

EFFECTO DE LOS PARÁMETROS DE CORRIDA CROMATOGRÁFICOS EN LA SEPARACIÓN DE LAS ESPECIES CONJUGADAS DE LA VACUNA CIMA_{vax}-EGF[®]

Yisel Quintana Tamayo¹, Dianelis de la Caridad Reina Peramo², Danais Vidal Rosell¹, Gustavo Gonzalez Ruiz¹, Vladimir Peña Sánchez¹

¹Centro de Inmunología Molecular, ²Instituto Finlay de Vacunas

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto de varios parámetros que influyen en la cromatografía líquida de alta resolución por fase reversa (HPLC-FR) para lograr una correcta separación de las especies moleculares. Se empleó el método para la determinación de pureza de la materia prima de rhEGF mediante HPLC-FR y se modificaron los factores gradiente, columna cromatográfica, concentración del apareador/supresor de iones en las fases móviles, así como el aumento de la temperatura del horno. Antes de probar un aumento en la temperatura del horno se evaluó la termoestabilidad de las muestras empleadas sometiendo a diferentes temperaturas. Para evaluar el efecto provocado por este estrés se determinó la pureza de las muestras tratadas. Las muestras sometidas a altas temperaturas no se afectaron estructuralmente. El método cromatográfico escogido permitió la separación de los picos de rhEGF libre que no se conjugaron durante el proceso productivo. La modificación de los parámetros de corrida evaluados no mostró cambios significativos en el perfil obtenido, ya que ninguno influyó en la resolución del pico correspondiente a las especies conjugadas. En base a las características estructurales de las proteínas que conforman el antígeno de la vacuna CIMA_{vax}-EGF[®] han de diseñarse métodos que permitan la separación de sus especies moleculares.

Materiales y Métodos

Se empleó el método para la determinación de pureza de la materia prima de rhEGF mediante HPLC-FR



