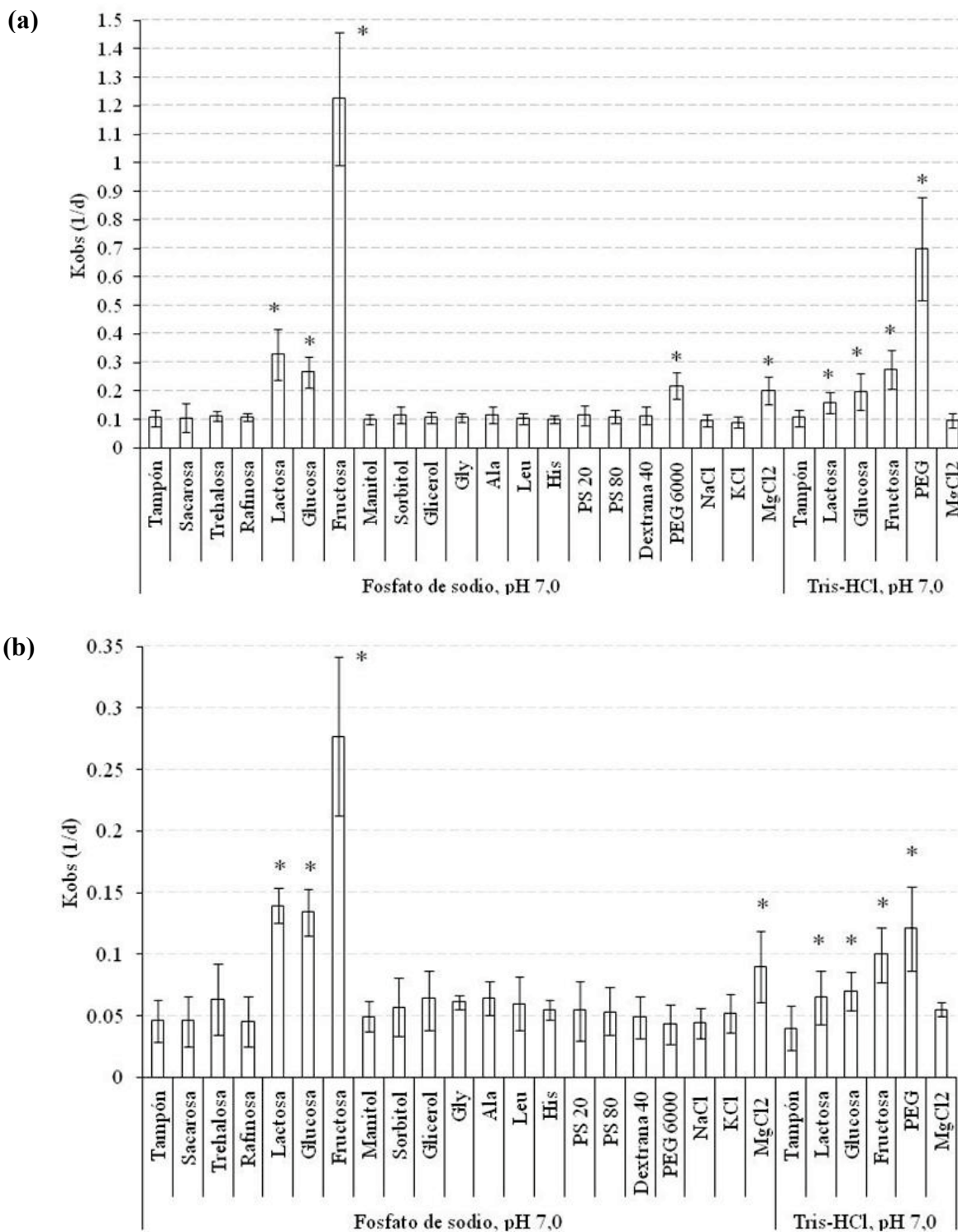


Figura 3.12. Efecto de los excipientes en la estabilidad del EGFhr en solución acuosa en tampón fosfato de sodio (pH 7,0;100 mM) durante el almacenamiento a 50 ± 2 °C. Los valores de la K_{obs} se determinaron en RP-HPLC (a) y en ELISA (b). La estabilidad del EGFhr en los excipientes que resultaron incompatibles en tampón fosfato también se estudió en tampón Tris-HCl (pH 7,0; 100 mM). La barra de error representa el intervalo de confianza del 95 %. *Denota incremento significativo en la K_{obs} con respecto al tampón (control sin excipientes).

Resultados y discusión

La figura 3.13 muestra los perfiles cromatográficos representativos de las muestras de EGFhr con los excipientes que resultaron incompatibles después de la exposición a 50 °C. La muestra control, no tratada, representa dos especies, el EGFhr₁₋₅₁ (pico con trr 0,8) y EGFhr₁₋₅₂ (pico con trr 1,0). En presencia del PEG, el EGFhr mostró un incremento significativo de las señales de los picos con trr 0,71 y 0,93, que se corresponden con la oxidación a sulfóxido de la Met²¹ en el EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂, respectivamente. En la muestra control (tampón) después de calentada durante tres días a 50 °C, al igual que en presencia del resto de los excipientes, se observó un incremento en las señales de los picos con trr 0,82 y 1,02 que se corresponden con modificaciones químicas del EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂, respectivamente. Estos resultados están en concordancia con los de los estudios de estrés (Sección 3.1), y con los reportados para el EGFhr en solución (Araki y cols., 1989; Besada y cols., 1990; Senderoff y cols., 1994).

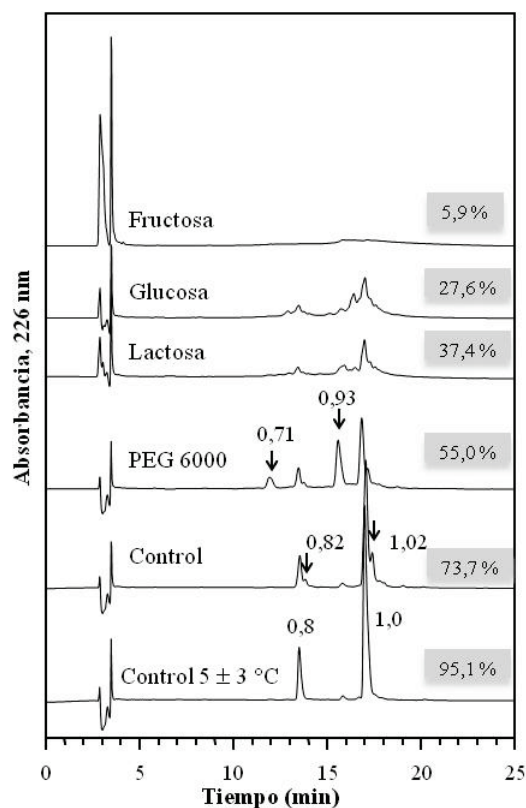


Figura 3.13. Perfiles cromatográficos del EGFhr, después de tres días de almacenamiento a 50 °C en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0) en presencia de los excipientes incompatibles. La separación se realizó en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrilo/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min. Las flechas indican la aparición o el incremento de la señal con respecto al control con su correspondiente valor de trr. Trr (0,71): EGFhr₁₋₅₁ oxidado en Met²¹ a sulfóxido; trr (0,8): EGFhr₁₋₅₁; trr (0,93): EGFhr₁₋₅₂ oxidado en Met²¹ a sulfóxido; trr (1,0): EGFhr₁₋₅₂. Encima de cada cromatograma y sombreado se presentan los porcentajes de EGFhr no modificado remanente.

Los perfiles de RP-HPLC para el EGFhr en presencia de los azúcares reductores muestran una apreciable disminución de la intensidad, acompañada por el ensanchamiento de los picos principales del EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂, y la aparición de nuevos picos (Figura 3.13). Estos resultados se deben probablemente a la interacción entre los azúcares reductores y el EGFhr, y la formación de productos de glicosilación no enzimática de la proteína (Rošćić y Horvat, 2006; Ledesma-Osuna y cols., 2008). La fructosa fue el excipiente que más afectó, al no detectarse ninguna señal en el cromatograma de esta muestra. En este

caso también pudieran ocurrir otras reacciones de degradación como desnaturalización y agregación (Lim y cols., 2014a).

Los resultados de este estudio muestran que con una adecuada selección de los excipientes es posible controlar en solución acuosa una de las principales rutas de degradación del EGFhr, que es la oxidación a sulfóxido de la Met²¹. Sin embargo, como muestra la figura 3.12, ninguno de los excipientes evaluados mostró un efecto estabilizante notable con relación al tampón (control sin excipiente). El incremento en la señal correspondiente a los picos con trr 0,82 y 1,02 fue similar en todas las variantes evaluadas (Figura 3.13).

3.2.6 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la velocidad de desamidación del EGFhr en solución acuosa

Una de las principales rutas de degradación del EGFhr en solución acuosa es la desamidación de la Asn¹, la cual se favorece a pH neutro y básico (Koch y cols., 1984; Araki y cols., 1989; Senderoff y cols., 1994). Los resultados del estudio de degradación forzada realizado en solución acuosa (Sección 3.1.1) evidenciaron la tendencia del EGFhr a la desamidación de la Asn¹; y la factibilidad de su detección y cuantificación mediante electroforesis en ausencia de SDS. Anteriormente se determinó que el EGFhr en solución acuosa, a valores de pH cercanos a 7,0, logra prevenir completamente la agregación mientras mantiene su plegamiento correcto (Sección 3.2.1). Debido a que la desamidación de la Asn¹ es la ruta de degradación del EGFhr con una mayor E_a (98,91 kJ/mol) (Senderoff y cols., 1994), y en consecuencia la que debe ser más sensible a los efectos de la temperatura, es que evaluamos el efecto de esta variable en dicha ruta de degradación.

En la figura 3.14 a se muestran las curvas de incremento del porcentaje de desamidación de la Asn¹ del EGFhr en función del tiempo y la temperatura de almacenamiento, determinada mediante electroforesis en ausencia de SDS. Se observó un incremento apreciable de la pendiente de la curva con el aumento de la temperatura. Como muestra la figura 3.14 b, las constantes de velocidad de desamidación de la Asn¹ del EGFhr en solución acuosa en función del inverso de la temperatura se ajustaron a la ecuación de Arrhenius en el rango de temperaturas estudiado ($r^2 = 0,996$). La E_a calculada a partir de la pendiente de la recta fue de 62,7 kJ/mol. Este valor se encuentra dentro del rango (50,2-104,6 kJ/mol) de valores de E_a informado para la desamidación de la Asn para varios péptidos (Oliva y cols., 2006; Wakankar y Borchardt, 2006). El valor de E_a informado para el EGFhr₁₋₄₈ fue de 98,91 kJ/mol (Senderoff y cols., 1994), superior al encontrado en nuestro estudio de 62,7 kJ/mol. Senderoff y cols. (1994) emplearon un EGFhr₁₋₄₈ y lo evaluaron en una solución de tampón fosfato de sodio (pH 6,0, 20 mM) que contenía polisorbato 80 al 0,01 %, mediante un método de RP-HPLC. En cambio, en este estudio se evaluó una

Resultados y discusión

mezcla de EGFhr₁₋₅₁/EGFhr₁₋₅₂ en tampón fosfato de sodio (pH 7,0; 100 mM) mediante una electroforesis en ausencia de SDS.

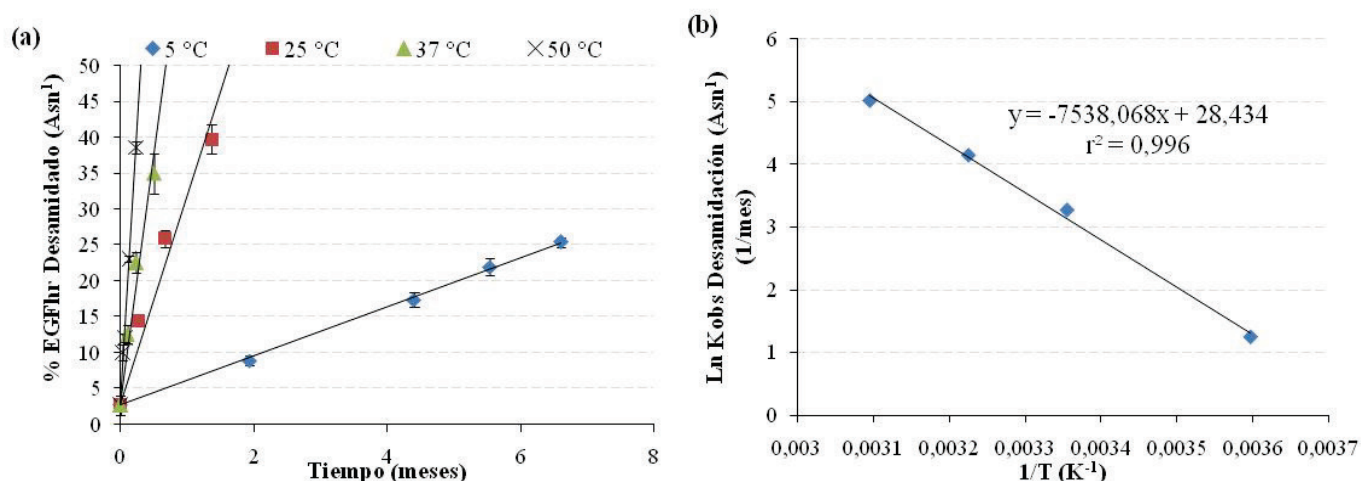


Figura 3.14. Efecto de la temperatura en la desamidación en solución acuosa del EGFhr (Asn¹) mediante electroforesis en ausencia de SDS. (a) Cinética de desamidación de la Asn¹ del EGFhr en función de la temperatura. (b) Gráfico de Arrhenius según la ecuación 1.4, del ln de la K_{obs} de desamidación (Asn¹) en función del inverso de la temperatura (kelvin).

Al calcular la constante de velocidad de desamidación (Tabla 3.2), se observa que a la temperatura de 5 ± 3 °C, condición de almacenamiento refrigerada, ocurre un incremento en la desamidación de aproximadamente 3,43 %/mes. A partir de estos resultados pueden notarse las dificultades para garantizar la calidad farmacéutica de una formulación líquida de EGFhr durante tiempos prolongados a 5 ± 3 °C.

Tabla 3.2. Valores de la constante de velocidad de desamidación del EGFhr en función de la temperatura. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

Temperatura (°C)	K_{obs} Desamidación (Asn ¹) (%/mes)	r^2
5 ± 3	3,43 (3,27-3,67)	0,999
25 ± 2	26,29 (12,30-40,28)	0,970
37 ± 2	62,94 (29,08-96,81)	0,970
50 ± 2	150,61 (128,5-172,72)	0,994

Las principales rutas de degradación del EGFhr en solución acuosa fueron la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido y la desamidación de la Asn¹, lo cual indica la complejidad para lograr la estabilidad de esta proteína durante tiempos prolongados a 5 ± 3 °C en una formulación líquida. Debido a las dificultades para controlar la desamidación del EGFhr en solución acuosa y a las altas exigencias en las regulaciones para la pureza de los productos bioterapéuticos parenterales (Q5C, 1996; Q6B, 1999), se propuso explorar una formulación en

estado sólido para encontrar una solución técnica apropiada. Por ello se propuso estudiar la estabilización del EGFhr mediante la liofilización.

3.3 Estabilización del EGFhr en una forma farmacéutica liofilizada

3.3.1 Efecto de la congelación-descongelación

Los experimentos de congelación-descongelación son útiles para identificar excipientes que estabilizan durante la congelación, la liofilización, o el almacenamiento. Durante la congelación y descongelación las proteínas se exponen a varios factores de estrés: tensiones interfaciales, fluctuaciones de temperatura, crio-concentración, cristalización de los excipientes, separación de fases y variaciones de pH (Bhatnagar y cols., 2007). En este estudio se evaluaron los mismos excipientes de uso parenteral que en el estudio de compatibilidad en solución a 50 °C (Sección 3.2.5).

Los resultados de la evaluación de la compatibilidad del EGFhr con los excipientes durante la congelación-descongelación se muestran en la tabla 3.3. Se consideraron incompatibles los excipientes que en alguna de las pruebas el rango de valores obtenidos no se solapó con el rango del control (sin excipientes) para la misma prueba, mostrando una disminución de los valores. Los excipientes incompatibles se destacan en negrita. Los azúcares reductores, y de forma más pronunciada la fructosa, afectaron la estabilidad del EGFhr en RP-HPLC. Los azúcares no reductores (sacarosa y trehalosa), y los polioles (manitol, sorbitol y glicerol) mostraron un efecto estabilizante sobre el EGFhr después de tres ciclos de congelación-descongelación, como atestiguan los resultados de RP-HPLC y ELISA. En general, el efecto de los aminoácidos y las sales en la estabilidad del EGFhr no fueron muy diferentes de los de la muestra control (sin excipiente). Los surfactantes (polisorbato 20 y 80) y el PEG afectaron la estabilidad del EGFhr después de tres ciclos de congelación-descongelación, como evidencian los resultados de pureza por RP-HPLC.

Debido a que el tampón fosfato puede presentar cambios de pH durante los procesos de congelación y descongelación, los excipientes que afectaron la estabilidad del EGFhr durante estos procesos también fueron evaluados en el tampón Tris-HCl. Como muestran los resultados de RP-HPLC de la tabla 3.3, entre los excipientes que afectaron la estabilidad del EGFhr en tampón fosfato de sodio (fructosa, polisorbatos y PEG), solamente los polisorbatos afectaron la estabilidad del EGFhr en tampón Tris-HCl. El EGFhr se oxidó con mayor facilidad en presencia de la fructosa y el PEG en el tampón fosfato de sodio que en el Tris-HCl. Esto pudiera deberse a la disminución del pH durante los procesos de congelación y descongelación en presencia del tampón fosfato (Murase y Franks, 1989), o debido a factores de interacción de estos excipientes con los tampones.

Resultados y discusión

Tabla 3.3. Efecto de los excipientes en la estabilidad del EGFhr después de tres ciclos de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelación a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, determinada mediante RP-HPLC y ELISA

Grupo	Excipientes	RP-HPLC (%) ^a	ELISA (%) ^b
Tampón (Control sin excipiente)	-	93,2 - 96,0	85,0 - 106,8
Sacáridos	Sacarosa	95,2 - 96,4	100,4 - 117,4
	Trehalosa	95,7 - 97,1	80,7 - 103,3
	Raffinosa	93,6 - 94,2	95,2 - 112,8
	Lactosa	92,4 - 93,2	98,5 - 121,3
	Glucosa	95,1 - 96,5	97,7 - 110,5
	Fructosa	77,0 - 80,0	103,3 - 114,5
Polialcoholes	Manitol	95,6 - 98,0	103,0 - 124,0
	Sorbitol	95,7 - 97,3	100,2 - 110,0
	Glicerol	91,9 - 95,3	106,9 - 119,5
Aminoácidos	Glicina	93,5 - 95,7	101,8 - 117,0
	Alanina	92,1 - 94,9	99,0 - 123,4
	Leucina	91,8 - 93,8	103,0 - 117,0
	Histidina	93,7 - 95,0	97,1 - 105,5
Surfactantes	Polisorbato 20	84,7 - 87,7	76,4 - 96,2
	Polisorbato 80	88,7 - 91,1	80,3 - 95,9
Polímeros	Dextrana 40	92,9 - 94,1	107,8 - 117,6
	PEG 6000	89,3 - 91,3	99,7 - 122,3
Sales	NaCl	93,2 - 94,4	90,9 - 112,1
	KCl	92,6 - 94,8	81,6 - 98,6
	MgCl ₂	95,0 - 97,0	82,5 - 100,9
Excipientes incompatibles evaluados en Tris-HCl pH 7,0	-	94,3 - 95,7	105,4 - 107,8
	Fructose	93,1 - 94,4	92,8 - 108,8
	Polisorbato 20	89,5 - 91,9	97,2 - 102,2
	Polisorbato 80	90,8 - 92,1	98,3 - 110,1
	PEG 6000	92,1 - 93,2	107,8 - 118,9

^aRP-HPLC (%) = [(Suma de las áreas de los picos de impurezas del EGFhr) \times 100] / (Suma de las áreas de todos los picos detectados). Se calcula para la muestra después de los ciclos de congelación-descongelación.

^bELISA (%) = [(Concentración de EGFhr por ELISA después de congelación-descongelación) \times 100] / (Concentración de EGFhr por ELISA antes de congelación-descongelación).

Se muestran los valores mínimo y máximo de los datos individuales (dos réplicas).

Resultados y discusión

Los cromatogramas representativos del EGFhr en presencia de la fructosa y el polisorbato 20 durante el estrés por congelación-descongelación son mostrados en la figura 3.15. Durante este estrés los únicos resultados afectados fueron los de RP-HPLC, no así los de ELISA. La muestra control no se afectó después de tres ciclos de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo, en presencia de fructosa mostró un incremento de las señales de los picos con trr de 0,71 y 0,93, que se corresponden con la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido del EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂, respectivamente. Las muestras en presencia de glucosa, polisorbato 80 y PEG también mostraron un pequeño incremento en las señales de los mismos picos. Este incremento en la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido durante el estrés por congelación y descongelación, pudiera deberse al incremento de la concentración de oxígeno disuelto en el hielo (Schwimmer, 1981). Otros autores han informado que la concentración de oxígeno en una solución “parcialmente” congelada a $-3,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue 1 150 veces mayor que a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fennema, 1975). Las señales de estos picos en presencia de fructosa fueron mucho más intensas que las obtenidas con el uso de los otros excipientes (Figura 3.15). La formación de sulfóxido de Met en el péptido Met-encefalina se atribuyó a la presencia de la fructosa y la glucosa. Los autores informan sobre una fuerte correlación entre la oxidación de la Met y la concentración del azúcar, con un mayor potencial oxidativo para la fructosa (Jakas y Horvat, 2008).

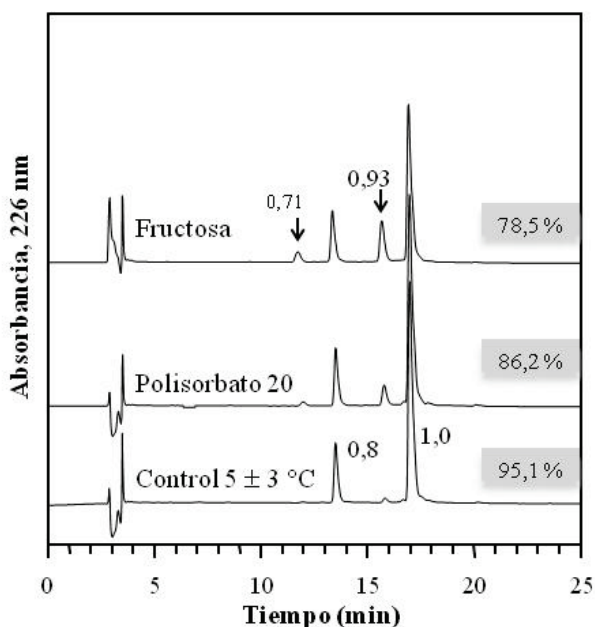


Figura 3.15. Perfiles cromatográficos del EGFhr en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0), después de 3 ciclos de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelación a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. La separación se realizó en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrilo/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min. Las flechas indican la aparición o el incremento de la señal con respecto al control con su correspondiente valor de trr. Trr (0,71): EGFhr₁₋₅₁ oxidado en Met²¹ a sulfóxido; trr (0,8): EGFhr₁₋₅₁; trr (0,93): EGFhr₁₋₅₂ oxidado en Met²¹ a sulfóxido; trr (1,0): EGFhr₁₋₅₂. Encima de cada cromatograma y sombreado se presentan los porcentajes de EGFhr no modificado remanente.

La principal ruta de degradación del EGFhr durante el estrés por congelación-descongelación fue la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido, la cual puede ser controlada con una selección adecuada de los excipientes y el pH de la solución.

3.3.2 Tamizado de excipientes para una formulación liofilizada

En el estudio de tamizado de excipientes durante la liofilización se descartaron los excipientes incompatibles con el EGFhr durante la exposición en solución a 50 °C y después del estrés por congelación-descongelación. También se descartaron otros excipientes por no ser apropiados para el proceso de liofilización, y se priorizaron aquellos que comúnmente se emplean en la liofilización de productos farmacéuticos (Wang, 2000). Las formulaciones liofilizadas están constituidas por una mezcla compleja de excipientes que beneficia al ingrediente activo o al producto como un todo. Sin embargo, la composición exacta de la formulación define los parámetros de los procesos subsiguientes. Por ejemplo, mientras más baja es la temperatura crítica del producto, más lento, largo y costoso será el proceso de liofilización. Consecuentemente, para la selección de los excipientes se combinaron elementos de su desempeño en la estabilización del EGFhr y su influencia en la temperatura de inicio de colapso (T_{ic}) mediante liomicroscopía criogénica.

La tabla 3.4 muestra los valores de T_{ic} de las formulaciones de EGFhr, donde los valores más bajos, inferiores a -40 °C, se obtuvieron en presencia de sorbitol y en el tampón fosfato. Los valores más altos, por encima de -15 °C, se obtuvieron en presencia de la Dextrana 40 y de la glicina. Los valores intermedios, entre -27,7 y -35,3 °C, fueron para la rafinosa, el manitol, la trehalosa y la sacarosa. En el caso del manitol, en la imagen del análisis por el liomicroscopio, se observó una amplia región de microcolapso entre -29,6 y -7,5 °C. Esta región de microcolapso pudiera estar relacionada con la presencia de manitol en estado amorfo. Se ha informado sobre la inhibición de la cristalización del manitol en formulaciones que contienen tampón fosfato (Izutsu y cols., 1993). En concordancia con otros estudios, los valores de T_{ic} fueron ligeramente inferiores a los valores de T_g' reportados para los mismos excipientes (por ejemplo, los valores de T_{ic}/T_g' , en °C, fueron: sacarosa -35/-32, trehalosa -32/-29 y Dextrana 40 -14/-10) (Her y Nail, 1994; Meister y Gieseler, 2009).

Los resultados de los atributos de calidad de la pastilla liofilizada se muestran en la tabla 3.4. La apariencia de la pastilla liofilizada no se alteró notablemente durante la liofilización para la mayoría de las formulaciones investigadas; lo que indica que el secado fue conducido por debajo de la temperatura crítica. Las excepciones fueron las formulaciones con sacarosa y con trehalosa, con apariencia parcialmente colapsadas. En el tampón fosfato (control sin excipiente) y con sorbitol se obtuvieron pastillas completamente colapsadas. La apariencia de la pastilla liofilizada estuvo en concordancia con los valores de T_{ic} mediante liomicroscopía criogénica y con el proceso de liofilización empleado.

Los valores iniciales de humedad residual estuvieron en el rango de 2,8-3,9 % y de 2,3-2,6 % para los procesos sin TT y con TT, respectivamente. Los niveles de humedad residual (2,3-3,9 %) fueron

Resultados y discusión

suficientes para proporcionar una pastilla organolépticamente aceptable. Los tiempos de reconstitución no fueron notablemente diferentes, todos muy pequeños, inferiores a 1 min. Este resultado probablemente se debe a las bajas concentraciones de los excipientes utilizados y de la proteína, los cuales tienden a producir pastillas que se reconstituyen fácilmente. Para las variantes de manitol y glicina, los resultados de los atributos de calidad fueron similares para los procesos sin TT y con TT (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Relación de los excipientes utilizados con las T_{ic} y los atributos de la pastilla liofilizada

Excipientes	T_{ic} (°C)	Ciclo	Apariencia	Humedad residual (%, m/m)	Tiempo de reconstitución (s)
Tampón (Fosfato Na)	$-49,5 \pm 0,5$	Sin TT*	Blanca, colapsada	$3,7 \pm 1,4$	6 ± 1
Sacarosa	$-35,3 \pm 0,4$	Sin TT*	Blanca, ligeramente colapsada	$3,1 \pm 0,3$	9 ± 2
Trehalosa	$-32,4 \pm 1,2$	Sin TT*	Blanca, ligeramente colapsada	$3,4 \pm 0,6$	11 ± 3
Rafinosa	$-27,7 \pm 0,9$	Sin TT*	Blanca, no colapsada	$3,2 \pm 0,4$	13 ± 3
Dextrana 40	$-14,1 \pm 1,2$	Sin TT*	Blanca, no colapsada	$3,9 \pm 0,5$	16 ± 2
Sorbitol	$-45,9 \pm 1,7$	Sin TT*	Blanca, colapsada	$3,7 \pm 0,5$	29 ± 2
Manitol	$-29,6 \pm 0,8$	Sin TT*	Blanca, no colapsada	$3,1 \pm 0,3$	9 ± 1
		Con TT*	Blanca, no colapsada	$2,6 \pm 0,3$	10 ± 3
Glicina	$-9,7 \pm 0,5$	Sin TT*	Blanca, no colapsada	$2,8 \pm 0,5$	11 ± 1
		Con TT*	Blanca, no colapsada	$2,3 \pm 0,3$	16 ± 2

*TT: Refiere la inclusión de tratamiento térmico durante el proceso de liofilización (Sección 2.4.2).

La estabilidad del EGFhr se estudió empleando métodos evaluados como indicativos de estabilidad. Se empleó el RP-HPLC por ser un método que evidenció ser muy versátil en su potencial para la detección de los diferentes productos de degradación del EGFhr. Como complemento del RP-HPLC se empleó el ELISA, el cual evidenció una fuerte correlación estadística positiva con el ensayo de proliferación celular y es un ensayo que permite evaluar simultáneamente un elevado número de muestras, y que es mucho más sencillo que los ensayos basados en células.

La estabilidad del EGFhr durante la liofilización se evaluó mediante la comparación de los resultados de los ensayos en las muestras antes y después del proceso. La pureza en RP-HPLC de las variantes de formulaciones liofilizadas y reconstituidas se comparó con la de la solución de partida de EGFhr, de 96,9 %. Los excipientes fueron considerados protectores cuando el error estándar de la pureza del EGFhr incluyó el valor de 96,9 %. La figura 3.16 a muestra que la pureza por RP-HPLC después de la liofilización se afectó únicamente en el control (tampón sin excipiente). En general, los valores de pureza en RP-HPLC de las formulaciones fueron similares, entre 96,1 y 97,3 %.

Resultados y discusión

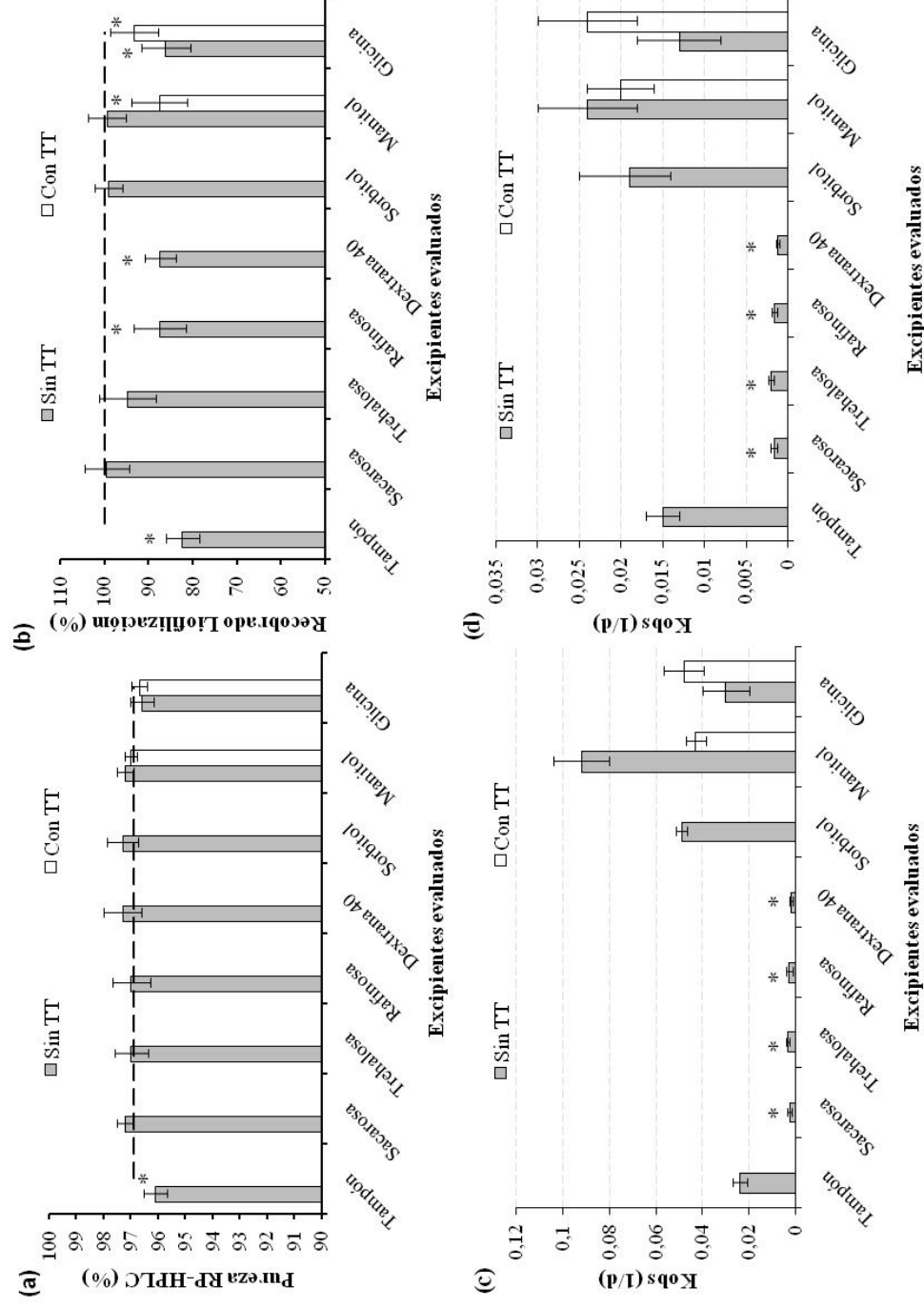


Figura 3.16. Influencia de los excipientes individuales al 2,0 % (m/v) en tampón fosfato de sodio (10 mM, pH 7,0) en la estabilidad del EGFhr. **(a, b)** Durante el proceso de liofilización, y **(c, d)** en los valores de la K_{obs} del EGFhr liofilizado durante la exposición a 50 ± 2 °C. La liofilización se realizó con los procedimientos de congelación sin TT y con TT. La estabilidad de la proteína se evaluó mediante RP-HPLC **(a, c)** y Elisa **(b, d)**. *Denota excipientes no protectores durante la liofilización **(a, b)**. La línea horizontal discontinua en **(a)** representa la pureza en RP-HPLC del EGFhr de partida (96,9 %), y en **(b)** representa el recobrado del 100 %. *Denota excipientes considerados estabilizantes durante la exposición a 50 ± 2 °C **(c, d)**. La barra de error representa el intervalo de confianza del 95 %.

Resultados y discusión

El recobrado del proceso de liofilización, evaluado mediante la concentración en ELISA, se consideró cuantitativo cuando incluyó el valor del 100 % en el intervalo de su error estándar. Los resultados del recobrado del proceso evidenciaron una disminución entre el 10 y el 20 % de la inmunoreactividad inicial, al liofilizar al EGFhr en ausencia de excipientes y en presencia de rafinosa, Dextrana 40 y glicina. También se obtuvieron pérdidas similares durante la liofilización en presencia del manitol cuando la operación se realizó con TT, figura 3.16 b. Por el contrario, la inmunoreactividad del EGFhr no se afectó durante la liofilización en presencia de sacarosa, trehalosa o sorbitol; ni en presencia de manitol cuando la operación se realizó sin TT. La ineffectividad de la rafinosa pudiera deberse a posibles interacciones de este sacárido con las proteínas a nivel de la estructura secundaria, según se evidenció mediante CD para un inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (Lim y cols., 2014a).

La estabilización completa del EGFhr se alcanzó únicamente al incorporar la proteína en matrices amorfa de disacáridos como la sacarosa y la trehalosa, en el sorbitol y además con la inclusión del manitol cuando se empleó el proceso sin TT. Las formulaciones con sorbitol y disacáridos estuvieron colapsada y parcialmente colapsada, respectivamente (Tabla 3.4). Sin embargo, en presencia de estos excipientes se logró la estabilización completa del EGFhr durante la liofilización, figura 3.16 a y b. Por el contrario, aunque las formulaciones con rafinosa, Dextrana 40, glicina y manitol (en el proceso con TT) no mostraron signos de colapso; tampoco lograron la estabilización completa del EGFhr. Informes sobre la influencia del colapso en la estabilidad de las proteínas durante la liofilización han mostrado que las pastillas colapsada tienen un tiempo de reconstitución similar, y estabilidad durante el proceso de liofilización comparable con las no colapsada en presencia del mismo excipiente (Schersch y cols., 2010). La estabilidad del EGFhr liofilizado en presencia de diferentes excipientes se estudió durante la exposición a 50 °C. Los datos experimentales demostraron una relación lineal entre el ln de la concentración remanente y el tiempo, lo que indica una cinética de primer orden tanto para el RP-HPLC como para el ELISA (Anexo 9). Los valores de las K_{obs} fueron mayores en RP-HPLC que en ELISA (Figura 3.16 c y d). El ensayo de ELISA empleado no detecta la presencia de la Met²¹ oxidada a sulfóxido en el EGFhr, y tiene un menor potencial que el RP-HPLC para detectar simultáneamente las diferentes modificaciones químicas del EGFhr (Sección 3.1).

Los resultados de los valores de K_{obs} muestran la presencia de excipientes “estabilizantes” y “no estabilizantes” del EGFhr liofilizado a 50 °C (Figura 3.16 c y d). Los estabilizantes (sacarosa, trehalosa, rafinosa y Dextrana 40) mostraron valores de K_{obs} inferiores a 0,005 d⁻¹, mientras los no estabilizantes (tampón fosfato de sodio, manitol, sorbitol y glicina) mostraron valores de K_{obs} superiores a 0,01 d⁻¹. La estabilidad durante la exposición a 50 °C de la formulación liofilizada de EGFhr mejoró, con respecto al

Resultados y discusión

control sin excipiente, al incorporar la proteína en una matriz amorfa de sacarosa, trehalosa, rafinosa o Dextrana 40. Informes sobre el efecto del colapso de los liofilizados en la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento a altas temperaturas, han mostrado una estabilidad completa de la proteína en las pastillas colapsada (Schersch y cols., 2012). Por otra parte, se ha informado una disminución de la estabilidad para los liofilizados que colapsaron durante el almacenamiento, debido al inicio de la cristalización y a la hidrólisis del estabilizante (Schersch y cols., 2013). En este trabajo no se observó relación directa entre el colapso de la pastilla del excipiente durante la liofilización y su potencial para la estabilización del EGFhr a altas temperaturas.

En el anexo 10 se muestran los perfiles de RP-HPLC típicos del EGFhr liofilizado en presencia de los excipientes después de siete días de almacenamiento a 50 °C. Los picos se identificaron según las asignaciones realizadas anteriormente por ESI-MS (Anexo 2). Como el EGFhr de partida, el liofilizado y calentado en presencia de sacarosa, Dextrana 40, trehalosa o rafinosa solamente mostraron los dos picos correspondientes a las especies principales del EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂, respectivamente. En los perfiles cromatográficos del EGFhr liofilizado en presencia de estos excipientes no se detectó la aparición de nuevos picos ni el incremento de la señal de los picos correspondientes a los productos de degradación detectados en el control, no calentado. En las formulaciones liofilizadas se encontraron las mismas rutas de degradación que en las formulaciones en solución acuosa.

Los disacáridos proporcionaron una elevada estabilización del EGFhr durante el proceso de liofilización, y el almacenamiento del liofilizado a 50 °C. Sin embargo, las T_{ic} de estas formulaciones fueron inferiores a -30 °C, y las pastillas generadas después de la liofilización experimentaron un colapso parcial. Por otra parte, se ha descrito sobre la habilidad de la Dextrana 40 para proporcionar una pastilla liofilizada amorfa con propiedades organolépticas excelentes (Michael, 2002). En este estudio, también hemos comprobado que la Dextrana 40 presenta una elevada T_{ic} (-14,1 °C) y un desempeño eficaz en la estabilización del EGFhr liofilizado durante la exposición a 50 °C. Para mejorar las propiedades tecnológicas y cosméticas de una formulación potencial de EGFhr, se propuso investigar la estabilidad de esta proteína en formulaciones liofilizadas con combinaciones de disacáridos-Dextrana 40. Debido a que la estabilización del EGFhr por la sacarosa y por la trehalosa mostró resultados similares, se seleccionó la sacarosa. Esta selección se basó en su mayor historial de uso en preparaciones liofilizadas, mayor facilidad de encontrar un proveedor de sacarosa con calidad farmacéutica y por ser menos costosa que la trehalosa.

