

INFORME DE INVESTIGACIÓN 2017

1. MATERIALES Y MÉTODOS

HPLC-ET (HPLC de exclusión de tamaño).

En esta cromatografía, los compuestos se separan con base en el tamaño de la molécula, es decir, el volumen hidrodinámico (radio de giro), en donde las moléculas con el radio más grande eluyen primero que las moléculas con radio más pequeño.

Condiciones:

- Columna: TSKGel SuperSW3000 4.6x300mm, 4µm (Tosoh, 18675)
- Temperatura de columna: 25°C
- Fase móvil: Buffer fosfato 0.2M, pH: 6.8.
- Tasa de flujo: 0.35 mL/min.
- Temperatura del automuestreador: 4°C.
- Detección: UV a 280 nm, 16 nm de ancho de banda, sin referencia.
- Preparación de la muestra: dilución a 10 mg/mL con la formulación buffer.

Preparación de los reactivos:

Preparación de la fase móvil: disolver 12,2 g/L de fosfato de sodio monobásico dihidrato y 32,7 g/L de fosfato de sodio dibásico heptahidrato en 950 mL/L de agua purificada. Mezclar bien utilizando una barra de agitación. Ajustar el pH a un punto de 6.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio o ácido fosfórico. Ajustar a un volumen de 1L con agua purificada. Filtrar a través de un filtro de 0.22 µm. Almacenar: a temperatura ambiente.

HPLC-IH (HPLC de interacción hidrofóbica).

Este tipo de cromatografía es un método de separación de proteínas por medio de regiones (hidrofóbicas) de grado no polar. Las proteínas se cargan en la columna bajo condiciones de alta salinidad y se utiliza un “gradiente de sal reverso” para eluir la muestra. Las especies más hidrofílicas eluyen primero seguidas de las especies de hidrofobicidad más alta. El tiempo de elución de las proteínas es directamente proporcional a su grado de hidrofobicidad.

Parámetros cromatográficos

Columna: TSKGel Butyl-NPR, Tosoh Bioscience
Filtro en-línea: 0,5µm
Columna de equilibrio: Fase móvil A 10% y Fase móvil B 90%
Flujo: 0,8 mL/minuto
Preparación de la muestra: diluir a 4 mg/mL utilizando la formulación buffer
Temperatura de la muestra: 4°C ± 2
Temperatura de la columna: 40°C ± 2
Detección: 280 nm y 360 nm

Tabla 1 Tabla de gradiente 1

Tiempo (minutos)	Flujo (mL/minuto)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0.0	0.8	10	90
1.0	0.8	10	90
10.0	0.8	100	0
13.0	0.8	100	0
14.0	0.8	10	90
20.0	0.8	10	90

Preparación de los reactivos

Ácido fosfórico 5M (H₃PO₄)

Añadir 66mL de agua purificada a 100mL en una probeta aforada o un matraz volumétrico.

Añadir 34mL de ácido fosfórico cuidadosamente.

Mezclar bien

Almacenar la solución a temperatura ambiente por un máximo de 6 meses.

Fase móvil A, Fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0±0.2), 1000mL

Añadir 7,10 g de fosfato dibásico de sodio a un beaker de 1000mL

Añadir aproximadamente 800mL de agua Milli-Q

Mezclar bien y ajustar el pH a 6.0±0.2 con ácido fosfórico 5M

Transferir la solución a un matraz volumétrico y llenar a volumen con agua Milli-Q

Filtrar la solución a través de un filtro de 0.2 µm

Almacenar el buffer fase móvil a temperatura ambiente por un máximo de 1 mes.

Fase móvil B, Fosfato de sodio 50 Mm, Citrato de sodio 850 mM (pH 6.0±0.2)
1000mL

Añadir 7,10 g de fosfato dibásico de sodio a un beaker de 1000mL

Añadir 250.0 g de citrato de sodio tribásico

Añadir aproximadamente 800mL de agua Milli-Q

Mezclar bien y ajustar el pH a 6.0±0.2 con ácido fosfórico 5M

Transferir la solución a un matraz volumétrico y llenar a volumen con agua Milli-Q

Filtrar la solución a través de un filtro de 0.2 µm

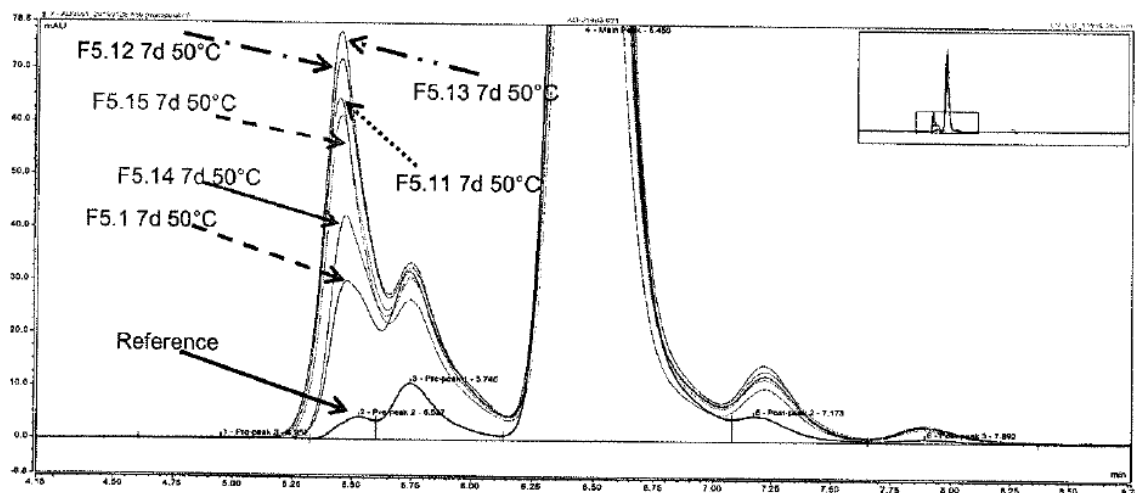
Almacenar el buffer fase móvil a temperatura ambiente por un máximo de 1 mes.

2. RESULTADOS

La estabilidad de la formulación F5.1 después de 7 días a 50°C (lo cual cae en el alcance de la reivindicación 1), de acuerdo a la medición mediante cromatografía HPLC por exclusión de tamaño y cromatografía HPLC de interacción hidrofóbica es mayor que la estabilidad de las formulaciones F5.11 a F5.15. Como se muestra a continuación, el % del pico principal (%MP) es mayor en la formulación F5.1 comparado con las formulaciones F5.11 a F5.15, ambas cuando se utilizan las cromatografías mencionadas.

Muestra	HPLC-ET			HPLC-IH		
	%Prepico	%MP	%Postpico	%Prepico	%MP	%Postpico
F5.1 7d 50°C	13.9	<u>81.0</u>	5.1	3.8	<u>72.1</u>	24.1
F5.11 7d 50°C	26.6	68.1	5.3	3.8	66.0	30.2
F5.12 7d 50°C	24.3	70.4	5.3	3.7	66.3	30.0
F5.13 7d 50°C	25.2	69.6	5.2	3.5	65.9	30.6
F5.14 7d 50°C	17.2	77.2	5.6	3.7	71.0	25.3
F5.15 7d 50°C	22.4	72.3	5.3	3.6	67.6	28.8

Cromatografía HPLC por exclusión de tamaño (HPLC-ET):



Cromatografía HPLC por interacción hidrofóbica (HPLC-IH):