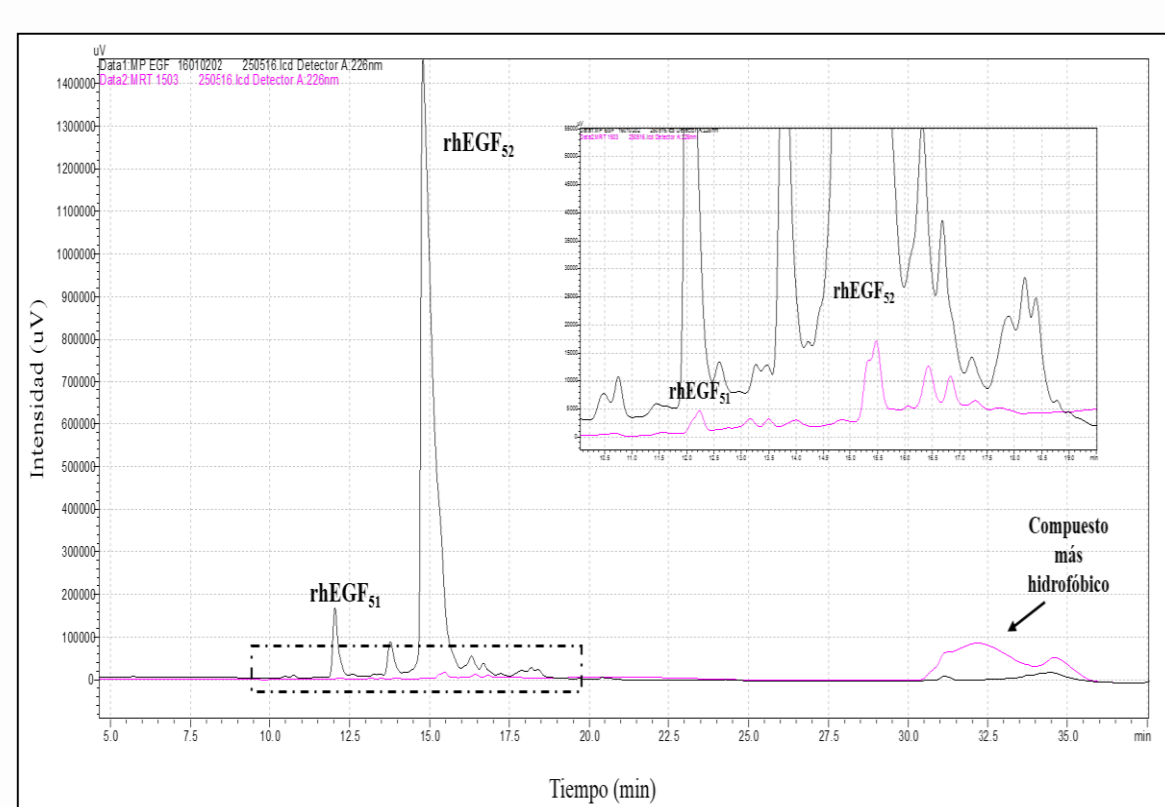
Modificación de factores críticos

- Modificación del gradiente de elución
- Cambio de columna cromatográfica
- Modificación de la concentración del apareador/supresor de iones en las fases móviles.
- Incremento de la temperatura del horno

1. Evaluación de la termoestabilidad de las muestras: Las muestras fueron incubadas a diferentes temperaturas (25, 35, 45, 60 y 70 ° C) por 40 minutos.
2. Evaluación del efecto causado por el estrés mediante GF-HPLC.

Resultados

Gradiente original

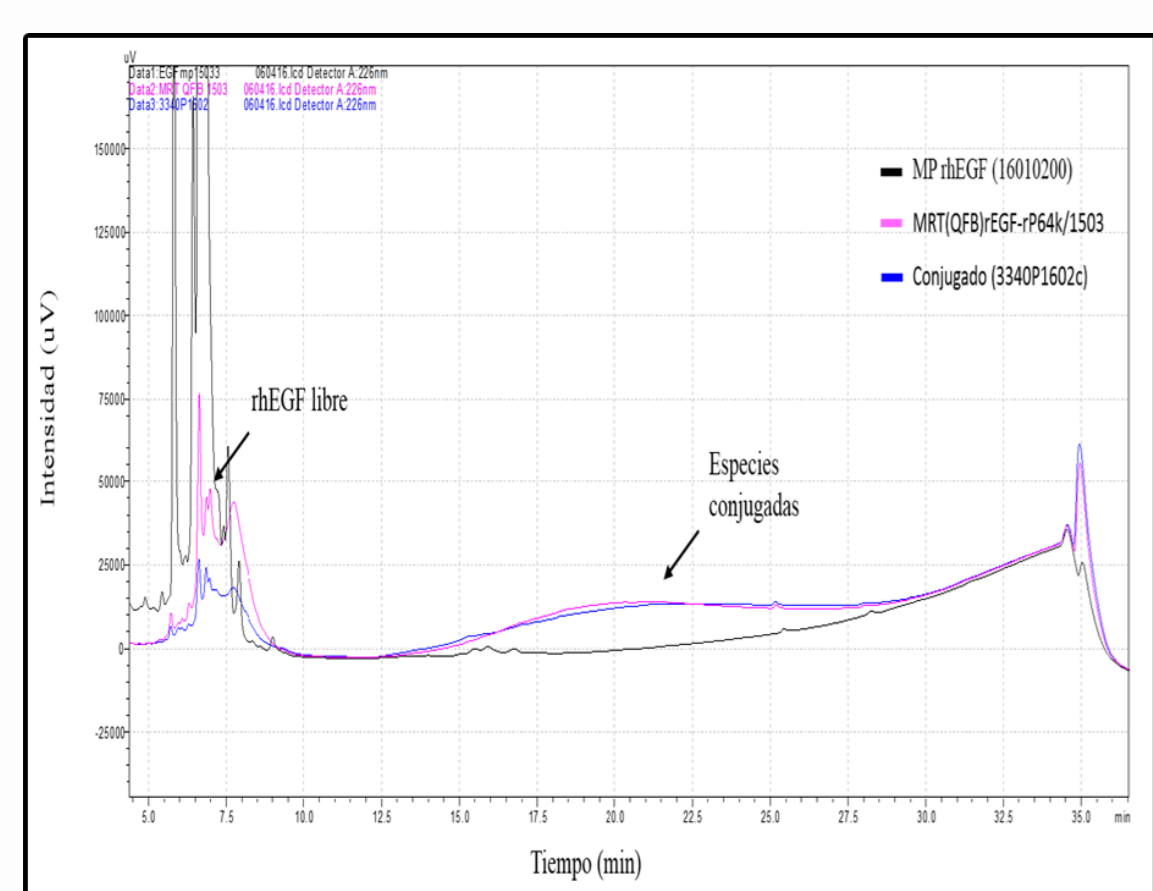


Tiempo (min)	% fase móvil B
0,01	20
28,00	40
32,00	80
35,00	20
40,00	20
40,00	Stop