3.3.3 Efecto de la combinación de la sacarosa y la Dextrana 40 como excipientes

Se estudió el efecto de las combinaciones sacarosa-Dextrana 40 en las propiedades farmacéuticas de la formulación. Los estudios mediante liomicroscopía criogénica mostraron un incremento en la T_{ic} con el

Resultados y discusión

incremento en la fracción másica de Dextrana 40 (Tabla 3.5). No se observaron evidencias de formación de escamas o costras en ninguna de las variantes, ni defectos macroscópicos, excepto para la variante que solo contenía sacarosa que resultó en una pastilla parcialmente colapsada. Los tiempos de reconstitución fueron inferiores a 20 s. Los niveles de humedad residual (3,0-4,2 %) fueron suficientes para proporcionar una pastilla organolépticamente aceptable (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Efecto de las combinaciones sacarosa-Dextrana 40 en la T_{ic} y en los atributos de la pastilla liofilizada de las formulaciones de EGFhr

Fracción másica de Dextrana 40 (m/m) ^a	T_{ic} (°C)	Apariencia de la pastilla	Humedad residual (% m/m)	Tiempo de reconstitución (s)
0	$-35,3 \pm 0,4$	Parcialmente colapsada	$3,3 \pm 0,3$	10 ± 2
0,25	$-30,8 \pm 0,5$	No colapsada	$3,1 \pm 0,3$	13 ± 3
0,5	$-26,0 \pm 1,4$	No colapsada	$3,0 \pm 0,2$	14 ± 2
0,75	$-19,6 \pm 0,9$	No colapsada	$3,6 \pm 0,3$	16 ± 2
1,0	$-14,1 \pm 1,2$	No colapsada	$4,2 \pm 0,3$	18 ± 3

^aFracción másica de Dextrana 40 (m/m) = (masa de Dextrana 40)/(masa de Dextrana 40 + masa de sacarosa).

En estudios de estabilización de formulaciones liofilizadas de proteínas se ha descrito sobre la mejora que produce la inclusión de la Dextrana 40 en las propiedades farmacéuticas de una formulación base de sacarosa (Allison y cols., 2000). Debido a que la Dextrana 40 tiene una alta T_g' , cercana a -10 °C (Her y Nail, 1994), la coliofilización de la sacarosa con la Dextrana 40 incrementó la T_g' y la T_{ic} de la formulación; permitiendo el uso de mayores temperaturas durante el secado primario del producto y, consecuentemente, reduciendo los costos de proceso (Tang y Pikal, 2004). Un incremento en la temperatura del producto de 1 °C disminuye el tiempo de la etapa de secado primario en aproximadamente un 13 % (Pikal, 1990). En tal sentido, la variación en la T_{ic} de aproximadamente 5 °C que se produce entre dos variantes vecinas de fracción másica de Dextrana 40 es significativo para el proceso de liofilización. Un simple cálculo aritmético permite anticipar una variación potencial de aproximadamente un 50 % en el tiempo de secado primario.

La estabilidad del EGFhr durante la liofilización se evaluó mediante la comparación de los resultados de los ensayos en las muestras antes y después del proceso. La pureza en RP-HPLC de las variantes de formulaciones liofilizadas y reconstituidas se comparó con la de la solución de partida de EGFhr, de 96,9 %. Los excipientes se consideraron protectores cuando el error estándar de la pureza del EGFhr incluyó el valor de 96,9 %. La figura 3.18 a muestra que la pureza por RP-HPLC después de la liofilización no se afectó en ninguna de las variantes.

Resultados y discusión

El recobrado del proceso de liofilización, mediante los ensayos de ELISA y de proliferación celular, se consideró cuantitativo cuando incluyó el valor del 100 % en el intervalo de su error estándar. Las tres variantes con fracciones másicas de Dextrana 40 de hasta 0,5 m/m alcanzaron un recobrado cuantitativo del EGFhr en los ensayos evaluados (Figura 3.17 a). Por el contrario, el recobrado disminuyó en las combinaciones con fracción másica de Dextrana 40 superiores a 0,5 m/m. Informes previos indican que los ensayos de ELISA y de proliferación celular son sensibles a los cambios en el plegamiento del EGFhr (Puchades y cols., 2005; Infante y cols., 2014). Un polisacárido de cadena larga, como la Dextrana 40, no puede formar enlaces por puentes de hidrógeno intermoleculares entre la proteína y el sacárido, lo que explica la incapacidad de los sacáridos grandes para proporcionarle protección a las proteínas durante el secado (Crowe y cols., 1993b). Esta pudiera ser la causa de la disminución en el recobrado del EGFhr durante la liofilización en las variantes con fracción másica de Dextrana 40 superiores a 0,5 m/m.

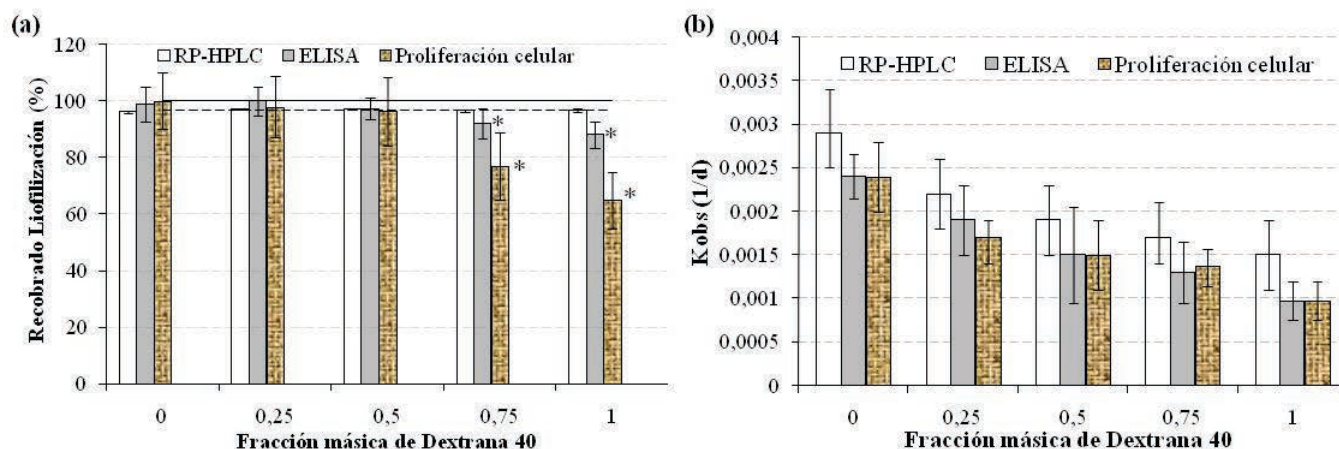


Figura 3.17. Influencia de la fracción másica de Dextrana 40 en la estabilidad del EGFhr en combinaciones sacarosa-Dextrana 40 formuladas en tampón fosfato de sodio (0,01 M, pH 7,0). La estabilidad de la proteína se evaluó mediante RP-HPLC, ELISA y ensayo de proliferación celular. (a) Recobrado del proceso de liofilización y (b) estabilidad del EGFhr liofilizado durante la exposición a 50 ± 2 °C (K_{obs}). En (a) la línea horizontal continua (100 %) representa el recobrado del 100 %, y la línea horizontal discontinua (96,9 %) representa la pureza en RP-HPLC del EGFhr de partida. *Denota pérdidas significativas del recobrado del EGFhr. En (b) la barra de error representa el intervalo de confianza del 95 %.

La estabilidad del EGFhr liofilizado durante la exposición a 50 °C se incrementó (disminución de la K_{obs}) con el incremento de la fracción másica de Dextrana 40 (Figura 3.17 b). Los cálculos de las K_{obs} para los ensayos se muestran en el anexo 11. La estabilidad del EGFhr en estado sólido durante la exposición a altas temperaturas puede ser influenciada por la T_g y la temperatura de cristalización de la formulación. El valor de la T_g reportado para la Dextrana 40 (190 °C) es muy superior al de la sacarosa (74 °C) (Saleki-Gerhardt y Zografí, 1994; Shamblin y cols., 1999). La adición de excipientes como la Dextrana 40

Resultados y discusión

puede aumentar notablemente la T_g y la temperatura de cristalización del liofilizado (Shamblin y cols., 1996). Estas propiedades también pueden influir favorablemente en el incremento de la estabilidad de los residuos de Asn/Asp contra las reacciones de desamidación/isomerización en el estado sólido (Wakankar y Borchardt, 2006; Schersch y cols., 2013).

En estado sólido, las dos causas fundamentales que originan los fenómenos de oxidación, desamidación e isomerización son la presencia de oxígeno disuelto y de agua. Ambas fueron eliminadas durante la liofilización. Es de esperar que los resultados de estabilidad sean susceptibles de ser mejorados mediante la reducción de la humedad residual del producto a través de la optimización del proceso de liofilización.

Considerando los resultados anteriores, se descartó una formulación que contenga solamente sacarosa debido a sus inferiores propiedades organolépticas, baja T_{ic} (Tabla 3.5) e inferior estabilidad a 50 °C con respecto al resto de las variantes evaluadas (Figura 3.17 b). Las formulaciones con fracciones másicas de Dextrana 40 por encima de 0,5 m/m fueron descartadas debido a la disminución del recobrado de EGFhr durante el proceso de liofilización, según los resultados de ELISA y de proliferación celular (Figura 3.17 a). Con el objetivo de mantener un margen de seguridad con relación a las composiciones críticas se seleccionó una formulación con fracción másica de Dextrana 40 de 0,25 m/m (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Composición de la formulación liofilizada de EGFhr seleccionada (fracción másica de Dextrana 40 de 0,25 m/m)

Componente	Cantidad por vial	Función
EGFhr	25, 75 o 250 μ g	Citoprotector y efecto trófico
Sacarosa	15,000 mg	Estabilizante
Dextrana 40	5,000 mg	Estabilizante
Dihidrógeno fosfato de sodio dihidratado	1,061 mg	Regulador de pH
Hidrógeno fosfato de di-sodio	0,454 mg	Regulador de pH

3.4 Evaluación de las operaciones tecnológicas y caracterización de la formulación desarrollada

Para el análisis de la calidad de una formulación liofilizada se requiere de un conjunto amplio de técnicas analíticas, que proporcionen datos que permitan una caracterización científicamente fundada de los atributos de calidad del producto y los parámetros críticos del proceso (Siew, 2014).

3.4.1 Operaciones de formulación y esterilización

Una formulación robusta debe permitir que se mantenga estable el producto biofarmacéutico durante las etapas de su fabricación. Al mismo tiempo, los parámetros claves de los procesos deben optimizarse para lograr un método de fabricación robusto (Rathore y Rajan, 2008). Debido a que las proteínas son moléculas lábiles, las fuerzas de cizallamiento que se pueden generar durante los procesos de mezclado y filtración

Resultados y discusión

pueden afectar su estabilidad (Biddlecombe y cols., 2009; Thomas y Geer, 2011). Por otra parte, la interacción de las proteínas con las superficies, o con los lixiviables de los materiales que se emplean para su fabricación, también pueden afectar su estabilidad (Bee y cols., 2011).

El efecto de la velocidad de agitación y el tiempo de mezclado en la estabilidad del EGFhr se evaluó a escala de banco para simular la influencia de las fuerzas de cizallamiento. Para ello, la formulación se sometió a diferentes velocidades de agitación, durante diferentes intervalos de tiempo; a continuación la estabilidad del EGFhr se evaluó mediante RP-HPLC. En la figura 3.18 a se observa que la única condición que afectó la estabilidad del EGFhr fue a la velocidad extrema de 400 rpm, y solamente después de 30 min de agitación. La resistencia del EGFhr al efecto de las fuerzas de cizallamiento pudiera estar relacionado con sus características estructurales: proteína pequeña y con tres enlaces por puentes de disulfuro intracatenarios. Como parte de la estrategia de control del proceso de fabricación, para el mezclado del EGFhr con el tampón de formulación, se recomiendan velocidades de agitación inferiores a 200 rpm y tiempos de mezclado máximo de 30 min.

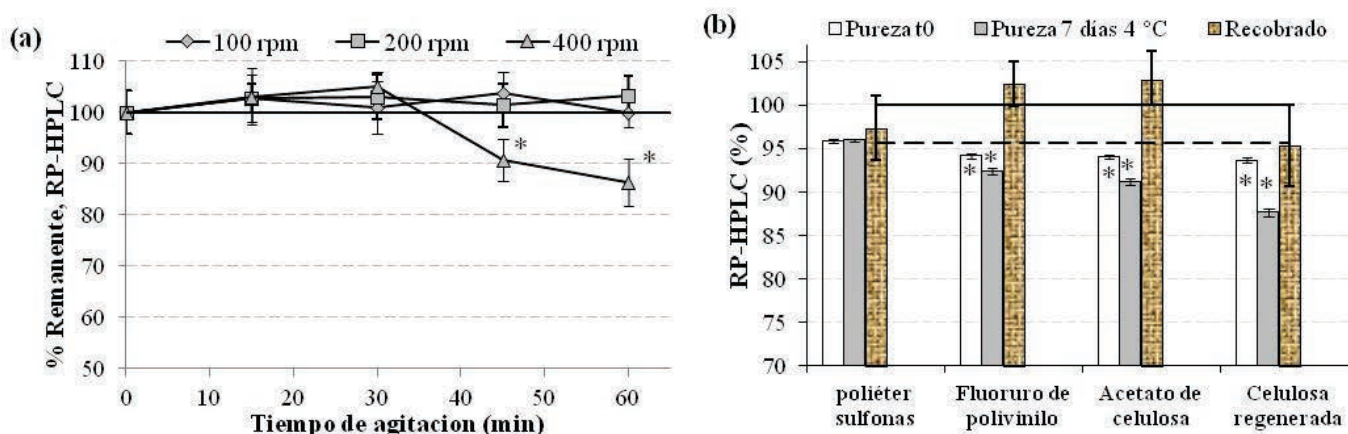


Figura 3.18. Influencia de las operaciones de mezclado y filtración esterilizante en la estabilidad de la formulación de EGFhr mediante RP-HPLC. **(a)** Efecto de la velocidad y el tiempo de agitación durante el mezclado. **(b)** Influencia de la naturaleza del medio de filtración en el recobrado y la pureza en RP-HPLC del EGFhr después de la filtración. La línea horizontal continua en ambas figuras representa el recobrado absoluto (100 %), y en **(b)** la línea horizontal discontinua representa la pureza en RP-HPLC del EGFhr de partida (95,7 %). *Denota disminución significativa del recobrado o la pureza en RP-HPLC del EGFhr (cuando el error estándar de la variable no incluyó el valor esperado (línea discontinua para la pureza en RP-HPLC y línea continua para el recobrado)).

El proceso de filtración esterilizante de las formulaciones puede afectar la estabilidad de las proteínas debido a la adsorción en las superficies del medio de filtración; la formación de agregados o la inducción de cambios químicos (Mahler y cols., 2010; Huang y cols., 2011; Liu y cols., 2012). Se evaluó el efecto

Resultados y discusión

de la naturaleza del medio de filtración en el recobrado y la estabilidad del EGFhr después del proceso de filtración (Figura 3.18 b). El recobrado de la proteína después del proceso no se afectó, el error estándar del valor medio para los medios de filtración evaluados incluyó el valor del recobrado absoluto (100 %, línea continua en la figura 3.18 b). Sin embargo, el único medio de filtración donde no se afectó la pureza en RP-HPLC del EGFhr fue al emplear los filtros de poliéter sulfonas, en este caso el error estándar del valor medio incluyó el valor de pureza del material de partida (95,7 %, línea discontinua en la figura 3.18 b). La pureza del EGFhr después de la filtración, según la naturaleza del medio de filtración mostró el siguiente orden: poliéter sulfonas > fluoruro de polivinilo > acetato de celulosa > celulosa regenerada. Después del almacenamiento del material filtrado durante siete días a 5 ± 3 °C, la pureza del EGFhr continuó invariable en las muestras donde se emplearon medios de filtración de poliéter sulfonas. Sin embargo, para el resto de las muestras la pureza continuó disminuyendo durante el almacenamiento (Figura 3.19 b).

Es posible garantizar la estabilidad del EGFhr durante los procesos de formulación y esterilización, mediante el control de la velocidad de agitación y el tiempo de mezclado, y con el empleo de filtros de poliéter sulfonas para su filtración esterilizante.

3.4.2 Caracterización de la formulación para el proceso de liofilización y ciclo empleado para la fabricación de lotes a escala piloto

Existen varias técnicas bien establecidas para la caracterización de la formulación para el proceso de liofilización. El objetivo es determinar la magnitud del enfriamiento requerido para lograr la solidificación completa de la matriz, y el valor de la “temperatura máxima permisible del producto”, para lograr una liofilización segura y eficiente (Roos, 1997). Las variables críticas de la formulación se evaluaron mediante impedancia eléctrica, ATD y liomicroscopía criogénica (Hajare y cols., 2012).

Los resultados del ATD (Figura 3.19 a) no mostraron ningún pico que pudiera relacionarse con los valores de temperatura eutéctica o de T_g' de la formulación. En la curva de ATD se señala el evento identificado como A, el cual está relacionado con el inicio de la fusión de los cristales de hielo, y el evento B representa su correspondiente pico endotérmico. Respecto a la curva de impedancia eléctrica obtenida durante el calentamiento de la muestra, se puede apreciar que en el punto D a -42 °C se produce una inflexión en el valor máximo de impedancia, lo cual indica que la congelación de esta formulación se debe realizar a un valor de temperatura de platina que garantice que se alcance al menos dicho valor, a fin de lograr la completa solidificación de la matriz. En el punto C a -26 °C se refleja un cambio brusco de la pendiente de la curva, seguida de la disminución sostenida de los valores de impedancia. Este comportamiento es

Resultados y discusión

indicativo de la desestabilización de la matriz congelada, que pudiera tener influencia sobre las variables del ciclo de liofilización (Hajare y cols., 2012).

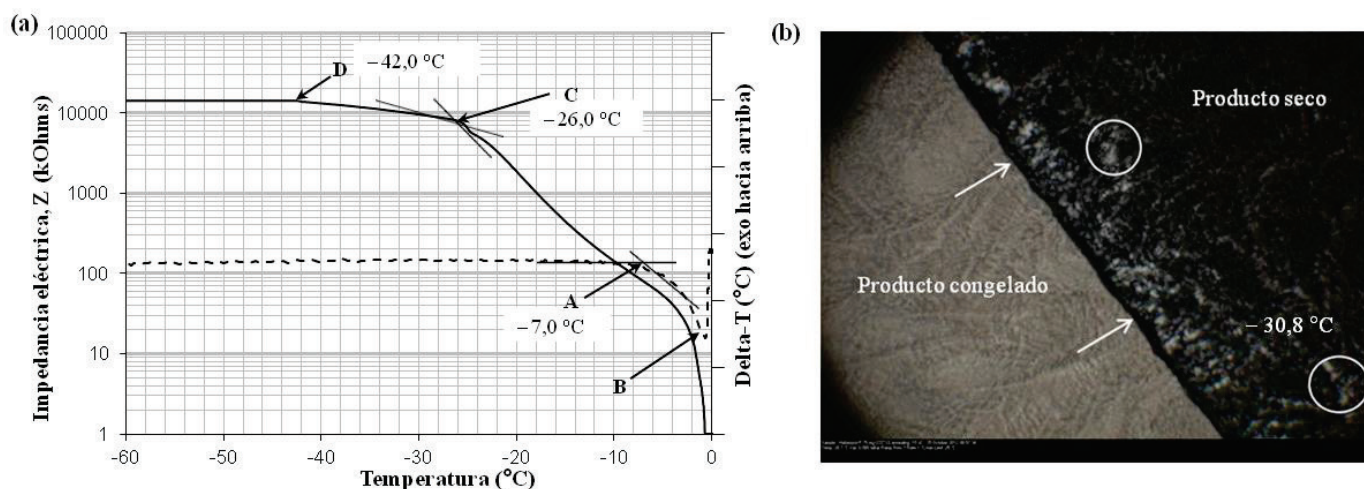


Figura 3.19. Caracterización de la formulación de EGFhr antes de la liofilización. (a) Análisis de impedancia eléctrica (línea continua) y curva de ATD (línea discontinua). (b) Análisis mediante liomicroscopía criogénica. En (b) las flechas indican la posición del frente de secado, y los círculos encierran los primeros puntos de colapso (T_{ic}), detectados durante el secado del producto.

El análisis por liomicroscopía criogénica permite la observación de los cambios morfológicos que se producen en la estructura de la matriz durante la liofilización, en función de un gradiente de temperatura previamente definido (Ward y Matejtschuk, 2010). En la figura 3.19 b se muestra la imagen tomada en el liomicroscopio al evaluar la formulación de EGFhr. En la misma se reflejan los cambios microscópicos que se producen en la morfología de la matriz, a medida que se sobrepasan los valores de temperatura de colapso. Los resultados evidenciaron una T_{ic} de $-30,8^{\circ}\text{C}$ y una temperatura de colapso completo de $-27,8^{\circ}\text{C}$. Al variar la concentración de la proteína entre 25 y 250 $\mu\text{g/mL}$, se obtuvieron valores de T_{ic} similares y cercanos a $-30,8^{\circ}\text{C}$. No se encontraron signos de formación de costras o escamas en las diferentes condiciones.

Los resultados anteriores se tuvieron en consideración para diseñar el ciclo de liofilización a escala piloto. Este producto puede liofilizarse con facilidad a temperaturas cercanas a $-30,8^{\circ}\text{C}$ después de una congelación inicial a temperaturas inferiores a $-42,0^{\circ}\text{C}$. En la figura 3.20 se muestra el ciclo de liofilización empleado para la fabricación de la formulación liofilizada de EGFhr a escala piloto. Se observa que la temperatura del producto, medida mediante termopares, se mantuvo por debajo de $-33,0^{\circ}\text{C}$, con valores inferiores a la T_{ic} del producto de $-30,8^{\circ}\text{C}$. Los lotes fabricados a escala piloto, empleando el ciclo mencionado, lograron de forma consistente valores de humedad residual inferiores al 5,0 % (m/m).

Resultados y discusión

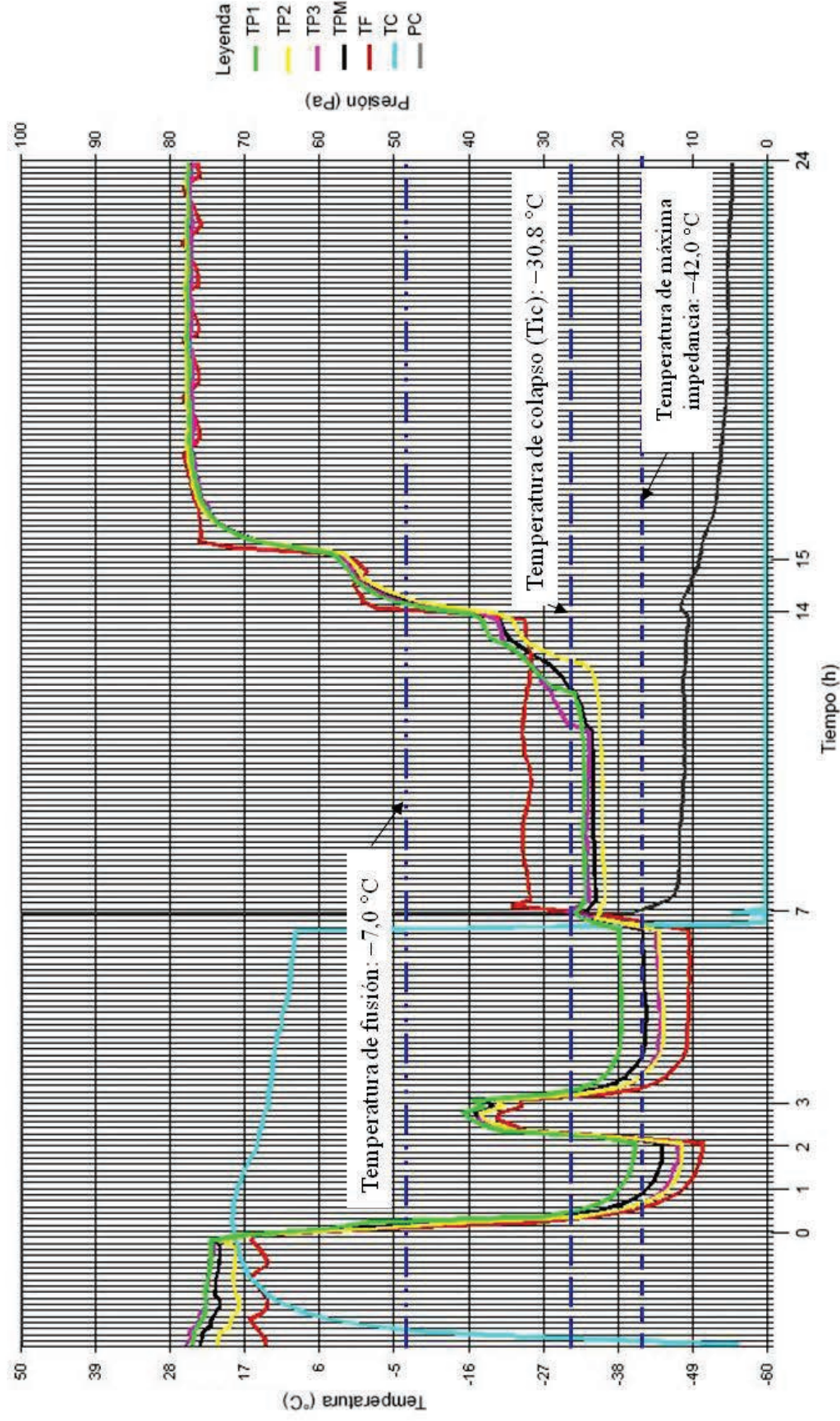


Figura 3.20. Perfil de presión-temperatura en función del tiempo, del ciclo de liofilización utilizado para la producción a escala piloto de la formulación liofilizada de EGfhr. TP-temperatura termopar, TPM-temperatura media de los tres termopares, TF-temperatura del fluido, TC-temperatura del condensador y PC-presión de la cámara. El tiempo antes del inicio del ciclo representa la carga de la máquina con el producto. Las temperaturas críticas del proceso aparecen como líneas discontinuas horizontales e identificadas con flechas.

Resultados y discusión

3.4.3 Efecto de la humedad residual en la temperatura de transición vítrea

La caracterización de la T_g y su relación con la humedad residual son elementos importantes de todo producto liofilizado, ya que se considera como un atributo crítico de calidad que la T_g del producto sea superior a la temperatura de almacenamiento. La figura 3.21 a muestra los termogramas de DSC empleados para determinar la T_g del producto a diferentes valores de humedad residual, según el método de Karl Fisher. Con el incremento de la humedad residual del producto disminuyó el valor de su T_g , con valores de T_g de 52,6 y 42,0 °C para valores de humedad residual de 3,06 y 4,22 %, respectivamente.

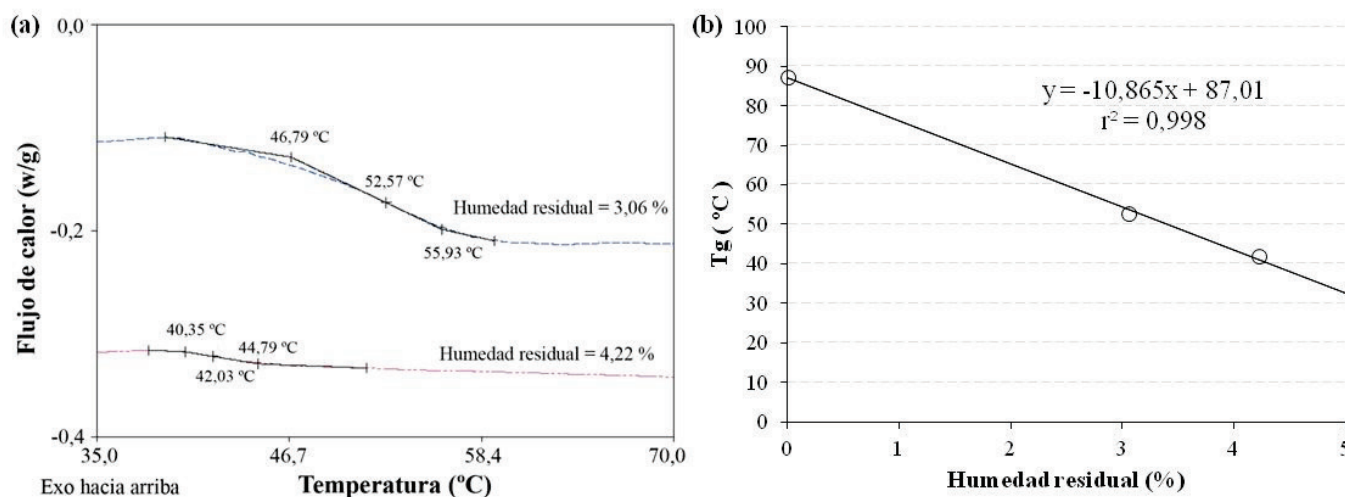


Figura 3.21. Relación de la T_g de la formulación liofilizada de EGFhr con la humedad residual. (a) Determinación mediante DSC de la T_g de la formulación liofilizada de EGFhr para diferentes valores de humedad residual del producto. (b) Relación de la T_g con la humedad residual del liofilizado. En (b) se inserta la ecuación obtenida mediante análisis de regresión, y que es:

$$T_g = -10,87 \times \text{humedad residual} + 87,01 \quad (r^2 = 0,998) \quad [3.1]$$

La figura 3.21 b muestra la relación entre la T_g y la humedad residual de la formulación en estudio. Empleando la ecuación de ajuste obtenida mediante análisis de regresión, como tendencia a la linealidad entre los parámetros T_g y humedad residual, es posible estimar el valor de T_g para cualquier valor de humedad residual del producto. Por ejemplo, para una humedad residual del producto del 5,0 %, el valor de T_g estimado está por encima de 30 °C. Según refiere la ICH, para productos que se almacenan bajo condiciones refrigeradas (5 ± 3 °C), la condición de estudio acelerado es de 25 ± 2 °C (Q1A(R2), 2003). Por consiguiente, desde este punto de vista, el producto puede ser aceptable con valores de humedad residual de hasta el 5,0 %. Para una formulación que solo contiene sacarosa se informa un valor de T_g de 59 °C para una humedad residual del 1,0 % (Saleki-Gerhardt y Zografí, 1994). Sin embargo, para la

Resultados y discusión

formulación sacarosa-Dextrana 40 desarrollada en este trabajo se estima un valor de T_g superior (de 76,2 °C) para el mismo valor de humedad residual (1,0 %).

3.4.4 Tiempo de reconstitución y materia particulada

Un atributo deseado de todo producto liofilizado es lograr una rápida reconstitución, que de lugar a una solución transparente y libre de partículas. La pastilla de la formulación liofilizada de EGFhr se reconstituyó fácilmente, con un tiempo de reconstitución inferior a 20 s. Entre los métodos para cuantificar la presencia de partículas subvisibles se encuentran el de oscurecimiento de la luz, la microscopía y el de zona de detección eléctrica (Coulter) (Singh y cols., 2010). El conteo de partículas subvisibles aceptable en preparaciones parenterales deben ser inferior a 6000 para partículas mayores o iguales que 10 μm , e inferior a 600 para partículas mayores o iguales que 25 μm (USP<788>, 2008). La figura 3.22 muestra los resultados para la formulación de EGFhr con el método de oscurecimiento de la luz. El conteo de partículas mayores o iguales que 10 μm fue inferior a 3000 y para partículas mayores o iguales que 25 μm fue inferior a 50. Estos resultados son muy inferiores a los límites exigidos por la USP.

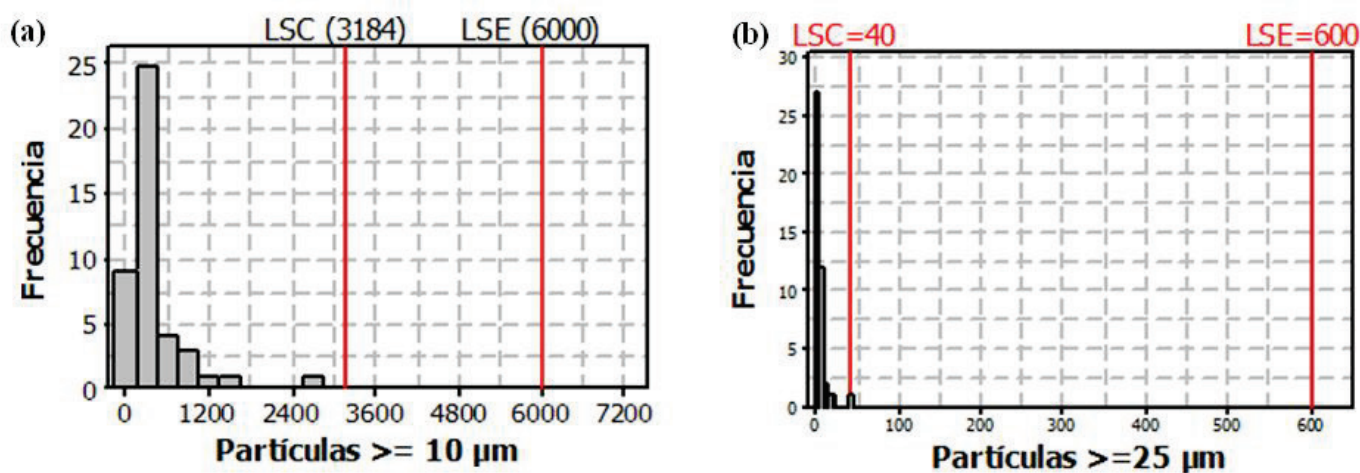


Figura 3.22. Histograma de frecuencia de los datos observados para la variable partículas subvisibles. (a) Histograma de los datos observados para la variable partículas mayores o iguales que 10 μm ; y (b) para la variable partículas mayores o iguales que 25 μm . Se emplearon resultados de 44 lotes. LSC-límite superior de control; LSE-límite superior de especificación (USP<788>, 2008).

De conjunto, los resultados de las evaluaciones y caracterizaciones de la formulación parenteral de EGFhr desarrollada evidenciaron que la misma mantiene una calidad apropiada durante los procesos de formulación, esterilización por filtración y liofilización, lo cual permitirá su uso como medicamento inyectable.

3.4.5 Efecto de los procesos de liofilización y simulación de la inyección en la estabilidad del EGFhr

Como el ambiente de las heridas crónicas se caracteriza por la presencia de células inflamatorias, proteasas y contaminación microbiana (Schultz y Gibson, 2013); es deseable que el producto biofarmacéutico inyectable sea isotónico (270-330 mOsmol/kg). Por otra parte, no es obligatorio que este producto sea isotónico, debido a que se trata de un parenteral de “pequeño” volumen, menor de 5,0 mL (De Luca y cols., 1992). Por consiguiente, para evaluar la estabilidad de la formulación de EGFhr se utilizaron como solvente de reconstitución el AI y la SSF.

Los procesos de liofilización y reconstitución pudieran dañar la estabilidad de las formulaciones de proteínas. Además, el efecto global del paso de la formulación a través del sistema de inyección a ser empleado en la clínica también pudiera dañar la estabilidad de la proteína, debido al estrés por cizallamiento durante la liberación (Thomas y Geer, 2011). La estabilidad del EGFhr durante los procesos de liofilización, reconstitución y el paso a través del sistema de inyección, se evaluó por diferentes métodos analíticos. Se evaluaron tres muestras: Pre-Liof., Liof.-reconstituido y después de la simulación de la inyección (Después-Jeringa).

Análisis físico-químicos

Como se evidenció en los capítulos anteriores, el análisis del EGFhr en RP-HPLC ha permitido la detección simultánea de los productos de degradación que con frecuencia aparecen en esta molécula. La figura 3.23 a muestra los cromatogramas de RP-HPLC de las muestras evaluadas: Pre-Liof., Liof.-reconstituido y Después-Jeringa, donde son separados los dos picos principales, el EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂. Los perfiles cromatográficos de las cinco muestras fueron similares. Esto evidenció que ni el proceso de liofilización, ni el de simulación de la inyección afectaron la estabilidad química del EGFhr. El EGFhr permaneció estable independientemente de que el liofilizado fuera reconstituido con AI o SSF.

La agregación del EGFhr en las muestras se evaluó mediante SEC (Figura 3.23 b). Los perfiles cromatográficos indicaron que la estabilidad coloidal del EGFhr no se afectó durante los procesos de liofilización ni de simulación de la inyección, después de la reconstitución con AI o con SSF. La población principal de moléculas eluyó a aproximadamente 29,8 min, lo que se corresponde con el monómero de EGFhr (M_M de 5 700 g/mol), según su determinación a partir de la curva de calibración derivada de los marcadores de M_M (Figura 3.23 b). Las señales de los picos de los excipientes pueden identificarse por comparación directa con el placebo (15 mg/mL de sacarosa, 5 mg/mL de Dextrana 40 en tampón fosfato de sodio a 0,01 M, pH de 6,5 a 7,0). No se detectaron ni agregados ni fragmentos de EGFhr.

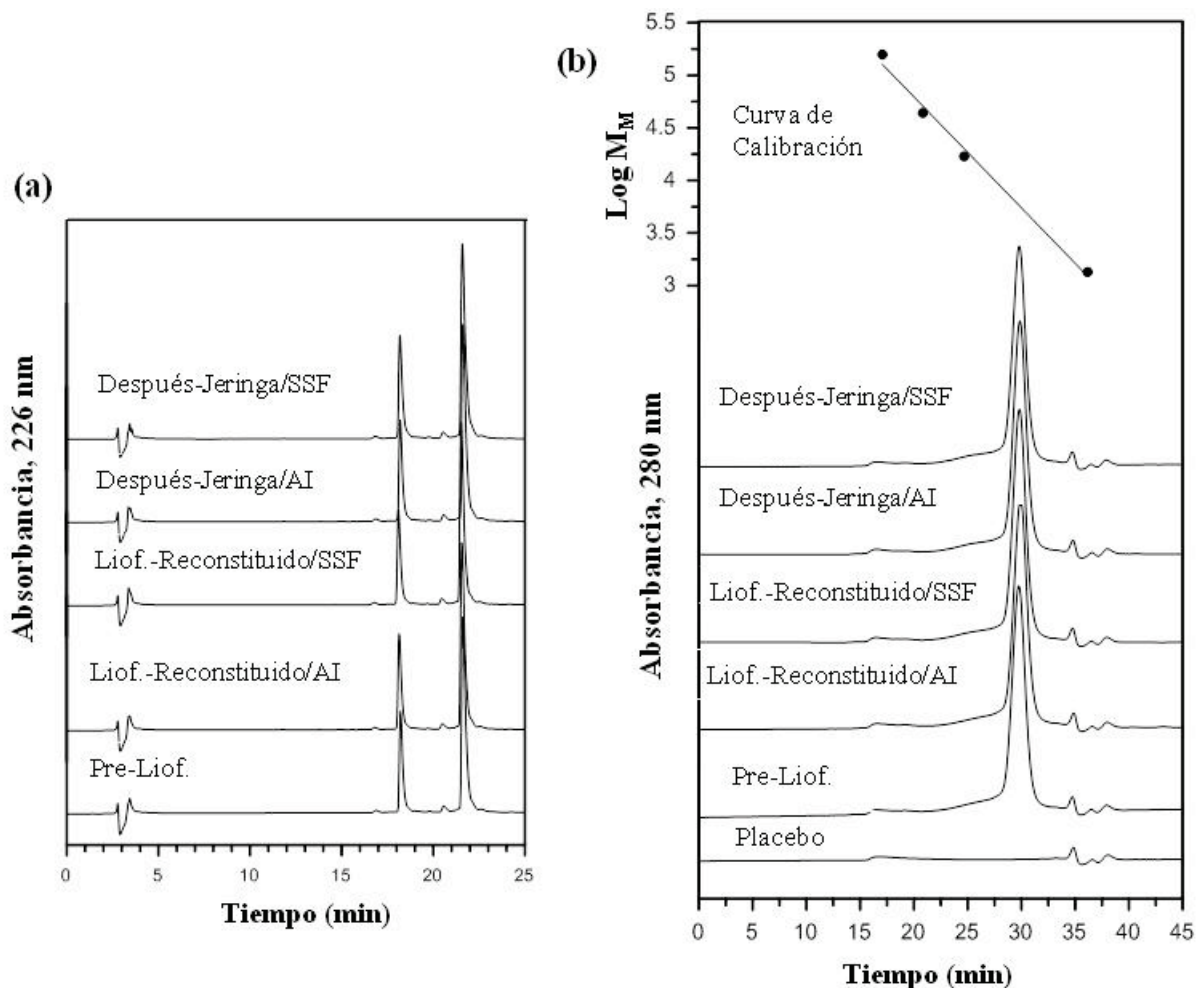


Figura 3.23. Efecto del proceso de liofilización y simulación de la inyección en la estabilidad del EGFhr mediante HPLC. (a) Superposición de los cromatogramas en RP-HPLC. Las especies se separaron en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrilo/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min. (b) Superposición de los cromatogramas en SEC. Las especies se separaron en una columna Superdex 75 empleando como fase móvil el tampón 0,1 M NaPO₄/0,5 M arginina-HCl a pH 6,5 y una velocidad de flujo constante de 0,5 mL/min. Se inserta la curva de calibración derivada de los marcadores de M_M. Las muestras liofilizadas fueron reconstituidas con AI o con SSF.

Estabilidad del plegamiento de la proteína

La evaluación de la estabilidad del plegamiento de las proteínas es importante durante la caracterización de una formulación liofilizada, ya que la preservación de la conformación nativa es una garantía para el mantenimiento de su actividad biológica (Friess y Winter, 2013). Se ha informado que la retención del plegamiento de la proteína después de la liofilización es un indicador de mayor estabilidad de la preparación (Xu y cols., 2013). La forma de los espectros de CD de las muestras, Pre-Liof., Liof-reconstituido y Después-Jeringa para el producto reconstituido con AI o con SSF fueron similares.

Resultados y discusión

Esto evidenció que el plegamiento del EGFhr no varió significativamente como resultado de las operaciones de liofilización, reconstitución y simulación de la inyección (Figura 3.24 a).

