



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN PANEL DE METODOLOGÍAS
PARA DEMOSTRAR BIOCMPARABILIDAD DE
FÁRMACOS BIOTECNOLÓGICOS, I.E., ANÁLOGOS DE
INSULINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOSÉ TEODORO ORTIZ PÁMANES



MÉXICO, CDMX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MONTIEL AGUIRRE JESUS FERNANDO
VOCAL: Profesor: DIMITROVA DINKOVA TZVETANKA
SECRETARIO: Profesor: REYES GRAJEDA JUAN PABLO
1er. SUPLENTE: Profesor: DIAZ FLORES LUIS ALEJANDRO
2° SUPLENTE: Profesor: GARZA AGUILAR SARA MARGARITA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN), INSTITUTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA: JUAN PABLO REYES GRAJEDA

X

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

SUSTENTANTE: JOSÉ TEODORO ORTIZ PÁMANES

X

José Teodoro Ortiz Pámanes

DEDICATORIA

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.”

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México por su valiosa contribución a mi formación y preparación como profesionista.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica por su colaboración en el financiamiento de este proyecto, así como a sus colaboradores que me instruyeron y guiaron a lo largo de mi estancia, con conocimiento, consejos y dirección.

A los miembros del jurado, por su tiempo en la revisión de este trabajo.

Al Instituto de Química, por sus aportaciones en el campo de la cristalografía de rayos X.

RESUMEN

La incidencia de enfermedades crónico-degenerativas (diabetes, cáncer, enfermedades autoinmunes, asma, etc.) ha aumentado en los últimos treinta años. La diabetes mellitus es una enfermedad que afecta a 415 millones de personas y se ubica dentro de las principales causas de muerte en México. La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para este tipo de enfermedades ha ido dirigiéndose hacia tratamientos altamente especializados en forma de medicamentos biotecnológicos de los cuales la mayoría corresponde al uso de productos de origen protéico, como anticuerpos monoclonales, citocinas, hormonas peptídicas como la insulina, entre otros.

Conforme se han ido venciendo las patentes de estos productos, la producción de medicamentos biocomparables ha ido acaparando un sector importante del mercado, sin embargo, el cambio en las variables del proceso de producción por aquellas propias de la industria farmacéutica que las fabrica conlleva a la acumulación de diferentes variaciones en el producto final y con ello un aumento en la incidencia de reacciones adversas, principalmente por reacciones de inmunogenicidad.

En las normas oficiales mexicanas, en particular la NOM-177-SSA1-2013, reguladas por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), se establecen los requerimientos mínimos para poder obtener el registro de un medicamento y así poder comercializar con él. No obstante, estos requerimientos no siempre son suficientes para una adecuada caracterización fisicoquímica de producto, puesto que se tiende a realizar la caracterización hacia la mínima obtención de información, dejando a un lado aspectos más globales sobre el biofármaco. La obtención de mayor información sobre el producto biocomparable podría predecir la incidencia de cierta reacción adversa y corregir variables dentro del proceso de producción y con ello aumentar la calidad del medicamento.

El presente trabajo se centra en el uso de diferentes metodologías analíticas, tales como cromatografía de líquidos de alta resolución, dispersión dinámica de luz, espectrometría de masas y cristalografía de rayos X principalmente, para la obtención de información más robusta sobre los biofármacos de uso más cotidiano en México, esto es, análogos de insulina, con el fin de implementar y/o complementar las metodologías existentes para caracterizar a otros biofármacos biocomparables que busquen obtener su registro ante la COFEPRIS.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. Proteínas.....	11
2.2. Biofármacos.....	16
2.3. Insulina como tratamiento para la diabetes.....	17
2.4. Problemas asociados a una caracterización deficiente.....	21
2.5. Normativa en México sobre Biofármacos.....	22
2.6. Criterios de Caracterización.....	23
2.6.1. Pureza. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE.....	23
2.6.2. Espectrometría de masas. Estructura primaria.....	24
2.6.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Huella peptídica	26
2.6.4. Dispersión Dinámica de Luz. Estados de agregación y radio hidrodinámico.....	27
2.6.5. Fluorescencia Intrínseca.....	29
2.6.6. Cristalografía de Rayos X. Estructura terciaria y cuaternaria.....	30
2.6.6.1. Química del estado sólido. Conceptos de Simetría.....	30
2.6.6.2. Celda unitaria y Redes de Bravais.....	31
2.6.6.3. Sistemas Cristalinos.....	31
2.6.6.4. Formación de un Cristal.....	32
2.6.6.5. Caracterización preliminar.....	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
4. JUSTIFICACION.....	36
5. OBJETIVOS.....	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
7. RESULTADOS.....	53
8. DISCUSION DE RESULTADOS.....	67
9. CONCLUSIONES.....	79
10. PERSPECTIVAS.....	80
11. REFERENCIAS.....	81
12. ANEXOS.....	87

ABREVIATURAS

ARN: ácido ribonucleico

ADN: ácido desoxirribonucleico.

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento.

DLS: Dynamic Light Scater (Dispersión Dinámica de Luz)

C: Citosina

G: Guanina

A: Adenina

T: Timina

MPT: modificaciones postraduccionales

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

TOF: Time of Flying

Aspt: Insulina Aspártica

Lisp: Insulina Lispro

Glar: Insulina Glargina

T.A.: Temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}$ C)

1. INTRODUCCIÓN

En México y el mundo, la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas (esto es, diabetes, cáncer, artritis reumatoide, asma, etc.) ha aumentado en los últimos treinta años y con ello la búsqueda de nuevos tratamientos para estos padecimientos. Con el avance tecnológico, surgen los medicamentos biotecnológicos, alternativas muy efectivas contra este tipo de enfermedades que tienen como principio activo a los biofármacos.