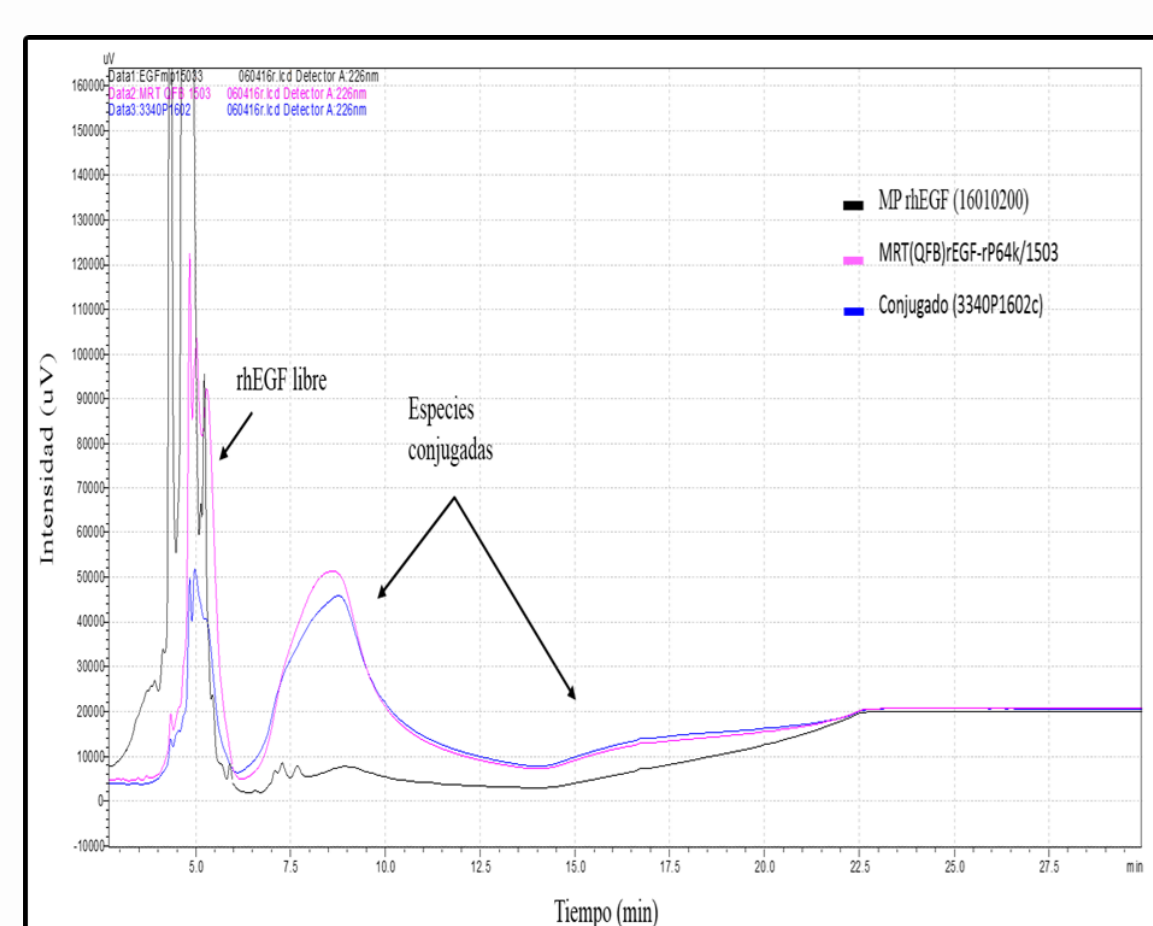
- Perfiles cromatográficos correspondientes a la materia prima rhEGF (negro) y al material de referencia de trabajo del conjugado rhEGF-rp64k (rosa).

- Superposición de picos de rhEGF y aparición de especies más hidrófobas que deben corresponder a los conjugados.