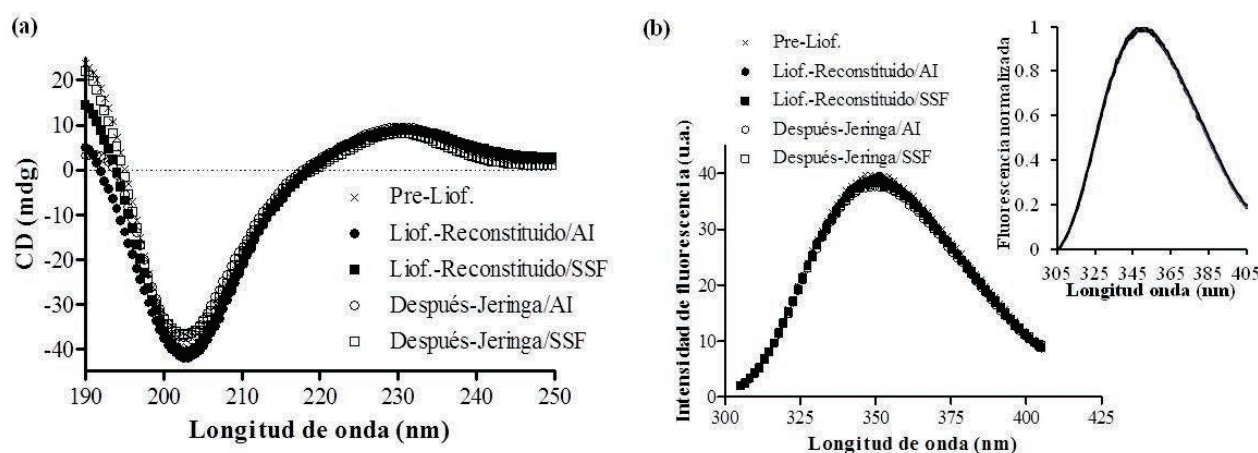


Figura 3.24. Efecto de los procesos de liofilización y simulación de la inyección en la estabilidad del plegamiento del EGFhr. (a) Superposición de los espectros de CD en el UV-lejano, y (b) superposición de los espectros de fluorescencia intrínseca del Trp. El inserto de (b) muestra los espectros de fluorescencia normalizada para las mismas muestras. Las muestras liofilizadas fueron reconstituidas con AI o con SSF.

El plegamiento del EGFhr se evaluó mediante espectroscopía de fluorescencia intrínseca del Trp, con espectros prácticamente idénticos para las muestras, lo que indicó la ausencia de cambios mayores en el ambiente local de los residuos de Trp (Figura 3.24 b). Los espectros normalizados de las muestras correspondientes a los diferentes procesamientos fueron prácticamente idénticos, con máximo de emisión cercano a 350 nm, y con desviación estándar de los valores de la longitud de onda del máximo de emisión de 1,3 nm del promedio. Estos resultados fueron similares a los reportados para el EGFhr en acetato de sodio a pH 3,6 (Gallay y cols., 1993). Los espectros son típicos de residuos de Trp expuestos y flexibles (Reshetnyak y cols., 2001; Lakowicz, 2006), los cuales son consistentes con la propiedades estructurales mostradas por el Trp⁴⁹ y el Trp⁵⁰ en la estructura tridimensional del EGFhr a pH fisiológico (Huang y cols., 2010). Todas estas observaciones, de conjunto, indican que no ocurrieron cambios mayores en el ambiente atómico de los residuos de Trp. En caso de agregación deberían detectarse cambios espectrales.

Inmunoreactividad y actividad biológica

La inmunoreactividad del EGFhr en las muestras evaluadas: Pre-Liof., Liof-reconstituido y Después-Jeringa, se evaluó utilizando un ELISA tipo sandwich basado en dos anticuerpos monoclonales que reconocen epitopos conformacionales (Infante y cols., 2014). Las curvas dosis-respuesta del ELISA para las muestras fueron superponibles, lo que indica que las operaciones realizadas no afectaron la propiedad de unión del EGFhr a los dos anticuerpos monoclonales utilizados en dicho ensayo (Figura 3.25 a).

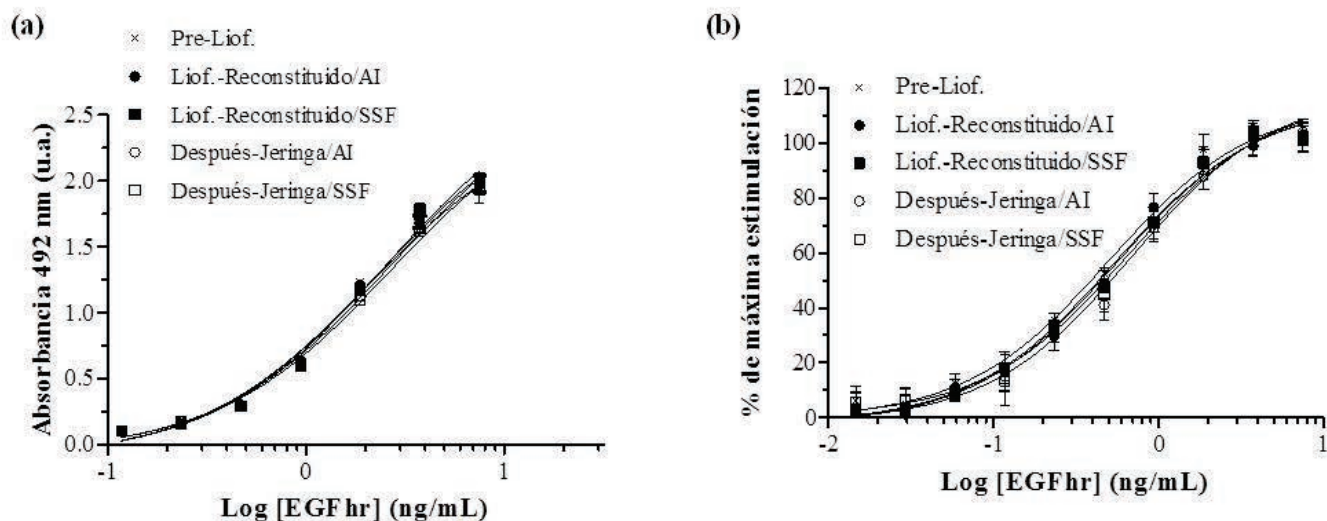


Figura 3.25. Efecto de los procesos de liofilización y simulación de la inyección en la estabilidad del EGFhr mediante los ensayos biológicos. **(a)** inmunoreactividad en un ELISA basado en anticuerpos monoclonales. Las barras de error no son visibles en la escala de la figura. **(b)** Actividad biológica en ensayo de proliferación celular. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con AI o con SSF.

La actividad biológica *in vitro* del EGFhr se evaluó utilizando un ensayo de proliferación celular. Las curvas log (concentración) *versus* respuesta mostraron una forma sigmoide simétrica. Las curvas dosis-respuestas de la actividad biológica de las muestras evaluadas fueron virtualmente superponibles, lo que indica que ni el proceso de liofilización ni el de simulación de la inyección afectaron la propiedad de unión del EGFhr a su receptor celular (Figura 3.25 b). Los valores de la CE_{50} de las muestras oscilaron entre 0,56 y 0,68 ng/mL, resultando similares a la informada para el EGFhr₁₋₅₃ de 0,6 ng/mL (Miyachi y cols., 1998).

Los resultados presentados evidencian que la formulación parenteral de EGFhr seleccionada proporciona una estabilización completa a la proteína durante los procesos de liofilización, reconstitución (AI y SSF), y el paso a través del sistema jeringuilla y aguja. Esta conclusión se basa en los resultados de RP-HPLC, SEC, CD, fluorescencia intrínseca del Trp, ELISA y ensayo de proliferación celular.

3.5 Estabilidad del EGFhr liofilizado en condiciones de estrés

3.5.1. Evaluación mediante ESI-MS de la estabilidad en condiciones de estrés del EGFhr liofilizado

El análisis de la proteína intacta mediante ESI-MS se considera una herramienta ideal para evaluar la estabilidad química de los péptidos y proteínas (Staub y cols., 2011; Fang y cols., 2012). Por tal motivo, se determinó la masa molecular del EGFhr mediante ESI-MS en las muestras después del proceso de liofilización y después del almacenamiento del liofilizado durante 15 días a 50 °C. En los espectros ESI-MS de la proteína intacta (Figura 3.26 a y b) solamente se observan las señales de los estados de carga 4+, 5+ y 6+ que coinciden con los valores esperados para las especies del EGFhr₁₋₅₁ y el EGFhr₁₋₅₂ sin modificaciones

Resultados y discusión

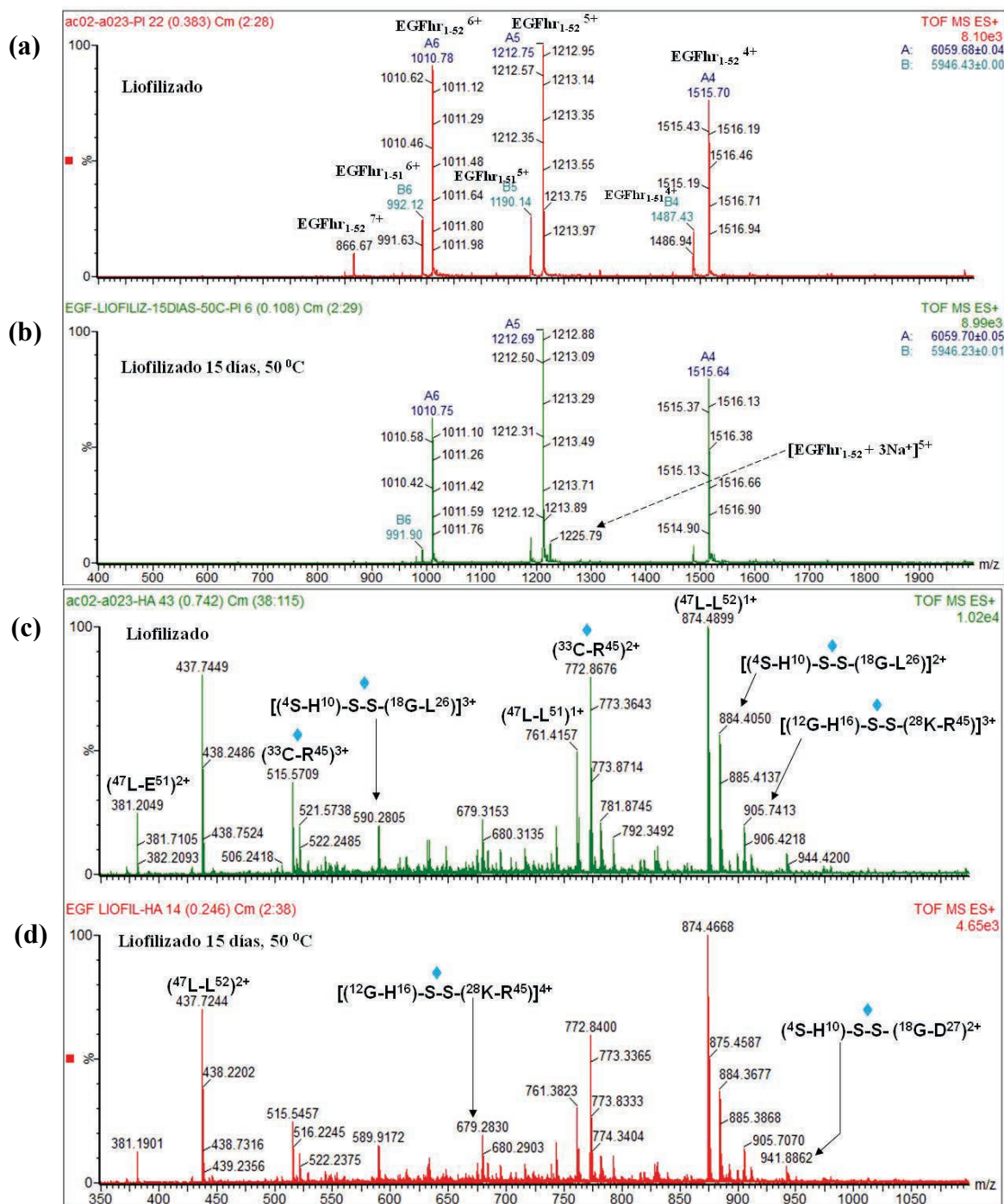


Figura 3.26. Evaluación de la estabilidad del EGFhr liofilizado mediante espectrometría de masas. Espectros ESI-MS de la proteína intacta contenida en el producto liofilizado (a), y en el liofilizado después del almacenamiento por 15 días a 50 ± 2 °C (b). En la esquina superior derecha de cada espectro (a y b) con las letras A y B se muestran las masas moleculares promedio del EGFhr₁₋₅₂ y EGFhr₁₋₅₁ (masas teóricas: 6 059,82 y 5 946,66 g/mol), respectivamente. Espectros ESI-MS (350-1 100 m/z) correspondientes a la hidrólisis ácida parcial del EGFhr contenido en el producto liofilizado (c), y en el liofilizado después del almacenamiento por 15 días a 50 ± 2 °C (d). En los espectros ESI-MS (c y d) se indican marcados con rombo los iones correspondientes a los péptidos que contienen las cisteínas unidas por enlaces disulfuro.

Resultados y discusión

químicas. Tampoco se detectaron nuevas señales que indiquen la aparición de modificaciones en el EGFhr durante la liofilización o el almacenamiento del liofilizado durante 15 días a 50 °C.

Los resultados anteriores evidenciaron que la liofilización fue una herramienta útil para lograr la estabilización del EGFhr. Sin embargo, las modificaciones covalentes como el intercambio de puentes disulfuro pueden ocurrir incluso en estado sólido (Yoshioka y cols., 1993). Por ejemplo, se ha descrito un incremento en la reactividad de la reacción de intercambio de enlaces disulfuro en estado sólido respecto a solución de péptidos derivados de la hormona de crecimiento humano (Chandrasekhar y Topp, 2015).

Considerando las razones anteriormente descritas se investigó sobre la formación correcta de los enlaces disulfuro del EGFhr en la formulación liofilizada, y después de calentada. Según se muestra en la figura 3.26 c y d, en los espectros ESI-MS se encontraron solamente los iones correspondientes a los diferentes péptidos que contienen las cisteínas formando los enlaces disulfuro intramoleculares esperados para el EGFhr (Cys⁶-Cys²⁰, Cys¹⁴-Cys³¹ y Cys³³-Cys⁴²). En este caso, de forma similar a como se analizó para los estudios de degradación forzada en solución acuosa en la sección 3.1.1, también se realizó una búsqueda exhaustiva de las variantes peptídicas que teóricamente se pueden generar en el espectro ESI-MS de la hidrólisis ácida parcial del EGFhr. La presencia de cada una de estas señales se buscó minuciosamente en el espectro ESI-MS después de magnificar adecuadamente cada una de las regiones en que se deberían detectar las distintas especies multicargadas. No se detectó señal alguna que coincidiera con las m/z y la distribución isotópica predichas.

3.5.2. Efecto de la humedad residual del liofilizado en la velocidad de desamidación del EGFhr

Debido a que los niveles de humedad residual del sólido pueden influir en la velocidad de desamidación, la estabilidad del EGFhr liofilizado se evaluó a diferentes valores de humedad residual y temperaturas de almacenamiento. La desamidación de la Asn¹ del EGFhr se cuantificó mediante electroforesis en ausencia de SDS. Empleando la expresión 3.1 obtenida a partir del gráfico de la figura 3.21 b, que relaciona los valores de humedad residual con la T_g del producto, fue posible estimar la T_g correspondiente a partir de los valores de humedad residual. En la figura 3.27 a se muestran los patrones electroforéticos de liofilizados con diferentes valores de humedad residual después de la exposición a 50 °C. Se observa un incremento de la intensidad de la banda del EGFhr desamidado con el incremento de la humedad residual.

En el anexo 12 se muestran las curvas de incremento en la desamidación de la Asn¹ en el liofilizado a diferentes valores de humedad residual para las temperaturas de 25, 37 y 50 °C. A partir de la pendiente de estas curvas se calculó la K_{obs} de desamidación para cada variante. Los valores de la K_{obs} de desamidación (Asn¹) del liofilizado a 2,8 % de humedad residual, comparados con los del EGFhr en estado acuoso

Resultados y discusión

(Sección 3.2.6), fueron de 61, 50 y 26 veces inferiores a las temperaturas de 25, 37 y 50 °C, respectivamente. Estos resultados se corresponden con la disminución de la K_{obs} de desamidación en estado sólido con respecto a solución acuosa (entre 2,7 y 116,6 veces), reportada para algunos péptidos (Li y cols., 2006).

Con los valores de la K_{obs} de desamidación, la T_g y la temperatura de almacenamiento de cada variante se construyó el gráfico de la figura 3.27 b. A temperaturas de almacenamiento por debajo de la T_g ($T - T_g < 0$) se reduce considerablemente la K_{obs} de desamidación, llegando a anularse aproximadamente a 25 °C por debajo de la T_g . Esto significa que el producto terminado con una humedad residual inferior al 3,0 % pudiera almacenarse de forma estable a 25 °C.

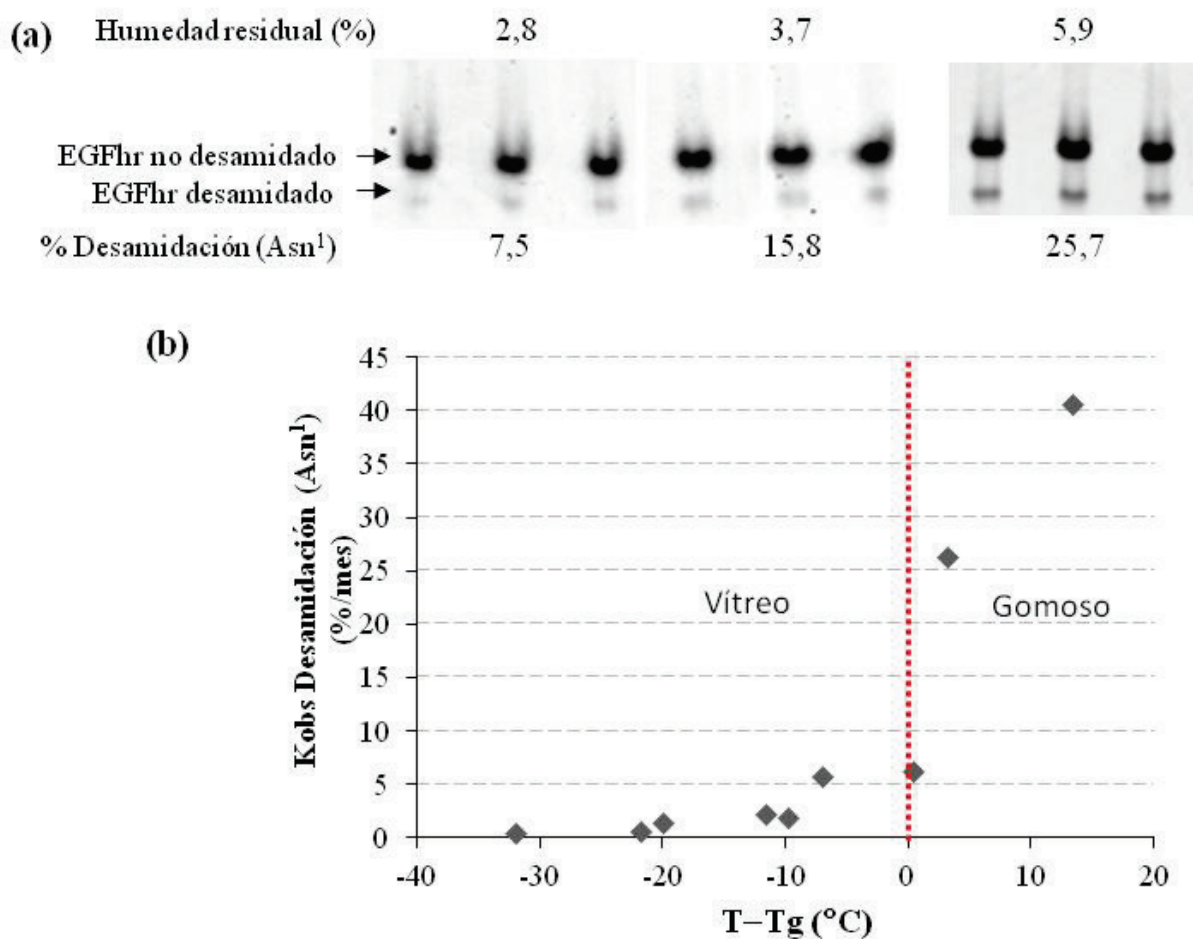


Figura 3.27. Cuantificación de la desamidación del EGFhr en función de la humedad residual y la T_g de la formulación liofilizada. (a) Análisis mediante electroforesis en ausencia de SDS de las muestras con diferentes valores de humedad residual después de 15 días de almacenamiento a 50 ± 2 °C. (b) Relación de la K_{obs} de desamidación (Asn¹) en función de la diferencia entre la temperatura de almacenamiento (T) y la T_g del producto. La identificación del EGFhr no desamidado y desamidado se corresponden con la migración de los patrones mostrados en la figura 3.3.

Resultados y discusión

Los resultados de este trabajo son similares a informes recientes con relación a la preparación de polvos liofilizados de liposomas redispersables para la liberación transdermal de EGFhr (Yin y cols., 2014). En dicho estudio se demostró que la estabilidad del EGFhr libre en la solución tampón disminuyó marcadamente después de un mes a 25 °C, con solamente un 9,7 % del EGFhr de partida. La formulación de EGFhr en liposomas incrementó la estabilidad de la proteína en solución; y los polvos de liposomas secados mediante liofilización convencional y liofilización por atomización ultrasónica mantuvieron su completa estabilidad después de un mes de almacenamiento a 25 °C.

De conjunto, los resultados de la evaluación de la estabilidad de la formulación liofilizada de EGFhr en condiciones de estrés por temperatura (25-50 °C) y humedad residual (2,8-5,9 %) mediante electroforesis libre de SDS, y mediante ESI-MS (15 días a 50 °C), permiten anticipar una elevada estabilidad del producto terminado. Posteriormente se estudiará la estabilidad del producto en condiciones aceleradas (25 ± 2 °C/ 60 ± 5 % de humedad relativa) y refrigeradas (5 ± 3 °C).

3.5.3 Efecto de los materiales de envase en la fotoestabilidad en condiciones de estrés del EGFhr liofilizado

La exposición a la luz blanca/UV puede afectar a las proteínas en una forma farmacéutica particular en dependencia del envase. Los productos biofarmacéuticos pueden ser afectados por las radiaciones de forma directa o indirecta, en dependencia de cómo la energía de la radiación es transferida (Kerwin y Remmele, 2007). Los medicamentos sensibles a la luz pueden ser afectados por la luz solar (especialmente la radiación ultravioleta) o por las fuentes de luz artificial (por ejemplo, la luz fluorescente). Como consecuencia aparecen cambios en las propiedades físico-químicas o biológicas del producto. Los estudios de estrés confirmaron que el EGFhr es sensible a la fotólisis inducida por la radiación UV (Sección 3.1.2).

La protección física de la exposición a la luz blanca/UV con el sistema de envase primario o secundario puede ser necesaria para proteger a las proteínas lábiles de la fotooxidación. Para determinar si los materiales de envase primario y/o secundario son apropiados para proporcionar una protección efectiva a la formulación liofilizada de EGFhr del efecto perjudicial de la luz blanca/UV, se evaluó la fotoestabilidad en condiciones de estrés. La aparición de cambios durante la exposición de las muestras fue evaluada mediante diferentes pruebas analíticas y los resultados comparados con los valores de referencia. La significación de los cambios se determinó mediante ANOVA utilizando un nivel de significación de 0,05 (Anexo 13).

La tabla 3.7 muestra los resultados del efecto de la exposición a la luz blanca/UV de la formulación liofilizada de EGFhr en diferentes condiciones de envase. No se encontraron diferencias en las propiedades

Resultados y discusión

Tabla 3.7. Resultados del estudio de fotoestabilidad para la calificación de los materiales de envase a utilizar en la formulación liofilizada de EGFhr. Los datos cuantitativos representan el intervalo de confianza del 95 %

Pruebas	Valores de Referencia	Análisis inicial (t ₀)	Control oscuridad	Envase primario ^a	Envase secundario ^b
Inspección visual	Pastilla liofilizada, blanca	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Reconstitución	Completa (≤ 20 s), no dejando residuos visibles como materia no disuelta y dando lugar a una solución clara e incolora	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Identificación ELISA	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado
Actividad específica ($\times 10^6$ UI/mg)	1,5-5,0	1,8-2,4	2,1-2,6	1,7-2,3	2,1-2,6
Pureza (%)					
1. RP-HPLC	$\geq 95,0$ EGFhr ₁₋₅₁ + EGFhr ₁₋₅₂	97,4-97,6	97,2-97,5	94,1-94,5*	97,2-97,6
2. SEC	$\geq 95,0$ %	98,3-98,9	98,3-98,8	97,3-98,3*	98,3-98,9
3. SDS-PAGE	$\geq 95,0$ %	100	100	100	100

^aEnvase primario: Viales 6R de vidrio de borosilicato neutro claro tipo I, calidad hidrolítica cerrados con tapones para liofilización de bromobutilo de 20 mm y sellados con sellos de aluminio y plástico tipo flip off.

^bEnvase secundario: Caja de cartón de papel plegable táctica inversa de 220 g/m² con barniz UV.

* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

organolépticas de los viales pertenecientes a las diferentes condiciones de irradiación, tanto antes como después de su reconstitución, ni cambio de color como resultado de la exposición a la luz blanca/UV. Por otra parte, la actividad específica en el ensayo de proliferación celular no se afectó, en comparación con los valores de referencia después de la irradiación en los materiales de envase estudiados, con una probabilidad de 0,3864 (Anexo 13). La pureza del EGFhr medida en SEC después de la exposición a la luz blanca/UV disminuyó significativamente en las muestras expuestas en el envase primario con respecto a los otros grupos, con una probabilidad de 0,0169, inferior al valor prefijado de 0,05. A pesar de resultar significativa la disminución en la pureza en SEC de la muestra expuesta en el envase primario, la afectación fue pequeña, con una pureza superior al 97 %. Tampoco se detectaron cambios en la pureza en SDS-PAGE del EGFhr liofilizado, al exponer las muestras en los materiales de envase evaluados (Tabla 3.7).

La pureza del EGFhr, medida en RP-HPLC, después de la exposición del producto a la luz blanca/UV disminuyó en las muestras expuestas en el envase primario con respecto a los otros grupos. La prueba de ANOVA para el ensayo de pureza en RP-HPLC fue estadísticamente significativa para los grupos estudiados, con una probabilidad de 0,0001, muy inferior al valor prefijado de 0,05 (Anexo 13, Tabla 3.7). Los perfiles cromatográficos de RP-HPLC muestran un incremento en la señal correspondiente a los picos marcados con la flecha, para la muestra expuesta en el envase primario, que se corresponde con la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido (Figura 3.28). También aparecieron nuevos picos a tiempos de retención mayores a los de los picos principales.

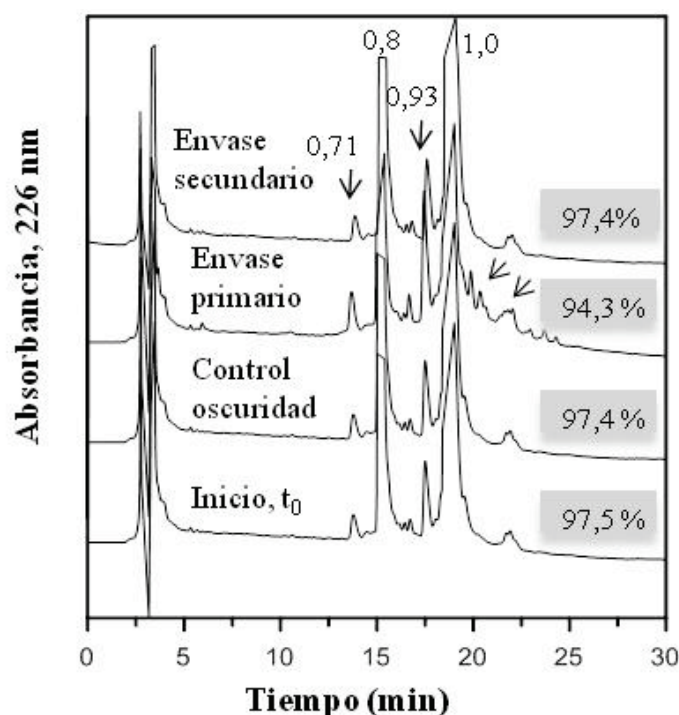


Figura 3.28. Perfiles cromatográficos magnificados de RP-HPLC según los materiales de envase empleados durante la irradiación en condiciones de estrés del EGFhr liofilizado. La separación se realizó en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrilo/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min. Las flechas indican incremento o aparición de señales en relación con el control. Trr (0,71): EGFhr₁₋₅₁ oxidado en Met²¹ a sulfóxido; trr (0,8): EGFhr₁₋₅₁; trr (0,93): EGFhr₁₋₅₂ oxidado en Met²¹ a sulfóxido; trr (1,0): EGFhr₁₋₅₂. Encima de cada cromatograma y sombreado se presentan los porcentajes de EGFhr no modificado remanente.

Resultados y discusión

El mayor incremento en los productos de degradación detectados en RP-HPLC fue de aproximadamente 3,0 % para el grupo del envase primario, para los otros grupos, el del control en la oscuridad y el que incluyó el envase secundario, no se detectaron cambios con relación a la muestra de partida (t_0), como muestra la figura 3.28. El envase secundario propuesto protegió efectivamente al EGFhr liofilizado del efecto perjudicial provocado por la exposición a la luz blanca/UV. El principal producto de degradación detectado fue la oxidación del EGFhr en la Met²¹ a sulfóxido, en concordancia con informes previos sobre la fotooxidación del EGFhr (Cini y cols., 1992). La degradación pudiera deberse a la oxidación indirecta de la proteína, a partir de la formación de especies de oxígeno reactivas, como los radicales peróxido (Kerwin y Remmele, 2007).

De los resultados de la exposición del EGFhr liofilizado a la luz blanca/UV puede concluirse que los materiales de envase escogidos son efectivos para la fotoprotección de la proteína. Las condiciones de exposición utilizadas en este estudio proporcionan un elevado margen de seguridad con respecto a las indicadas en la guía ICH (Q1B, 1996). Se utilizó una dosis de 1,2 veces lo estipulado en la guía ICH Q1B para lámpara de luz fría blanca fluorescente, y de 4,5 veces lo estipulado para la energía ultravioleta integrada.

3.6 Estudios de estabilidad de la formulación liofilizada de EGFhr

Para ser útil como producto terapéutico, la formulación debe mantener la integridad física, química y biológica del EGFhr durante 24 meses como mínimo (Chang y Hershenson, 2002). Teniendo en cuenta esto, para evaluar la estabilidad de la formulación liofilizada de EGFhr se tomaron como base los criterios de las guías ICH (Q5C, 1996; Q1A(R2), 2003; Q1D, 2003; Q1E, 2003); y lo establecido en las regulaciones del Centro Nacional para el Control de la Calidad de los Medicamentos (Regulación 21, 2008; Regulación 16, 2012).

3.6.1 Estabilidad del formulado a granel

El formulado a granel estéril se considera un producto intermedio, al cual se le debe estudiar la estabilidad durante el tiempo de espera. Para un producto liofilizado, el tiempo de espera debe cubrir los tiempos de esterilización *in situ* de la línea de llenado y de la máquina liofilizadora, el tiempo de duración del llenado, etc. El período de tiempo debe permitir responder a necesidades operativas que requieran posponer las operaciones de llenado y/o, liofilización (Regulación 16, 2012). La tabla 3.8 muestra que los resultados de las pruebas de calidad del formulado a granel se mantuvieron dentro de los valores de referencia, y sin variaciones con respecto al inicio, después de siete días de almacenamiento a 5 ± 3 °C.

Resultados y discusión

Tabla 3.8. Resultados de estabilidad del formulado a granel del EGFhr después de siete días de almacenamiento a 5 ± 3 °C

Pruebas	Presentaciones	25 µg/vial		250 µg/vial	
	Valores de Referencia	t ₀	7 días	t ₀	7 días
Características organolépticas	Solución clara e incolora, sin residuos visibles como materia no disuelta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido por Bradford (%)	80-120 % del valor prefijado	96,0-112,7	91,6-104,2	82,2-103,4	93,3-109,4
Actividad específica ($\times 10^6$ UI/mg)	1,5-5,0	2,1-2,8	2,1-3,0	1,7-2,7	2,3-2,5
Pureza en RP-HPLC (%)	$\geq 95,0$ EGFhr ₁₋₅₁ + EGFhr ₁₋₅₂	97,4-97,7	96,4-97,9	97,1-97,4	96,9-97,3
pH	6,25-7,25	6,73-6,74	6,75-6,80	6,83-6,84	6,82-6,85

Los resultados cuantitativos muestran los valores mínimo y máximo de los datos individuales ($n = 3$ lotes).

3.6.2 Estabilidad acelerada y de vida de estante

La estabilidad acelerada y de vida de estante de la formulación liofilizada de EGFhr se evaluó según los criterios de las guías ICH. Específicamente, para cubrir el plan de desarrollo clínico, se realizó un estudio de corchete entre 25 y 250 µg/vial según la guía ICH (Q1D, 2003). Para ello, se evaluaron tres lotes de cada presentación.

Los resultados de los puntos finales de las pruebas del estudio de estabilidad acelerada y de vida de estante para cada presentación se muestran en la tabla 3.9. Para las condiciones de almacenamiento estudiadas no se observaron cambios en la apariencia, identidad, contenido, actividad específica y pureza en las diferentes evaluaciones, y los resultados permanecieron dentro de los valores de referencia. La excepción fue la humedad residual que aumentó en el tiempo, con el valor más alto alcanzado a la condición de mayor temperatura (25 ± 2 °C/ 60 ± 5 % de humedad relativa). Este incremento en el contenido de humedad residual es común para los productos liofilizados y es causado por la desadsorción del agua de los tapones de goma de los viales, seguido por la captura de la humedad por la pastilla liofilizada higroscópica (Vromans y Van Laarhoven, 1992; Corveleyn y cols., 1997). Sin embargo, lo más importante es que el incremento en el contenido de humedad residual no sobrepasó los valores de referencia (≤ 5 %), ni afectó la calidad del producto durante los períodos evaluados a las respectivas condiciones de almacenamiento (Tabla 3.9).

Resultados y discusión

Tabla 3.9. Resultados de los parámetros de calidad de la formulación liofilizada de EGFhr en el tiempo a diferentes fortalezas y condiciones de almacenamiento

Presentaciones		25 µg/vial		250 µg/vial			
Condiciones de almacenamiento		25 ± 2 °C	5 ± 3 °C	25 ± 2 °C	5 ± 3 °C		
Pruebas	Valores de Referencia	t ₀	6 meses	24 meses	t ₀	6 meses	24 meses
Inspección visual	Pastilla liofilizada, blanca	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Reconstitución	Completa (≤20 s), no dejando residuos visibles como materia no disuelta y dando lugar a una solución clara e incolora	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Identificación ELISA	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado
Contenido por Bradford (%)	80-120 % del valor prefijado	92-112	96-118	88-109	97-111	109-112	89-98
Actividad específica (× 10 ⁶ UI/mg)	1,5-5,0	2,1-3,0	1,8-2,7	2,5-2,6	2,6-2,8	2,3-3,1	2,7-2,9
Pureza (%)							
1. RP-HPLC	≥ 95,0 EGFhr ₁₋₅₁ + EGFhr ₁₋₅₂	95,3-96,0	95,1-95,5	95,0-95,5	95,5-96,0	95,2-95,5	95,0-96,1
2. SEC	≥ 95,0	97,3-98,8	96,5-96,7	97,0-97,7	97,6-98,6	96,5-97,0	97,2-97,7
3. SDS-PAGE	≥ 95,0	98-100	98-100	99-100	100-100	98-100	100-100
pH	6,25-7,25	6,75-6,88	6,65-6,84	6,70-6,84	6,70-6,86	6,75-6,82	6,73-6,84
Humedad residual (%)	≤ 5	1,5-3,2	2,5-4,1	2,4-3,9	1,4-3,1	3,2-4,4	3,1-4,0

Los resultados cuantitativos muestran los valores mínimo y máximo de los datos individuales (n = 3 lotes).

Resultados y discusión

Los exámenes de la formulación a los diferentes períodos de tiempo durante los estudios acelerado y de vida de estante no indicaron la aparición de cambios físicos, tales como: colapso, cambio de color o aparición de partículas. Bajo las mismas condiciones, la reconstitución completa del producto ocurrió en un tiempo inferior a 20 s, no dejó residuos visibles y dió lugar a una solución clara e incolora con valores de pH entre 6,65 y 6,88. El EGFhr fue correctamente identificado en el ELISA y los resultados de la actividad específica no cambiaron en el tiempo. Los perfiles cromatográficos de RP-HPLC solamente mostraron variaciones pequeñas durante los períodos de tiempo y condiciones de almacenamiento evaluadas, sin cambios en el tiempo de retención o la aparición de nuevos picos (Anexo 14). Los perfiles de SEC indicaron únicamente la presencia de la especie monomérica de EGFhr durante los períodos evaluados (Anexo 14). La formulación probó ser no pirogénica, no tóxica, y estéril en las diferentes evaluaciones del presente estudio.

La guía ICH Q1E aborda el tema de la evaluación de los datos de estabilidad y presenta varios enfoques estadísticos para la evaluación de los resultados de uno o varios lotes generados por diseños de estabilidad reducidos o completos (Q1E, 2003). Para el análisis de los datos de los estudios acelerado y de vida de estante, la aplicación de un diseño de regresión lineal simple se considera razonable. Por dicha razón, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\ln Y = \ln Y_0 - \text{Pendiente} \times t \quad [3.2]$$

Donde Y es el ensayo, t es el factor tiempo expresado en meses, la pendiente es la constante de degradación y Y_0 es el ensayo en t_0 .

Para el análisis estadístico de tendencia, entre las características evaluadas en los estudios de estabilidad, se analizaron la pureza en RP-HPLC y la actividad biológica. La primera se seleccionó debido a su habilidad para detectar pequeños cambios químicos en el EGFhr, mientras que la segunda fue debido a su importancia para la efectividad del producto.

Estudio de estabilidad acelerada

Las pendientes para la pureza por RP-HPLC de la presentación de 25 µg/vial fueron significativamente diferentes y no pueden ser agrupadas (Anexo 15). En este caso ninguna de las pendientes fue significativa, probablemente debido a la pequeña potencia estadística de la prueba y no debido a la ausencia real de variación de la pureza en el tiempo. El análisis visual de la variación de la pureza en el tiempo (Figura 3.29 a y b) indica que el lote 1 no mostró disminución de la pureza durante los primeros 3 meses. Este resultado está en contraste con la variación de pureza para los otros lotes de las dos presentaciones y sugiere la subestimación de la pureza en t_0 para el lote 1.

Resultados y discusión

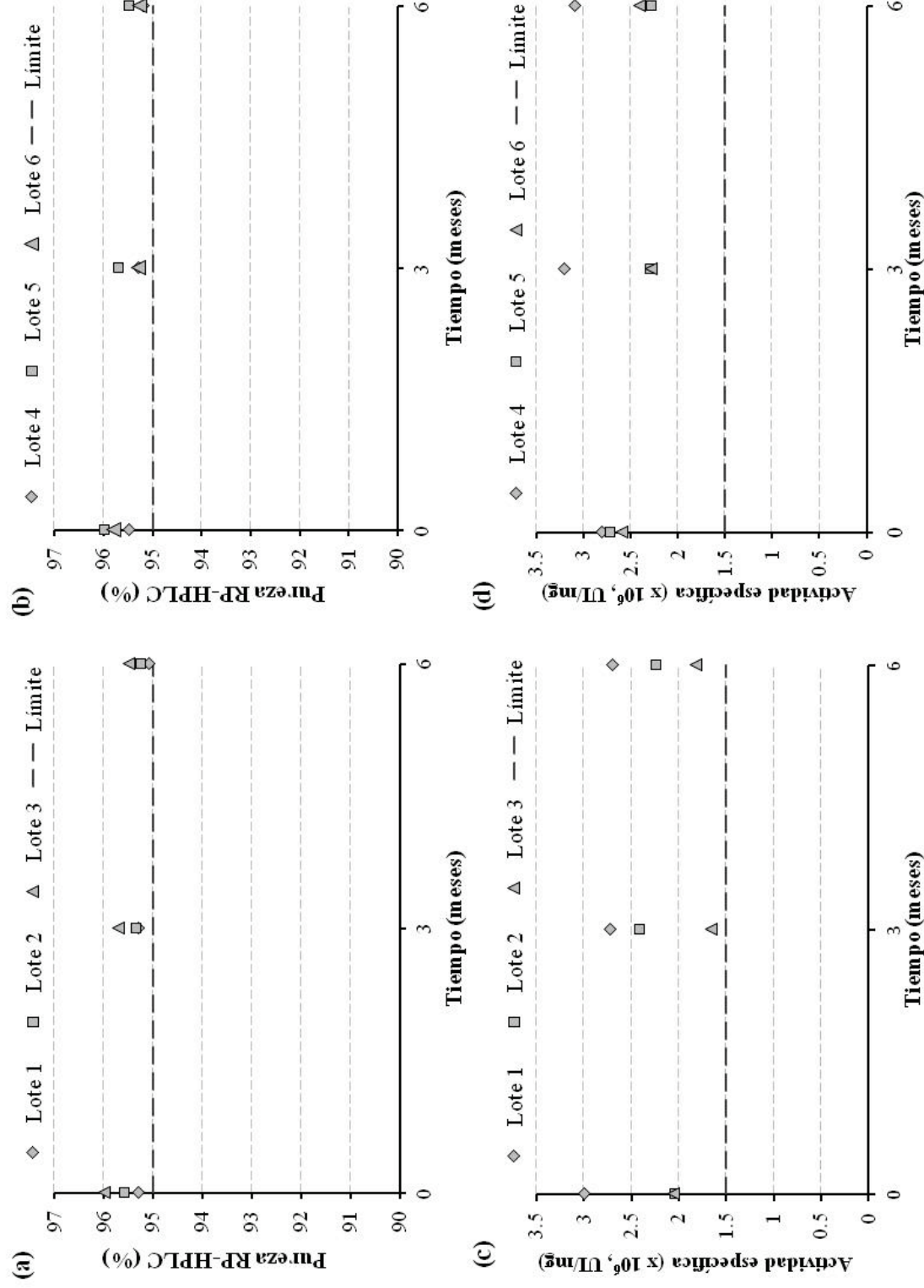


Figura 3.29. Estabilidad acelerada a 25 ± 2 °C/60 \pm 5 % de humedad relativa de la formulación liofilizada de EGFhr. (a) y (b) pureza por RP-HPLC a 25 y 250 μ g/vial, respectivamente; (c) y (d) actividad biológica específica para las presentaciones de 25 y 250 μ g/vial, respectivamente.