Su uso ha ido en aumento en la última década, de modo que hoy en día ya existen cerca de 70 productos registrados como de referencia ante la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios), la cual, es un organismo gubernamental encargado de establecer las normas y requisitos a los que deben sujetarse los establecimientos de salud, control sanitario de productos y servicios; de manera general todo aspecto en el que esté involucrado la salud en el país.

Para que un medicamento pueda comercializarse es necesario que transcurra alrededor de una década de investigación para su aprobación y comercialización, en el mejor de los casos, y uno de los puntos críticos para que esto sea posible es la etapa de investigación preclínica. En el caso de los medicamentos biotecnológicos, existe un periodo todavía mayor y es por eso que entre mejor caracterizado esté en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, la duración de la etapa de investigación preclínica se reduce considerablemente y el tiempo de aprobación también se reduce.

En este contexto, van surgiendo a la par medicamentos biotecnológicos biocomparables, los cuales buscan tener un efecto igual con respecto a los medicamentos de referencia, a precios más accesibles para la población. Sin embargo, es imposible tener una copia idéntica de éstos debido a que las propiedades están dadas intrínsecamente al proceso de producción, que es único para cada medicamento. Esto genera ligeras variaciones en el producto final que a la larga provocan reacciones de inmunogenicidad indeseables y efectos adversos nocivos para el paciente.

El presente trabajo busca obtener la mayor cantidad de información con diferentes metodologías analíticas para caracterizar biofármacos y de esta manera contribuir en los estudios de biocomparabilidad posteriores que se quieran hacer para así reducir los tiempos de aprobación de éstos, así como contar con información que pueda ser útil para predecir la incidencia de reacciones adversas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas conformadas por diferentes permutaciones de veinte α -L-aminoácidos y contienen al menos cincuenta de estos en su estructura. Los aminoácidos son las unidades fundamentales (monómeros) de las proteínas y son moléculas conformadas por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre. (Matthews C. et. Al, 2002)

En la naturaleza existen alrededor de 500 aminoácidos (Wagner I. y Musso H., 1983) que pueden clasificarse tanto en alfa aminoácidos, beta aminoácidos, gamma aminoácidos o delta aminoácidos, así como por sus propiedades de carga a determinado pH. De manera general se clasifican por las propiedades otorgadas por su cadena lateral R. Los alfa aminoácidos son de mayor importancia debido a que están codificados por el código genético de la mayoría de los seres vivos.

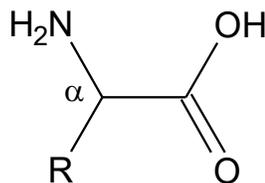


Figura 1. Formula general de un alfa aminoácido, donde el carbono alfa es el primer carbono que sostiene tanto al grupo amino (NH_2) como al grupo carboxilo (COOH), y a partir del cual, varia la cadena lateral R.

A pH fisiológico (≈ 7.4) la mayoría de los aminoácidos se encuentran en un estado de zwitterion, esto es, en estado neutro, pero con cargas formales positivas y negativas derivadas de los grupos amino y carboxilo ionizados. Es en este estado de carga que se clasifican de acuerdo a la figura 2.

Los aminoácidos pueden unirse entre ellos por medio de un enlace covalente tipo amida entre el grupo α -amino de un aminoácido y grupo α -carboxilo de otro, este tipo de enlace también se denomina “enlace peptídico” y al producto de la unión de estos se denomina péptido (Cox, et al. 2005). Dos aminoácidos unidos forman un dipéptido, tres, tripéptido, y así continua la nomenclatura en orden de complejidad.

A partir de 2-10 aminoácidos unidos, se denomina a la cadena “oligopéptido” y de 10-100 aminoácidos se denomina “polipéptido”. Las proteínas son estructuras polipeptídicas que presentan un plegamiento específico tridimensional.