Modificación del gradiente de elución



Tiempo (min)	% fase móvil B
0,01	0
7,00	40
10,00	40
28,00	80
32,00	90
35,00	20
40,00	20
40,00	Stop



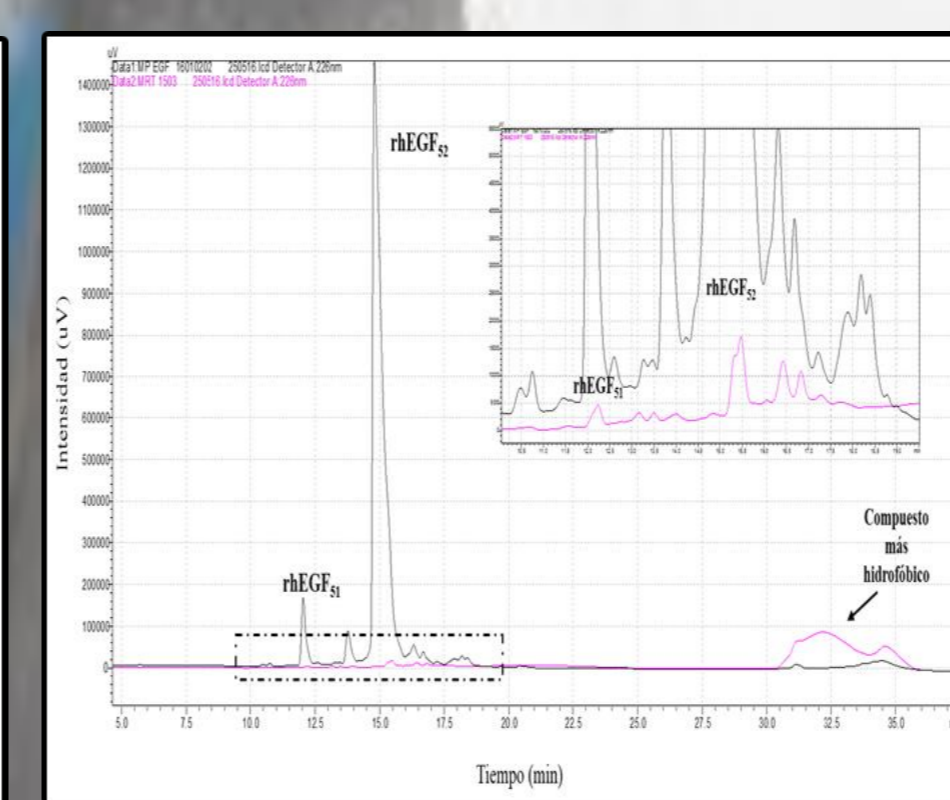
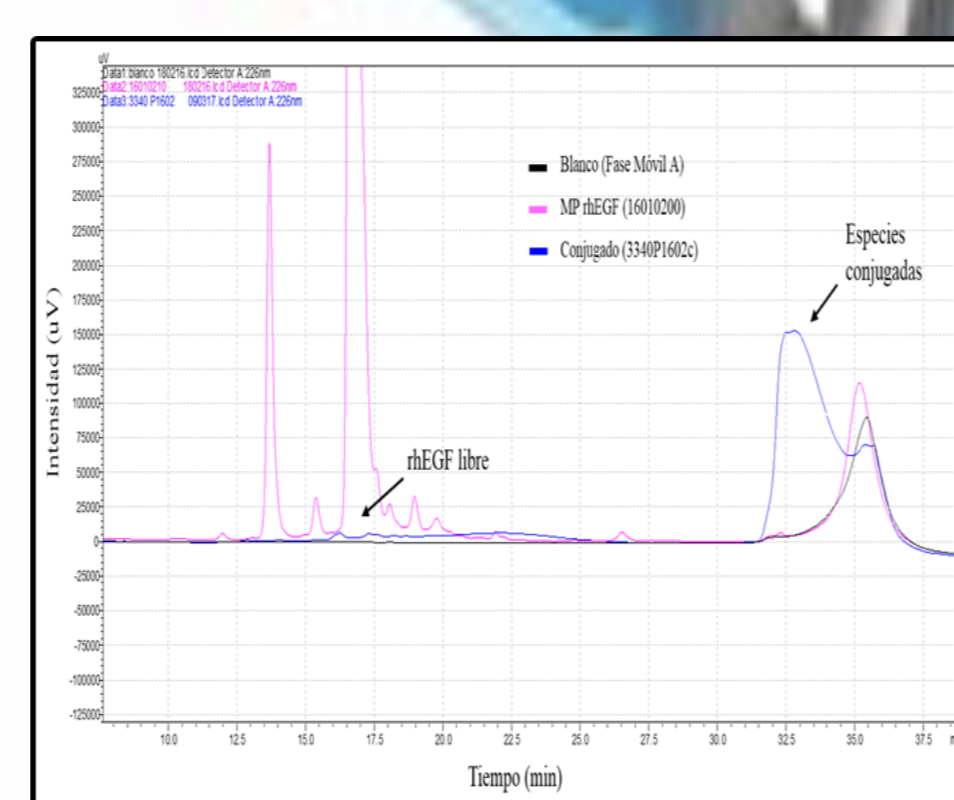
Tiempo (min)	% fase móvil B
0,01	0
7,00	60
12,00	60
20,00	80
28,00	80
32,00	100
35,00	100
40,00	20
40,00	Stop