Resultados y discusión

Para la presentación de 250 µg/vial la variación de la pureza en el tiempo no mostró diferencias significativas entre los lotes. Sin embargo, los interceptos fueron significativamente diferentes, por lo que se calculó una pendiente de regresión común (Tabla 3.10). La pendiente de regresión común fue significativa, con una probabilidad de 0,0006, lo que significa que la pureza varió significativamente en el tiempo, pero el modelo de regresión predice que la pureza permanecerá por encima de 95,0 % por más de 6 meses, incluido el lote con el valor de pureza más bajo en el tiempo de liberación (Anexo 16).

Tabla 3.10. Evaluación estadística mediante técnicas de regresión de los resultados de estabilidad acelerada y de vida de estante de los lotes ($n = 3$) de la formulación liofilizada de EGFhr^a

Parámetro	Presentación	Probabilidad (25 ± 2 °C)		Probabilidad (5 ± 3 °C)	
		RP-HPLC	Actividad específica	RP-HPLC	Actividad específica
Pendiente	25 µg/vial	0,15 [*]	0,52	0,64	0,95
	250 µg/vial	0,36	0,28	0,37	0,67
	25 µg/vial + 250 µg/vial	No procede	0,95	0,66	0,31
Intercepto	25 µg/vial	No procede	0,027 ^{**}	0,075 [*]	0,67
	250 µg/vial	0,008 ^{**}	0,048 ^{**}	0,19 [*]	0,46
	25 µg/vial + 250 µg/vial	No procede	No procede	No procede	0,30
Regresión común		0,0006 ^{**}	0,36	0,26	0,55
Comentario sobre la regresión común		Pendiente común, lotes de 250 µg/vial	Pendiente común, ambas presentaciones	Pendiente común, ambas presentaciones	Intercepto y pendiente común, ambas presentaciones

^aDiferencias estadísticamente significativas según se describe en la sección 2.11.4: ^{*}($p < 0,25$), ^{**}($p < 0,05$).

Para las dos presentaciones, ninguno de los lotes mostró variaciones apreciables en el tiempo para la actividad específica en ensayo de proliferación celular en el estudio acelerado (Figura 3.29 c y d). Los valores de probabilidad para la diferencia de las pendientes no fueron estadísticamente significativos para las presentaciones de 25 y 250 µg/vial, dando la posibilidad de combinar las pendientes de los lotes de la misma presentación (Tabla 3.10, Anexo 17). Tampoco resultó estadísticamente significativo el valor de probabilidad para la pendiente de la regresión común (con los lotes de ambas presentaciones). Finalmente, se obtuvo una regresión de pendiente común con 11 grados de libertad para la varianza residual. El elevado número de grados de libertad implica una elevada potencia estadística, pero aun en ese caso la regresión no mostró significación con un valor de probabilidad de 0,36 (Tabla 3.10). Esto significa que no hubo variaciones de la actividad específica en el tiempo.

Estudio de estabilidad de vida de estante

Como se muestra en la figura 3.30 a y b, durante el almacenamiento a 5 ± 3 °C, en ninguno de los lotes se aprecian variaciones de la pureza en RP-HPLC durante el tiempo. Sin embargo, con el objetivo de realizar un análisis de regresión, se compararon las pendientes de los lotes para cada presentación, y siempre que fue

Resultados y discusión

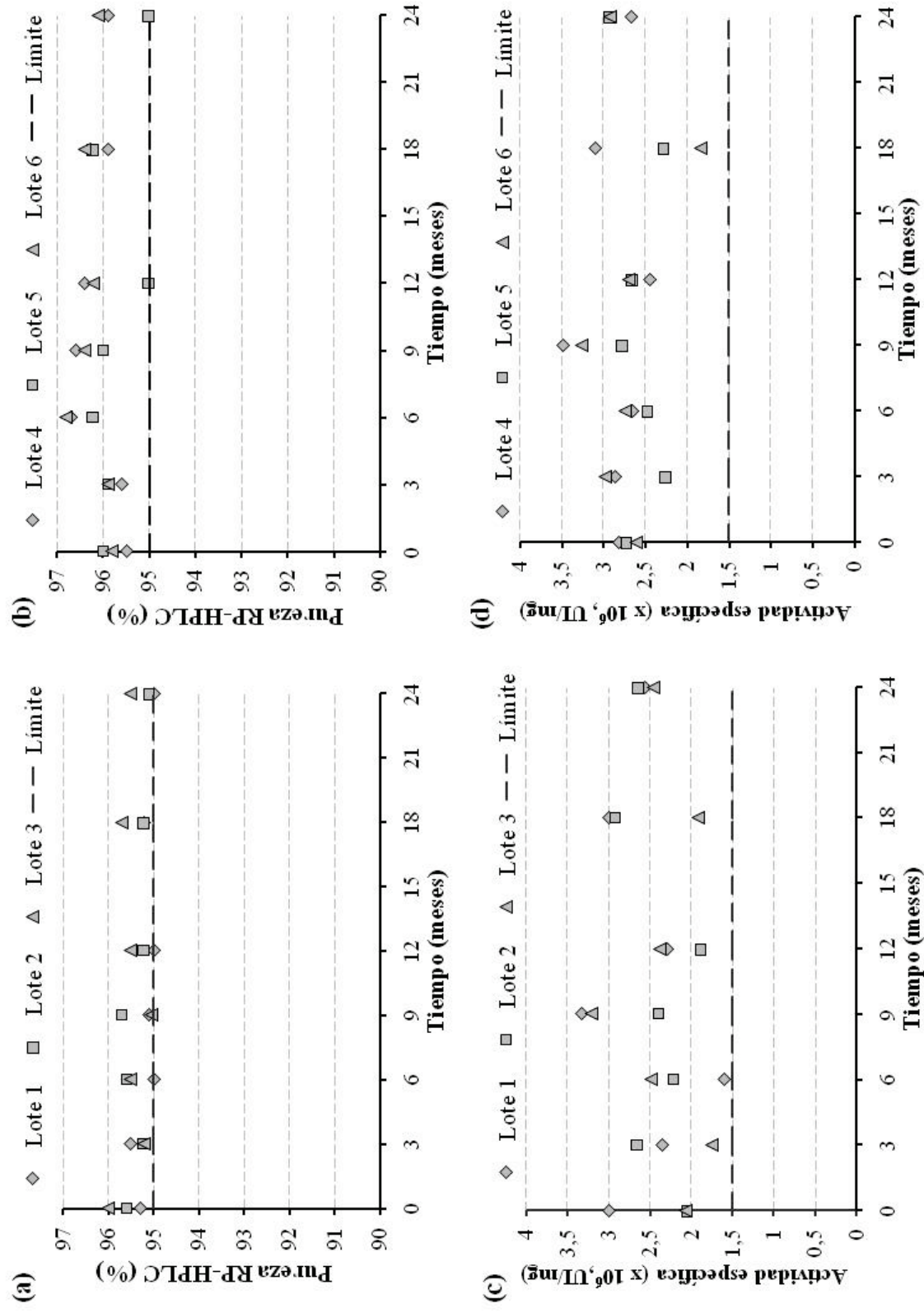


Figura 3.30. Estabilidad a largo plazo a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ de la formulación liofilizada de EGFhr. (a) y (b) pureza por RP-HPLC a 25 y 250 $\mu\text{g/vial}$, respectivamente; (c) y (d) actividad biológica específica para las presentaciones de 25 y 250 $\mu\text{g/vial}$, respectivamente.

Resultados y discusión

posible se combinaron (Tabla 3.10, Anexo 18). Los valores de probabilidad para la diferencia de las pendientes no fueron estadísticamente significativos, lo que permite combinar las pendientes de los lotes de la misma presentación. Tampoco fueron estadísticamente significativas las pendientes de las regresiones comunes para cada presentación, lo que permite combinar las pendientes de ambas presentaciones. Finalmente, se obtuvo una regresión de pendiente común con 35 grados de libertad para la varianza residual. El elevado número de grados de libertad implica una alta potencia estadística, pero aun en ese caso la regresión no mostró significación ($p = 0,26$, Tabla 3.10). Esto significa que no hubo variaciones de la pureza por RP-HPLC en el tiempo.

A partir de la observación visual de la figura 3.30 c y d no se aprecian variaciones de la actividad específica de los lotes en el tiempo. Para este ensayo, se realizó un análisis similar al de la pureza en RP-HPLC (Tabla 3.10, Anexo 19). En este caso, las pendientes y los interceptos no mostraron diferencias significativas. Esto permitió realizar el análisis de una regresión común con 40 grados de libertad para la varianza residual. La probabilidad para la pendiente común fue de 0,55, lo que significa que la actividad biológica no cambió en el tiempo (Tabla 3.10).

Los estudios de estabilidad del EGFhr en solución acuosa a altas temperaturas han evidenciado que esta es una molécula muy lábil. La vida útil, mediante RP-HPLC, observada para un EGFhr₁₋₄₈ en solución a 30 °C fue de aproximadamente seis días (Senderoff y cols., 1994). Se ha descrito que la estabilidad del EGFhr libre, en solución tampón, disminuyó hasta solo un 9,7 % del valor inicial después de un mes a 25 °C (Yin y cols., 2014). El EGFhr en solución después de almacenado a altas temperaturas experimenta desamidación de la Asn¹ y oxidación de la Met²¹ a sulfóxido. La prevención de estas rutas de degradación se logró mediante la liofilización en una mezcla de sacarosa y Dextrana 40. No se ha informado sobre estudios de estabilidad a largo plazo del EGFhr liofilizado, sino solo durante períodos de tiempo limitado, principalmente como parte de estudios de estabilidad acelerada en solución acuosa (Araki y cols., 1989; Senderoff y cols., 1994; Yin y cols., 2014).

3.6.3 Estabilidad del producto reconstituido

La estabilidad de la formulación liofilizada de EGFhr después de reconstituida puede ser influenciada por la temperatura de almacenamiento y el tipo de solvente utilizado para la reconstitución. Al igual que durante la evaluación del efecto del proceso de liofilización, para los estudios de estabilidad del producto reconstituido se utilizó tanto AI como SSF. La estabilidad del reconstituido se estudió en las presentaciones de 25 y 75 µg/vial, que cubren el rango utilizado en ensayos clínicos (Fernandez-Montequín y cols., 2009). Para evaluar la calidad del producto hasta el final de su vida útil, la estabilidad del reconstituido se estudió en

Resultados y discusión

lotes del producto liofilizado con fecha cercana a su caducidad y en lotes poco después de su fabricación. La tabla 3.11 presenta los valores de referencia y los resultados de las pruebas de estabilidad en las condiciones de almacenamiento evaluadas. No se observaron cambios en la apariencia, identidad, contenido por Bradford, actividad específica en ensayo de proliferación celular y pureza por RP-HPLC durante las evaluaciones, y los resultados se mantuvieron dentro de los valores de referencia.

La completa reconstitución de un producto liofilizado dentro de un período de tiempo corto es muy importante, mientras que la reconstitución incompleta del producto indica problemas de estabilidad que pudieran tener implicaciones directas en la seguridad del producto y salud del paciente. El valor de pH del producto reconstituido con AI fue cercano a 6,8 y al reconstituirlo con SSF el pH fue cercano a 6,5. Los valores de pH de los dos reconstituidos se encontraron dentro del rango apropiado para formulaciones inyectables (entre 4,0 y 8,0) (Kinnunen y Mersny, 2014). La pequeña variación observada en el pH se debe probablemente a las variaciones de la fuerza iónica, según la teoría de Debye-Hückel (Debye y Hückel, 1923); y no impactaron en la calidad del producto (Tabla 3.11). Como es de esperar, la osmolaridad del producto se vio influenciada por el solvente de reconstitución. La reconstitución con SSF hace isotónica la solución y no afectó negativamente la estabilidad del EGFhr a 5 ± 3 °C después de 24 h.

Por todo lo anterior, en el rango de fortalezas entre 25 y 250 µg/vial, el EGFhr fue química, física y biológicamente estable como un polvo liofilizado para inyección, y mantiene su solubilidad y estabilidad. Al mismo tiempo, estos datos demuestran que la calidad del producto se mantiene durante la exposición a la luz, la transportación, el almacenamiento prolongado o la reconstitución. Este producto terapéutico inyectable, conocido con el nombre de Heberprot-P, se utiliza comercialmente y ha demostrado un perfil favorable de seguridad y eficacia en varios ensayos clínicos (Fernandez-Montequín y cols., 2009; Berlanga y cols., 2013), y un balance beneficio-riesgo positivo para el tratamiento de la úlcera del pie diabético (López-Saura y cols., 2013).

Resultados y discusión

Tabla 3.11. Evaluación de la estabilidad después de la reconstitución de la formulación liofilizada de EGFhr con 5,0 mL de AI o con SSF y almacenada durante 24 h a 5 ± 3 °C

		Presentaciones			75 µg/vial		
		Solvente de reconstitución			25 µg/vial		
Pruebas	Valores de Referencia	t ₀ ^a	24 h	SSF	24 h	t ₀ ^a	24 h
Características organolépticas del reconstituido	Solución clara, incolora, no dejando residuos visibles como materia no disuelta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Identidad ELISA	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado
Contenido por Bradford (%)	80-120 % del valor prefijado	108-116/ 102-114	104-112/ 88-104	86-114/ 105-118	106-111/ 101-103	96-110/ 95-100	103-105/ 96-108
Actividad específica ($\times 10^6$ UI/mg)	1,5-5,0	3,0-3,3/ 2,4-2,5	2,4-3,0/ 2,3-2,4	2,9-3,1/ 2,7-3,1	2,6-3,1/ 2,6-2,7	2,5-3,0/ 2,6-3,1	2,8-3,0/ 2,7-3,3
Pureza por RP-HPLC (%)	$\geq 95,0$ EGFhr ₁₋₅₁ + EGFhr ₁₋₅₂	95,1-95,2/ 95,4-95,6	95,2-95,3/ 95,2-95,4	95,3-95,5/ 95,0-95,1	95,0-95,2/ 96,7-97,5	95,1-95,5/ 96,3-97,4	95,0-95,4/ 96,6-96,8
pH	6,25-7,25	6,99-7,04/ 6,86-6,95	6,82-6,88/ 6,83-6,87	6,42-6,58/ 6,43-6,56	6,99-7,04/ 6,98-6,99	6,91-6,97/ 6,92-6,94	6,42-6,56/ 6,44-6,60
Osmolaridad	270-330 mOsmol/kg	60-65/ 63-67	8-10/ 9-12	302-308/ 305-309	57-61/ 60-65	10-11/ 9-13	300-303/ 307-310

^aPara t₀, y como referencia, el contenido de los viales fue reconstituido con 1,0 mL de AI como es de práctica común para las pruebas de liberación de los lotes.

Los resultados cuantitativos muestran los valores de los datos individuales de los lotes fresco/envejecido (n = 2 lotes).

Conclusiones

4. CONCLUSIONES

1. La combinación de los ensayos de RP-HPLC, electroforesis en ausencia de SDS, espectrometría de masas en modo ESI-MS, ELISA y ensayo de proliferación celular permiten una evaluación apropiada de la estabilidad del EGFhr. Las principales rutas de degradación del EGFhr identificadas fueron la desamidación de la Asn¹ y la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido.
2. En solución acuosa la mayor estabilidad química, coloidal y del plegamiento del EGFhr, durante la exposición a 50 ± 2 °C, se encontró a pH cercano a 7,0. La principal incompatibilidad de esta proteína se encontró con los azúcares reductores, los polisorbatos y el polietilenglicol, ya que incrementan la oxidación del EGFhr. No obstante, a pH 7,0 ocurrió la desamidación de la Asn¹ a una velocidad de 3,43 %/mes a 5 ± 3 °C, lo cual dificulta el logro de una formulación líquida estable a largo plazo.
3. La combinación de la sacarosa (15 mg/mL) con la Dextrana 40 (5 mg/mL) en tampón fosfato de sodio a pH 7,0 y 10 mM permitió la estabilización del EGFhr durante la liofilización, y aumentó su estabilidad durante el almacenamiento a 50 ± 2 °C.
4. La formulación desarrollada de EGFhr mantiene su estabilidad durante las operaciones tecnológicas de mezclado, esterilización por filtración, liofilización, y simulación de la inyección. Dicha formulación se puede liofilizar con facilidad a temperaturas del producto inferiores a $-30,8$ °C, durante el secado primario, alcanzando niveles de humedad residual menores del 5,0 %. El producto se reconstituye en menos de 20 s, dando lugar a una solución transparente con conteo de partículas subvisibles inferior a 3000, para partículas mayores o iguales a 10 μm , y a 50 para partículas mayores o iguales a 25 μm .
5. La evaluación en espectrometría de masas del EGFhr evidenció que la proteína liofilizada se mantiene intacta después de 15 días de almacenamiento a 50 ± 2 °C. La desamidación de la Asn¹ en la formulación liofilizada se reduce a medida que disminuye la humedad residual y la temperatura de almacenamiento, con 0,43 %/mes a 25 ± 2 °C para una humedad residual cercana al 3,0 %. El material de envase secundario (cartón con barniz UV) fue capaz de brindar una protección efectiva al producto, frente al efecto de la exposición a la luz blanca/UV.
6. La formulación liofilizada fue estable durante al menos 2 años a 5 ± 3 °C, y 6 meses a 25 ± 2 °C. Después de su reconstitución con AI o con SSF, el producto mantuvo la estabilidad física, química y biológica durante 24 h a 5 ± 3 °C.

5. RECOMENDACIONES

1. Proponer nuevos estudios para mejorar el proceso de liofilización (por ejemplo resistencia de la capa seca y T_g' por DSC).
2. Realizar el escalado industrial del proceso de fabricación del producto.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, G., Irons, L., 1993. Some implications of structural collapse during freeze-drying using *Erwinia caratovora* L-asparaginase as a model. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 58, 71-76.
2. Adams, G.D., Ramsay, J.R., 1996. Optimizing the lyophilization cycle and the consequences of collapse on the pharmaceutical acceptability of *erwinia* L-Asparaginase. *J. Pharm. Sci.* 85, 1301-1305.
3. Alewood, D., Nielsen, K., Alewood, P., Craik, D., Andrews, P., Nerrie, M., White, S., Domagala, T., Walker, F., Rothacker, J., Burgess, A., Nice, E., 2005. The role of disulfide bonds in the structure and function of murine epidermal growth factor (mEGF). *Growth Factors* 23, 97-110.
4. Allison, S., Dong, A., Carpenter, J., 1996. Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration. *Biophys. J.* 71, 2022-2032.
5. Allison, S., Randolph, T., Manning, M., Middleton, K., Davis, A., Carpenter, J., 1998. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 358, 171-181.
6. Allison, S.D., Manning, M.C., Randolph, T.W., Middleton, K., Davis, A., Carpenter, J.F., 2000. Optimization of storage stability of lyophilized actin using combinations of disaccharides and dextran. *J. Pharm. Sci.* 89, 199-214.
7. Angell, C., 1995. Formation of glasses from liquids and biopolymers. *Science* 267, 1924-1935.
8. Arakawa, T., Kita, T., Carpenter, J., 1991. Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations. *Pharm. Res.* 8, 285-291.
9. Arakawa, T., Prestrelski, S., Kenney, W., Carpenter, J., 2001. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 307-326.
10. Araki, F., Nakamura, H., Nojima, N., Tsukumo, K., Sakamoto, S., 1989. Stability of recombinant epidermal growth factor in various solutions. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 404-407.
11. Armstrong, D.G., Cohen, K., Courric, S., Bharara, M., Marston, W., 2011. Diabetic foot ulcers and vascular insufficiency: our population has changed, but our methods have not. *J. Diabetes Sci. Technol.* 5, 1591-1595.
12. Atanu Kumar, J., 2012. HPLC: Highly Accessible Instrument in Pharmaceutical Industry for Effective Method Development. *Pharm. Anal. Acta* 3, 2.

Referencias bibliográficas

13. Aumiller, W.D., Dollahite, H.A., 2015. Pathogenesis and management of diabetic foot ulcers. JAAPA 28, 28-34.
14. Avanti, C., Amorij, J.-P., Setyaningsih, D., Hawe, A., Jiskoot, W., Visser, J., Kedrov, A., Driessen, A.J., Hinrichs, W.L., Frijlink, H.W., 2011. A new strategy to stabilize oxytocin in aqueous solutions: I. The effects of divalent metal ions and citrate buffer. AAPS Journal 13, 284-290.
15. Avanti, C., Permentier, H.P., Dam, A.v., Poole, R., Jiskoot, W., Frijlink, H.W., Hinrichs, W.L., 2012. A new strategy to stabilize oxytocin in aqueous solutions: II. Suppression of cysteine-mediated intermolecular reactions by a combination of divalent metal ions and citrate. Mol. Pharm. 9, 554-562.
16. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., Tomic-Canic, M., 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen. 16, 585-601.
17. Bazley, L., Gullick, W., 2005. The epidermal growth factor receptor family. Endocr. Relat. Cancer 12, S17-S27.
18. Bee, J.S., Randolph, T.W., Carpenter, J.F., Bishop, S.M., Dimitrova, M.N., 2011. Effects of surfaces and leachables on the stability of biopharmaceuticals. J. Pharm. Sci. 100, 4158-4170.
19. Bell, G., Fong, N., Stempien, N., 1986. Human EGF precursor: cDNA sequence, expression *in vitro* and gene organisation. Nucleic Acids Res. 14, 8427-8446.
20. Bell, L., 1997. Peptide Stability in Solids and Solutions. Biotechnol. Prog. 13, 342-346.
21. Berlanga-Acosta, J., 2011. Diabetic lower extremity wounds: the rationale for growth factors-based infiltration treatment. Int. Wound J. 8, 612-620.
22. Berlanga, J., Fernandez-Montequín, J., Valdes, C., Franco, N., Rojas, I., Santana, H., Chacon, L., Guillen, G., Herrera, L., Canan-Haden, L., Geronimo, H., Sotolongo, J., 2003. Use of a pharmaceutical composition containing epidermal growth factor (EGF) for diabetic foot amputation prevention. European Patent No. 1466617.
23. Berlanga, J., Fernández, J.I., López, E., López, P.A., Río, A.d., Valenzuela, C., Baldomero, J., Muzio, V., Raíces, M., Silva, R., 2013. Heberprot-P: a novel product for treating advanced diabetic foot ulcer. MEDICC review 15, 11-15.
24. Berlanga, J., Savigne, W., Valdez, C., Franco, N., Alba, J., Rio, A.d., López-Saura, P., Guillen, G., López, E., Herrera, L., 2006. Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds. Int. Wound J. 3, 232-239.

Referencias bibliográficas

25. Besada, V., Antuch, W., Cinza, A., Rojas, I., Quintana, M., Padron, G., Takao, T., Shimonishi, Y., 1990. Chemical characterization of recombinant human epidermal growth factor. *Anal. Chim. Acta* 239, 301-305.
26. Beynan, R., Easterby, J., 1996. *Buffer Solutions*, BIOS Scientific Publishers, Oxford.
27. Bhatnagar, B., Bogner, R., Pikal, M., 2007. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.* 12, 505-524.
28. Biddlecombe, J.G., Smith, G., Uddin, S., Mulot, S., Spencer, D., Gee, C., Fish, B.C., Bracewell, D.G., 2009. Factors influencing antibody stability at solid-liquid interfaces in a high shear environment. *Biotechnol. Prog.* 25, 1499-1507.
29. Bindschaedler, C., 1999. Lyophilization process validation. *Drugs Pharm. Sci.* 96, 373-408.
30. Blessy, M., Patel, R.D., Prajapati, P.N., Agrawal, Y.K., 2014. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review. *J. Pharm. Anal.* 4, 159-165.
31. Blume, P., Driver, V.R., Tallis, A.J., Kirsner, R.S., Kroeker, R., Payne, W.G., Wali, S., Marston, W., Dove, C., Engler, R.L., 2011. Formulated collagen gel accelerates healing rate immediately after application in patients with diabetic neuropathic foot ulcers. *Wound Repair Regen.* 19, 302-308.
32. Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N., Eccleston, G.M., 2008. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J. Pharm. Sci.* 97, 2892-2923.
33. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.* 72, 248-254.
34. Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Barr, P.J., 1984. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4642-4646.
35. Brazeau, G.A., Cooper, B., Svetic, K.A., Smith, C.L., Gupta, P., 1998. Current perspectives on pain upon injection of drugs. *J. Pharm. Sci.* 87, 667-677.
36. Brem, H., Sheehan, P., Boulton, A.J., 2004. Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. *Am. J. Surg.* 187, S1-S10.
37. Brown, G., Nanney, L., Griffen, J., Cramer, A., Yancey, J., Curtsinger, L., 1989. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *New Engl. J. Med.* 321, 76-79.
38. Burgess, A., Lloyd, C., Smith, S., Stanley, E., Walter, F., Fabri, L., Simpson, R., Nice, E., 1988. Murine epidermal growth factor: Structure and Function. *Biochemistry* 27, 4977-4985.

Referencias bibliográficas

39. Calnan, D., Fagbemi, A., Berlanga-Acosta, J., Mrchbank, T., Sizer, T., Lakhoo, K., Edwards, A., Playford, R., 2000. Potency and stability of C-terminal truncated human epidermal growth factor. *Gut* 47, 622-627.
40. Capelle, M.A., Gurny, R., Arvinte, T., 2007. High throughput screening of protein formulation stability: practical considerations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65, 131-148.
41. Carpenter, G., Cohen, S., 1979. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 193-216.
42. Carpenter, J., Manning, M., 2002. Rational design of stable protein formulation. *Theorie and Practice*, Kluver Academic/Plenum Publishers, New York.
43. Carpenter, J., Pikal, M., Chang, B., Randolph, T., 1997. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharm. Res.* 14, 969-975.
44. Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28, 3916-3922.
45. Carpenter, J.F., Prestrelski, S.J., Dong, A., 1998. Application of infrared spectroscopy to development of stable lyophilized protein formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 231-238.
46. Carpenter, J.F., Randolph, T.W., Jiskoot, W., Crommelin, D.J., Middaugh, C.R., Winter, G., 2010. Potential inaccurate quantitation and sizing of protein aggregates by size exclusion chromatography: Essential need to use orthogonal methods to assure the quality of therapeutic protein products. *J. Pharm. Sci.* 99, 2200-2208.
47. Çelebi, N., Türkyilmaz, A., Gönül, B., Özogul, C., 2002. Effects of epidermal growth factor microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats. *J. Control. Release* 83, 197-210.
48. Chandrasekhar, S., Topp, E.M., 2015. Thiol-Disulfide Exchange in Peptides Derived from Human Growth Hormone During Lyophilization and Storage in the Solid State. *J. Pharm. Sci.* 104, 1291-1302.
49. Chang, B., Beauvais, R., Dong, A., Carpenter, J., 1996a. Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* 331, 249.
50. Chang, B.S., Hershenson, S., 2002. Practical approaches to protein formulation development, In: Carpenter, J.F. and Manning, M.C. (Eds.), *Rational Design of Stable Protein Formulations*, Springer, New York, pp. 1-25.
51. Chang, B.S., Kendrick, B.S., Carpenter, J.F., 1996b. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J. Pharm. Sci.* 85, 1325-1330.

Referencias bibliográficas

52. Chang, L.L., Shepherd, D., Sun, J., Ouellette, D., Grant, K.L., Tang, X.C., Pikal, M.J., 2005a. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?. *J. Pharm. Sci.* 94, 1427-1444.
53. Chang, L.L., Shepherd, D., Sun, J., Tang, X.C., Pikal, M.J., 2005b. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *J. Pharm. Sci.* 94, 1445-1455.
54. Chi, E.Y., Krishnan, S., Randolph, T.W., Carpenter, J.F., 2003. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.* 20, 1325-1336.
55. Chirino, A., Mire-Sluis, A., 2004. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. *Nat Biotechnol* 22, 1383-1392.
56. Choi, J.K., Jang, J.-H., Jang, W.-H., Kim, J., Bae, I.-H., Bae, J., Park, Y.-H., Kim, B.J., Lim, K.-M., Park, J.W., 2012. The effect of epidermal growth factor (EGF) conjugated with low-molecular-weight protamine (LMWP) on wound healing of the skin. *Biomaterials* 33, 8579-8590.
57. Chu, Y., Yu, D., Wang, P., Xu, J., Li, D., Ding, M., 2010. Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 18, 499-505.
58. Chuyen, N., 1998. Maillard reaction and food processing. Application aspects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 434, 213-235.
59. Cicerone, M., Soles, C., Chowdhuri, Z., Pikal, M., Chang, L., 2005. Fast dynamics as a diagnostic for excipients in preservation of dried proteins. *Am. Pharm. Rev.* 8, 22.
60. Cicerone, M.T., Soles, C.L., 2004. Fast dynamics and stabilization of proteins: binary glasses of trehalose and glycerol. *Biophys. J.* 86, 3836-3845.
61. Cicerone, M.T., Tellington, A., Trost, L., Sokolov, A., 2003. Substantially Improved Stability of biological agents in dried form. *BioProc. Int.* 1, 36-47.
62. Cini, J., Ace, C., Spaltro, J., Georgenascimento, C., 1992. Photooxidation of recombinant human epidermal growth-factor. *FASEB J.* 6 (4), 1350-1350.
63. Cini, J., Finkenaur, A., 1992. Stabilized compositions containing epidermal growth factor. U. S. Patent No. 130298.

Referencias bibliográficas

64. Cinza, A., Quintana, M., Lombardero, J., Poutou, R., Pérez, E., Pérez, L., Mella, C., Besada, V., Padrón, G., Castellanos, L., Estrada, R., Morales-Grillo, J., 1991. A batch process for production of human Epidermal Growth Factor in yeast. Product characterization. *Biotechnol. Apl.* 8, 166-173.
65. Clark, R.A., 2008. Synergistic signaling from extracellular matrix-growth factor complexes. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1354-1355.
66. Cleland, J., Powell, M., Shire, S., 1993. The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* 10, 307-377.
67. Corveleyn, S., De Smedt, S., Remon, J.P., 1997. Moisture absorption and desorption of different rubber lyophilisation closures. *Int. J. Pharm.* 159, 57-65.
68. Costantino, H., 2004. Excipients for use in lyophilized pharmaceutical peptide, protein and other bioproducts, In: Costantino H. and Pikal M. (Eds.), *Lyophilization of Biopharmaceuticals*, AAPS, Arlington, pp. 139-228.
69. Costantino, H.R., Firouzabadian, L., Hogeland, K., Wu, C., Beganski, C., Carrasquillo, K.G., Córdova, M., Griebenow, K., Zale, S.E., Tracy, M.A., 2000. Protein spray-freeze drying. Effect of atomization conditions on particle size and stability. *Pharm. Res.* 17, 1374-1382.
70. Costantino, H.R., Langer, R., Klibanov, A.M., 1994. Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin. *Pharm. Res.* 11, 21-29.
71. Crowe, J., Crowe, L., Carpenter, J., 1993a. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis, part 1. *BioPharm.* 6, 28-28.
72. Crowe, J., Crowe, L., Carpenter, J., 1993b. Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis, part 2. *BioPharm.* 6, 40-43.
73. Davidson, P., Sun, W.Q., 2001. Effect of sucrose/raffinose mass ratios on the stability of co-lyophilized protein during storage above the Tg. *Pharm. Res.* 18, 474-479.
74. De Luca, P., Boylan, J., Avis, K., Lieberman, H., Lachman, L., 1992. Formulation of small volume parenterals, In: Avis, K., Lieberman, H., and Lachman, L. (Eds.), *Pharmaceutical dosage forms: parenteral medications*. Marcel Dekker, New York, pp. 173-248.
75. Debye, P., Hückel, E., 1923. De la theorie des electrolytes. I. abaissement du point de congelation et phenomenes associes. *Phys. Z.* 24, 185-206.
76. Değim, Z., Çelebi, N., Alemdaroğlu, C., Deveci, M., Öztürk, S., Özoğul, C., 2011. Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. *Int. Wound J.* 8, 343-354.

Referencias bibliográficas

77. DiBiase, M., Rhodes, C., 1996. Formulation and evaluation of epidermal growth factor in pluronic F-127 gel. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, 823-831.
78. Eckhardt, B., Oeswein, J., Bewley, T., 1991. Effect of freezing on aggregation of human growth hormone. *Pharm. Res.* 8, 1360-1364.
79. Ejima, D., Yumioka, R., Arakawa, T., Tsumoto, K., 2005. Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography. *J. Chromatogr. A* 1094, 49-55.
80. Falanga, V., 1992. Growth factors and chronic wounds: the need to understand the microenvironment. *J. Dermatol.* 19, 667-672.
81. Falanga, V., Eaglstein, W., Bucalo, B., Katz, M., Harris, B., Carson, P., 1992. Topical use of human recombinant epidermal growth factor (h-EGF) in venous ulcers. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 18, 604-606.
82. Fang, W.-J., Qi, W., Kinzell, J., Prestrelski, S., Carpenter, J.F., 2012. Effects of excipients on the chemical and physical stability of glucagon during freeze-drying and storage in dried formulations. *Pharm. Res.* 29, 3278-3291.
83. Fennema, O., 1975. Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems, In: Duckworth R.B. (Ed.), *Food science and technology*, Academic Press, London, pp. 397-412.
84. Fernandez-Montequín, J., Valenzuela-Silva, C., Díaz, O.G., Savigne, W., Sancho-Soutelo, N., Rivero-Fernández, F., Sánchez-Penton, P., Morejón-Vega, L., Artaza-Sanz, H., García-Herrera, A., González-Benavides, C., Hernández-Cañete, C., Vázquez-Proenza, A., Berlanga-Acosta, J., López-Saura, P., 2009. Intralesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: Multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Int. Wound J.* 6, 432-444.
85. Finkenaur, A., Somerville, N., 1988. Stabilized compositions containing epidermal growth factor. U. S. Patent No. 4717717.
86. Finney, D., 1964. Parallel line assay, In: *Statistical Method in Biology Assay*, Griffin, London, pp. 100-138.
87. Franks, F., 1998. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 38-42.
88. Franks, F., 2007. *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
89. Franks, F., Hatley, R.H.M., Mathias, S.F., 1991. Materials science and the production of shelf stable biologicals. *BioPharm.* 4, 38-55.

Referencias bibliográficas

90. Freyre, F., Vázquez, J., Duarte, C., Ferrá, E., López, I., Arteaga, N., 1989. Anticuerpos monoclonales que reconocen los factores de crecimiento epidérmico humano y murino. *Interferón y Biotecnología* 6, 32-46.
91. Friess, W., Winter, G., 2013. Meeting the challenges in freeze-drying of pharmaceuticals and biologicals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 161.
92. Frokjaer, S., Otzen, D.E., 2005. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 298-306.
93. Gainza, G., Aguirre, J.J., Pedraz, J.L., Hernández, R.M., Igartua, M., 2013. rhEGF-loaded PLGA-Alginate microspheres enhance the healing of full-thickness excisional wounds in diabetised Wistar rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 243-252.
94. Gainza, G., Pastor, M., Aguirre, J.J., Villullas, S., Pedraz, J.L., Hernandez, R.M., Igartua, M., 2014. A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: *In vitro* bioactivity and *in vivo* effectiveness in healing-impaired db/db mice. *J. Control. Rel.* 185, 51-61.
95. Gallay, J., Vincent, M., Sierra, I.M., Alvarez, J., Ubieta, R., Madrazo, J., Padron, G., 1993. Protein flexibility and aggregation state of human epidermal growth factor. A time-resolved fluorescence study of the native protein and engineered single-tryptophan mutants. *Eur. J. Biochem.* 211, 213-219.
96. Game, F., Hinchliffe, R., Apelqvist, J., Armstrong, D., Bakker, K., Hartemann, A., Löndahl, M., Price, P., Jeffcoate, W., 2012. A systematic review of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 28, 119-141.
97. Gerónimo, H., Martínez, Y., Brito, O., Ferrero, J., García, G., Santana, H., Rosales, I., Costa, L., Quintana, M., 2006. Validación del ensayo para la determinación de la actividad biológica de la IFA de EGF y del producto terminado CITOPROT-P. Informe Técnico, CIGB.
98. Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M., 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5, 467-477.
99. Graziano, G., Catanzano, F., Riccio, A., Barone, G., 1997. A reassessment of the molecular origin of cold denaturation. *J. Biochem.* 122, 395-401.
100. Grazul-Bilska, A.T., Johnson, M.L., Bilski, J.J., Redmer, D.A., Reynolds, L.P., Abdullah, A., Abdullah, K.M., 2003. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)* 39, 787-800.
101. Gregory, H., Willshire, I.R., 1975. The isolation of the urogastones-inhibitors of gastric acid secretion-from human urine. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 1765-1774.

Referencias bibliográficas

102. Groenen, L., Nice, E., Burgess, A., 1994. Structure-function relationships for the EGF/TGF- α family of mitogens. *Growth Factors* 11, 235-257.
103. Guariguata, L., Whiting, D., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., Shaw, J., 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 103, 137-149.
104. Guo, J., Harn, N., Robbins, A., Dougherty, R., Middaugh, C.R., 2006. Stability of helix-rich proteins at high concentrations. *Biochemistry* 45, 8686-8696.
105. Hafsa, N.E., Wishart, D.S., 2014. CSI 2.0: a significantly improved version of the Chemical Shift Index. *J. Biomol. NMR* 60, 131-146.
106. Hajare, A.A., More, H.N., Walekar, P.S., Hajare, D.A., 2012. Optimization of Freeze drying cycle protocol using real time microscopy and integrated differential thermal analysis-electrical impedance. *Res. J. Pharm. Tech.* 5, 985-991.
107. Hajimiri, M., Shahverdi, S., Kamalinia, G., Dinarvand, R., 2015. Growth factor conjugation: Strategies and applications. *J. Biomed. Mat. Res. Part A* 103, 819-838.
108. Hancock, B., Zografi, G., 1997. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J. Pharm. Sci.* 86, 1-12.
109. Hancock, B.C., Shamblin, S.L., Zografi, G., 1995. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm. Res.* 12, 799-806.
110. Hardwicke, J.T., Hart, J., Bell, A., Duncan, R., Thomas, D.W., Moseley, R., 2011. The effect of dextrin-rhEGF on the healing of full-thickness, excisional wounds in the (db/db) diabetic mouse. *J. Control. Rel.* 152, 411-417.
111. Harris, R., Chung, E., Coffey, R., 2003. EGF receptor ligand. *Exp. Cell Res.* 284, 2-13.
112. Hatley, R., 1997. Glass fragility and the stability of pharmaceutical preparations-excipient selection. *Pharm. Dev. Technol.* 2, 257-264.
113. Heath, W.F., Merrifield, R., 1986. A synthetic approach to structure-function relationships in the murine epidermal growth factor molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6367-6371.
114. Heitz, P., Kasper, M., Noorden, S.V., Polak, J., Gregory, H., Pearse, A., 1978. Immunohistochemical localization of urogastrone to human duodenal and submaxillary glands. *Gut* 19, 408-413.
115. Her, L., Nail, S., 1994. Measurement of glass transitions of the maximally freeze-concentrated solutes by differential scanning calorimetry. *Pharm. Res.* 11, 54-59.

Referencias bibliográficas

116. Hinchliffe, R., Brownrigg, J., Andros, G., Apelqvist, J., Boyko, E., Fitridge, R., Mills, J., Reekers, J., Shearman, C., Zierler, R., 2016. Effectiveness of revascularisation of the ulcerated foot in patients with diabetes and peripheral artery disease: a systematic review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 32, 119-127.
117. Hong, J., Jung, H., Kim, Y., 2006. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers. *Ann. Plast. Surg.* 56, 394-398.
118. Huang, H., Mohan, S., Yu, C., 2010. The NMR solution structure of human epidermal growth factor (hEGF) at physiological pH and its interactions with suramin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 705-710.
119. Huang, M., Horwitz, T.S., Zweiben, C., Singh, S.K., 2011. Impact of extractables/leachables from filters on stability of protein formulations. *J. Pharm. Sci.* 100, 4617-4630.
120. Infante, Y.C., Pupo, A., Rojas, G., 2014. A combinatorial mutagenesis approach for functional epitope mapping on phage-displayed target antigen: application to antibodies against epidermal growth factor. *mAbs* 6 (3), 637-648.
121. Izutsu, K., Yoshioka, S., Terao, T., 1993. Decreased Protein-Stabilizing Effects of Cryoprotectants Due to Crystallization. *Pharm. Res.* 10, 1232-1237.
122. Jaenicke, R., Heber, U., Franks, F., Chapman, D., Griffin, M.C., Hvidt, A., Cowan, D., 1990. Protein Structure and Function at Low Temperatures. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 326, 535-553.
123. Jakas, A., Horvat, Š., 2008. Reactivity and oxidative potential of fructose and glucose in enkephalin-sugar model systems. *Amino Acids* 34, 329-332.
124. Jennings, T.A., 1999. *Lyophilization: introduction and basic principles*. Interpharm Press, Englewood.
125. Ji, W., Sun, Y., Yang, F., van den Beucken, J.J., Fan, M., Chen, Z., Jansen, J.A., 2011. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharm. Res.* 28, 1259-1272.
126. Jiskoot, W., Randolph, T.W., Volkin, D.B., Middaugh, C.R., Schöneich, C., Winter, G., Friess, W., Crommelin, D.J., Carpenter, J.F., 2012. Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J. Pharm. Sci.* 101, 946-954.