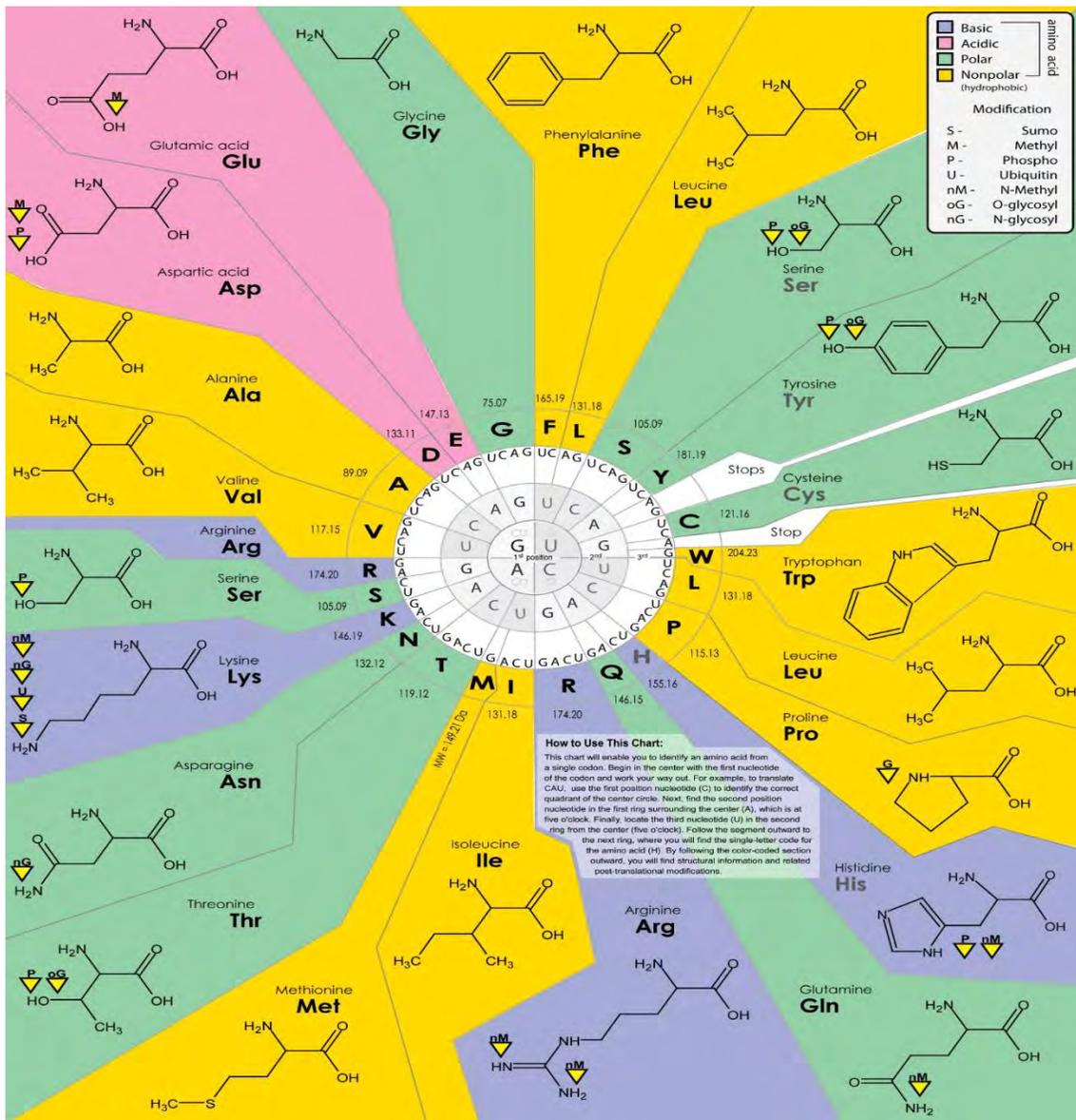


Figura 2. Algunas propiedades de los 20 L-alfa-aminoácidos principales que conforman a las proteínas. Se muestra el código genético universal que codifica para cada aminoácido, en el centro se encuentran cuatro sectores, que muestran las cuatro primeras bases nitrogenadas de ARN mensajero, posteriormente hacia afuera del círculo se muestran las bases siguientes posibles que conforman el

codón que se traduce para un cierto aminoácido. Además, se clasifica por colores la naturaleza que le otorga la cadena lateral al aminoácido, siendo en color amarillo aquellos de naturaleza hidrofóbica o no polar, azul de carácter básico, verde de carácter polar no iónico, y rosa de carácter ácido. Imagen disponible en <http://www.u.arizona.edu/~joas/geneticcodeaminoacids.png>

De manera general, las proteínas son producidas en el interior de las células a partir de un proceso molecular denominado traducción, en donde a partir de un molde de DNA (gen), se produce un templado de ARN mensajero (ARNm) mediante un proceso denominado transcripción. Este mensaje puede migrar al citoplasma de las células donde es leído por los ribosomas, los cuales son estructuras que se encargan de sintetizar a las proteínas decodificando la información. Ésta se lee en tripletes de bases nitrogenadas denominados codones (ARNm) y cada aminoácido está unido a una molécula de ARNt (anticodón) y mediante la complementariedad de las bases nitrogenadas del ARNm con el ARNt es como se va produciendo el polipéptido. Sin embargo, la producción de proteínas no termina aquí, sino que existen modificaciones posteriores (modificación postraduccion) que permiten la señalización y migración de la proteína a diversos lugares dentro o fuera de la célula. (Karp 2010)

Las proteínas presentan diferentes órdenes de complejidad en su estructura, donde se denomina estructura primaria al orden secuencial de los aminoácidos unidos por el enlace peptídico, la estructura primaria o secuencia de una proteína se representa por medio de un código de letras específico para cada aminoácido, por convención, la representación se lee de izquierda a derecha, posicionando el amino terminal del lado izquierdo y el carboxilo terminal del lado derecho.

*KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDY
GILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSDGNGMNAW
VAWRNRCKGTDVQAWIRGCLR*

Figura 3. Secuencia o estructura primaria de la proteína lisozima. Donde se muestra el código de una letra para los diferentes 20 aminoácidos. Entrada del PDB: 4N9R.

Siguiendo con el nivel de complejidad, se denomina estructura secundaria al plegamiento tridimensional regular de la secuencia de aminoácidos, donde se encuentran 3 tipos principales de plegamientos. La hélice α , lámina β y hélice 3_{10} . Para que se puedan adoptar cualquiera de estas conformaciones Linus Pauling (quien postuló estas estructuras en 1950 a partir de los estudios cristalográficos de mioglobina) propuso las siguientes condiciones para que se puedan cumplir:

1. Dos átomos no pueden acercarse más allá de su radio de van der Waals.
2. El enlace peptídico permanece en un plano y en configuración *trans*. Por tanto, solo es posible la rotación de los dos enlaces adyacentes al carbono α de cada aminoácido.
3. Se requiere de una fuerza no covalente que establezca a los diferentes tipos de plegado regular, predominando el enlace de hidrogeno entre un protón del enlace amida y el oxígeno del grupo carbonilo de otro aminoácido.