- Existencia de más especies hidrófobas que otras que necesitan un mayor porcentaje de disolvente B para eluir..

Cambio de columna cromatográfica

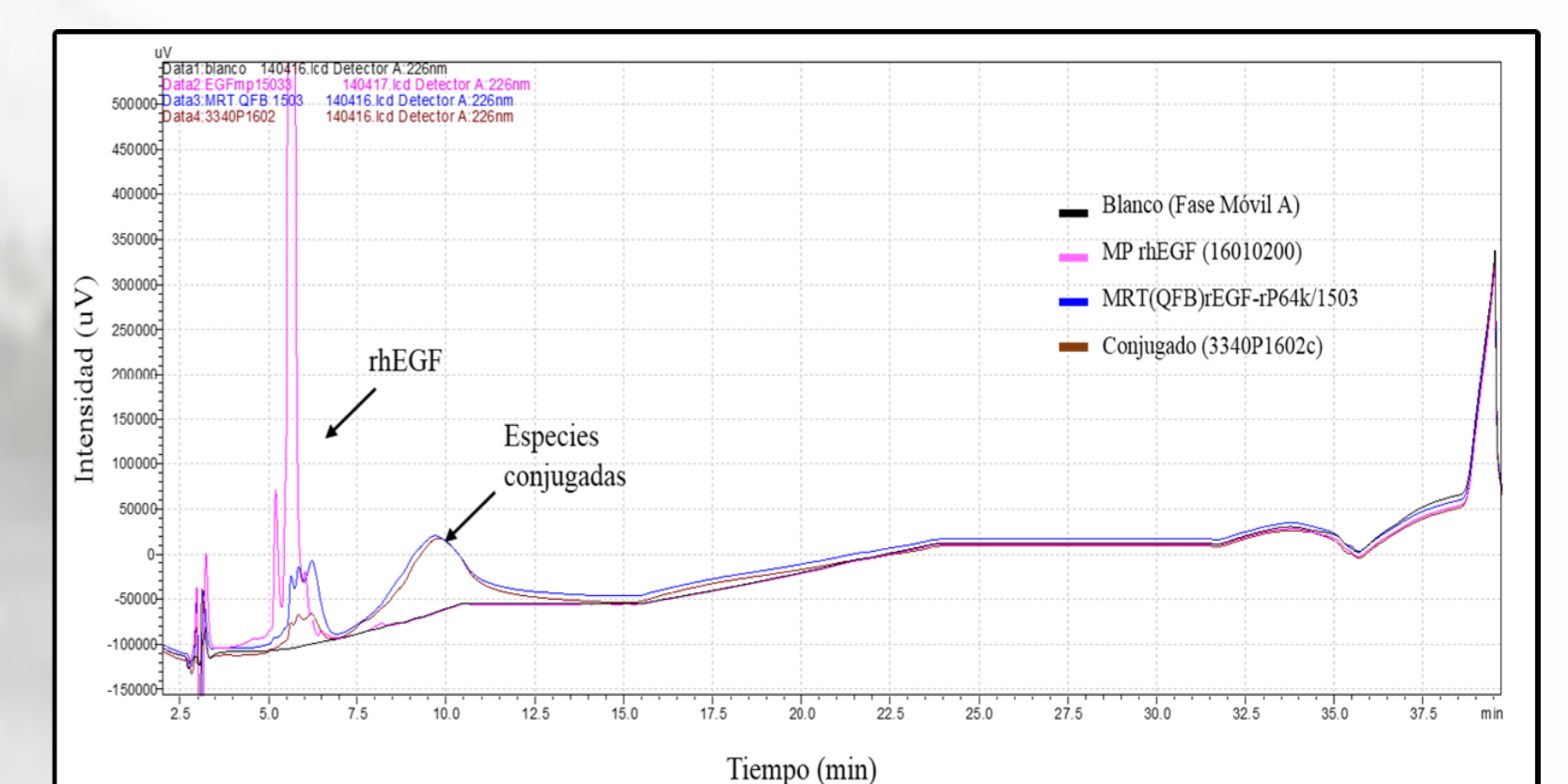
Vydac C4