Referencias bibliográficas

127. Jorgensen, L., Hostrup, S., Moeller, E.H., Grohgan, H., 2009. Recent trends in stabilising peptides and proteins in pharmaceutical formulation-considerations in the choice of excipients. *Expert opin. Drug Deliv.* 6, 1219-1230.
128. Jørgensen, P., Eskildsen, L., Nexø, E., 1999. Adsorption of EGF receptor ligands to test tubes-a factor with implications for studies on the potency of these peptides. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 59, 191-198.
129. Kasper, J.C., Winter, G., Friess, W., 2013. Recent advances and further challenges in lyophilization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 162-169.
130. Kenneth, C., Roger, C., 2005. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 293, 101-125.
131. Kerwin, B.A., Remmele, R.L., 2007. Protect from light: photodegradation and protein biologics. *J. Pharm. Sci.* 96, 1468-1479.
132. Kim, E., Gao, Z., Park, J., Li, H., Han, K., 2002. rhEGF/HP-beta-CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery. *Int. J. Pharm.* 233, 159-167.
133. Kim, N.A., Lim, D.G., Lim, J.Y., Kim, K.H., Jeong, S.H., 2014. Fundamental analysis of recombinant human epidermal growth factor in solution with biophysical methods. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41, 300-306.
134. Kinnunen, H.M., Mørn, R.J., 2014. Improving the outcomes of biopharmaceutical delivery via the subcutaneous route by understanding the chemical, physical and physiological properties of the subcutaneous injection site. *J. Control. Rel.* 182, 22-32.
135. Koch, J., Fife, T., Bender, V., Moss, B., 1984. Molecular species of epidermal growth factor carrying immunosuppressive activity. *J. Cell. Biochem.* 25, 45-59.
136. Kuhlman, B., Yang, H., Boice, J., Fairman, R., Raleigh, D., 1997. An exceptionally stable helix from the ribosomal protein L9: implications for protein folding and stability. *J. Mol. Biol.* 270, 640-647.
137. Kulkarni, A., Diehl-Jones, W., Ghanbar, S., Liu, S., 2014. Layer-by-layer assembly of epidermal growth factors on polyurethane films for wound closure. *J. Biomater. Appl.* 29, 278-290.
138. Kumar, V., Kalonia, D.S., 2006. Removal of Peroxides in Polyethylene Glycols by Vacuum Drying: Implications in the Stability of Biotech and Pharmaceutical Formulations. *AAPS PharmSciTech* 7, E47-E53.
139. Lai, M.C., Topp, E.M., 1999. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. *J. Pharm. Sci.* 88, 489-500.
140. Lakowicz, J., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer, New York.

Referencias bibliográficas

141. Landi, S., Held, H., 1985. Effect of oxidation on the stability of tuberculin purified protein derivative (PPD). *Develop. Biol. Standard.* 58, 545-552.
142. Laurencin, C.T., Nair, L.S., 2014. *Nanotechnology and Regenerative Engineering: The Scaffold*. CRC Press.
143. Ledesma-Osuna, A.I., Ramos-Clamont, G., Vázquez-Moreno, L., 2008. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochim. Pol.* 55, 491-497.
144. Lee, H., Park, T.G., 2002. Preparation and characterization of mono-PEGylated epidermal growth factor: evaluation of in vitro biologic activity. *Pharm. Res.* 19, 845-851.
145. Levine, H., 2002. *Amorphous Food and Pharmaceutical Systems*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
146. Levine, R.L., Moskovitz, J., Stadtman, E.R., 2000. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB life* 50, 301-307.
147. Li, B., Schowen, R.L., Topp, E.M., Borchardt, R.T., 2006. Effect of N-1 and N-2 residues on peptide deamidation rate in solution and solid state. *AAPS Journal* 8, E166-E173.
148. Li, R., D'souza, A., Schowen, R., Borchardt, R., Topp, E., Laird, B., 2000. Effects of solution polarity and viscosity on peptide deamidation. *J. Pep. Res.* 56, 326-334.
149. Li, R., Topp, E., Hageman, M., 2002. Effect of viscosity on the deamidation rate of a model Asn-hexapeptide. *J. Pep. Res.* 59, 211-220.
150. Li, S., Patapoff, T.W., Nguyen, T.H., Borchardt, R.T., 1996. Inhibitory effect of sugars and polyols on the metal-catalyzed oxidation of human relaxin. *J. Pharm. Sci.* 85, 868-872.
151. Li, S., Schöneich, C., Borchardt, R.T., 1995. Chemical instability of protein pharmaceuticals: mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnol. Bioeng.* 48, 490-500.
152. Lim, D.G., Kim, N.A., Lim, J.Y., Kim, K.H., Hada, S., Jeong, S.H., 2014a. Evaluation of etanercept stability as exposed to various sugars with biophysical assessment. *Int. J. Pharm.* 476, 50-59.
153. Lim, J.Y., Kim, N.A., Lim, D.G., Kim, K.H., Jeong, S.H., 2014b. Effects of thermal and mechanical stress on the physical stability of human growth hormone and epidermal growth factor. *Arch. Pharm. Res.*, 1-11.
154. Liu, L., Randolph, T.W., Carpenter, J.F., 2012. Particles shed from syringe filters and their effects on agitation-induced protein aggregation. *J. Pharm. Sci.* 101, 2952-2959.
155. López-Saura, P., Yera-Alos, I., Valenzuela-Silva, C., González-Díaz, O., 2013. Medical Practice Confirms Clinical Trial Results of the Use of Intralesional Human Recombinant Epidermal Growth

Referencias bibliográficas

- Factor in Advanced Diabetic Foot Ulcers. *Adv. Pharmacoeconom. Drug Safety* 2 (128). doi: 10.4172/2167-1052.1000128.
156. López-Saura, P.A., Berlanga-Acosta, J., Fernández-Montequín, J., Valenzuela-Silva, C., González-Díaz, O., Savigne, W., Dinh, T., 2011. Intralesional Human Recombinant Epidermal Growth Factor for the Treatment of Advanced Diabetic Foot Ulcer: From Proof of Concept to Confirmation of the Efficacy and Safety of the Procedure, In: Rijeka, D.T. (Ed.), *Global Perspective on Diabetic Foot Ulcerations*, InTech Europe, pp. 217-238.
157. Lu, H.-S., Chai, J.-J., Li, M., Huang, B.-R., He, C.-H., Bi, R.-C., 2001. Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization. *J. Biol. Chem.* 276, 34913-34917.
158. Maa, Y.-F., Nguyen, P.-A.T., Hsu, S.W., 1998. Spray-drying of air-liquid interface sensitive recombinant human growth hormone. *J. Pharma. Sci.* 87, 152-159.
159. Mahler, H.-C., Huber, F., Kishore, R.S., Reindl, J., Rückert, P., Müller, R., 2010. Adsorption behavior of a surfactant and a monoclonal antibody to sterilizing-grade filters. *J. Pharm. Sci.* 99, 2620-2627.
160. Maltesen, M.J., Van De Weert, M., 2008. Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discov. Today: Technol.* 5, E81-E88.
161. Manning, M., Chou, D., Murphy, B., Payne, R., Katayama, D., 2010. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm. Res.* 27, 544-575.
162. Manning, M., Patel, K., Borchardt, R., 1989. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.* 6, 903-918.
163. Mast, B., Schultz, G., 1996. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair. Regen.* 4, 411-420.
164. McInnes, C., Grothe, S., O'Connor-McCourt, M., Sykes, B.D., 2000. NMR study of the differential contributions of residues of transforming growth factor alpha to association with its receptor. *Protein Eng.* 13, 143-147.
165. Medina-Selby, A., Nascimento, C.G., 1992. Human epidermal growth factor having substitution at position 11. U. S. Patent No. 5158935.
166. Meister, E., Gieseler, H., 2009. Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: Drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition Data. *J. Pharm. Sci.* 98, 3072-3087.
167. Michael, J., 2002. Excipient-drug interactions in parenteral formulations. *J. Pharm. Sci.* 91, 2283-2300.

Referencias bibliográficas

168. Michaeli, A., Feitelson, J., 1997. Reactivity of singlet oxygen toward proteins: the effect of structure in basic pancreatic trypsin inhibitor and in ribonuclease A. *Photochem. Photobiol.* 65, 309-315.
169. Minton, A.P., 2000. Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 34-39.
170. Miyauchi, A., Ebisu, S., Uchida, K., Yoshida, M., Ozawa, M., Tojo, T., Kadowaki, K., Takagi, H., 1998. Pilot scale production of a recombinant human epidermal growth factor, secreted by *Bacillus brevis*, using expanded bed adsorption. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 21, 208-214.
171. Moya, G., O, M.L., Rey, I., 2011. Validación de la técnica de Fase Reversa por HPLC para el Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante. Informe Técnico, CIGB.
172. Murase, N., Franks, F., 1989. Salt precipitation during the freeze-concentration of phosphate buffer solutions. *Biophys. chem.* 34, 293-300.
173. Murray, M.B., Tadaki, D.K., Campion, S.R., Lamerdin, J.A., Serpersu, E.H., Bradrick, T.D., Niyogi, S.K., 1998. Structure-function analysis of a conserved aromatic cluster in the N-terminal domain of human epidermal growth factor. *Protein Eng.* 11, 1041-1050.
174. Nail, S.L., Jiang, S., Chongprasert, S., Knopp, S.A., 2002. Fundamentals of freeze-drying, In: Nail, S.L. and Akers, M.J. (Eds.), "Pharmaceutical Biotechnology 14". Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 281-360.
175. Neelon, K., Schreier, H.J., Meekins, H., Robinson, P.M., Roberts, M.F., 2005. Compatible solute effects on thermostability of glutamine synthetase and aspartate transcarbamoylase from *Methanococcus jannaschii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1753, 164-173.
176. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
177. Nice, E., Domagala, T., Fabri, L., Nerrie, M., Walker, F., Jorissen, R., Burgess, A., Cui, D.-F., Zhang, Y.-S., 2002. Rapid microscale enzymic semisynthesis of epidermal growth factor (EGF) analogues. *Growth Factors* 20, 71-80.
178. Niiyama, H., Kuroyanagi, Y., 2014. Development of novel wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor and vitamin C derivative. *J. Artificial Organs* 17, 81-87.
179. Oetjen, G.W., Haseley, P., 2004. Freeze-Drying, Second, Completely Revised and Extended Edition. Wiley-VCH, Weinheim.

Referencias bibliográficas

180. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-787.
181. Oliva, A., Llabrés, M., Fariña, J.B., 2006. Data analysis of kinetic modelling used in drug stability studies: isothermal versus nonisothermal assays. *Pharm. Res.* 23, 2595-2602.
182. Oliyai, C., Borchardt, R.T., 1994. Chemical pathways of peptide degradation. VI. Effect of the primary sequence on the pathways of degradation of aspartyl residues in model hexapeptides. *Pharm. Res.* 11, 751-758.
183. Oliyai, C., Patel, J.P., Carr, L., Borchardt, R.T., 1994. Solid state chemical instability of an asparaginy residue in a model hexapeptide. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 48, 167-173.
184. Overcashier, D., Brooks, D., Costantino, H., Hsu, C., 1997. Preparation of excipient-free recombinant human tissue-type plasminogen activator by lyophilization from ammonium bicarbonate solution: An investigation of the two-stage sublimation phenomenon. *J. Pharm. Sci.* 86, 455-459.
185. Overcashier, D.E., Patapoff, T.W., Hsu, C.C., 1999. Lyophilization of protein formulations in vials: Investigation of the relationship between resistance to vapor flow during primary drying and small-scale product collapse. *J. Pharm. Sci.* 88, 688-695.
186. Parkins, D.A., Lashmar, U.T., 2000. The formulation of biopharmaceutical products. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 129-137.
187. Ph.Eur.<2.6.9>, 2003. Test for abnormal toxicity. Volume IV Appendix XIV E, General test 1. British Pharmacopoeia Commission, TSO publisher.
188. Philo, J.S., 2009. A critical review of methods for size characterization of non-particulate protein aggregates. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 359-372.
189. Pikal, M., 1990. Freeze-drying of proteins. Part I: process design. *BioPharm* 3, 18-28.
190. Pikal, M., Shah, S., Roy, M., Putman, R., 1990. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int. J. Pharm.* 60, 203-207.
191. Pikal, M.J., 2004. Mechanisms of Protein Stabilization during Freeze-Drying and Storage: The Relative Importance of Thermodynamic Stabilization and Glassy State Relaxation Dynamics. *Drugs Pharm. Sci.* 137, 63-107.
192. Playford, R.J., Marchbank, T., Calnan, D.P., Calam, J., Royston, P., Batten, J.J., Hansen, H.F., 1995. Epidermal growth factor is digested to smaller, less active forms in acidic gastric juice. *Gastroenterology* 108, 92-101.

Referencias bibliográficas

193. Prestrelski, S.J., Tedeschi, N., Arakawa, T., Carpenter, J.F., 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65, 661-671.
194. Provencher, S., Glöckner, J., 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-37.
195. Puchades, Y., Ojalvo, A., García, Y., Chinae, G., Gerónimo, H., Vispo, N., 2005. Identification of peptides mimicking the natural epitope recognized by the CB-EGF1 anti-EGF monoclonal antibody. *Biotechnol. Appl.* 22, 203-206.
196. Q1A(R2), 2003. International Conference on Harmonisation, Stability Testing of New Drug Substances and Products.
197. Q1B, 1996. International Conference on Harmonisation, Photostability Testing of New Drug Substances and Products.
198. Q1D, 2003. International Conference on Harmonisation, Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products.
199. Q1E, 2003. International Conference on Harmonisation, Evaluation for Stability Data.
200. Q5C, 1996. International Conference on Harmonisation, Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products.
201. Q6B, 1999. International Conference on Harmonisation, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.
202. Ramos, Y., Garcia, Y., Pérez-Riverol, Y., Leyva, A., Padrón, G., Sánchez, A., Castellanos-Serra, L., González, L.J., Besada, V., 2011. Peptide fractionation by acid pH SDS-free electrophoresis. *Electrophoresis* 32, 1323-1326.
203. Randolph, T.W., Carpenter, J.F., 2007. Engineering challenges of protein formulations. *AIChE Journal* 53, 1902-1907.
204. Rankin, T.M., Miller, J.D., Gruessner, A.C., Nickerson, D.S., 2015. Illustration of Cost Saving Implications of Lower Extremity Nerve Decompression to Prevent Recurrence of Diabetic Foot Ulceration. *J. Diabetes Sci. Technol.* 9, 873-880.
205. Rathore, N., Rajan, R.S., 2008. Current perspectives on stability of protein drug products during formulation, fill and finish operations. *Biotechnol. Prog.* 24, 504-514.
206. Razis, A.F.A., Ismail, E.N., Hambali, Z., Abdullah, M.N.H., Ali, A.M., Lila, M.A.M., 2008. Expression of recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli* and characterization of its biological activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 144, 249-261.

Referencias bibliográficas

207. Regulación 21, 2008. Requisitos para la autorización y modificación de ensayos clínicos, CECMED, República de Cuba.
208. Regulación 16, 2012. Directrices sobre buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos, CECMED, República de Cuba.
209. Reshetnyak, Y., Koshevnik, Y., Burstein, E., 2001. Decomposition of Protein Tryptophan Fluorescence Spectra into Log-Normal Components. III. Correlation between Fluorescence and Microenvironment Parameters of Individual Tryptophan Residues. *Biophys. J.* 81, 1735-1758.
210. Rey, L., 1976. Glimpses into the fundamental aspects of freeze-drying. *Dev. Biol. Stand.* 36, 19-27.
211. Roberts, C., Das, T., Sahin, E., 2011. Predicting solution aggregation rates for therapeutic proteins: Approaches and challenges. *Int. J. Pharm.* 418, 318-333.
212. Roberts, C.J., 2014. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol.* 32, 372-380.
213. Roos, Y., 1997. Frozen state transitions in relation to freeze drying. *J. Therm. Anal.* 48, 535-544.
214. Rošćić, M., Horvat, Š., 2006. Transformations of bioactive peptides in the presence of sugars- characterization and stability studies of the adducts generated via the Maillard reaction. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 4933-4943.
215. Saarialho-Kere, U., 1998. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch. Dermatol. Res.* 290, S47-S54.
216. Saleki-Gerhardt, A., Zografi, G., 1994. Non-Isothermal and Isothermal Crystallization of Sucrose from the Amorphous State. *Pharm. Res.* 11, 1166-1173.
217. Sanford, B., Bon, C., 1997. *Pharmaceutical Statistics Practical and Clinical Applications*, Third ed. Marcel Dekker, New York, pp. 315-325.
218. Schägger, H., von_Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
219. Schersch, K., Betz, O., Garidel, P., Muehlau, S., Bassarab, S., Winter, G., 2010. Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins I: Stability after freeze-drying. *J. Pharm. Sci.* 99, 2256-2278.
220. Schersch, K., Betz, O., Garidel, P., Muehlau, S., Bassarab, S., Winter, G., 2012. Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins, part 2: stability during storage at elevated temperatures. *J. Pharm. Sci.* 101, 2288-2306.

Referencias bibliográficas

221. Schersch, K., Betz, O., Garidel, P., Muehlau, S., Bassarab, S., Winter, G., 2013. Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins III: Collapse during storage at elevated temperatures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 240-252.
222. Schirr-Bonnans, S., Costa, N., Derumeaux-Burel, H., Bos, J., Lepage, B., Garnault, V., Martini, J., Hanaire, H., Turnin, M.-C., Molinier, L., 2016. Cost of diabetic eye, renal and foot complications: a methodological review. *Eur. J. Health Econ.* doi:10.1007/s10198-016-0773-6.
223. Schultz, G.S., Gibson, D.J., 2013. Measurement of Biomarkers for Impaired Healing in Fluids and Tissues, In: Mani, R., Romanelli, M., Shukla, V. (eds.), *Measurements in Wound Healing*, Springer, London, pp. 243-258.
224. Schwimmer, S., 1981. *Source book of food enzymology*. AVI Publishing, Westport.
225. Senderoff, R., Wootton, S., Boctor, A., Chen, T., Giordani, A., Julian, T., Radebaugh, G., 1994. Aqueous stability of human epidermal growth factor 1-48. *Pharm. Res.* 11, 1712-1721.
226. Shamblin, S., Tang, X., Chang, L., Hancock, B., Pikal, M., 1999. Characterization of the time scales of molecular motion in pharmaceutically important glasses. *J. Phys. Chem. B* 103, 4113-4121.
227. Shamblin, S.L., Hancock, B.C., Pikal, M.J., 2006. Coupling between chemical reactivity and structural relaxation in pharmaceutical glasses. *Pharm. Res.* 23, 2254-2268.
228. Shamblin, S.L., Huang, E.Y., Zografi, G., 1996. The effects of co-lyophilized polymeric additives on the glass transition temperature and crystallization of amorphous sucrose. *J. Therm. Anal. Cal.* 47, 1567-1579.
229. Sheardown, H., Clark, H., Wedge, C., Apel, R., Rootman, D., Cheng, Y., 1997. A semi-solid drug delivery system for epidermal growth factor in corneal epithelial wound healing. *Curr. Eye Res.* 16, 183-191.
230. Siew, A., 2014. Freeze Drying Protein Formulations. *Pharm. Technol.* 38, 28-34.
231. Singh, G., Foster, C., 1987. Epidermal growth factor in alkali-burned corneal epithelial wound healing. *Am. J. Ophthalmol.* 103, 802-808.
232. Singh, S.K., Afonina, N., Awwad, M., Bechtold-Peters, K., Blue, J.T., Chou, D., Cromwell, M., Krause, H.J., Mahler, H.C., Meyer, B.K., 2010. An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics. *J. Pharm. Sci.* 99, 3302-3321.
233. Slade, L., Levine, H., Reid, D.S., 1991. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30, 115-360.

Referencias bibliográficas

234. Smiell, J.M., Wieman, T.J., Steed, D.L., Perry, B.H., Sampson, A.R., Schwab, B.H., 1999. Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound Rep. Reg.* 7, 335-346.
235. Son, K., Kwon, C., 1995. Stabilization of human epidermal growth factor (hEGF) in aqueous formulation. *Pharm. Res.* 12, 451-454.
236. Sreerama, N., Venyaminov, S., Woody, R., 2000. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Inclusion of denatured proteins with native protein in the analysis. *Anal. Biochem.* 287, 243-251.
237. Sreerama, N., Woody, R.W., 1993. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 209, 32-44.
238. Staub, A., Guilleme, D., Schappler, J., Veuthey, J.-L., Rudaz, S., 2011. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 810-822.
239. Stotz, C., Winslow, S., Houchin, M., D'Souze, A., Ji, J., Topp, E., 2004. Degradation Pathways for Lyophilized Peptides and Proteins, In: Costantino, H. and Pikal M. (Eds.), *Lyophilization of Biopharmaceuticals*, Springer, New York, pp. 443-478.
240. Stryer, L., Berg, J. and Tymoczko, J., 2008. *Biochemistry*. W. H. Freeman, New York.
241. Sukumar, N., Ramachandran, T., Lakshmikantha, C., 2014. Development and characterization of cactus-dextrin-recombinant human epidermal growth factor based silk scaffold for wound dressing applications. *J. Ind. Text.* 43, 565-576.
242. Sun, W.Q., Davidson, P., Chan, H.S., 1998. Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 245-254.
243. Tang, X.C., Pikal, M.J., 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm. Res.* 21, 191-200.
244. Thomas, C., Geer, D., 2011. Effects of shear on proteins in solution. *Biotechnol. Lett.* 33, 443-456.
245. Thomas, D.R., Walmsley, A.M., 2014. Improved expression of recombinant plant-made hEGF. *Plant Cell Rep.* 33, 1801-1814.
246. Tigli, R.S., Gümüşderelioğlu, M., 2008. Evaluation of RGD-or EGF-immobilized chitosan scaffolds for chondrogenic activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 43, 121-128.
247. Timasheff, S.N., 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 67-97.

Referencias bibliográficas

248. Timasheff, S.N., 1998. Control of Protein Stability and Reactions by Weakly Interacting Cosolvents: The Simplicity of the Complicated. *Adv. Protein Chem.* 51, 355-432.
249. Timasheff, S.N., 2002. Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochemistry* 41, 13473-13482.
250. Tonnis, W.F., Mensink, M.A., de Jager, A., van der Voort Maarschalk, K., Frijlink, H.W., Hinrichs, W.L.J., 2015. Size and Molecular Flexibility of Sugars Determine the Storage Stability of Freeze-Dried Proteins. *Mol. Pharmaceutics* 12, 684-694.
251. Trappler, E., 2004. Lyophilization equipment, In: Pikal M.J. and Costantino, H.R. (Eds.), *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, Lyophilization of Biopharmaceuticals*, AAPS Press, Arlington, pp. 3-41.
252. Trengove, N.J., Stacey, M.C., Macauley, S., Bennett, N., Gibson, J., Burslem, F., Murphy, G., Schultz, G., 1999. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen.* 7, 442-452.
253. Tsai, P., Volkin, D.B., Dabora, J.M., Thompson, K.C., Bruner, M.W., Gress, J.O., Matuszewska, B., Keogan, M., Bondi, J.V., Middaugh, C.R., 1993. Formulation design of acidic fibroblast growth factor. *Pharm. Res.* 10, 649-659.
254. Ugwu, S.O., Apte, S.P., 2004. The effect of buffers on protein conformational stability. *Pharm. Technol.* 28, 86-113.
255. Ulubayram, K., Cakar, A., Korkusuz, P., Ertan, C., Hasirci, N., 2001. EGF containing gelatin-based wound dressings. *Biomaterials* 22, 1345-1356.
256. Umbreit, W.W., Burris, R.H., 1960. Method for glucose and other sugars, In: Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.F. (Eds.), *Manometric & biochemical techniques*, Burguers Publishing, Minneapolis.
257. USP<71>, 2008. Sterility test. United States Pharmacopoeial Convention. ed 30 NF-25. Ed. Rockville, Maryland, USA.
258. USP<151>, 2008. Pyrogen tests. United States Pharmacopoeial Convention. ed 30 NF-25. Ed. Rockville, Maryland, USA.
259. USP<788>, 2008. Particulate matter in injections. United States Pharmacopoeial Convention. ed 30 NF-25. Ed. Rockville, Maryland, USA.
260. USP<791>, 2008. pH. United States Pharmacopoeial Convention. ed 30 NF-25. Ed. Rockville, Maryland, USA.

Referencias bibliográficas

261. USP<921>, 2008. Water determination. United States Pharmacopoeial Convention. ed 30 NF-25. Ed. Rockville, Maryland, USA.
262. Valdés, J., Mantilla, E., Márquez, G., Bonilla, R., Proenza, Y., Díaz, M., Martínez, S., Frometa, W., Martínez, Y., Narciandi, E., 2009. Improving the expression of Human Epidermal Growth Factor in *Saccharomyces cerevisiae* by manipulating culture conditions. *Biotechnol. Apl.* 26, 1-9.
263. Valliere-Douglass, J.F., Lewis, P., Salas-Solano, O., Jiang, S., 2015. Solid-State mAbs and ADCs Subjected to Heat-Stress Stability Conditions can be Covalently Modified with Buffer and Excipient Molecules. *J. Pharm. Sci.* 104, 652-665.
264. Van Zoelen, E.J., Stortelers, C., Lenferink, A.E., Van De Poll, M.L., 2000. The EGF domain: requirements for binding to receptors of the ErbB family. *Vitam. Horm.* 59, 99-131.
265. Vázquez, J., Freyre, M., Duarte, C., Ferra, E., López, I., Pérez, E., Gavilondo, J., 1990. Radio y enzimoimmunoensayos para el Factor de Crecimiento Epidérmico con anticuerpos monoclonales de ratón. *Biotechnol. Apl.* 7, 42-49.
266. Vermeer, A.W., Norde, W., 2000. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys. J.* 78, 394-404.
267. Veves, A., Falanga, V., Armstrong, D.G., Sabolinski, M.L., 2001. Graftskin, a Human Skin Equivalent, Is Effective in the Management of Noninfected Neuropathic Diabetic Foot Ulcers A prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care* 24, 290-295.
268. Vriend, G., 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graphics* 8, 52-56.
269. Vromans, H., Van Laarhoven, J., 1992. A study on water permeation through rubber closures of injection vials. *Int. J. Pharm.* 79, 301-308.
270. Wakankar, A.A., Borchardt, R.T., 2006. Formulation considerations for proteins susceptible to asparagine deamidation and aspartate isomerization. *J. Pharm. Sci.* 95, 2321-2336.
271. Wang, W., 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 185, 129-188.
272. Wang, W., 2000. Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 203, 1-60.
273. Wang, W., 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int. J. Pharm.* 289, 1-30.
274. Wang, W., Ignatius, A.A., Thakkar, S.V., 2014. Impact of Residual Impurities and Contaminants on Protein Stability. *J. Pharm. Sci.* 103, 1315-1330.

Referencias bibliográficas

275. Ward, K.R., Matejtschuk, P., 2010. The use of microscopy, thermal analysis, and impedance measurements to establish critical formulation parameters for freeze-drying cycle development, In: Rey, L. and May, J.C. (Eds.), Freeze drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products, Marcel Dekker, New York, pp. 112-135.
276. Waterman, K.C., Adami, R.C., Alsante, K.M., Hong, J., Landis, M.S., Lombardo, F., Roberts, C.J., 2002. Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. *Pharm. Dev. Technol.* 7, 1-32.
277. Wazer, J.V., Callis, C., 1958. Metal Complexing By Phosphates. *Chem. Rev.* 58, 1011-1046
278. Weiss, W.F., Young, T.M., Roberts, C.J., 2009. Principles, approaches, and challenges for predicting protein aggregation rates and shelf life. *J. Pharm. Sci.* 98, 1246-1277.
279. Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835-870.
280. Willemer, H., 1992. Measurements of temperatures, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze-drying. *Dev. Biol. Stand.* 74, 123-136.
281. Wishart, D.S., Sykes, B.D., 1994. The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR* 4, 171-180.
282. Wisniewski, R., 1998. Large-scale cryopreservation of cells, cell components, and biological solutions. *Biopharm.* 11, 42-49.
283. Wong, W.-K.R., Lam, E., Huang, R., Wong, R.S.-C., Morri, C., Hackett, J., 2001. Applications, and Efficient Large-Scale Production, of Recombinant Human Epidermal Growth Factor. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 18, 51-71.
284. Xu, Y., Carpenter, J.F., Cicerone, M.T., Randolph, T.W., 2013. Contributions of local mobility and degree of retention of native secondary structure to the stability of recombinant human growth hormone (rhGH) in glassy lyophilized formulations. *Soft Matter* 9, 7855-7865.
285. Yamagata, H., Nakahama, K., Suzuki, Y., Kakinuma, A., Tsukagoshi, N., Udaka, S., 1989. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 3589-3593.
286. Yang, C., Huang, Y., Wu, P., Tsai, Y., 2005. The evaluation of stability of recombinant human epidermal growth factor in burn-injured pigs. *Process Biochem.* 40, 1661-1665.
287. Yarden, Y., Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127-137.

Referencias bibliográficas

288. Yildirimer, L., Thanh, N.T., Seifalian, A.M., 2012. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends Biotechnol.* 30, 638-648.
289. Yin, F., Guo, S., Gan, Y., Zhang, X., 2014. Preparation of redispersible liposomal dry powder using an ultrasonic spray freeze-drying technique for transdermal delivery of human epithelial growth factor. *Int. J. Nanomedicine* 9, 1665-1675.
290. Yoon, C.S., Lee, E.G., Lee, Y.S., Chung, I.Y., 1997. Expression of recombinant epidermal growth factor in *E. coli*. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2, 86-89.
291. Yoshioka, S., Aso, Y., 2005. A quantitative assessment of the significance of molecular mobility as a determinant for the stability of lyophilized insulin formulations. *Pharm. Res.* 22, 1358-1364.
292. Yoshioka, S., Aso, Y., 2007. Correlations between molecular mobility and chemical stability during storage of amorphous pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* 96, 960-981.
293. Yoshioka, S., Aso, Y., Izutsu, K.-i., Terao, T., 1993. Aggregates formed during storage of β -galactosidase in solution and in the freeze-dried state. *Pharm. Res.* 10, 687-691.
294. Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y., 2006. β -Relaxation of Insulin Molecule in Lyophilized Formulations Containing Trehalose or Dextran as a Determinant of Chemical Reactivity. *Pharm. Res.* 23, 961-966.
295. Yoshioka, S., Tajima, S., Aso, Y., Kojima, S., 2003. Inactivation and aggregation of β -galactosidase in lyophilized formulation described by Kohlrausch-Williams-Watts stretched exponential function. *Pharm. Res.* 20, 1655-1660.
296. Yu, L., 2001. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Adv. Drug Del. Rev.* 48, 27-42.
297. Zheng, K., Middaugh, C.R., Siahaan, T.J., 2009. Evaluation of the physical stability of the EC5 domain of E-cadherin: Effects of pH, temperature, ionic strength, and disulfide bonds. *J. Pharm. Sci.* 98, 63-73.
298. Zybailov, B., Sun, Q., van Wijk, K.J., 2009. Workflow for Large Scale Detection and Validation of Peptide Modifications by RPLC-LTQ-Orbitrap: Application to the *Arabidopsis thaliana* Leaf Proteome and an Online Modified Peptide Library. *Anal. Chem.* 81, 8015-8024.

7. AUTOBIBLIOGRAFIA RELACIONADA DIRECTAMENTE CON LA TESIS

Artículos científicos:

1. **Santana H, González Y, Campana PT, Noda J, Amarante O, Itri R, Beldarraín A, Páez R**, (2013) "Screening for stability and compatibility conditions of recombinant human epidermal growth factor for parenteral formulation: Effect of pH, buffers, and excipients". *International Journal of Pharmaceutics* **452**, 52-62.
2. **Santana H, Sotolongo J, González Y, Hernández G, China G, Gerónimo H, Amarante O, Beldarraín A, Páez R**, (2014) "Stabilization of a recombinant human epidermal growth factor parenteral formulation through freeze-drying". *Biologicals* **42**, 322-333.
3. **Santana H, García G, Vega M, Beldarraín A, Páez R**, (2015) "Stability studies of a freeze-dried recombinant human epidermal growth factor formulation for wound healing". *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **69 (3)**, 399-416.

Presentaciones en congresos científicos internacionales:

1. **Santana H, Sotolongo J, Viltres Y, Gerónimo H, Vega M, Betancourt BY, Berlanga J, Martínez E, Páez R**, (2007) "Development of a freeze-dried parenteral formulation containing human recombinant epidermal growth factor for the treatment of chronic wounds". Biotecnología Habana 2007. Cartel.
2. **Santana H, Vega M, Rivas-Granizo P, Ferraz H, Brito O, Hernández M, Font M, Rey I, Amarantes O, González Y, Páez R**, (2009) "Stress Photostability of a Recombinant Human Epidermal Growth Factor Freeze-Dried Parenteral Formulation". Biotecnología Habana 2009. Cartel.
3. **Gerónimo H, Martínez Y, Brito O, González J, Ferrero J, Rodríguez C, Vega M, García G, Costa L, Izquierdo M, Rosales I, Quintana M, Santana H**, (2010) "Establecimiento y validación del ensayo de actividad biológica para el control del Heberprot-P. Cartel, Co-Autor. Biotecnología Habana 2010. Cartel.
4. **Santana H, Vega M, Berlanga J, Sotolongo J, Gerónimo H, Moya G, Gil J, Noda J, Sánchez A, Besada V, González LJ, García G, Páez R, Martínez E**, (2011) "Formulation strategy of rh-EGF intralesional injections for wound healing". Immunopharmacology 2011, Varadero, Cuba, 3 al 7 Junio. Cartel.
5. **Costa L, García G, Santana H**, (2011) "The Comparability in Biotechnology Product, Study Report of Heberprot-P during its Development". Immunopharmacology 2011, Varadero, Cuba, 3 al 7 Junio. Cartel.

8. AUTOBIBLIOGRAFIA NO RELACIONADA DIRECTAMENTE CON LA TESIS

Patentes:

1. **Berlanga J, Fernandez-Montequín JI, Valdes-Pérez C, Franco-Pérez N, Rojas I, Santana H, Chacón L, Guillén G, Herrera L, Canan-Haden L, Gerónimo H, Sotolongo JA.** "Use of a pharmaceutical composition containing epidermal growth factor (EGF) for diabetic foot amputation prevention". *Patente Europea número 1466617*.
2. **Bello I, López-Saura P, García Y, Santana H, Aguilera A, Páez R y Anasagasti L.** "Stable formulations containing enhancing proportions of Gamma- and alpha-interferons". *Patente en Estados Unidos número US 853 5657*.
3. **Santana H, Ventosa N, Martínez E, Veciana J, Cabrera I, Berlanga JA.** "Vesicles comprising epidermal growth factor and compositions thereof". *Solicitud de Patente en Europa con número de publicación 2915541*.

Artículos científicos:

1. **Garcia OL, Gonzalez B, Menendez A, Sosa AE, Fernandez JR, Santana H y Meneses N,** (1996) "The argU Gene Product Enhances Expression of the Recombinant Human $\alpha 2$ -Interferon in *Escherichia coli*". *Annals of the New York Academy of Sciences* **782**, 79-86.
2. **Hardy E, Santana H, Sosa A, Hernández L, Fernández-Patrón C, y Castellanos-Serra L,** (1996) "Recovery of biologically active proteins detected with imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc (reverse stain) on sodium dodecyl sulfate gels". *Analytical Biochemistry* **240**, 150-152.
3. **Castellanos-Serra L, Fernandez-Patron C, Hardy E, Santana H y Huerta V,** (1997) "High yield elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels at the low-picomole level. Application to N-terminal sequencing of a scarce protein and to in-solution biological activity analysis of on-gel renatured proteins". *Journal of Protein Chemistry* **16**, 415-419.
4. **Bouyon R, Hernandez JR, Aleaga T, Santana H, Gil M, Sosa R y Herrera L,** (1997) "Ion exchange chromatography for the purification of recombinant human alpha-2b interferon. Comparative study of medium and high resolution gels". *Biotechnologia Aplicada* **14**, 189-192.
5. **Hardy E, Pupo E, Santana H, Guerra M y Castellanos-Serra L,** (1998) "Elution of lipopolysaccharides from polyacrylamide gels". *Analytical biochemistry* **259**, 162-165.
6. **Sánchez JC, Padrón G, Santana H y Herrera L,** (1998) "Elimination of an H₁FN α 2b readthrough species, produced in *Escherichia coli*, by replacing its natural translational stop signal". *Journal of Biotechnology* **63**, 179-186.

7. **Díaz N, Santana H, Cruz M, Brito R, Maso Y, Pérez E y Furrázola G**, (1998) "Obtaining antibodies and development of an immunoassay for the detection of *Escherichia coli* proteins in preparations of human recombinant gamma interferon". *Revista Argentina de Microbiología* **30**, 64-72.
8. **Reytor E, Hernández L, Santana H, Blanco R, Barceló MT, Rodríguez I y Boué O**, (1998) "A competitive enzyme linked immunosorbent assay for recombinant Bm86 produced in *Pichia pastoris*". *Biotechnology Techniques* **12**, 919-923.
9. **Santana H, Martínez E, Sánchez JC, Moya G, Sosa R, Hardy E y Herrera L**, (1999) "Molecular characterization of recombinant human interferon alpha-2b produced in Cuba. *Biotechnologia Aplicada* **16**, 154-159.
10. **Pupo E, Aguila A, Santana H, Núñez JF, Castellanos-Serra L y Hardy E**, (1999) "Mice immunization with gel electrophoresis-micropurified bacterial lipopolysaccharides". *Electrophoresis* **20**, 458-461.
11. **Santana H, Espino Y, Franco A, Furrázola G y Hardy E**, (1999) "A sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of recombinant human interferon α -2b". *Biotechnology techniques* **13**, 341-346.
12. **Bouyón R, Santana H, Pérez EM, Hernández N, Furrázola G y Abrahantes MC**, (2003) "Development and Validation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Recombinant Human Gamma Interferon". *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* **24**, 1-10.
13. **Rodrieuez-Silva A, López-Saura P, Berlanga J, Cosme K, Barcardi D, Truillo R, Sotolongo J, Pujol V, Ferrero W, Jiménez D, Chuay C, Aznar E, Suárez S, Hernández N, Sánchez JC, de la Cruz T, Montané M, Vega JL, Perez E, Vega M, Costa L, Santana H, Besada V, González LJ, Heredia I, Quiñones Y, Ubieta R, Delgado A, Aguila A, Gutiérrez D, Portuondo I, Gutierrez A, Chuay D, Carballo LA, Mauri M, Silva R, Martinez D, López-Mola E, Herera L**, (2010) "Marketing Authorization of Heberprot-P, a Cuban Product for the Diabetic Foot Ulcer Treatment". *VacciMonitor* **19** (2), 213-214.
14. **Fernández-Oliva M, Santana H, Suardíaz R, Gavín JA y Pérez CS**, (2012) "Combined nuclear magnetic resonance spectroscopy and molecular dynamics study of growth hormone releasing hexapeptide GHRP-6 and a cyclic analogue". *Magnetic Resonance in Chemistry* **50**, 364-371.
15. **Sánchez JC, Hernández N, Hernández R, Musacchio A, Llopiz A, Santana H, Pujol V, Bourg V**, (2013) "Definition of a Security Value Determined by Limulus Amebocyte Lysate Assay Targeting the Recombinant Human Epidermal Growth Factor". *BioPharm International* **26**, 44-52.
16. **Valiente J, García del Barco D, Guillen G, Santana H, Altruda F, Tarone G, Silengo L, Berlanga J**, (2013) "Cardiotropic effect of GHRP-6: *in vivo* characterization by echocardiography". *Biotechnologia Aplicada* **30**, 285-289.

17. Santana H, Avila CL, Cabrera I, Páez R, Falcón V, Pessoa A, Ventosa N, Veciana J, Itri R, Ramos Souza Barbosa L, (2014) “How does Growth Hormone Releasing Hexapeptide self-assemble in Nanotubes?”. *Soft Matter* 10, 9260-9269.

Logros científicos:

1. Desarrollo de nuevas técnicas analíticas y preparativas que preservan la integridad biológica de las biomoléculas. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.1996. **Coautor**.
1. Obtención de un interferón gamma humano recombinante inmunoestimulador en humanos. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.1998. **Coautor**.
2. Obtención de un nuevo Interferón alfa 2b humano recombinante con alta homogeneidad molecular y competitividad internacional. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.1998. **Coautor**.
3. Caracterización físico-química e inmunológica del antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B obtenido en forma de agregados por cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (SEC). Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba. 2000. **Colaborador**.
4. Factibilidad, a través de una nueva interfaz, de la espectrometría de masas de lipopolisacáridos separados en geles de poliacrilamida. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.2005. **Coautor**.
5. Diseño de Metodologías Específicas para la Caracterización por Espectrometría de Masas de Proteínas Recombinantes de uso en Humanos y en la Industria Biotecnológica”. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.2008. **Colaborador**.
6. Medalla de Oro de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) 2011, a la invención: “Use of a pharmaceutical composition containing epidermal growth factor (EGF) for diabetic foot amputation prevention”. **Coautor**.
7. CIGB-552: nuevo péptido penetrador con acción antitumoral mediada por el aumento de los niveles de la proteína COMMD1 en la célula de cáncer. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.2014. **Colaborador**.