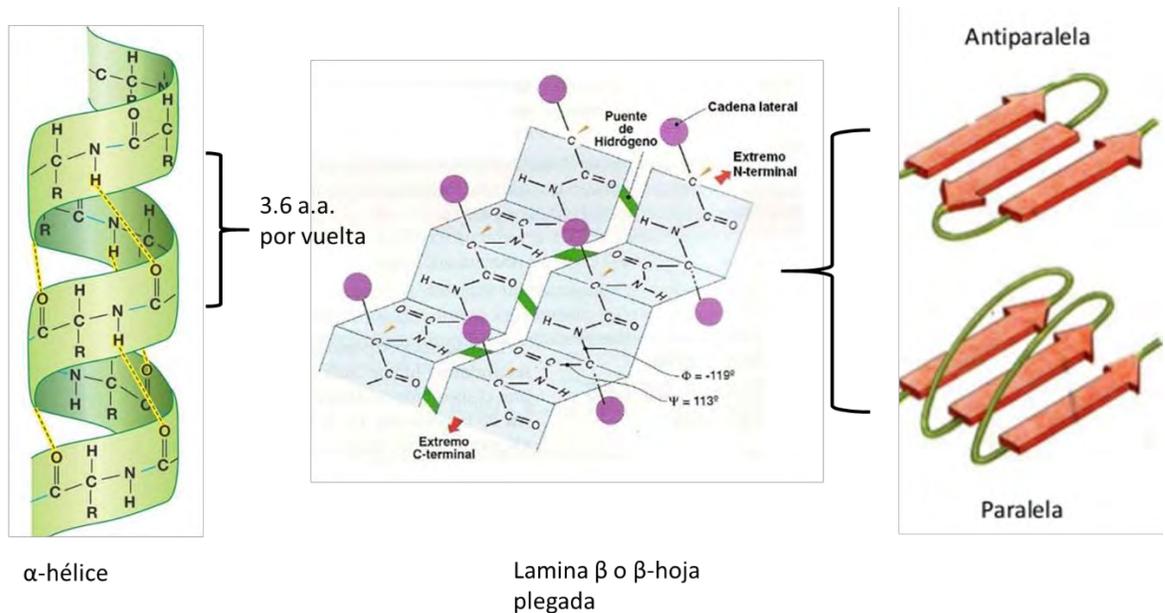


Figura 4: Representación de los tipos principales de estructuras secundarias, donde para la alfa hélice, debe de haber 3.6 aminoácidos por vuelta, además de que es prioridad sentido dextrógiro de las vueltas. Se estabiliza por los puentes de hidrogeno entre los aminoácidos de la hélice. Para la lámina beta, existen dos tipos, paralela y antiparalela determinado por el sentido del amino terminal y carboxilo terminal. Se estabiliza por puentes de hidrógeno entre las cadenas de otra lámina.

La complejidad de las proteínas viene siendo aún mayor, puesto que no termina en la estructura secundaria. Se denomina estructura terciaria al plegamiento específico de los elementos de la estructura secundaria para generar zonas predominantes de estructura secundaria, denominados dominios, y estos interactúan con otros para formar el doblamiento completo. La información de éste plegamiento específico está determinado por la secuencia de aminoácidos y se debe en gran parte a fuerzas intermoleculares no covalentes como puentes de hidrogeno, puentes salinos y van der Waals que estabilizan tal plegamiento, además las uniones covalentes entre residuos de cisteínas (puentes disulfuro), otorgan una mayor estabilidad del plegamiento. (Nelson L.D & Cox M.M. 2008)

Se denomina estructura cuaternaria cuando convergen proteínas para formar un complejo macromolecular funcional formado por múltiples subunidades de éstas con determinada estructura terciaria (L.C. Wade 2004). De ser la asociación entre cadenas polipeptídicas similares o idénticas se denomina proteína homotípica, y en el caso de ser cadenas diferentes de denomina heterotípica.

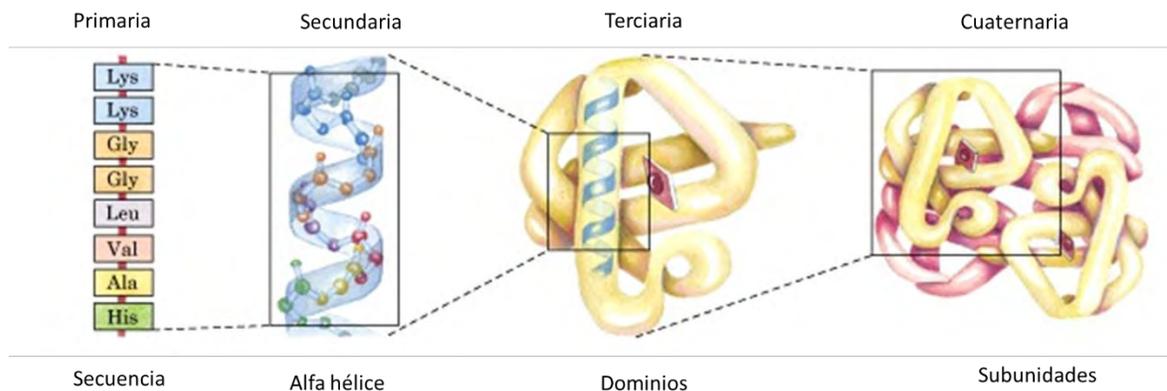


Figura 5. Representación de los niveles de organización de las proteínas. En particular de la mioglobina. Imagen disponible en: http://xray.bmc.uu.se/Courses/bioinformatik2003/Intro/struc_levels.jpg

Las proteínas se han venido utilizando como tratamiento desde la década de 1890, desde la utilización de sueros animales por parte de Emile von Behring y otros; cuyo trabajo fue pionero en la investigación de inmunización pasiva lo que le dio el premio Nobel de Medicina en 1901 (Behring E., 1901). Desde entonces se ha ido incurriendo en el campo de sueroterapia, vacunación, etc., y debido a que muchas proteínas hoy en día han demostrado tener un efecto terapéutico para el tratamiento de ciertas enfermedades crónico-degenerativas, tales como diabetes, artritis reumatoide, algunos tipos de cáncer etc.; por tanto, en analogía a los fármacos convencionales surgen los biofármacos.