Vydac C8



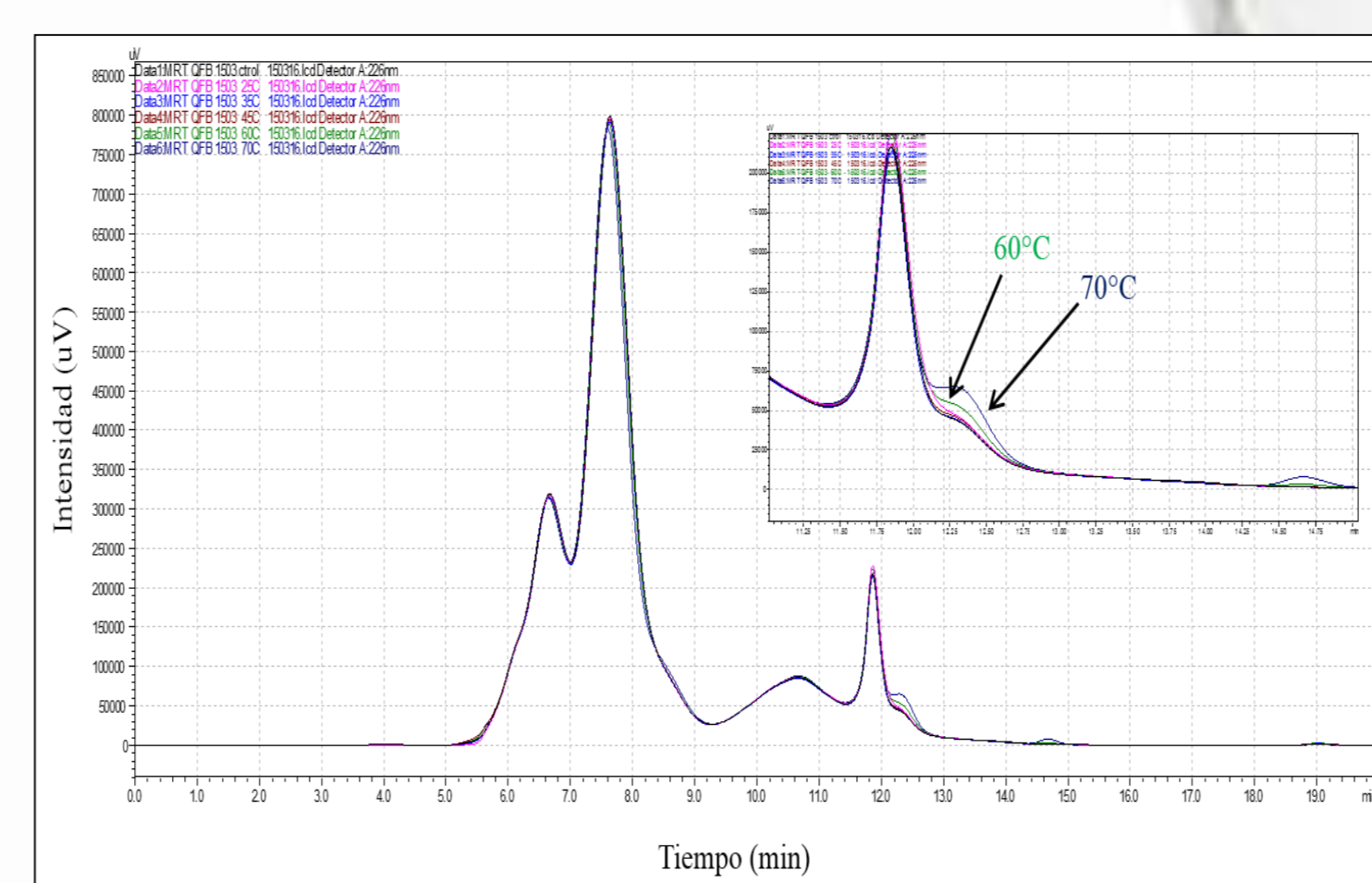
- Presencia de un pico de mayor intensidad y simetría que el obtenido para las especies conjugadas en la corrida con la columna Vydac C8.