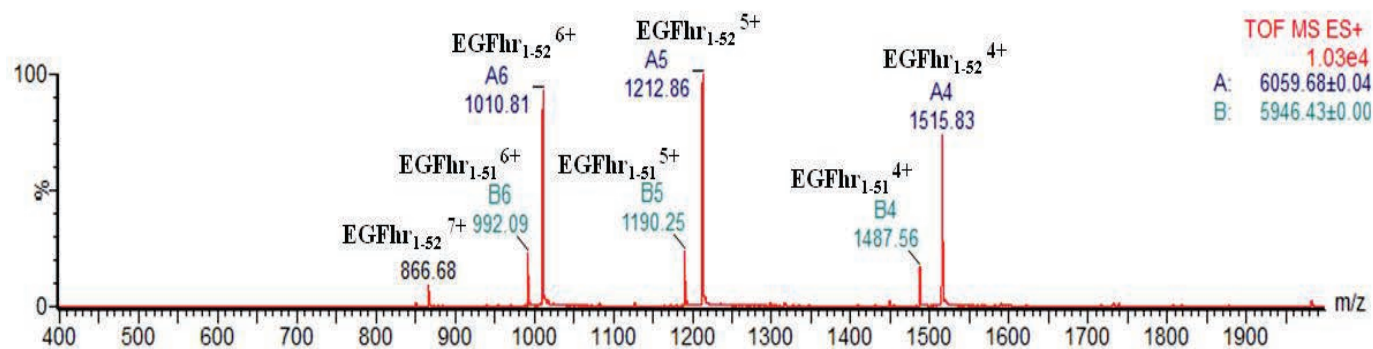
9. ANEXOS

ANEXO 1

Caracterización por ESI-MS del IFA del EGChr producido en *Saccharomyces cerevisiae*

Determinación de la masa molecular de la proteína intacta

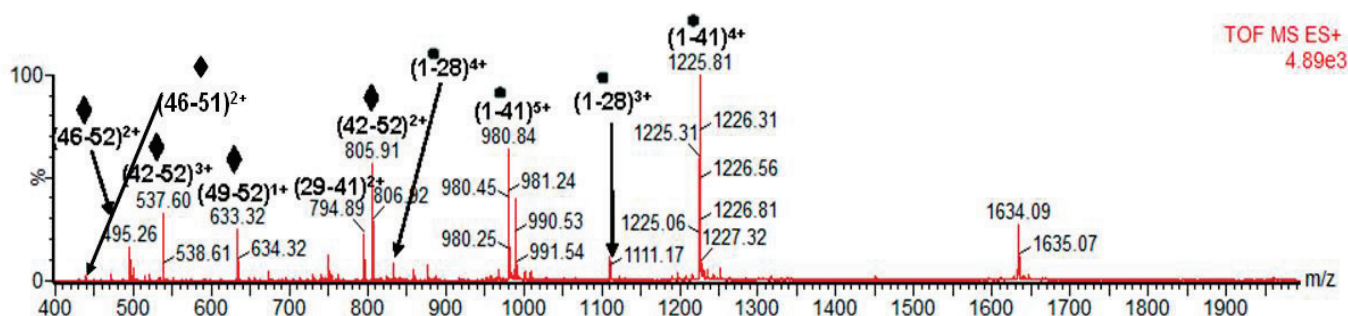
En los análisis en ESI-MS del EGChr se detectan las señales de los estados de cargas 4+, 5+ y 6+ que fueron consistentes con las masas moleculares teóricas del EGChr truncado en el extremo C-terminal para dar especies con 51 y 52 aminoácidos y con tres enlaces de disulfuro intramoleculares. En la esquina superior derecha del espectro, con las letras A y B, se muestran las masas moleculares promedio del EGChr₁₋₅₂ y EGChr₁₋₅₁ de 6 059,68 y 5 946,43 g/mol, respectivamente. Considerando que las masas teóricas del EGChr₁₋₅₂ y EGChr₁₋₅₁ son de 6 059,82 y 5 946,66 g/mol, los resultados fueron determinados con muy buena exactitud, esto evidenció la integridad de los dos componentes mayoritarios del IFA de EGChr (EGChr₁₋₅₁ y el EGChr₁₋₅₂).



Espectro ESI-MS de la proteína intacta del IFA de EGChr. Como EGChr₁₋₅₂ y EGChr₁₋₅₁ se representan las especies truncadas en el extremo C-terminal del EGChr con 52 y 51 aminoácidos, respectivamente. En la esquina superior derecha de cada espectro con las letras A y B se muestran las masas moleculares promedio determinadas para el EGChr₁₋₅₂ y EGChr₁₋₅₁ (masas teóricas: 6 059,68 y 5 946,43 g/mol), respectivamente.

Secuenciación de los extremos C-terminal y N-terminal

Para la secuenciación de los extremos C-terminal y N-terminal fue necesario digerir con tripsina el IFA de EGChr. En el espectro ESI-MS de la digestión con tripsina de la proteína después de reducida y propionamidada se muestran las señales marcadas con rombos negros para identificar las especies asignadas a péptidos del C-terminal, y las marcadas con círculos negros se corresponden con las asignadas a péptidos del N-terminal del EGChr.



Espectro ESI-MS de la digestión triptica de la proteína reducida y propionamidata del IFA de EGFr. Las señales marcadas con rombos y círculos negros se corresponden con especies asignadas a los péptidos C-terminal y N-terminal del EGFr, respectivamente.

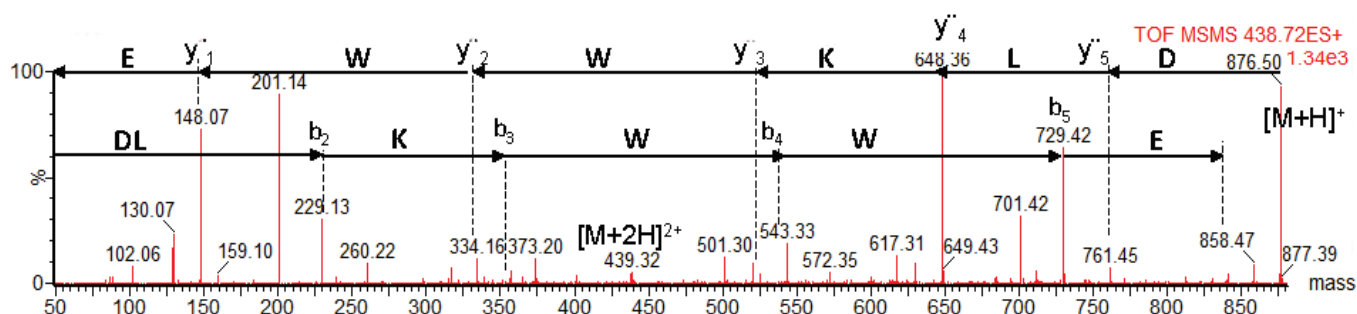
La siguiente tabla muestra el resumen de las asignaciones realizadas a cada una de las señales correspondientes a los péptidos.

Masas moleculares monoisotópicas obtenidas para los péptidos generados durante la digestión triptica de la proteína reducida y propionamidata

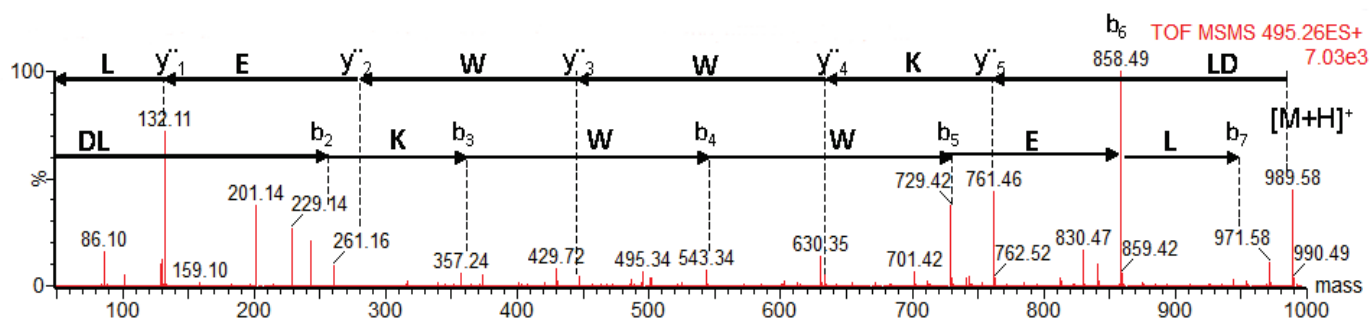
m/z teórica	z	m/z experimental	Error (%) ^a	Asignación
495,26	2	495,26	0,00	D ⁴⁶ -L ⁵²
438,72	2	438,72	0,00	D ⁴⁶ -E ⁵¹
633,30	1	633,32	0,003	W ⁴⁹ -L ⁵²
794,87	2	794,89	0,003	Y ²⁹ -R ⁴¹
832,61	4	832,63	0,003	N ¹ -K ²⁸
1109,83	3	1 109,82	0,0009	
980,23	5	980,25	0,002	N ¹ -R ⁴¹
1225,03	4	1 225,06	0,002	

^ael error está calculado de la siguiente manera: $Error(\%) = \{Abs [(m_{teórica} - m_{experimental})/m_{teórica}]\} \times 100$

Los péptidos C-terminal correspondientes a las señales doble carga m/z 438,72 y 495,26 de las especies EGFr₁₋₅₁ y EGFr₁₋₅₂, respectivamente, se secuenciaron mediante ESI-MS/MS. Los espectros ESI-MS/MS deconvolucionados permiten asegurar que las secuencias asignadas a los péptidos C-terminal (⁴⁶DLKWE⁵¹) y (⁴⁶DLKWEL⁵²) se corresponden con las esperadas para el EGFr₁₋₅₁ y EGFr₁₋₅₂, respectivamente. Las dos especies mayoritarias del EGFr mantienen íntegro el extremo C-terminal.

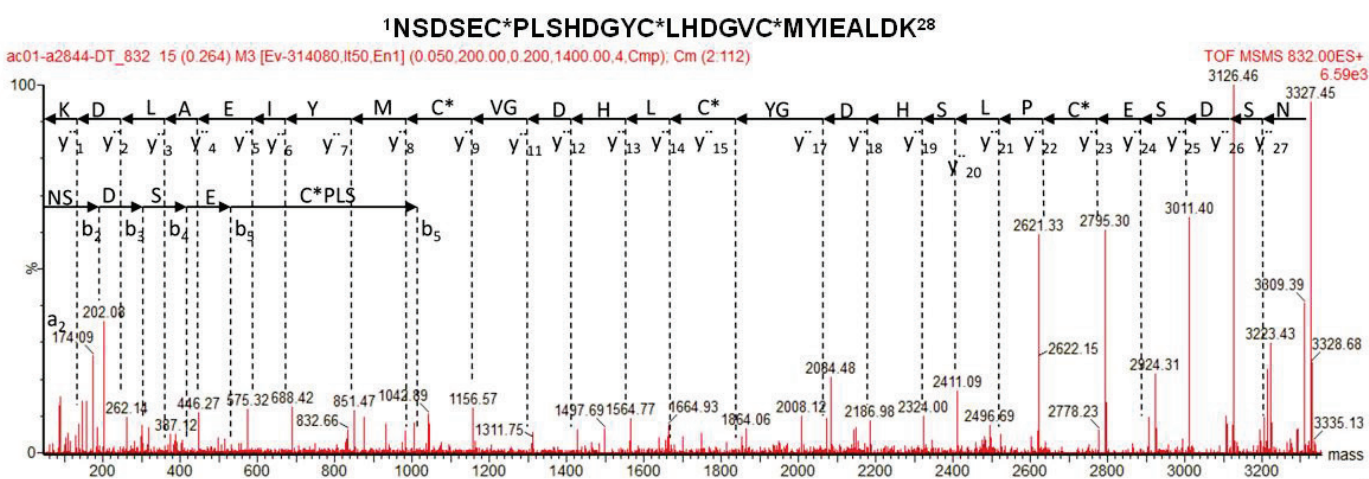


Espectro ESI-MS/MS de la señal doble carga m/z 438,72 correspondiente al péptido C-terminal ($^{46}\text{DLKWWE}^{51}$) de la especie EGFhr₁₋₅₁, contenido en el IFA.



Espectro ESI-MS/MS de la señal doble carga m/z 495,26 correspondiente al péptido C-terminal ($^{46}\text{DLKWWE}^{52}$) de la especie EGFhr₁₋₅₂, contenido en el IFA.

El péptido N-terminal correspondiente a la señal cuatro cargas m/z 832,00 se secuenció mediante ESI-MS/MS. El espectro ESI-MS/MS deconvolucionado permite asegurar que la secuencia asignada al péptido N-terminal ($^1\text{NSDSEC*PLSHDGYC*LHDGVC*MYIEALDK}^{28}$) se corresponde con la esperada, y que el EGFhr mantiene el extremo N-terminal íntegro.

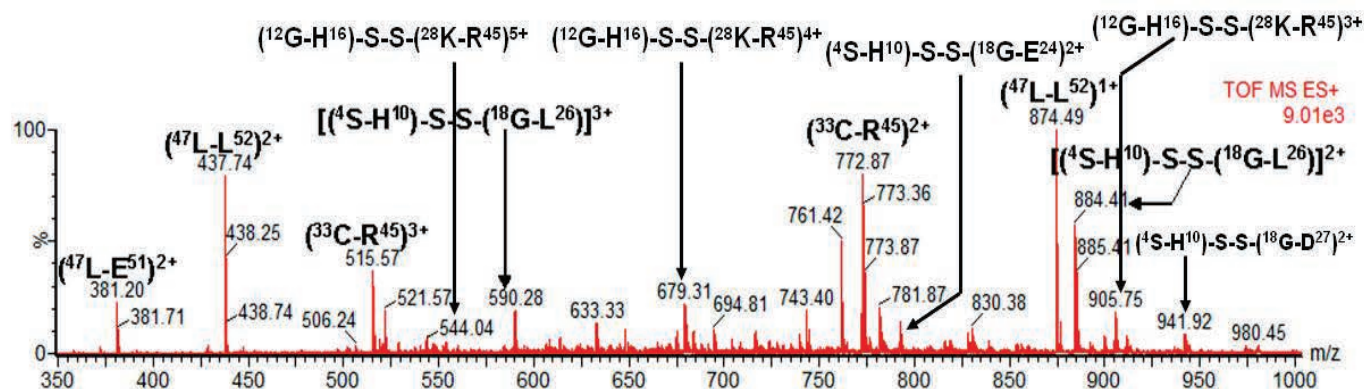


Espectro ESI-MS/MS deconvolucionado de la señal cuatro cargas m/z 832,00 correspondiente al péptido N-terminal del IFA de EGFhr.

C*: cisteínas reducidas y alquiladas con acrilamida.

Análisis de los enlaces disulfuro

Para verificar la correcta formación de los enlaces disulfuro en el EGFhr, la proteína se sometió a hidrólisis ácida parcial (Besada y cols., 1990). En la tabla de la página siguiente se muestran los valores de las relaciones m/z de los péptidos generados. Las señales se asignaron considerando la concordancia entre los valores teóricos y experimentales y la especificidad del corte químico realizado. En el espectro ESI-MS, se observan los iones de m/z correspondientes a los péptidos que mantienen enlazadas las cisteínas por enlaces disulfuro ($\text{Cys}^6\text{-Cys}^{20}$, $\text{Cys}^{14}\text{-Cys}^{31}$ y $\text{Cys}^{33}\text{-Cys}^{42}$) (Besada y cols., 1990).



Región ampliada del espectro ESI-MS (350-1000 m/z) correspondiente a la hidrólisis en medio ácido del EGFhr contenido en el IFA.

Masas moleculares monoisotópicas de los péptidos que están formando enlace disulfuro en la molécula de EGFhr que fueron detectados durante la caracterización por ESI-MS después de la hidrólisis ácida parcial

m/z teórica	z	m/z experimental	Error (%) ^a	Asignación
515,25	3	515,24	0,002	C ³³ -R ⁴⁵ (péptido con un enlace disulfuro intramolecular entre las Cys ³³ -Cys ⁴²)
772,36	2	772,36	0,00	
589,92	3	589,94	0,003	[(⁴ S-H ¹⁰)-S-S-(¹⁸ G-L ²⁶)] ⁺ señal asignada a dos péptidos (⁴ S-H ¹⁰ y ¹⁸ G-L ²⁶) enlazados mediante un enlace disulfuro intermolecular entre las Cys ⁶ -Cys ²⁰
884,38	2	884,41	0,003	
941,93	2	941,92	0,001	[(⁴ S-H ¹⁰)-S-S-(¹⁸ G-D ²⁷)] ⁺ señal asignada a dos péptidos (⁴ S-H ¹⁰ y ¹⁸ G-D ²⁷) enlazados mediante un enlace disulfuro intermolecular entre las Cys ⁶ -Cys ²⁰
792,35	2	792,35	0,00	[(⁴ S-H ¹⁰)-S-S-(¹⁸ G-E ²⁴)] señal asignada a dos péptidos (⁴ S-H ¹⁰ y ¹⁸ G-E ²⁴) enlazados mediante un enlace disulfuro intermolecular entre las Cys ⁶ -Cys ²⁰
437,74	2	437,74	0,00	(⁴⁷ L-L ⁵²) ⁺
381,19	2	381,20	0,003	(⁴⁷ L-E ⁵¹) ⁺
904,75	3	905,08	0,036	[(¹² G-H ¹⁶)-S-S-(²⁸ K-R ⁴⁵)] señal asignada a dos péptidos (¹² G-H ¹⁶ y ²⁸ K-R ⁴⁵) enlazados mediante un enlace disulfuro intermolecular que une a las Cys ¹⁴ -Cys ³¹ y además contiene un enlace disulfuro intramolecular que une a las Cys ³³ -Cys ⁴²
678,81	4	679,06	0,036	
543,23	5	543,45	0,040	

^ael error está calculado de la siguiente manera: $Error (\%) = \{Abs [(m_{teórica} - m_{experimental})/m_{teórica}]\} \times 100$

Referencias

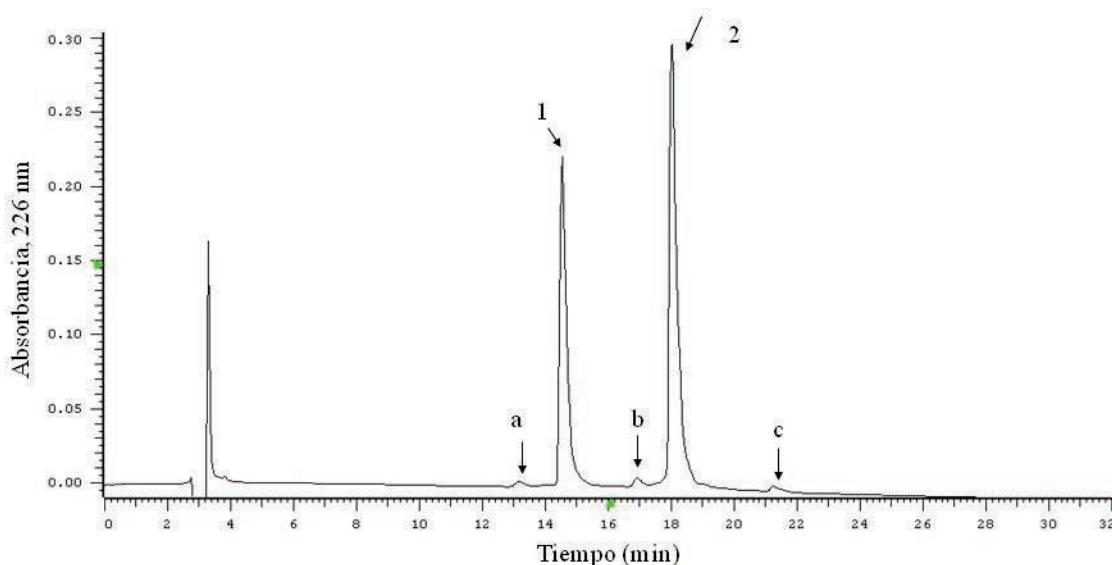
Besada, V., Antuch, W., Cinza, A., Rojas, I., Quintana, M., Padron, G., Takao, T., Shimonishi, Y., 1990. Chemical characterization of recombinant human epidermal growth factor. Anal. Chim. Acta 239, 301-305.

ANEXO 2

Caracterización por ESI-MS de los principales productos de degradación del IFA del EGFhr aislados mediante RP-HPLC

Aislamiento de las especies del IFA de EGFhr por RP-HPLC

En la figura se muestra el perfil cromatográfico de RP-HPLC del IFA de EGFhr, las especies eluidas se colectaron y analizaron por ESI-MS para caracterizar cada especie a nivel molecular.



Aislamiento en RP-HPLC de los componentes principales y productos de degradación del IFA de EGFhr. Las especies se separaron en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrilo/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min.

La siguiente tabla resume las masas moleculares de la proteína intacta determinada por ESI-MS.

Identificación de los componentes principales y productos de degradación de las fracciones de EGFhr separadas mediante RP-HPLC

Fracción	<i>trr</i> ^a	Masa teórica	Masa experimental	Error (%) ^b	Asignación
a	0,72	5 962,66	5 962,74	0,001	EGFhr ₁₋₅₁ Met ²¹ sulfóxido
1	0,81	5 946,66	5 946,69	0,0005	EGFhr ₁₋₅₁
b	0,94	6 075,82	6 075,96	0,002	EGFhr ₁₋₅₂ Met ²¹ sulfóxido
2	1,00	6 059,82	6 059,81	0,0001	EGFhr ₁₋₅₂
c	1,18	6 168,64	6 169,05	0,007	EGFhr ₁₋₅₂ + 113 g/mol

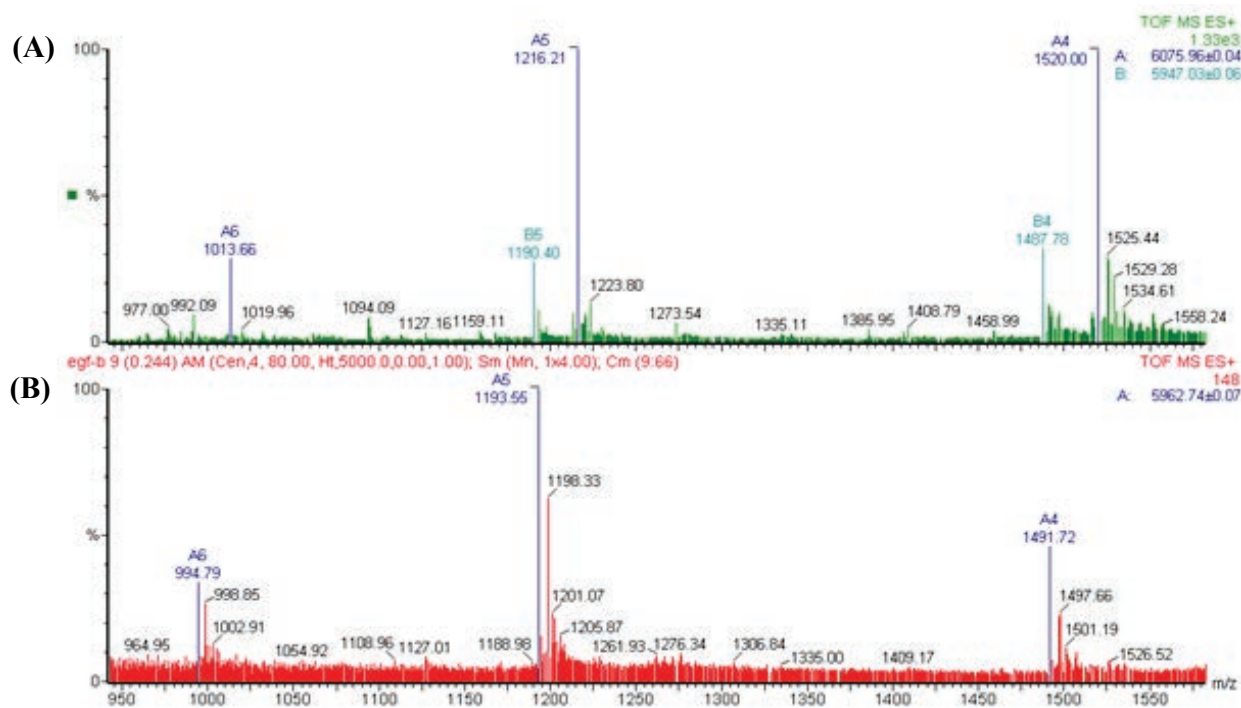
^a*trr*: tiempo de retención relativo.

$trr = [(\text{tiempo de retención del EGFhr modificado})/(\text{tiempo de retención del EGFhr}_{1-52})]$.

^ael error está calculado de la siguiente manera: $\text{Error (\%)} = \{Abs [(m_{teórica} - m_{experimental})/m_{teórica}]\} \times 100$

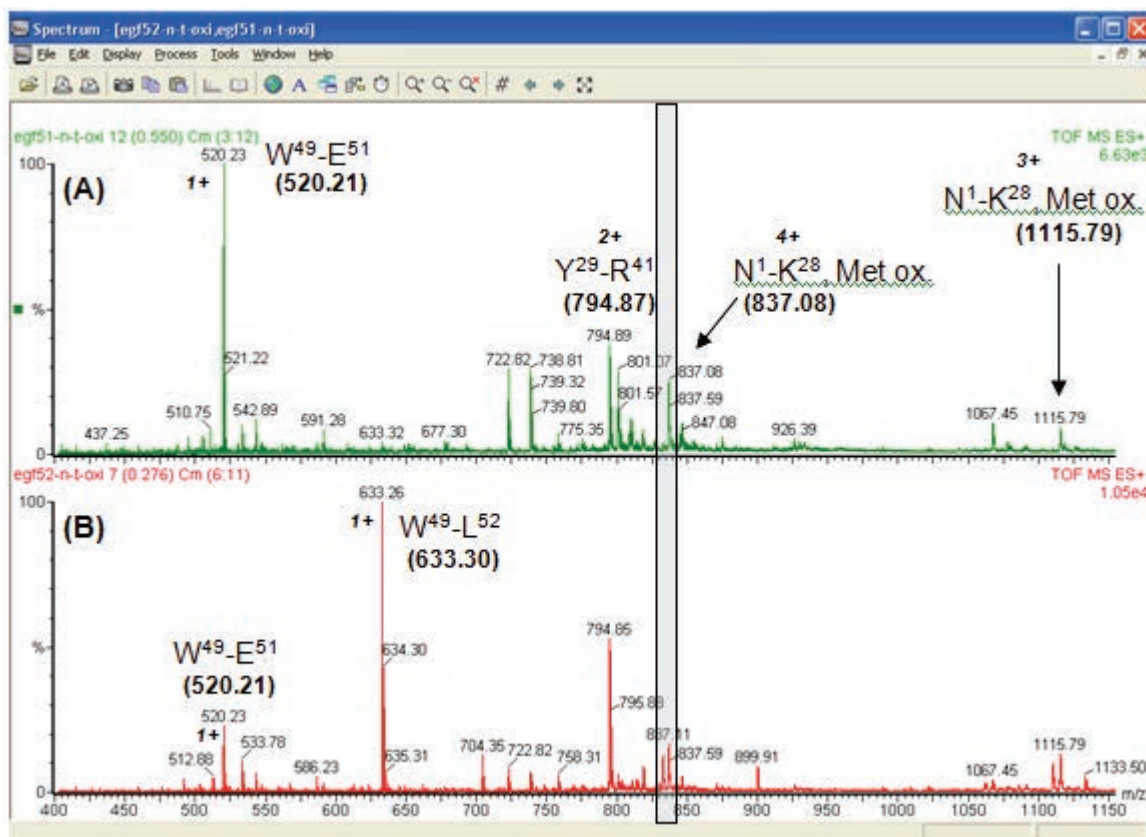
Caracterización de las fracciones (a) y (b)

En la siguiente figura se observa que los valores de las masas moleculares promedio determinadas por ESI-MS para las especies presentes en las fracciones (a) y (b) fueron 5 962,74 y 6 075,96 g/mol, respectivamente. Estos resultados concuerdan muy bien con las masas moleculares promedio esperadas para las especies de EGFhr truncadas por el extremo C-terminal, originando las especies de EGFhr₁₋₅₁ y EGFhr₁₋₅₂ y considerando la adición de un átomo de oxígeno, presumiblemente por un proceso de oxidación con el consecuente incremento en la masa molecular de +16 g/mol.



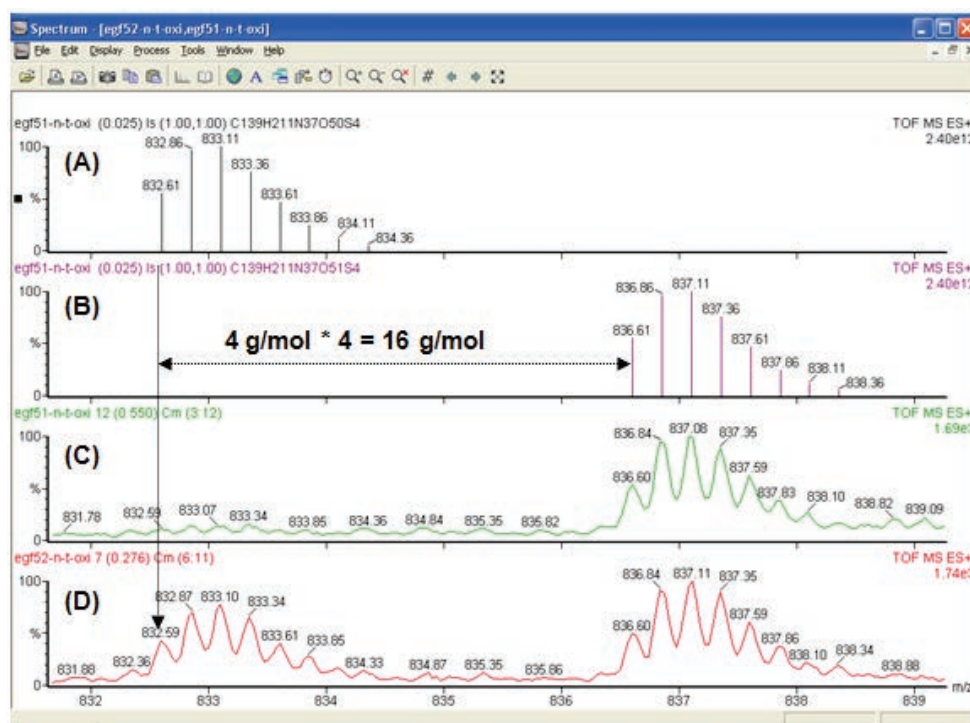
Espectros ESI-MS correspondientes a fracciones (b) y (a) del cromatograma de RP-HPLC [fracción (b), (**Panel A**) y fracción (a), (**Panel B**)]. Las masas moleculares teóricas promedio del EGFhr₁₋₅₂ y el EGFhr₁₋₅₁, presumiblemente oxidado en la Met₂₁ son de 6 075,82 y 5 962,66 g/mol, respectivamente. En la esquina superior derecha aparece la masa molecular promedio determinada experimentalmente.

El sitio de oxidación específico tentativamente fue asignado a la oxidación de la Met²¹ a sulfóxido (Besada y cols., 1990). Para verificar esta hipótesis, las fracciones (a) y (b) fueron colectadas a partir de las corridas de RP-HPLC y posteriormente reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina. Los péptidos derivados se analizaron mediante ESI-MS para verificar el sitio de oxidación específico. El péptido N-terminal con la Met²¹ oxidada a sulfóxido se detectó en los espectros como señales triple cargadas (m/z 1 115,79) y tetracargadas (m/z 837,08) como se muestra en la siguiente figura.



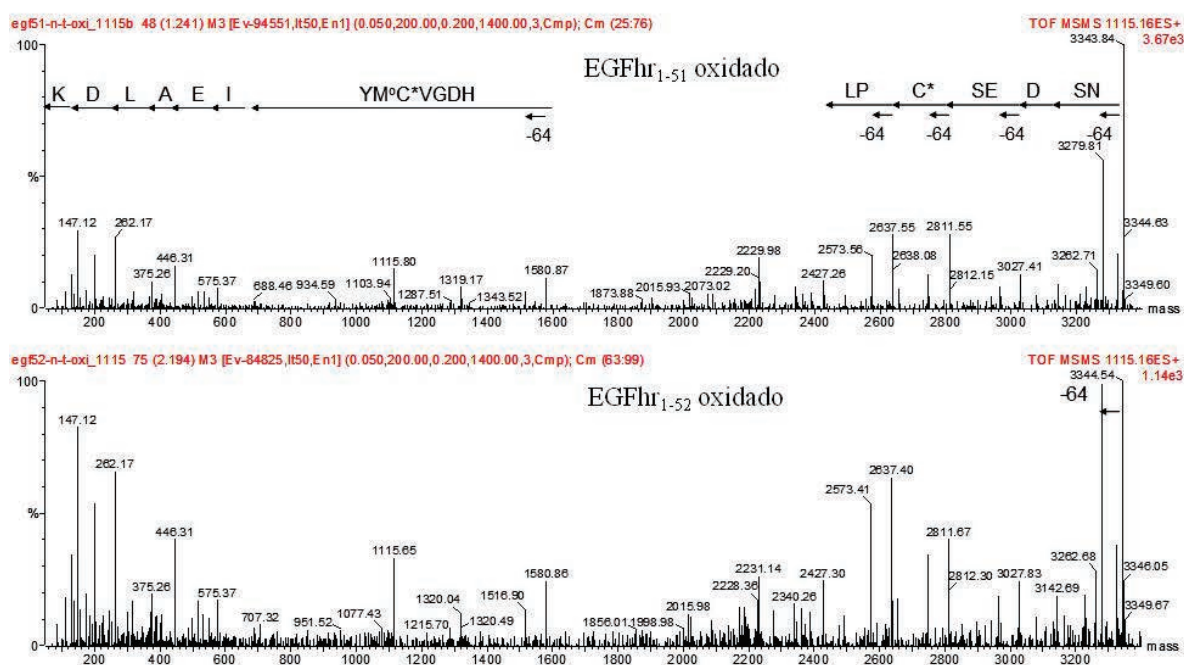
Espectros ESI-MS de los péptidos tripticos después de la reducción y alquilación de las cisteínas de las especies de EGFhr₁₋₅₁ (**Panel A**) y EGFhr₁₋₅₂ (**Panel B**). Las señales más intensas fueron asignadas, se muestra la carga del ión y entre paréntesis la masa molecular teórica. Las regiones destacadas dentro del rectángulo se muestran en la figura siguiente.

La distribución isotópica teórica del péptido N-terminal no modificado (Figura siguiente, panel A) se comparó con la del mismo péptido que presumiblemente tenía oxidada la Met²¹ a sulfóxido (Figura siguiente, panel B), los resultados concuerdan con los esperados.



Distribuciones isotópicas teóricas correspondientes a las especies no oxidada (A) y oxidada (B) del péptido N-terminal del EGFhr ($\text{Asn}^1\text{-Lys}^{28}$)⁴⁺. Las regiones ampliadas en los paneles C y D se corresponden con regiones destacadas dentro del rectángulo de la figura anterior.

Para confirmar que el péptido N-terminal contenía una Met oxidada a sulfóxido se secuenció el péptido triple carga m/z 1115,16 mediante ESI-MS/MS. En el espectro ESI-MS/MS de la siguiente figura se observó una señal intensa debido a la pérdida de masa de 64 g/mol del ión precursor.

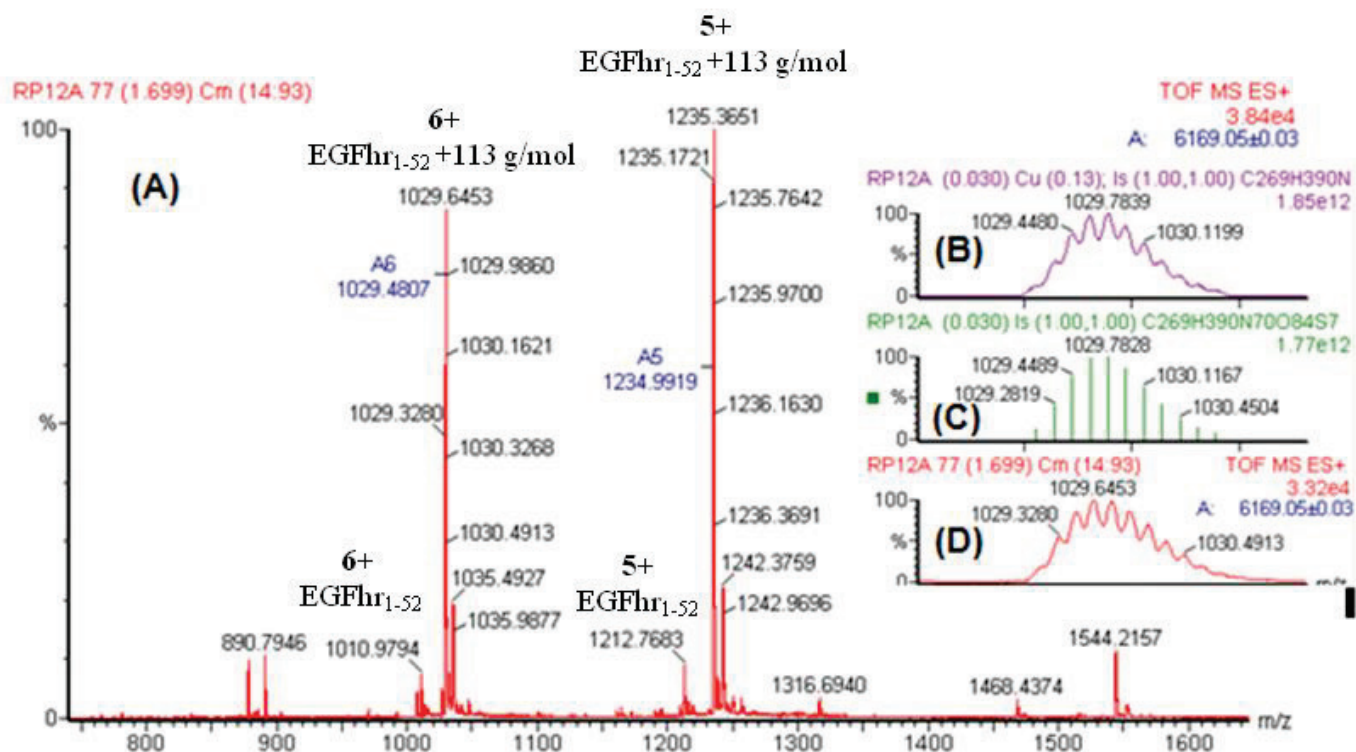


Espectros ESI-MS/MS de la señal triple carga con relación m/z de 1115,16 correspondiente al péptido N-terminal ($\text{Asn}^1\text{-Lys}^{28}$) con un sulfóxido de Met.

La fragmentación debido a la pérdida de masa de 64 g/mol ($-\text{CH}_3\text{SOH}$) es muy específica de péptidos que contienen un residuo de sulfóxido de Met, lo que corrobora que este péptido está oxidado. Este tipo de fragmentación ha sido reportada por otros autores al identificar péptidos con la Met oxidada a sulfóxido (Smith y cols., 1997; Lagerwerf y cols., 1996).

Caracterización de la fracción (c) correspondiente al EGFhr₁₋₅₂ + 113 g/mol

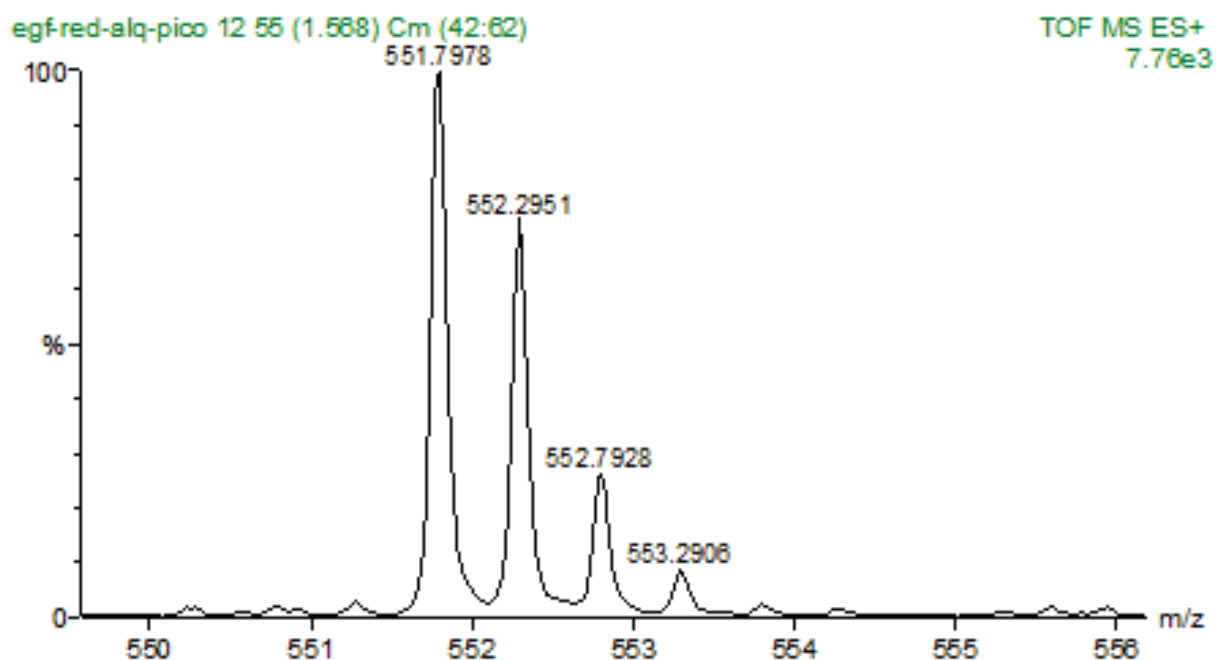
En la siguiente figura se muestra el análisis por ESI-MS de la fracción (c) del cromatograma de RP-HPLC. Se observa una proteína cuya masa molecular se corresponde con el EGFhr₁₋₅₂ con un incremento de masa de 113 g/mol. Debido a que dicho incremento de masa nunca se detectó en la especie de EGFhr₁₋₅₁, se asumió como hipótesis que la modificación ocurrió en el extremo C-terminal de la especie de EGFhr₁₋₅₂.