2.2. Biofármacos

La palabra biofármaco proviene de las raíces griegas *bios (vida)* y *phármakon* (remedio o cura), y se describe como una sustancia de origen biológico producido por técnicas de biología molecular (expresión de proteínas por ADN recombinante en sistemas heterólogos), que presenta actividad farmacológica y se identifica por sus propiedades físicas, químicas y biológicas (NOM-177-SSA1-2013).

Un medicamento biotecnológico es toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que presente un efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y que se identifique como tal por sus propiedades físicas, químicas, biológicas y actividad farmacológica. (NOM-177-SSA1-2013)

Dentro de éstos, se encuentran muchos de los productos de origen protéico, tales como anticuerpos monoclonales, hormonas de origen peptídico, proteínas de señalización (citoquinas), algunas vacunas, enzimas terapéuticas, factores de crecimiento hematopoyético. Aunque no se restringe únicamente al uso de proteínas, hoy en día ya existen productos y terapias que utilizan ADN y ARN

terapéutico (Gendicine, Advexin, entre otros) en etapa de investigación. Sin embargo, la mayoría del mercado actual está centrado en la producción y comercialización de proteínas. (Pearson Sue, Hepeng Jia 2004)

De los biofármacos más usados e importantes en México que se encuentran registrados ante la COFEPRIS existen desde diferentes anticuerpos monoclonales, interferones e insulina. (COFEPRIS, 2016)

2.3. Insulina como tratamiento para la diabetes.

La insulina humana es una hormona peptídica producida en las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas de donde fue aislada de perros por primera vez en 1922 por Banting y Best. Está formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por dos puentes disulfuro siendo un total de 51 aminoácidos los que conforman a su estructura con una masa molecular de 5808 Da. Regula el metabolismo de carbohidratos y grasas a partir de la internalización de glucosa desde el torrente sanguíneo hacia el interior de las células y está implicada en ciertos aspectos de síntesis de proteínas. Tiene una vida media en plasma de 6 minutos y desaparece de circulación aproximadamente a los 15 minutos. (Guyton & Hall 2000)

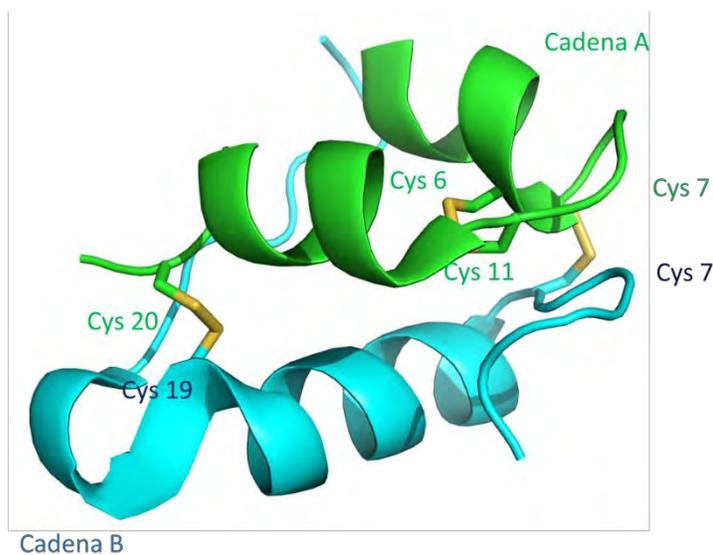


Figura 6. Representación tridimensional de la insulina humana, mostrándose en verde la cadena A, en azul la cadena B y en amarillo los residuos de aminoácidos que forman puente disulfuro. Se observa además la presencia de estructuras secundarias.

PDB entry: 5BTS.

Cuando existen alteraciones en el control de la glucosa por una modulación errónea por parte de la insulina aparece una enfermedad crónico degenerativa conocida como diabetes mellitus, de la cual existen 3 variantes principales, tipo 1 (insulina-dependiente), tipo 2 (resistente a la insulina) y gestacional.

En México, la diabetes mellitus se encuentra dentro de las primeras diez enfermedades crónico degenerativas de mayor incidencia y es un problema grave a la salud de la población mundial, se estima que 415 millones de personas la padecen y cerca del 80% es el variante tipo 2. (Shi & Hu 2014)

Sus complicaciones derivan principalmente hacia la falla renal, daño necrótico en las extremidades inferiores, enfermedades cardiovasculares, coma hiperosmolar, entre otros. Cabe mencionar que la diabetes tipo II, es una enfermedad multifactorial, en particular se ve influenciada por varios genes y factores ambientales, tales como obesidad, nivel de actividad física y dieta. (Jun et al. 1999)

Con el descubrimiento de la insulina muchos de los problemas asociados a esta enfermedad particularmente para el tipo I, se han visto mermados considerablemente y las personas llevan una vida normal bajo tratamiento. En combinación con hipoglucemiantes e insulina igual ha sido un tratamiento eficaz para el variante tipo 2. Antiguamente la insulina se obtenía de otros animales, sin embargo hoy en día es producida por tecnologías de biología molecular a partir de la inserción del gen humano “*INS*” en bacterias de *Escherichia coli* o en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.(Hirsch 2005)

Gracias al estudio de su estructura que se produjeron por las mismas vías tecnológicas, análogos estructurales con diferentes perfiles farmacocinéticos, esto es duración en la circulación y por tanto el efecto deseado, debido a que la insulina por sí misma, no alcanzaba el tiempo de efecto deseado y había que recurrir a constantes administraciones.