Incremento de la concentración del agente apareador/supresor de iones (TFA)



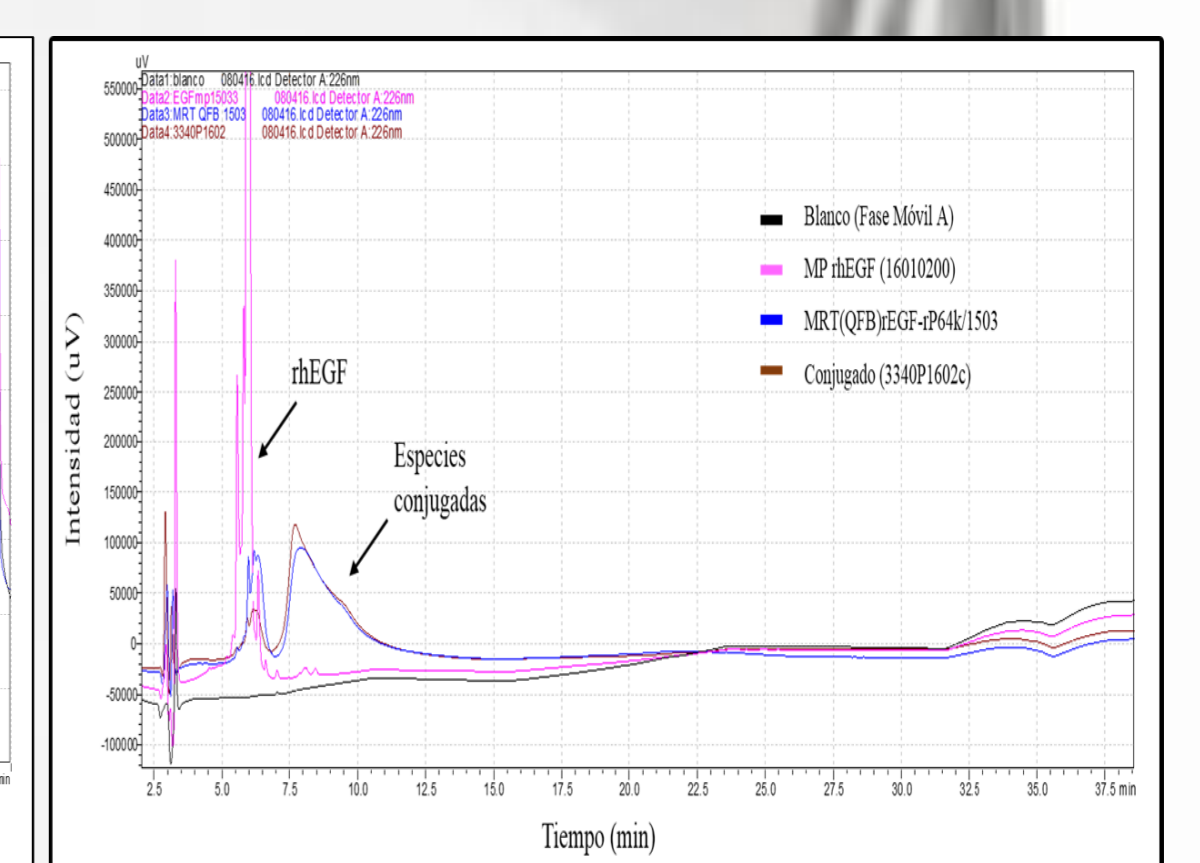
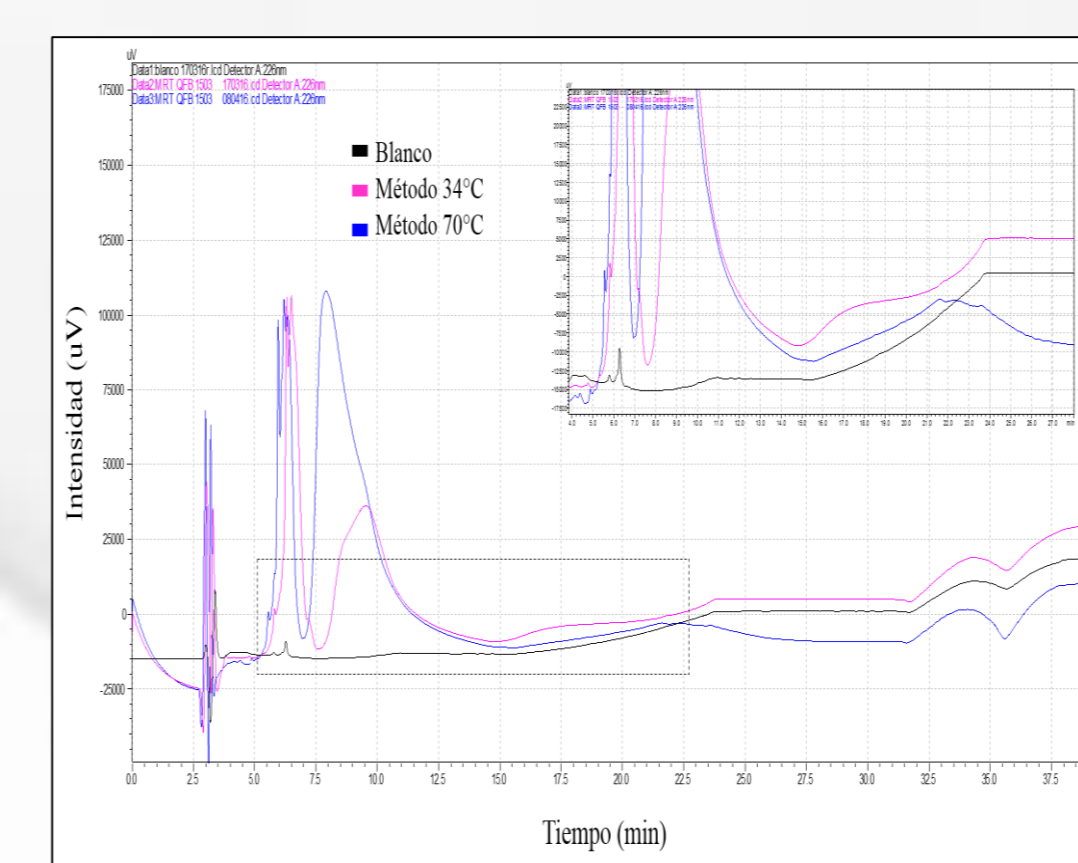
- Separación del pico de rhEGF libre y otro pico asimétrico formado por las especies conjugadas.