Espectros ESI-MS de la fracción (c) del cromatograma de RP-HPLC donde se observan los iones multicargados del EGFhr₁₋₅₂ con un incremento de masa de 113 g/mol (A). Las regiones ampliadas (B) y (C) muestran la distribución isotópica teórica del EGFhr₁₋₅₂ en forma continua y de barra, respectivamente. La región ampliada en (D) muestra la distribución isotópica experimental del ión multicargado (6+) del espectro en (A).

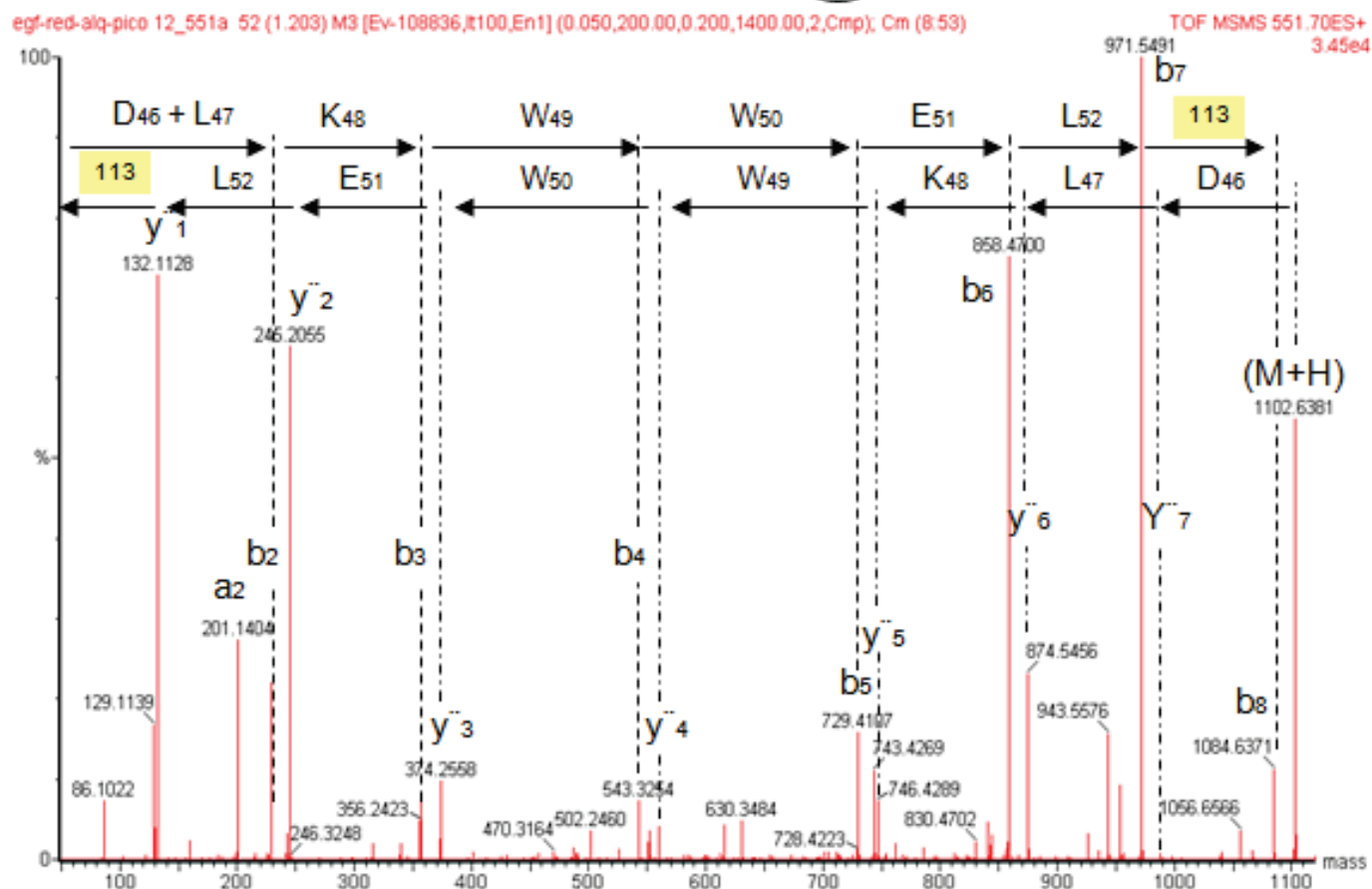
La fracción (c) del cromatograma de RP-HPLC fue colectada, reducida, carboximetilada y digerida con tripsina. Los péptidos resultantes se analizaron por ESI-MS para detectar la localización de la modificación de la proteína. En el espectro ESI-MS de la digestión con tripsina de esta fracción que se muestra debajo, el péptido C-terminal del EGFhr₁₋₅₂ (WWEL) no se detectó, esto sugiere que la

modificación ocurrió en la región C-terminal de la proteína. Sin embargo, se detectó una señal doble carga m/z 551,79 que no puede explicarse por la secuencia del EGFhr, excepto considerando el péptido C-terminal del EGFhr₁₋₅₂ con incremento de masa de 113 g/mol.



Región ampliada del espectro ESI-MS de la digestión triptica del EGFhr₁₋₅₂ con un incremento de masa de 113 g/mol, se observa una señal doble carga m/z 551,79 que no se pudo asignar a los péptidos tripticos.

El péptido C-terminal correspondiente a la señal doble carga m/z 551,79 se secuenció mediante ESI-MS/MS. En la figura de la página siguiente se muestra el espectro deconvolucionado, asegurando que el incremento de 113 g/mol ocurrió en el péptido C-terminal del EGFhr₁₋₅₂. Esta modificación ocurre probablemente en el extremo C-terminal del EGFhr₁₋₅₃, donde la Arg₅₃ está modificada a un aldehído (Amici y cols., 1989). Esta reacción de oxidación es catalizada por la presencia de iones metálicos y radicales libre de oxígeno, los cuales están presentes en el proceso de fermentación y catalizan dicha reacción como se ha informado. Otro factor que contribuye es la aireación vigorosa que se requiere para el crecimiento de la biomasa. Debemos enfatizar que esta modificación es minoritaria.



Espectro ESI-MS/MS del péptido m/z 551,79 mostrado en la figura anterior. Esta señal se corresponde con el péptido C-terminal con un incremento de su masa de 113 g/mol.

Referencias

- Besada, V., Antuch, W., Cinza, A., Rojas, I., Quintana, M., Padron, G., Takao, T., Shimonishi, Y., 1990. Chemical characterization of recombinant human epidermal growth factor. *Anal. Chim. Acta* 239, 301-305.
- Smith, J.B., Jiang, X., Abraham, E., 1997. Identification of hydrogen peroxide oxidation sites of α A- and α B-crystallins. *Free radical research* 26, 103-111.
- Lagerwerf, F.M., van de Weert, M., Heerma, W., Haverkamp, J., 1996. Identification of oxidized methionine in peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1905-1910.
- Amici, A., Levine, R., Tsai, L., Stadtman, E., 1989. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J. Biol. Chem.* 264, 3341-3346.

ANEXO 3

Impurezas detectadas en los estudios de degradación forzada mediante el ensayo de RP-HPLC

Impurezas presentes en las muestras antes y después de los tratamientos de estrés. El porcentaje de EGFhr remanente en cada muestra es marcado en negritas

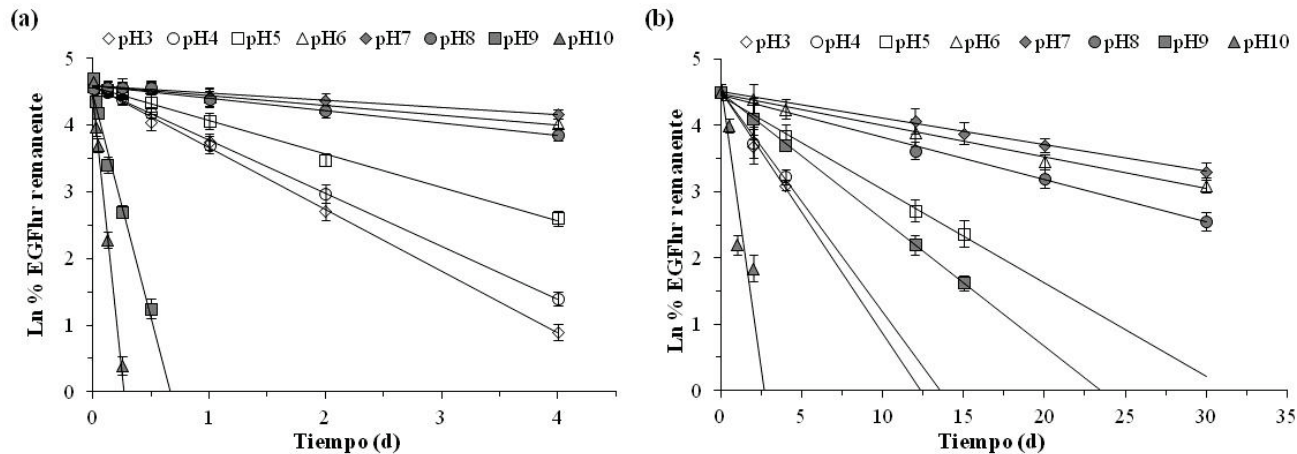
Tiempo de retención relativo (<i>t_{rr}</i> ^a)	Control, -20 °C (pH y calor extremos) ^b	pH 3,0 4 días 50 ± 2 °C	pH 7,0 4 días 50 ± 2 °C	pH 9,0 4 días 50 ± 2 °C	Control, 25 ± 2 °C (H ₂ O ₂) ^b	H ₂ O ₂ 0,01%	H ₂ O ₂ 0,1%	Control, 25 ± 2 °C (fotólisis) ^b	Irradiado en bulbos
	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)		(%)
0,64				17,5					0,3
0,71	0,2	0,2	0,6		0,4	2,1	13,0	0,2	1,5
0,75		0,1		0,1					1,0
0,80 (EGFhr₁₋₅₁)	21,2	11,9	17,4	2,1	30,6	28,7	17,9	21,3	17,0
0,84		9,0	7,0	0,4					0,9
0,9	0,1	0,5	0,3	69,9	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3
0,94	0,8	1,0	2,7		1,3	5,4	28,8	1,0	7,3
0,97		0,5	0,1	0,1					1,9
1,00 (EGFhr₁₋₅₂)	76,5	37,6	48,8	7,9	66,5	62,6	39,5	76,7	63,9
1,03		5,3	21,8						0,7
1,05	0,5	31,0	0,3	0,4	0,4	0,4	0,1	0,1	1,5
1,10		1,0	0,4	0,1					0,6
1,15	0,1	0,5	0,1	1,0	0,1	0,1	0,2		2,2
1,18	0,6	1,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,6	0,9
EGFhr₁₋₅₁ + EGFhr₁₋₅₂	97,7	49,5	66,2	10,0	97,1	91,3	57,4	98,0	80,9

^a*t_{rr}* = [(tiempo de retención del EGFhr modificado)/(tiempo de retención del EGFhr₁₋₅₂)].

^b Para los tres grupos de experimentos se utilizaron diferentes lotes de IFA de EGFhr.

ANEXO 4

Cálculos de las constantes de velocidad de degradación del EGFhr en función del pH de la solución



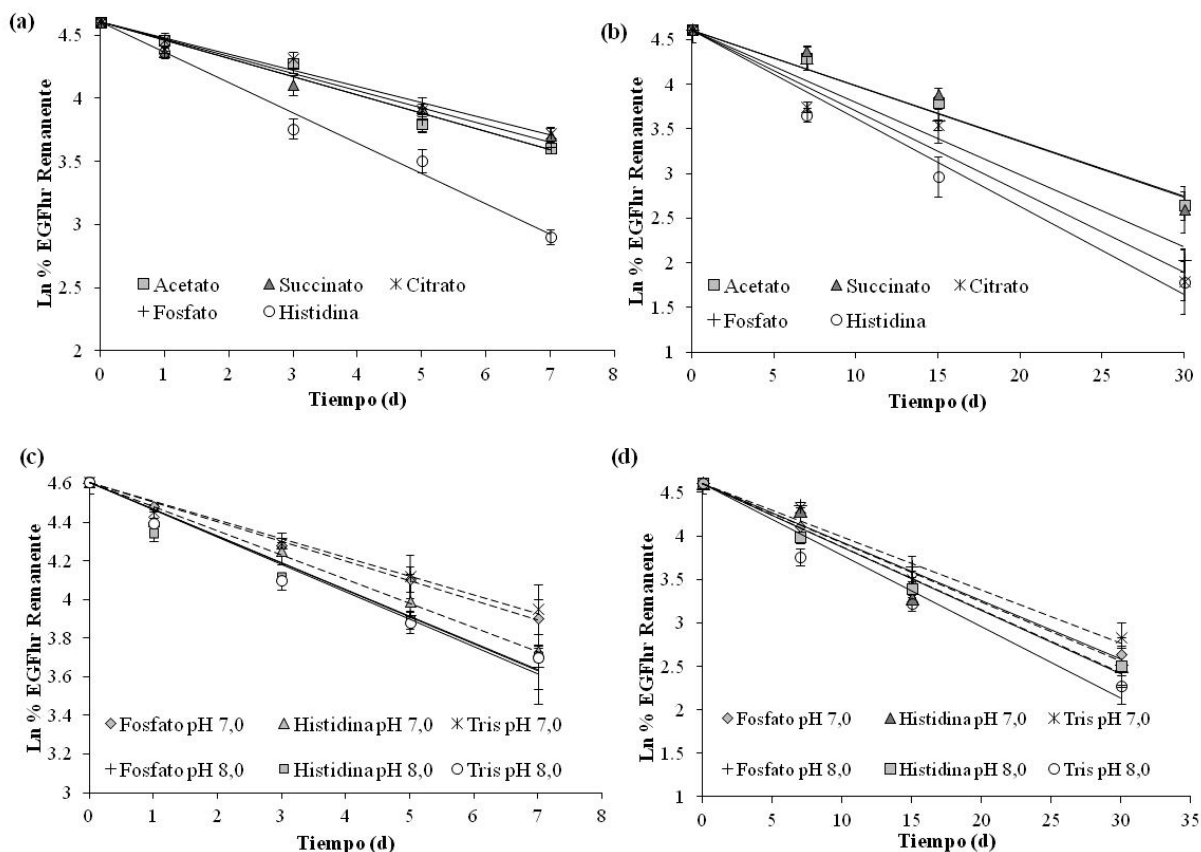
Cinética de degradación del EGFhr en función del pH de la solución a 50 ± 2 °C por el método de RP-HPLC (panel a) y por el de ELISA (panel b).

Parámetros de ajuste de la ecuación de la recta para los diferentes valores de pH. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

RP-HPLC			ELISA	
pH	K _{obs} (%/d)	r ²	K _{obs} (%/d)	r ²
3	0,93 (0,88-0,97)	0,998	0,363 (0,328-0,399)	0,998
4	0,80 (0,77-0,82)	0,999	0,331 (0,295-0,366)	0,998
5	0,51 (0,47-0,54)	0,997	0,141 (0,126-0,156)	0,996
6	0,148 (0,125-0,170)	0,983	0,048 (0,042-0,053)	0,993
7	0,104 (0,081-0,126)	0,966	0,04 (0,037-0,044)	0,998
8	0,185 (0,156-0,215)	0,981	0,064 (0,052-0,077)	0,996
9	6,68 (5,49-7,86)	0,984	0,191 (0,187-0,196)	0,999
10	16,46 (13,92-19,01)	0,993	1,37 (0,89-1,84)	0,987

ANEXO 5

Cálculos de las constantes de velocidad de degradación del EGFhr en función del pH y el tipo de tampón de la solución



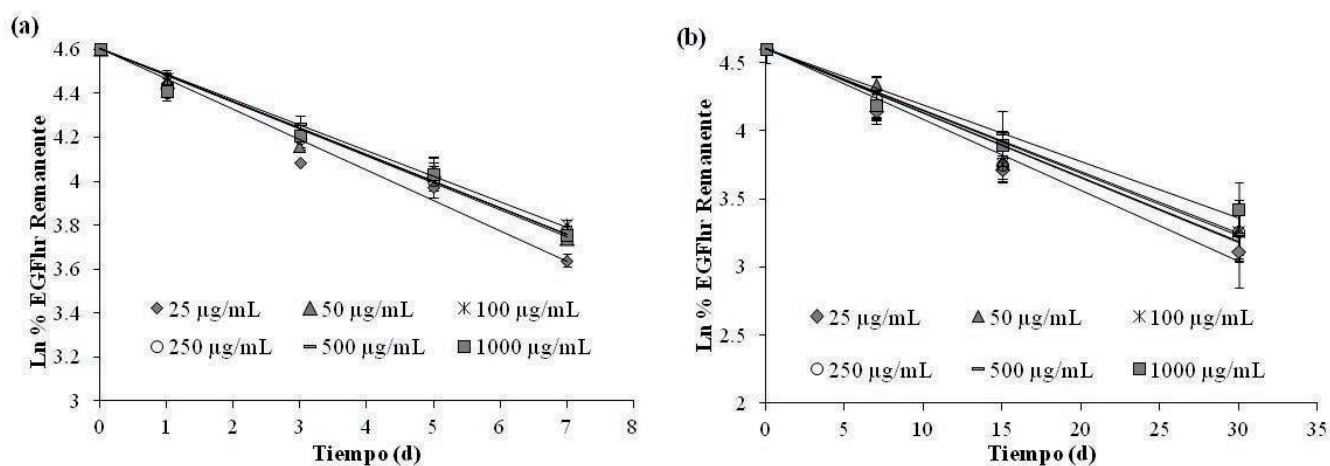
Cinética de degradación del EGFhr en función del pH y el tipo de tampón de la solución a 50 ± 2 °C por el método de RP-HPLC (paneles a y c) y por el de ELISA (paneles b y d). Se emplearon diferentes tampones a pH 6,0 (paneles a y b) y a pH 7,0 y 8,0 (paneles c y d). En líneas discontinua pH 7,0 y en líneas continuas pH 8,0.

Parámetros de ajuste de la ecuación de la recta para las combinaciones de pH y tipo de tampón. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

RP-HPLC				ELISA	
pH	Tipo de tampón	K_{obs} (%/d)	r^2	K_{obs} (%/d)	r^2
6,0	Acetato	0,148 (0,106-0,190)	0,977	0,067 (0,045-0,088)	0,989
	Succinato	0,123 (0,088-0,157)	0,977	0,069 (0,033-0,104)	0,972
	Citrato	0,129 (0,093-0,166)	0,977	0,090 (0,037-0,142)	0,964
	Fosfato	0,138 (0,097-0,179)	0,975	0,087 (0,053-0,122)	0,998
	Histidina	0,236 (0,185-0,288)	0,986	0,091 (0,056-0,127)	0,984
7,0	Fosfato	0,099 (0,091-0,107)	0,998	0,066 (0,043-0,089)	0,987
	Histidina	0,120 (0,097-0,142)	0,990	0,073 (0,031-0,116)	0,965
	Tris	0,091 (0,076-0,105)	0,993	0,062 (0,028-0,095)	0,968
8,0	Fosfato	0,131 (0,103-0,160)	0,986	0,072 (0,048-0,096)	0,988
	Histidina	0,123 (0,085-0,161)	0,973	0,069 (0,048-0,090)	0,990
	Tris	0,117 (0,066-0,167)	0,950	0,075 (0,040-0,110)	0,977

ANEXO 6

Cálculos de las constantes de velocidad de degradación en función de la concentración de EGFr



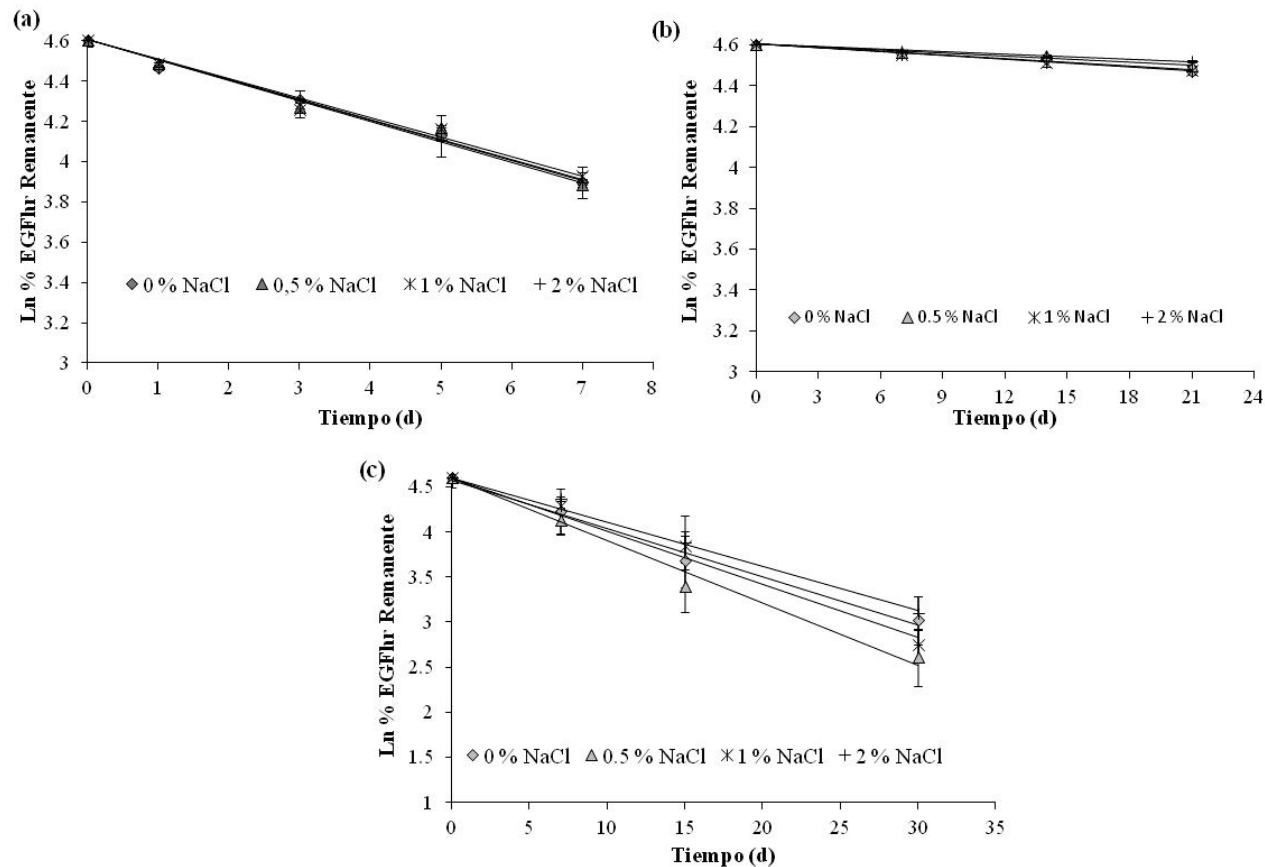
Cinética de degradación del EGFr en función de la concentración de la proteína en la solución a 50 ± 2 °C por el método de RP-HPLC (*panel a*) y por ELISA (*panel b*).

Parámetros de ajuste de la ecuación de la recta para las concentraciones de EGFr. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

Concentración EGFr (µg/mL)	RP-HPLC		ELISA	
	K_{obs} (%/d)	r^2	K_{obs} (%/d)	r^2
25	0,133 (0,096-0,170)	0,977	0,049 (0,032-0,066)	0,987
50	0,118 (0,088-0,148)	0,981	0,046 (0,025-0,066)	0,978
100	0,113 (0,099-0,127)	0,995	0,044 (0,024-0,064)	0,979
250	0,112 (0,091-0,134)	0,989	0,045 (0,025-0,065)	0,978
500	0,119 (0,102-0,135)	0,994	0,044 (0,028-0,059)	0,986
1000	0,115 (0,093-0,137)	0,989	0,038 (0,021-0,055)	0,979

ANEXO 7

Cálculos de las constantes de velocidad de degradación del EGFhr en función de la fuerza iónica de la solución



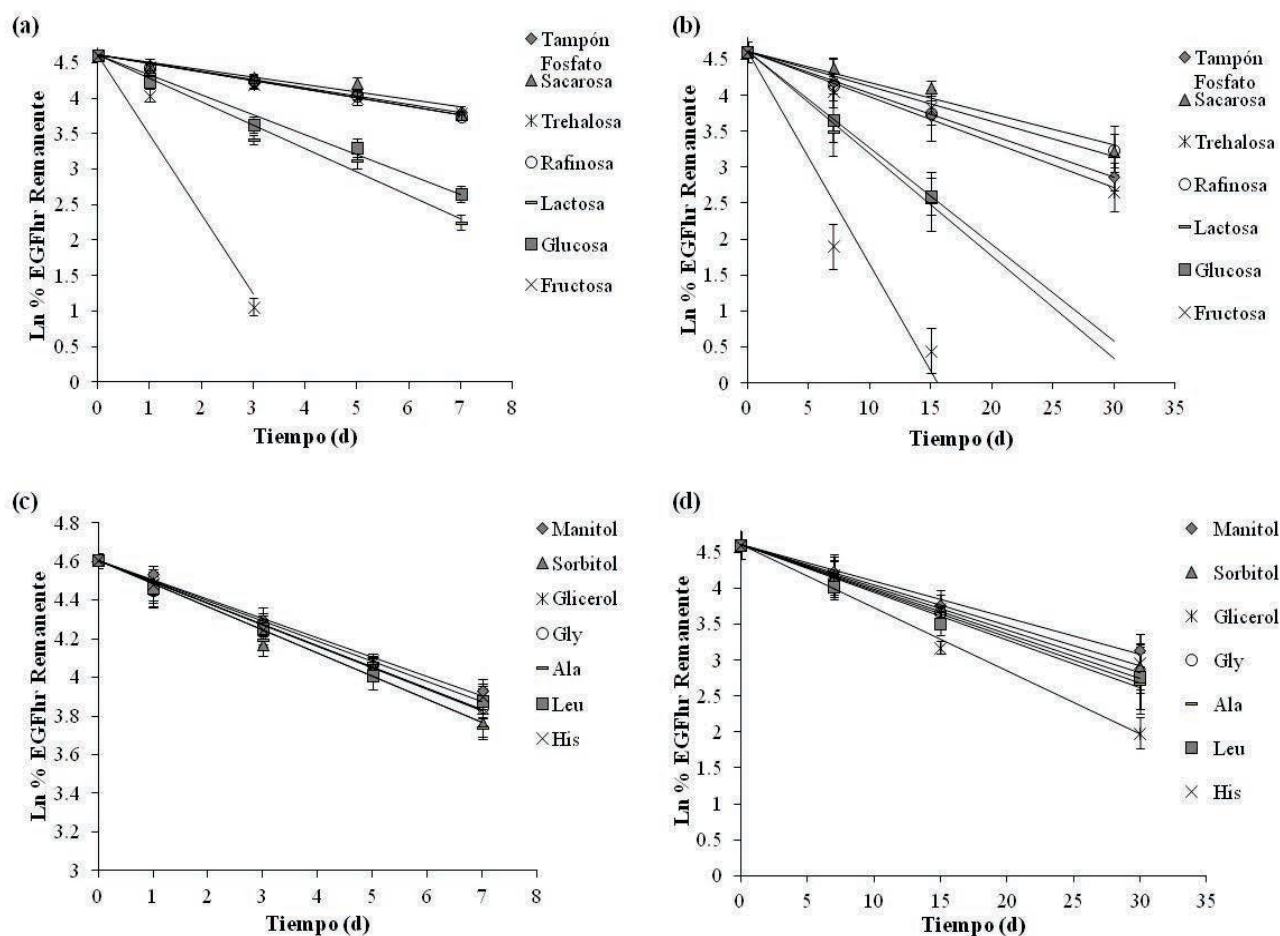
Cinética de degradación del EGFhr en función de la fuerza iónica de la solución a 50 ± 2 °C por el método de RP-HPLC (panel a), SEC (panel b) y ELISA (panel c).

Parámetros de ajuste de la ecuación de la recta para las concentraciones de NaCl. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

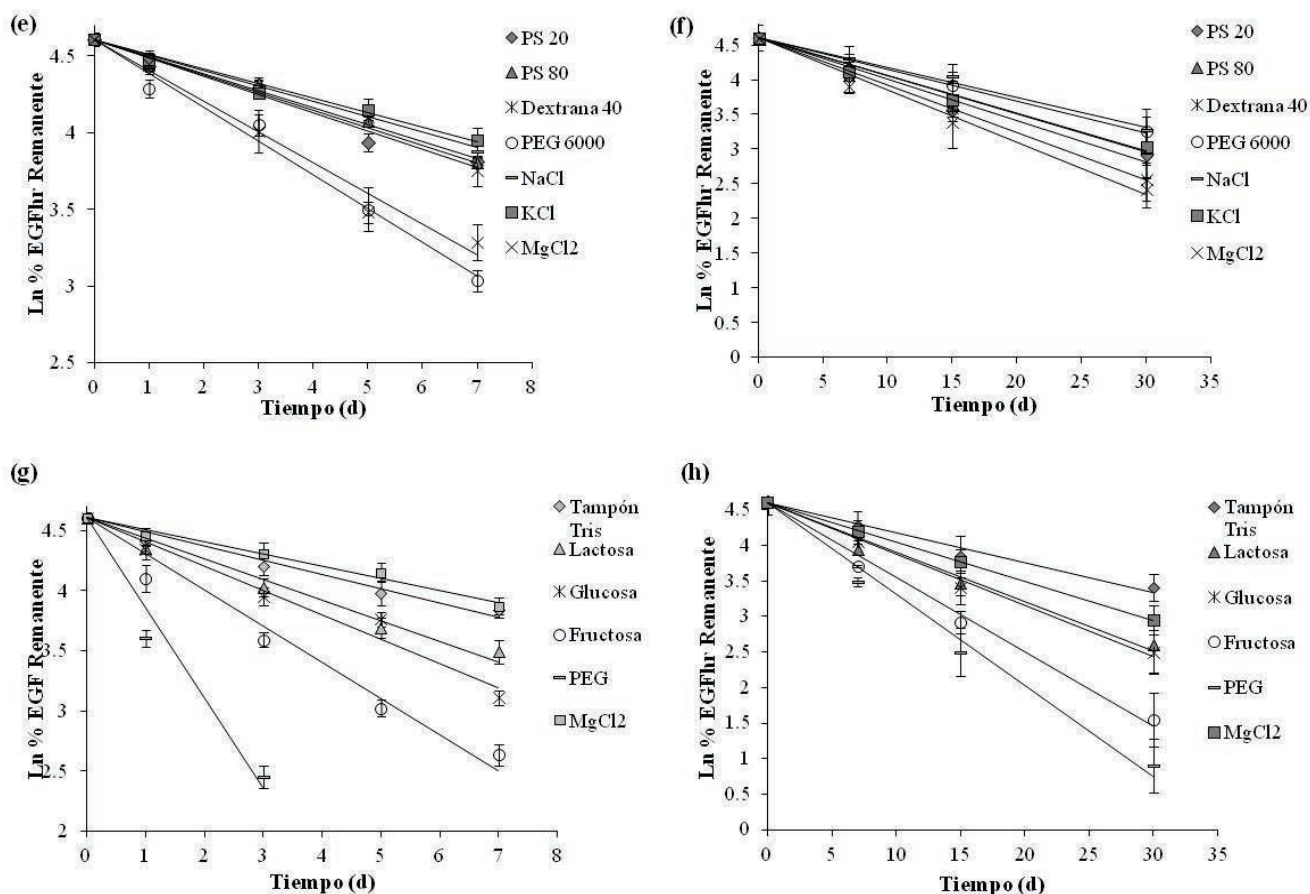
NaCl (%)	RP-HPLC		SEC		ELISA	
	K_{obs} (%/d)	r^2	K_{obs} (%/d)	r^2	K_{obs} (%/d)	r^2
0	0,097 (0,083-0,111)	0,994	0,0061 (0,0039-0,0084)	0,985	0,054 (0,038-0,069)	0,991
0,5	0,097 (0,072-0,122)	0,981	0,0049 (0,0027-0,0071)	0,979	0,067 (0,042-0,092)	0,985
1	0,092 (0,069-0,115)	0,982	0,0057 (0,0025-0,0088)	0,997	0,063 (0,043-0,082)	0,989
2	0,099 (0,089-0,108)	0,997	0,0040 (0,0027-0,0054)	0,988	0,051 (0,039-0,064)	0,994

ANEXO 8

Cálculos de las constantes de velocidad de degradación del EGFhr en solución acuosa en presencia de los excipientes comúnmente utilizados en formulaciones parenterales de proteínas



Cinética de degradación del EGFhr en presencia de los excipientes en solución acuosa a 50 ± 2 °C en tampón fosfato de sodio obtenida por el método de RP-HPLC (paneles a y c) y por ELISA (paneles b y d). En presencia de sacáridos (paneles a y b), y de polialcoholes y aminoácidos (paneles c y d).



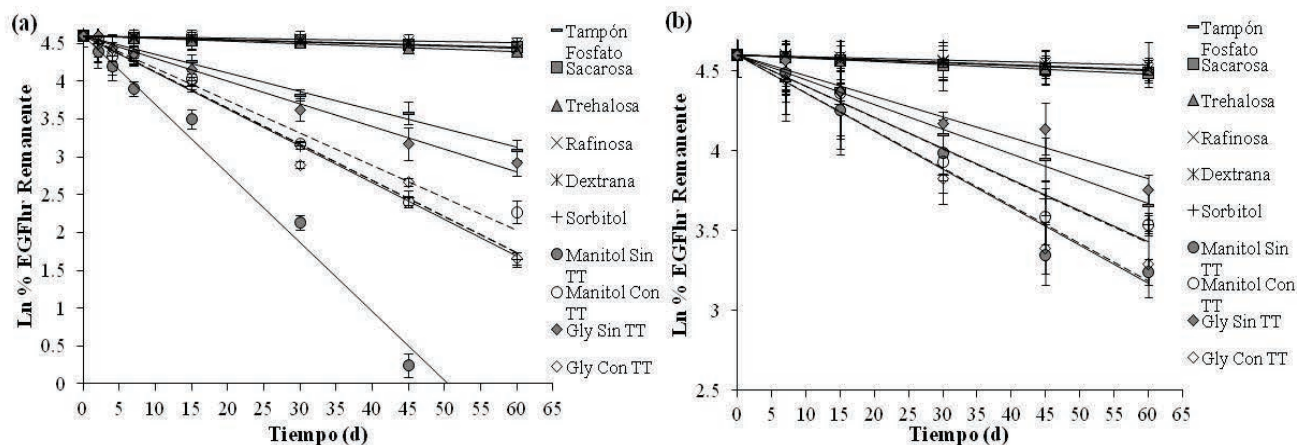
Cinética de degradación del EGFr en presencia de los excipientes en solución acuosa a 50 ± 2 °C obtenida por el método de RP-HPLC (**paneles e y g**) y por ELISA (**paneles f y h**). En tampón fosfato de sodio y en presencia de polímeros y sales (**paneles e y f**); y en tampón Tris-HCl con los excipientes que resultaron incompatibles en tampón fosfato de sodio (**paneles g y h**).

Parámetros de ajuste de la ecuación de la recta para el EGFhr en solución en presencia de los excipientes. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

Excipientes	RP-HPLC		ELISA	
	K _{obs} (%/d)	r ²	K _{obs} (%/d)	r ²
Tampón Fosfato Na	0,097 (0,079-0,115)	0,989	0,058 (0,056-0,060)	0,999
Sacarosa	0,106 (0,055-0,158)	0,954	0,046 (0,026-0,067)	0,979
Trehalosa	0,112 (0,094-0,129)	0,994	0,063 (0,034-0,092)	0,978
Rafinosa	0,110 (0,097-0,123)	0,989	0,045 (0,024-0,065)	0,977
Lactosa	0,329 (0,241-0,418)	0,979	0,139 (0,124-0,153)	0,998
Glucosa	0,266 (0,211-0,321)	0,988	0,134 (0,131-0,136)	0,999
Fructosa	1,226 (1,659-4,110)	0,967	0,277 (0,212-0,341)	0,998
Manitol	0,101 (0,083-0,119)	0,991	0,049 (0,036-0,061)	0,993
Sorbitol	0,117 (0,089-0,145)	0,983	0,057 (0,033-0,081)	0,981
Glicerol	0,107 (0,088-0,126)	0,991	0,071 (0,050-0,092)	0,990
Glicina	0,107 (0,092-0,122)	0,986	0,061 (0,055-0,067)	0,998
Alanina	0,117 (0,087-0,146)	0,982	0,064 (0,050-0,077)	0,995
Leucina	0,105 (0,086-0,125)	0,989	0,060 (0,038-0,082)	0,986
Histidina	0,100 (0,086-0,114)	0,997	0,055 (0,047-0,063)	0,998
Polisorbato 20	0,115 (0,082-0,149)	0,975	0,055 (0,032-0,080)	0,980
Polisorbato 80	0,110 (0,086-0,134)	0,986	0,053 (0,033-0,072)	0,986
Dextrana 40	0,114 (0,081-0,146)	0,991	0,049 (0,032-0,066)	0,987
PEG 6000	0,218 (0,171-0,265)	0,986	0,043 (0,027-0,059)	0,986
NaCl	0,098 (0,076-0,120)	0,985	0,044 (0,032-0,056)	0,992
KCl	0,090 (0,071-0,110)	0,986	0,052 (0,036-0,067)	0,990
MgCl ₂	0,201 (0,151-0,250)	0,982	0,090 (0,061-0,119)	0,989
Tampón Tris-HCl	0,098 (0,078-0,117)	0,988	0,040 (0,022-0,058)	0,979
Lactosa	0,159 (0,122-0,196)	0,984	0,065 (0,043-0,087)	0,988
Glucosa	0,198 (0,134-0,262)	0,970	0,070 (0,054-0,086)	0,994
Fructosa	0,275 (0,208-0,343)	0,983	0,100 (0,078-0,123)	0,995
PEG 6000	0,699 (0,520-0,878)	0,993	0,122 (0,088-0,155)	0,992
MgCl ₂	0,098 (0,074-0,122)	0,982	0,055 (0,052-0,058)	0,999

ANEXO 9

Cálculos de las constantes de velocidad de degradación del EGFhr liofilizado en presencia de los excipientes comúnmente utilizados en formulaciones parenterales de proteínas



Cinética de degradación del EGFhr liofilizado en presencia de los excipientes a 50 ± 2 °C por el método de RP-HPLC (**panel a**) y el de ELISA (**panel b**). En líneas discontinuas el proceso de liofilización con tratamiento térmico (Gly Con TT y manitol Con TT).