Los análogos de insulina humana más comunes se presentan en la siguiente tabla:

Nombre	Compañía	Farmacocinética	Secuencia	Masa Molecular (Da)
Glargina	Sanofi-Aventis	Lenta	A: GIVEQCCTSICSLYQLENYC G B: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT RR	6063
Lispro	Eli Lilly & Co.	Rápida	A: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN B: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFY K PT	5808
Aspart	Novo Nordisk	Rápida	A: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN B: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFY D KT	5825.8
Humulin	Eli Lilly & Co.	Rápida	A: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN B: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT	5808

Tabla 1. Principales análogos de insulina humana. Se muestran algunas propiedades y en rojo se resaltan los cambios principales con respecto a la secuencia de la insulina humana original (humulin). Para insulina Lispro, existe una inversión entre la lisina (K) con respecto a la prolina (P), para la Glargina, la adición de dos residuos de arginina (G) y la substitución de asparagina (N) por glicina y para Aspart, substitución de la prolina (P) por un residuo de ácido aspártico.

Cabe mencionar que un análogo no es lo mismo a un medicamento biocomparable. De acuerdo con la Unión Europea (UE), una definición más acertada es que un medicamento biocomparable es la versión de copia de un medicamento biológico previamente autorizado ante una agencia de salud, que ha demostrado similitud en sus características fisicoquímicas, eficacia y seguridad. (Weise et al. 2011)

Dado que existe una inherente variabilidad biológica debido al vector utilizado durante el proceso de manufactura, el producto también muestra un cierto grado de variabilidad que se conoce como microheterogeneidad, por lo que no siempre es posible obtener una copia idéntica del producto de referencia. Esto es debido a que los fabricantes de este tipo de medicamentos no tienen acceso a los datos del desarrollador original y necesitan crear sus propios procesos de manufactura, los cuales deben ser capaces de generar un producto lo más similar posible al de referencia. (Wharf 2007)

Las fuentes de variabilidad incluyen el uso de diferentes sistemas de expresión, (organismos eucariontes o procariontes), tiempos de fermentación, procesos de purificación, el uso de diferentes excipientes para estabilizar al producto, entre otros.(Weise et al. 2011)

En el caso de la utilización de sistemas eucariontes para la producción, existe a su vez modificaciones postraduccionales (MPT), las cuales incluyen glicosilaciones, hidroxilaciones, fosforilaciones, carboxilaciones, entre otras, y éstas, no ocurren de manera reproducible convirtiéndose en una de las grandes fuentes de variabilidad que existen entre lotes del mismo biofármaco. (Walsh G. & Jefferis R. 2006)

Además, la similitud en las características fisicoquímicas del biofármaco es un prerrequisito para la posible reducción de requerimientos en las etapas preclínicas y clínicas. Esto depende de que tan bien la molécula esté descrita por los métodos analíticos que se encuentran en el estado del arte, basándose en las diferencias observadas o potenciales entre el medicamento biocomparable y el de referencia, además de la evidencia clínica obtenida con el medicamento de referencia.

2.4. Problemas asociados a la caracterización deficiente de los medicamentos biocomparables.

Dado que la mayoría de los biofármacos son producidos a partir de sistemas heterólogos, existe la posibilidad de que se presenten reacciones adversas debido a problemas de inmunogenicidad.(Schellekens 2002a)

Los principales factores que repercuten en la inmunogenicidad de los biofármacos son: variación de la secuencia; ya que el grado de divergencia con respecto a las proteínas humanas aumenta la probabilidad de generar nuevos epítopes que pueden reconocer las células del sistema inmune (Chang 2000), glicosilación postraducciona; en donde los sistemas de expresión procariontes no llevan a cabo glicosilación de proteínas por lo que se ven más expuestos los sitios antigénicos, además, se ha visto que la inmunogenicidad también está asociada a la solubilidad reducida de las proteínas por carecer de este tipo de modificación, el tipo de célula

huésped, esto es, el organismo utilizado para expresión del biofármaco, contaminantes e impurezas relacionadas al proceso, formulación, vía de administración, dosis y duración del tratamiento y las características del paciente. Este es un factor importante, puesto que puede existir una susceptibilidad genética a la producción de anticuerpos, o, por el contrario, una baja susceptibilidad como la que se observa en pacientes con cáncer. (Schellekens 2002a)

Para la mayoría de los biofármacos, la producción de anticuerpos de manera ocasional se observa un aumento o decremento de la eficacia.

Una manera de predecir la inmunogenicidad es mediante el conocimiento detallado de las características del biofármaco. Para las proteínas recombinantes, la secuencia y el grado de homología con respecto a la forma nativa es un factor importante para determinar la factibilidad de inducir la respuesta inmune puesto que se puede esperar que una distribución de estas diferencias tenga un efecto importante en la probabilidad de generar nuevos epítopes sobre las células T y B. (Chang 2000; Ebbers HC, Crow SA, Vulto AG 2012)

2.5. Normativa en México sobre Biofármacos.

En México, la entidad encargada de la supervisión sobre los métodos de caracterización de medicamentos y evaluación de la calidad es la COFEPRIS, y en particular la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013, establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable así como los requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad, requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad y requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. De la cual en el numeral 11.8.3.5; se menciona que los estudios fisicoquímicos y biológicos deben permitir distinguir atributos con respecto de la composición, estructura primaria y estructura de orden superior de los biofármacos. Por otro lado en el numeral 11.8.3.6; se menciona que el análisis de la estructura

de orden superior debe realizarse empleando métodos analíticos que permitan conocer la estructura tridimensional e integridad química como plegamiento, estabilidad termodinámica, tamaño, modificaciones postraduccionales, isoformas y variantes de carga (oxidaciones, de amidaciones, isomerizaciones, entre otras), masa absoluta y todas aquellas que aporten información sobre la identidad, heterogeneidad y pureza del biofármaco.