Efecto del estrés térmico en muestras tratadas por GF-HPLC



- Perfiles cromatográficos obtenidos a partir de muestras sometidas a estrés por temperatura mediante la técnica de filtración en gel.
- Pequeña disminución en la pureza de las muestras sometidas a 60 ° C y 70 ° C.
- Las muestras no fueron afectadas estructuralmente por la temperatura.

Modificación de la temperatura del horno (70 ° C)



- Incremento de la intensidad y simetría del pico correspondiente a las especies menos hidrófobas.
- Desaparición del pico de los más hidrófobos que aparecen a la temperatura de 34°C.

Conclusiones y recomendaciones

- El método cromatográfico elegido permitió la separación de picos de rhEGF libre que no se conjugaron durante el proceso productivo.
- La modificación de los parámetros de ejecución evaluados no mostró cambios significativos en el perfil obtenido, ya que ninguno influyó en la resolución del pico correspondiente a la especie conjugada.
- La evaluación de la termoestabilidad de las muestras utilizadas por HPLC-FR mostró que los conjugados no se vieron afectados estructuralmente a temperaturas elevadas de hasta 70 ° C durante un tiempo de 40 min.
- Basados en las características estructurales de las proteínas que forman el antígeno de la vacuna CIMA_{vax}-EGF[®], los métodos deben diseñarse para permitir la separación de sus especies moleculares.