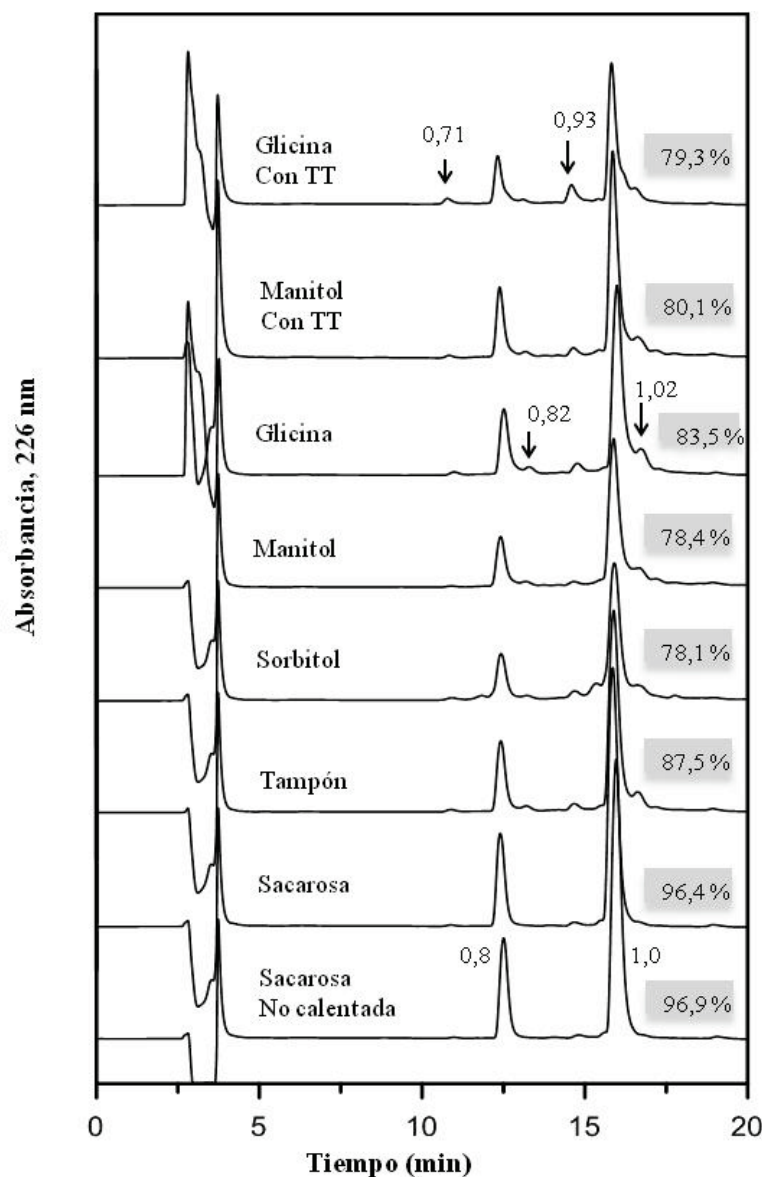
Parámetros de ajuste de la ecuación de la recta para el EGFhr liofilizado en presencia de los excipientes. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

Excipiente	RP-HPLC		ELISA	
	K_{obs} ($\times 10^{-2}$, %/d)	r^2	K_{obs} ($\times 10^{-2}$, %/d)	r^2
Tampón Fosfato Na	2,4 (2,1-2,7)	0,992	1,5 (1,3-1,7)	0,989
Sacarosa	0,24 (0,19-0,30)	0,976	0,16 (0,12-0,2)	0,969
Trehalosa	0,34 (0,30-0,40)	0,990	0,2 (0,17-0,22)	0,993
Rafinosa	0,28 (0,25-0,32)	0,992	0,16 (0,13-0,20)	0,975
Dextrana 40	0,17 (0,14-0,21)	0,983	0,12 (0,1-0,13)	0,990
Sorbitol	4,9 (4,7-5,1)	0,998	1,9 (1,3-2,4)	0,959
Manitol Sin TT*	9,2 (8,0-10,5)	0,986	2,4 (1,8-3,0)	0,967
Manitol Con TT*	4,3 (3,6-5,0)	0,973	2,0 (1,4-2,6)	0,956
Gly Sin TT*	3,0 (2,7-3,3)	0,989	1,3 (0,9-1,8)	0,950
Gly Con TT*	4,8 (4,2-5,5)	0,983	2,4 (1,9-3,0)	0,966

*Sin TT: Sin tratamiento térmico y Con TT: Con tratamiento térmico; se refiere a las metodologías de liofilización utilizadas (Sección 2.4.2).

ANEXO 10

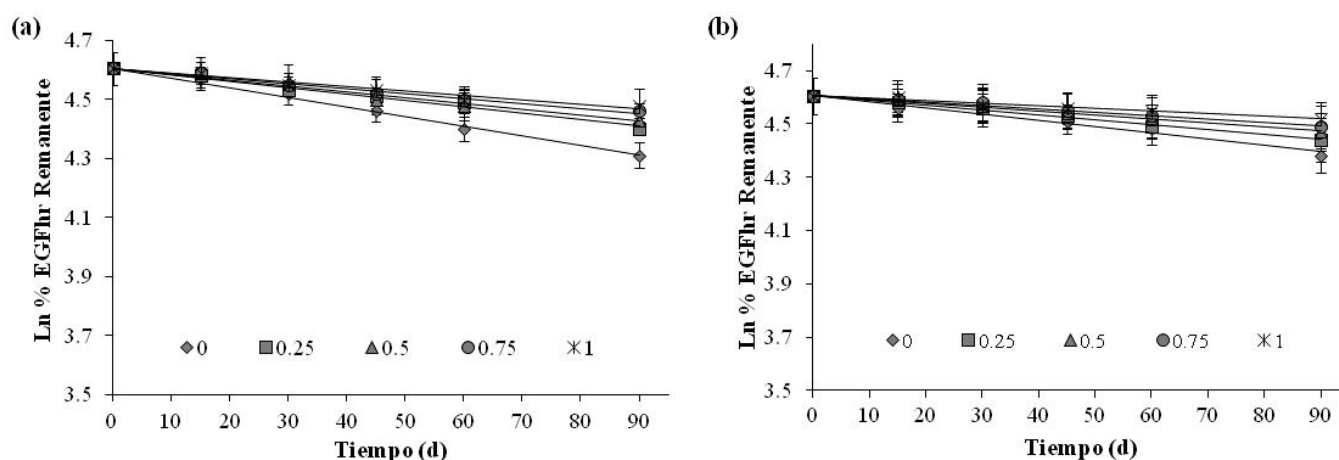
Comparación de los perfiles cromatográficos de RP-HPLC del EGFhr liofilizado en presencia de los excipientes después de siete días de almacenamiento a 50 °C



Perfiles cromatográficos de RP-HPLC correspondientes a las muestras en presencia de excipientes en las formulaciones liofilizadas. Las muestras fueron evaluadas después de siete días de exposición a 50 ± 2 °C. La formulación base empleada para todos los excipientes fue el tampón fosfato de sodio (10 mM, pH 7,0). Las metodologías de liofilización utilizadas fueron “Sin TT” (sin tratamiento térmico) y “Con TT” (con tratamiento térmico). Las especies se separaron en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrilo/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min. Las flechas indican la aparición o el incremento de señal con respecto al control con su correspondiente valor de trr. Trr (0,71): EGFhr₁₋₅₁ oxidado en Met²¹ a sulfóxido; trr (0,8): EGFhr₁₋₅₁; trr (0,93): EGFhr₁₋₅₂ oxidado en Met²¹ a sulfóxido; trr (1,0): EGFhr₁₋₅₂. Encima de cada cromatograma y sombreado se presentan los porcentajes de EGFhr no modificado remanente.

ANEXO 11

Cálculos de las constantes de velocidad de degradación del EGFhr liofilizado en presencia de las combinaciones sacarosa-Dextrana 40



Cinética de degradación del EGFhr liofilizado en combinaciones sacarosa-Dextrana 40 a 50 ± 2 °C por el método de RP-HPLC (*panel a*) y el de ELISA (*panel b*).

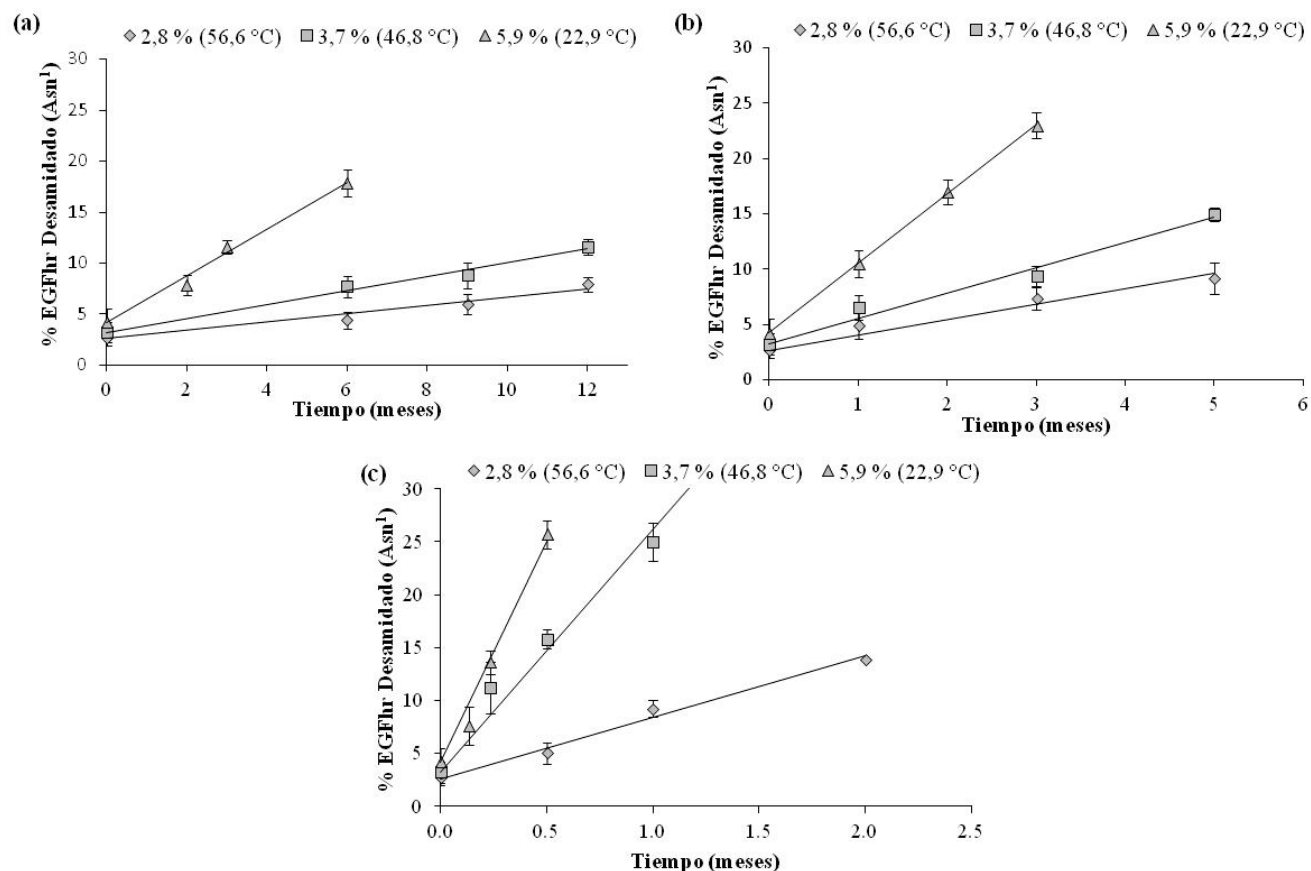
Parámetros de ajuste de la ecuación de la recta para las combinaciones sacarosa-Dextrana 40 liofilizadas. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

Fracción másica de Dextrana 40 ^a (m/m)	RP-HPLC		ELISA	
	K_{obs} ($\times 10^{-2}$, %/d)	r^2	K_{obs} ($\times 10^{-2}$, %/d)	r^2
0	0,29 (0,26-0,32)	0,995	0,24 (0,18-0,31)	0,964
0,25	0,22 (0,18-0,26)	0,982	0,19 (0,17-0,21)	0,993
0,5	0,20 (0,14-0,25)	0,962	0,15 (0,14-0,17)	0,994
0,75	0,17 (0,13-0,20)	0,982	0,13 (0,11-0,15)	0,987
1	0,15 (0,11-0,19)	0,959	0,097 (0,075-0,12)	0,974

^aFracción másica de Dextrana 40 (m/m) = (masa de Dextrana 40)/(masa de Dextrana 40 + masa de sacarosa).

ANEXO 12

Cuantificación de la constante de velocidad de desamidación de la Asn¹ del EGFhr en función de la humedad residual del liofilizado



Cinética de desamidación de la Asn¹ del EGFhr en función de la humedad residual del liofilizado mediante electroforesis en ausencia de SDS a diferentes temperaturas: (a) 25 ± 2 °C, (b) 37 ± 2 °C y (c) 50 ± 2 °C. En cada gráfico, además del porcentaje de humedad residual, se indica entre paréntesis la T_g del producto.

Parámetros de ajuste de la ecuación de la recta para los diferentes valores de humedad residual y temperaturas. Se incluyen los valores de los parámetros de ajuste del EGFhr en solución acuosa según la tabla 3.2. Entre paréntesis el intervalo de confianza del 95 %

Humedad residual (%)	25 ± 2 °C		37 ± 2 °C		50 ± 2 °C	
	K _{obs} [% Desamidado (Asn ¹)/mes]	r ²	K _{obs} [% Desamidado (Asn ¹)/mes]	r ²	K _{obs} [% Desamidado (Asn ¹)/mes]	r ²
2,8	0,431 (0,160-0,702)	0,959	1,26 (0,59-1,92)	0,971	5,75 (3,72-7,78)	0,987
3,7	0,676 (0,434-0,917)	0,986	2,21 (1,28-3,14)	0,981	20,94 (11,26-30,62)	0,977
5,9	2,32 (1,62-3,02)	0,990	6,30 (5,99-6,61)	0,999	44,37 (29,12-59,64)	0,987
solución	26,29 (12,30-40,28)	0,970	62,94 (29,08-96,81)	0,970	150,61 (128,5-172,72)	0,994

ANEXO 13

Evaluación estadística de los resultados del estudio de fotoestabilidad en condiciones de estrés del EGFhr liofilizado en presencia de diferentes materiales de envase

I) Se muestran las salidas del ANOVA para el ensayo de proliferación celular

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	5,7945E9	3	1,9315E9	1,07	0,864
Intra grupos	3,43858E10	19	1,80978E9		
Total (Corr.)	4,01803E10	22			

Pruebas de Múltiple Rangos, Método: 95.0 porcentaje LSD

Condiciones	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Envase primario	5	198519	X
Inicio (t = 0)	5	203424	X
Control oscuridad	8	232406	X
Envase secundario	5	233467	X

II) Se muestran las salidas del ANOVA para la pureza por SEC

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	1,87605	3	0,625349	4,67	0,0169
Intra grupos	2,00736	15	0,133824		
Total (Corr.)	3,88341	18			

Pruebas de Múltiple Rangos, Método: 95.0 porcentaje LSD

Condiciones	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Envase primario	4	97,805	X
Control oscuridad	5	98,568	X
inicio	6	98,568	X
Envase secundario	4	98,595	X

III) Se muestran las salidas del ANOVA para la pureza por RP-HPLC

Tabla ANOVA

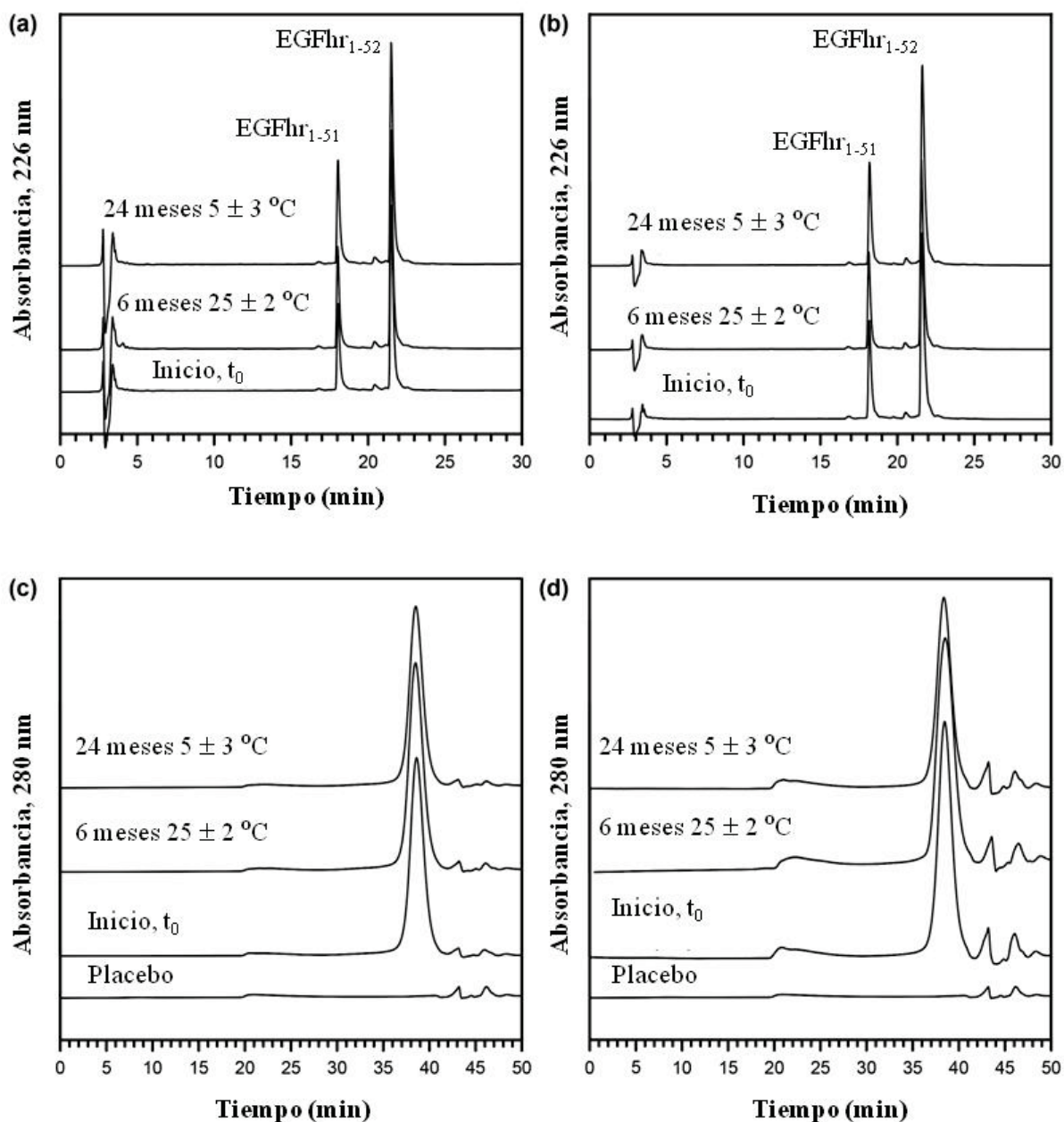
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Entre grupos	20,3534	3	6,78447	191,55	0,0001
Intra grupos	0,283346	8	0,0354183		
Total (Corr.)	20,6368	11			

Pruebas de Múltiple Rangos, Método: 95.0 porcentaje LSD

Condiciones	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Envase primario	3	94,2813	X
Envase secundario	3	97,0567	X
Inicio (t = 0)	3	97,38	X
Control oscuridad	3	97,3833	X

ANEXO 14

Perfiles cromatográficos de la formulación liofilizada de EGFhr durante los estudios de estabilidad acelerada y de vida de estante



Perfiles cromatográficos de la formulación liofilizada de EGFhr después del análisis en RP-HPLC (paneles a y b) y SEC (paneles c y d) al finalizar el estudio de estabilidad acelerada y real en las presentaciones de 25 µg/vial (paneles a y c) y 250 µg/vial (paneles b y d). La separación en RP-HPLC se realizó en una columna Vydac C₈ empleando un gradiente lineal de 20-40 % (v/v) de acetonitrino/0,05 % TFA en agua/0,1 % TFA en 28 min, a un flujo constante de 1,0 mL/min. La separación en SEC se realizó en una columna Superdex 75 empleando como fase móvil el tampón 0,1 M NaPO₄/0,5 M arginina-HCl a pH 6,5 y a un flujo constante de 0,4 mL/min.

ANEXO 15

Evaluaciones estadísticas de los resultados de estabilidad a 25 ± 2 °C en RP-HPLC mediante técnicas de regresión. Presentación de 25 µg/vial

Real Stability Program Results

Name of the Study: RP-HPLC (25 µg/vial)

Kinetics: 1 th order

Normalization: Against Labeled Value

Labeled Value: 1

Minimum permissible Activity in percent: 100

Lots Data

Total Number of Lots in the study: 3

Number of active lots in the study: 3

Data for Active Lots (time in months)

Lot 1		Lot 2		Lot 3	
Time	Purity	Time	Purity	Time	Purity
0.00	95.300	0.00	95.600	0.00	96.000
3.00	95.300	3.00	95.500	3.00	95.712
6.00	95.100	6.00	95.300	6.00	95.497

Regression Summary and ANOVA for equality of slopes and intercepts

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
Lot 1	-0.0063	0.00000	-0.00035	0.000002	0.0000007	1	0.0000007	0.3333333	
Lot 2	-0.0094	0.00001	-0.00052	0.000005	0.0000002	1	0.0000002	0.1212852	
Lot 3	-0.0158	0.00001	-0.00088	0.000014	0.0000001	1	0.0000001	0.0529715	
Pooled Residual Mean Square				0.0000010	3	0.0000003			

Regression with common slope

25 µg/vial -0.0315 0.00002 -0.000583 0.000018 0.0000036 5 0.0000007 0.0039317

Residual Mean Square due to common slope 0.0000026 2 0.0000013

Summary of ANOVA for common slope

F= 3.823 **Probability= 0.14960798<0.25 Significant, slopes are considered unequals**

Parameters used for estimation as results of the above analysis

Intercept= 4.564221604

Slope= -0.000876324

Estimated Results

Time	% RP-HPLC	Lower Limit
0.000	95.9878484	95.8164560
6.000	95.4844744	95.3139809
12.000	94.9837403	94.5758041
18.000	94.4856320	93.8252925
24.000	93.9901359	93.0776276
30.000	93.4972383	92.3348632
36.000	93.0069254	91.5975445
48.000	92.0340001	90.1398565
60.000	91.0712524	88.7049504

Time to reach the minimum permissible purity = 5208.3751538595 months

Lower Limit of the time to reach the minimum permissible purity= 3412.8581995936 months

ANEXO 16

Evaluaciones estadísticas de los resultados de estabilidad a 25 ± 2 °C en RP-HPLC mediante técnicas de regresión. Presentación de 250 µg/vial

Real Stability Program Results

Name of the Study: RP-HPLC (250 µg/vial)
 Kinetics: 1 th order
 Normalization: Against Labeled Value
 Labeled Value: 1
 Minimum permissible Activity in percent: 100

Lots Data

Total Number of Lots in the study: 3
 Number of active lots in the study: 3

Data for Active Lots (time in months)

Lot 4		Lot 5		Lot 6	
Time	Purity	Time	Purity	Time	Purity
0.00	95.500	0.00	96.000	0.00	95.800
3.00	95.300	3.00	95.700	3.00	95.500
6.00	95.200	6.00	95.500	6.00	95.400

Regression Summary and ANOVA for equality of slopes and intercepts

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
Lot 4	-0.0094	0.00001	-0.00052	0.000005	0.0000002	1	0.0000002	0.1207898	
Lot 5	-0.0157	0.00001	-0.00087	0.000014	0.0000002	1	0.0000002	0.0727316	
Lot 6	-0.0126	0.00001	-0.00070	0.000009	0.0000007	1	0.0000007	0.1786460	
Pooled Residual Mean Square				0.0000011	3	0.0000004			

Regression with common slope

250 µg/vial -0.0377 0.00003 -0.000697 0.000026 0.0000022 5 0.0000004 **0.0005598**
 Residual Mean Square due to common slope 0.0000011 2 0.0000005

Summary of ANOVA for common slope

F= 1.483 **Probability= 0.35653456>0.25 Not significant, slopes are considered equals**

Regression with common slope and common intercept

250 µg/vial -0.0377 0.00005 -0.000697 0.000026 0.0000287 7 0.0000041 0.0391654
 Residual Mean Square due to common slope and intercept 0.0000265 2 0.0000133

Summary of ANOVA for common intercept

F= 36.528 **Probability= 0.00783389<0.25 Significant so intercepts are considered unequals**

Parameters used for estimation as results of the above analysis

Intercept= 4.558951819
 Slope= -0.000697353

Estimated Results

Time	% RP-HPLC	Lower Limit
0.000	95.4833436	95.3938342
6.000	95.0846646	94.9955289
12.000	94.6876502	94.5177540
18.000	94.2922935	94.0273635
24.000	93.8985876	93.5361872
30.000	93.5065255	93.0463812
36.000	93.1161005	92.5585838
48.000	92.3401341	91.5898651
60.000	91.5706341	90.6307915

Time to reach the minimum permissible purity= 6537.5082963334 months

Lower Limit of the time to reach the minimum permissible purity= 5193.9490677535 months

ANEXO 17

Evaluaciones estadísticas de los resultados de estabilidad a 25 ± 2 °C por actividad específica mediante técnicas de regresión

I) Presentación de 25 µg/vial

Real Stability Program Results

Name of the Study: Specific Activity (25 µg/vial)
 Kinetics: 1th order
 Normalization: Against Labeled Value
 Labeled Value: 1
 Minimum permissible Activity in percent: 100

Lots Data

Total Number of Lots in the study: 3
 Number of active lots in the study: 3

Data for Active Lots (time in months)

Lot 1		Lot 2		Lot 3	
Time	Activity	Time	Activity	Time	Activity
0.00	3005200.000	0.00	2051000.000	0.00	2065160.000
3.00	2731056.586	3.00	2414503.318	3.00	1666327.000
6.00	2704691.001	6.00	2249065.287	6.00	1827538.663

Regression Summary and ANOVA for equality of slopes and intercepts

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
Lot 1	-0.3161	0.00678	-0.01756	0.005550	0.0012314	1	0.0012314	0.2802422	
Lot 2	0.2766	0.01339	0.01536	0.004249	0.0091373	1	0.0091373	0.6189816	
Lot 3	-0.3667	0.02317	-0.02037	0.007471	0.0157014	1	0.0157014	0.6155807	
Pooled Residual Mean Square					0.0260701	3	0.0086900		

Regression with common slope

25 µg/vial -0.4062 0.04334 -0.007523 0.003056 0.0402845 5 0.0080569 0.5649393
 Residual Mean Square due to common slope 0.0142144 2 0.0071072

Summary of ANOVA for common slope

F= 0.818 **Probability= 0.52060332>0.25** Not significant, slopes are considered equals

Regression with common slope and common intercept

25 µg/vial -0.4062 0.30923 -0.007523 0.003056 0.3061730 7 0.0437390 0.7991463
 Residual Mean Square due to common slope and intercept 0.2658885 2 0.1329442

Summary of ANOVA for common intercept

F= 15.298 **Probability= 0.02668287<0.25** Significant so intercepts are considered unequals

Parameters used for estimation as results of the above analysis

Intercept= 14.489562569
 Slope= -0.007522603

Estimated Results

Time	Activity	Lower Limit
0.000	1962171.9757735	1726604.3914341
6.000	1875577.0834558	1650405.6060078
12.000	1792803.8109900	1403374.7827424
18.000	1713683.5020282	1167610.3419204
24.000	1638054.9433917	966749.0357610
30.000	1565764.0365880	799040.1545110
36.000	1496663.4838243	659883.9615055
48.000	1367476.4652126	449530.9222323
60.000	1249440.4407676	306005.3753944

Time to reach the minimum permissible activity= 1926.1366983091 months
 Lower Limit of the time to reach the minimum permissible activity= undefined

II) Presentación de 250 µg/vial

Real Stability Program Results

Name of the Study: Specific Activity (250 µg/vial)
 Kinetics: 1 th order
 Normalization: Against Labeled Value
 Labeled Value: 1
 Minimum permissible Activity in percent: 100

Lots Data

Total Number of Lots in the study: 3
 Number of active lots in the study: 3

Data for Active Lots (time in months)

Lot 4		Lot 5		Lot 6	
Time	Activity	Time	Activity	Time	Activity
0.00	2808862.400	0.00	2731288.000	0.00	2604359.200
3.00	3212547.172	3.00	2301845.862	3.00	2292029.456
6.00	3095615.854	6.00	2284856.485	6.00	2415693.646

Regression Summary and ANOVA for equality of slopes and intercepts

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
Lot 4	0.2916	0.00962	0.01620	0.004725	0.0048941	1	0.0048941	0.5056100	
Lot 5	-0.5354	0.02039	-0.02975	0.015926	0.0044638	1	0.0044638	0.3099736	
Lot 6	-0.2256	0.00825	-0.01253	0.002828	0.0054179	1	0.0054179	0.6017216	
Pooled Residual Mean Square					0.0147758	3	0.0049253		

Regression with common slope

250 µg/vial -0.4694 0.03825 -0.008692 0.004080 0.0341736 5 0.0068347 0.4746569
 Residual Mean Square due to common slope 0.0193978 2 0.0096989

Summary of ANOVA for common slope

F= 1.969 **Probability= 0.28430825>0.25 Not significant, slopes are considered equals**

Regression with common slope and common intercept

250 µg/vial -0.4694 0.13598 -0.008692 0.004080 0.1318967 7 0.0188424 0.6558199
 Residual Mean Square due to common slope and intercept 0.0977231 2 0.0488616

Summary of ANOVA for common intercept

F= 9.921 **Probability= 0.04759965<0.25 Significant so intercepts are considered unequals**

Parameters used for estimation as results of the above analysis

Intercept= 14.742647577
 Slope= -0.008692386

Estimated Results

Time	Activity	Lower Limit
0.000	2527263.3030456	2246426.8429970
6.000	2398833.7942082	2132268.7749645
12.000	2276930.7674831	1817143.8518389
18.000	2161222.5625754	1517836.0337500
24.000	2051394.3733776	1262171.7371120
30.000	1947147.3914794	1047879.0903720
36.000	1848197.9932033	869312.8744125
48.000	1665128.7857715	597640.4698395
60.000	1500193.0980345	410588.5542137

Time to reach the minimum permissible activity= 1696.0414335775 months
 Lower Limit of the time to reach the minimum permissible activity= undefined

ANEXO 18

Evaluaciones estadísticas de los resultados de estabilidad a 5 ± 3 °C en RP-HPLC mediante técnicas de regresión

I) Presentación de 25 µg/vial

Real Stability Program Results

Name of the Study: RP-HPLC (25 µg/vial)
Kinetics: 1 th order
Normalization: Against Labeled Value
Labeled Value: 1
Minimum permissible Activity in percent: 100

Lots Data

Total Number of Lots in the study: 3
Number of active lots in the study: 3

Data for Active Lots (time in months)

Lot 1		Lot 2		Lot 3	
Time	Purity	Time	Purity	Time	Purity
0.00	95.300	0.00	95.600	0.00	96.000
3.00	95.500	3.00	95.200	3.00	95.200
6.00	95.000	6.00	95.600	6.00	95.500
9.00	95.100	9.00	95.700	9.00	95.040
12.00	95.000	12.00	95.200	12.00	95.500
18.00	95.200	18.00	95.200	18.00	95.700
24.00	95.000	24.00	95.100	24.00	95.500

Regression Summary and ANOVA for equality of slopes and intercepts

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
Lot 1	-0.0558	0.00002	-0.00013	0.000007	0.0000167	5	0.0000033	0.2005280	
Lot 2	-0.0822	0.00004	-0.00019	0.000016	0.0000254	5	0.0000051	0.1383828	
Lot 3	-0.0084	0.00006	-0.00002	0.000000	0.0000046	5	0.0000129	0.9141964	
Pooled Residual Mean Square				0.0001067	15	0.0000071			

Regression with common slope

25 µg/vial -0.1465 0.00013 -0.000114 0.000017 0.0001132 17 0.0000067 0.1321662
Residual Mean Square due to common slope 0.0000065 2 0.0000033

Summary of ANOVA for common slope

F= 0.458 **Probability= 0.64125386>0.25 Not significant, slopes are considered equals**

Regression with common slope and common intercept

25 µg/vial -0.1465 0.00017 -0.000114 0.000017 0.0001573 19 0.0000083 0.1722836
Residual Mean Square due to common slope and intercept 0.0000441 2 0.0000221

Summary of ANOVA for common intercept

F= 3.101 **Probability= 0.07459806<0.25 Significant so intercepts are considered unequals**

Parameters used for estimation as results of the above analysis

Intercept= 4.556864583
Slope= -0.000113710

Estimated Results

Time	% RP-HPLC	Lower Limit
0.000	95.2842551	95.0815858
6.000	95.2192687	95.0499890
12.000	95.1543267	94.9917318
18.000	95.0894289	94.9040092
24.000	95.0245754	94.7955902
30.000	94.9597661	94.6759719
36.000	94.8950010	94.5505695
48.000	94.7656034	94.2917510
60.000	94.6363822	94.0284024

Time to reach the minimum permissible purity= 40074.4886084040 months
Lower Limit of the time to reach the minimum permissible purity= undefined

II) Presentación de 250 µg/vial

Real Stability Program Results

Name of the Study: RP-HPLC (250 µg/vial)
 Kinetics: 1 th order
 Normalization: Against Labeled Value
 Labeled Value: 1
 Minimum permissible Activity in percent: 100

Lots Data

Total Number of Lots in the study: 3
 Number of active lots in the study: 3

Data for Active Lots (time in months)

Lot 4		Lot 5		Lot 6	
Time	Purity	Time	Purity	Time	Purity
0.00	95.500	0.00	96.000	0.00	95.800
3.00	95.600	3.00	95.900	3.00	95.900
6.00	96.700	6.00	96.200	6.00	96.800
9.00	96.600	9.00	96.000	9.00	96.400
12.00	96.400	12.00	95.000	12.00	96.200
18.00	95.900	18.00	96.200	18.00	96.400
24.00	95.900	24.00	95.000	24.00	96.100

Regression Summary and ANOVA for equality of slopes and intercepts

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
Lot 4	0.0298	0.00015	0.00007	0.000002	0.0001483	5	0.0000297	0.8023850	
Lot 5	-0.1468	0.00018	-0.00034	0.000050	0.0001335	5	0.0000267	0.2285918	
Lot 6	0.0381	0.00007	0.00009	0.000003	0.0000715	5	0.0000143	0.6478132	
Pooled Residual Mean Square					0.0003532	15	0.0000235		

Regression with common slope

250 µg/vial -0.0790 0.00041 -0.000061 0.000005 0.0004040 17 0.0000238 0.6573733
 Residual Mean Square due to common slope 0.0000508 2 0.0000254

Summary of ANOVA for common slope

F= 1.079 **Probability= 0.36506530>0.25 Not significant, slopes are considered equals**

Regression with common slope and common intercept

250 µg/vial 0.0790 0.00050 -0.000061 0.000005 0.0004931 19 0.0000260 0.6705895
 Residual Mean Square due to common slope and intercept 0.0000891 2 0.0000445

Summary of ANOVA for common intercept

F= 1.891 **Probability= 0.18520794<0.25 Significant so intercepts are considered unequals**

Parameters used for estimation as results of the above analysis

Intercept= 4.564516627
 Slope= -0.000061318

Estimated Results

Time	% RP-HPLC	Lower Limit
0.000	96.0161711	95.6307112
6.000	95.9808526	95.6587455
12.000	95.9455470	95.6360533
18.000	95.9102544	95.5572413
24.000	95.8749748	95.4389711
30.000	95.8397082	95.2993138
36.000	95.8044545	95.1485770
48.000	95.7339861	94.8316452
60.000	95.6635695	94.5058218

Time to reach the minimum permissible purity= 74440.1854212242 months
 Lower Limit of the time to reach the minimum permissible purity= undefined

Evaluaciones estadísticas de los resultados de estabilidad a 5 ± 3 °C en RP-HPLC para la regresión común

Comparación de purezas en RP-HPLC para lotes de 25 y 250 µg/vial

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
25 µg/vial	1288.286	-0.1465	0.00013	-0.000114	0.000017	0.0001132	17	0.0000067	0.1321662
250 µg/vial	1288.286	-0.079	0.00041	-0.000061	0.000005	0.000404	17	0.0000238	0.6573733
Pool						0.0005172	34	1.52118E-05	
Pendiente común									
2576.572	-0.2255	0.00054	-8.75194E-05	1.97356E-05	0.000520264	35	1.48647E-05	0.25702737	
Incremento por pendiente común						3.06438E-06	1	3.06438E-06	
F =	0.201448	P=	0.656402391	>	0.25	por lo que no hay diferencia entre las pendientes			

ANEXO 19

Evaluaciones estadísticas de los resultados de estabilidad a 5 ± 3 °C por actividad específica mediante técnicas de regresión

I) Presentación de 25 µg/vial

Real Stability Program Results

Name of the Study: Specific Activity (25 µg/vial)

Kinetics: 1 th order

Normalization: Against Labeled Value

Labeled Value: 1

Minimum permissible Activity in percent: 100

Lots Data

Total Number of Lots in the study: 3

Number of active lots in the study: 3

Data for Active Lots (time in months)

Lot 1		Lot 2		Lot 3	
Time	Activity	Time	Activity	Time	Activity
0.00	3005200.000	0.00	2051000.000	0.00	2065160.000
3.00	2731056.586	3.00	2414503.318	3.00	1666327.000
6.00	2704691.001	6.00	2249065.287	6.00	1827538.663

Regression Summary and ANOVA for equality of slopes and intercepts

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
Lot 1	-0.3161	0.00678	-0.01756	0.005550	0.0012314	1	0.0012314	0.2802422	
Lot 2	0.2766	0.01339	0.01536	0.004249	0.0091373	1	0.0091373	0.6189816	
Lot 3	-0.3667	0.02317	-0.02037	0.007471	0.0157014	1	0.0157014	0.6155807	
Pooled Residual Mean Square					0.0260701	3	0.0086900		

Regression with common slope

25 µg/vial -0.4062 0.04334 -0.007523 0.003056 0.0402845 5 0.0080569 0.5649393
Residual Mean Square due to common slope 0.0142144 2 0.0071072

Summary of ANOVA for common slope

F= 0.818 **Probability= 0.52060332>0.25** Not significant, slopes are considered equals

Regression with common slope and common intercept

25 µg/vial -0.4062 0.30923 -0.007523 0.003056 0.3061730 7 0.0437390 0.7991463
Residual Mean Square due to common slope and intercept 0.2658885 2 0.1329442

Summary of ANOVA for common intercept

F= 15.298 **Probability= 0.02668287<0.25** Significant so intercepts are considered unequals

Parameters used for estimation as results of the above analysis

Intercept= 14.489562569
Slope= -0.007522603

Estimated Results

Time	Activity	Lower Limit
0.000	1962171.9757735	1726604.3914341
6.000	1875577.0834558	1650405.6060078
12.000	1792803.8109900	1403374.7827424
18.000	1713683.5020282	1167610.3419204
24.000	1638054.9433917	966749.0357610
30.000	1565764.0365880	799040.1545110
36.000	1496663.4838243	659883.9615055
48.000	1367476.4652126	449530.9222323
60.000	1249440.4407676	306005.3753944

Time to reach the minimum permissible activity= 1926.1366983091 months

Lower Limit of the time to reach the minimum permissible activity= undefined

II) Presentación de 250 µg/vial

Real Stability Program Results

Name of the Study: Specific Activity (250 µg/vial)
 Kinetics: 1 th order
 Normalization: Against Labeled Value
 Labeled Value: 1
 Minimum permissible Activity in percent: 100

Lots Data

Total Number of Lots in the study: 3
 Number of active lots in the study: 3

Data for Active Lots (time in months)

Lot 4		Lot 5		Lot 6	
Time	Activity	Time	Activity	Time	Activity
0.00	2808862.400	0.00	2731288.000	0.00	2604359.200
3.00	3212547.172	3.00	2301845.862	3.00	2292029.456
6.00	3095615.854	6.00	2284856.485	6.00	2415693.646

Regression Summary and ANOVA for equality of slopes and intercepts

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
Lot 4	0.2916	0.00962	0.01620	0.004725	0.0048941	1	0.0048941	0.5056100	
Lot 5	-0.5354	0.02039	-0.02975	0.015926	0.0044638	1	0.0044638	0.3099736	
Lot 6	-0.2256	0.00825	-0.01253	0.002828	0.0054179	1	0.0054179	0.6017216	
Pooled Residual Mean Square					0.0147758	3	0.0049253		

Regression with common slope

250 µg/vial -0.4694 0.03825 -0.008692 0.004080 0.0341736 5 0.0068347 0.4746569
 Residual Mean Square due to common slope 0.0193978 2 0.0096989

Summary of ANOVA for common slope

F= 1.969 **Probability= 0.28430825>0.25 Not significant, slopes are considered equals**

Regression with common slope and common intercept

250 µg/vial -0.4694 0.13598 -0.008692 0.004080 0.1318967 7 0.0188424 0.6558199
 Residual Mean Square due to common slope and intercept 0.0977231 2 0.0488616

Summary of ANOVA for common intercept

F= 9.921 **Probability= 0.04759965<0.25 Significant so intercepts are considered unequals**

Parameters used for estimation as results of the above analysis

Intercept= 14.742647577
 Slope= -0.008692386

Estimated Results

Time	Activity	Lower Limit
0.000	2527263.3030456	2246426.8429970
6.000	2398833.7942082	2132268.7749645
12.000	2276930.7674831	1817143.8518389
18.000	2161222.5625754	1517836.0337500
24.000	2051394.3733776	1262171.7371120
30.000	1947147.3914794	1047879.0903720
36.000	1848197.9932033	869312.8744125
48.000	1665128.7857715	597640.4698395
60.000	1500193.0980345	410588.5542137

Time to reach the minimum permissible activity= 1696.0414335775 months
 Lower Limit of the time to reach the minimum permissible activity= undefined

Evaluaciones estadísticas de los resultados de estabilidad a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ por actividad específica para la regresión común

Comparación de Actividad Específica para lotes de 25 y 250 µg/vial

Lot Name	Sxx	Sxy	Syy	Slope	SSReg	SSRes	dfRes	MSRes	Probability
25 µg/vial	1288.286	7.213	0.77891	0.005599	0.040385	0.7385231	19	0.0388696	0.3208642
250 µg/vial	1288.286	-1.7364	0.37684	-0.001348	0.00234	0.3744959	19	0.0197103	0.7341924
Pool									
						1.113019	38	0.029289974	
Pendiente común									
2576.572	5.4766	1.15575	0.002125537	0.011640718	1.144109282	39	0.029336135	0.53241755	
Incremento por pendiente com'un									
					0.031090282	1	0.031090282		
F =	1.061465	P = 0.309394543 > 0.25 por lo que no hay diferencia entre las pendientes							
Regresión con intercepto y pendiente común									
2576.572	5.4766	1.305703	0.002125537	0.011640718	1.29406275	40	0.032351569	0.55198979	
Incremento por intercepto común									
					0.149953468	1	0.149953468		
F =	1.104527	P = 0.299912601 > 0.25, por lo que no hay diferencia entre los interceptos							