Además de esta norma se tienen apartados para los medicamentos biotecnológicos en las siguientes: NOM-EM-001-SSA1-2012, NOM-059-SSA1-2013.

Sin embargo, un único análisis de la secuencia nunca será suficiente para predecir y evitar la inducción de anticuerpos. Es por eso que se requiere de otras técnicas que evalúen impurezas, heterogeneidad, formación de agregados degradación del producto, ensayos de afinidad en tiempo real basados en resonancia de plasmones, y modelado computacional de tres dimensiones a partir de datos de cristalografía de rayos X.

2.6. Criterios de Caracterización

2.6.1. Pureza. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es una técnica de separación utilizada ampliamente en los laboratorios de biología molecular. Este método fue desarrollado por Arne Tiselius en la década de 1930 y se basa en la aplicación de un campo eléctrico a través de un medio para favorecer el movimiento de moléculas cargadas de un polo a otro a diferentes velocidades. Como las proteínas son moléculas anfóteras (su carga depende del pH del medio); permite la separación de una mezcla de estas bajo su influencia. La electroforesis se puede separar en tres tipos principalmente: electroforesis de zona, isoelectroenfoque y separación por tamaño, donde este último aprovecha las propiedades del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) para dar a las proteínas una carga neta negativa además de la adición de un agente reductor (usualmente beta mercaptoetanol) que escinde los puentes disulfuro preexistentes y permite la formación de péptidos más pequeños; favoreciendo así

su migración hacia el ánodo. Si además se utiliza una matriz de gel de poliacrilamida que permita una migración diferencial en función del tamaño de las proteínas, recibe el nombre de electroforesis SDS-PAGE (sodium dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).(Lord 2003)

El gel se produce a partir de una reacción de polimerización catalizada por radicales libres a partir de monómeros de acrilamida y N, N'-metilenbisacrilamida (bis-acrilamida) en presencia de persulfato de amonio (APS) y el catalizador TEMED. Como resultado se forma un co-polímero de cadenas largas de acrilamida unidas por bis-acrilamida en una red tridimensional, con el buffer de reacción ocupando los intersticios de la matriz y manteniendo su forma extendida. La razón de polimerización depende de la concentración de monómeros, la temperatura, así como la pureza de los reactivos.

Dentro de las propiedades más importantes de las proteínas que se aprovechan para esta técnica destacan su movilidad electroforética, los cuales están en función de su tamaño, forma, y pH. Las unidades de la migración electroforética se miden en $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ (unidades de velocidad de migración sobre unidades de campo eléctrico). Las principales ventajas de esta técnica radican en su alta reproducibilidad, simpleza y además de que proporciona información del peso molecular, subunidades proteicas, pureza y además de la separación de un amplio margen de proteínas.

2.6.2. Espectroscopia de masas. Estructura Primaria.

La espectrometría de masas es una de las técnicas más robustas usadas en química analítica. Originaria de la época de 1897 en Cambridge, Inglaterra por el equipo de John Thomson. Él descubrió que descargas eléctricas en gases producían iones y se generaban trayectorias parabólicas en función de su masa. Este descubrimiento le valió el premio Nobel de física en 1906. Fue hasta 1960 que se implementó como una técnica para caracterizar compuestos orgánicos y en la década de los 80's desarrollaron los sistemas para ionizar de manera eficiente a

moléculas biológicas como proteínas. La ventaja de esta técnica radica en su alta sensibilidad, precisión, capacidad de elucidación de estructura e identificación confiable de compuestos.

Un espectrómetro de masas está formado por distintos módulos que cumplen 7 funciones básicas: un sistema de entrada, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, un sistema de control y un sistema de registro de datos. En función de los tres primeros es el tipo de muestras que puede analizar un espectrómetro de masas (Plascencia V. G. 2003). La siguiente tabla resume las variantes de los distintos espectrómetros.

Tabla 2. Posibles variantes de espectrómetros de masas.

Componente	Variantes
Sistema de entrada	<ol style="list-style-type: none"> 1. Directo 2. Columna capilar cromatografía liq.
Fuente de iones	<ol style="list-style-type: none"> 1. Impacto electrónico 2. Ionización Química 3. Ionización de campo 4. Deserción de campo 5. Bombardeo con átomos rápidos 6. Electrospray 7. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)
Analizador de masas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cuadrupolo 2. Trampa de iones (Ion-trap) 3. Tiempo de vuelo (Time-of-flight, TOF) 4. Analizador FT-ICR

Los procesos básicos asociados con la espectrometría de masas incluyen la generación de iones en fase gaseosa de un analito y la medición de las relaciones masa/carga (m/z) de estos. El hecho de que se encuentre en fase gaseosa le otorga ciertas ventajas, donde en primer lugar su movimiento puede ser controlado de manera precisa por campos electromagnéticos, además se incrementa la

sensibilidad del instrumento. Dentro de las principales desventajas es en sí la ionización y mantener al analito en fase gaseosa. Esto ha ido disminuyendo con los equipos que aprovechan la tecnología MALDI y electrospray especialmente con moléculas grandes como péptidos y proteínas.(Aebersold & Mann 2003)

El fundamento del analizador de masas radica en una mezcla de iones que poseen diferentes relaciones masa-carga (m/z) y poseen diferentes abundancias relativas. Posteriormente campos electromagnéticos los separan de acuerdo a esta relación m/z y pasan a través de un orificio que es selectivo a los iones que llegan al detector. Las diferentes relaciones m/z son analizadas a la salida del detector y las corrientes de iones son registradas como una función del tiempo, al final del experimento se genera un gráfico conocido como espectro de masas donde se observan picos de diferentes intensidades relativas que corresponden a fragmentos de un ion en función de m/z . El pico de mayor abundancia se conoce como pico base y aquel con mayor m/z como ion molecular, el cual es el que nos proporciona información sobre la masa molecular del compuesto; la información estructural es conocida a partir de las m/z de los fragmentos. (Rubakhin et al. 2005)

Las aplicaciones más usadas de esta técnica son elucidación de estructura, determinación del peso molecular y por consiguiente identificación de compuestos de mezclas complejas resueltos por técnicas de separación como cromatografía. Para análisis de proteínas se utiliza las tecnologías MALDI/TOF y en ciertos aspectos electrospray con trampa de iones y a partir de los patrones de fragmentación de péptidos digeridos previamente, se puede elucidar la estructura primaria de las proteínas al compararse esa información con respecto a distintas bases de datos.

2.6.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y Digestión Enzimática. Huella peptídica.

La cromatografía es una técnica de separación inventada por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX. Agrupa un conjunto de diversos métodos que facilitan separación, identificación y determinación de componentes en mezclas

complejas. La muestra se disuelve en una fase móvil, pudiendo ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, y se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en alguna superficie sólida. La elección de estos componentes se hace en función de lograr una distribución homogénea a distintos puntos de la fase estacionaria. Aquellos componentes que presenten una alta afinidad por la fase estacionaria serán retenidos mayor tiempo en función al flujo de fase móvil y aquellos con pobre afinidad migraran más rápido. (Skoog et al. 2010)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) usa estos mismos principios solo que esta agrupada en un instrumento con bombas de alta presión acopladas a él que dispensan fase móvil a través de columnas de acero empacadas con fase estacionaria, pueden ser de varios tamaños y tipos de fase estacionaria, dependiendo del uso final. Además, se dispone de un detector que puede aprovechar las propiedades inherentes al analito o al disolvente, donde los más utilizados son los detectores de absorción UV-visible mediante un arreglo de fotodiodos; el cual permite leer varias longitudes de onda simultaneas y sobreponer espectros para así deducir si algún pico está puro o no (co-elución de componentes).(Skoog et al. 2010, [A])

Dentro de los usos posibles para el análisis de proteínas, destaca una técnica conocida como huella peptídica, la cual consiste en realizar una digestión enzimática de la muestra con alguna enzima que corte en sitios específicos de manera reproducible. Así, la proteína se escinde en péptidos de menor tamaño y es posible observar en un cromatograma el perfil característico de elución con determinada enzima de corte. Además si se colectan estas fracciones se puede analizar por espectrometría de masas y proceder a la identificación de la proteína al comparar los resultados con una base de datos.(Creasy 1999)

2.6.4. Dispersión Dinámica de Luz. Estados de agregación y radio hidrodinámico

Una de las técnicas más utilizadas para determinar el tamaño de partícula en suspensión en pocos minutos es DDL. Se basa en mediciones del ensanchamiento

por efecto Doppler de la luz dispersada como resultado del movimiento browniano de las partículas. (Skoog et al. 2010, [C])

La muestra se ilumina mediante un haz láser de longitud de onda única y a partir de técnicas de mezcla óptica o pulsos de luz se trasladan las frecuencias ópticas (6×10^{14} Hz) a frecuencias cercanas a 0 Hz que son de más fácil medición. Posteriormente un tubo fotomultiplicador (TFM) se emplea como tamiz lineal de la frecuencia ya que la señal de salida es proporcional a la intensidad de la radiación dispersada. Debido a que las partículas están en continuo movimiento, la intensidad dispersada observada, $I(t)$, fluctúa con el tiempo y las trazas de éstas generan una señal que se asemeja a un patrón de ruido. Las partículas pequeñas causan que la intensidad fluctúe con mayor rapidez que las grandes. (Skoog et al. 2010, [C])

Posteriormente se determina la función de autocorrelación de la señal. Ésta es la transformada de Fourier del espectro de potencia. Debido a que la radiación dispersada tiene la forma gráfica de una línea lorentziana, su transformada resulta en una disminución exponencial (Skoog et al. 2010, [C]). A partir de ésta, la constante de tiempo de la disminución exponencial τ está relacionada directamente con el coeficiente de difusión translacional (D_T) de partículas esféricas, isotrópicas en movimiento browniano, de acuerdo a la ecuación:

$$\tau = D_T q^2$$

Donde q , se conoce módulo del vector de dispersión y se determina mediante:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Aquí, n es el índice de refracción, θ , ángulo de dispersión y λ , longitud de onda del láser. Posteriormente el tamaño de partícula se obtiene a partir de D_T y de su forma de acuerdo a la relación Stokes-Einstein para partículas esféricas y calcular su diámetro hidrodinámico d_h :

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D_T}$$

Donde k , es la constante de Boltzman, T , la temperatura absoluta y η la viscosidad del medio.

Con la estimación del tamaño de partícula es posible determinar una propiedad conocida como índice de polidispersidad, la cual representa la relación existente entre la distribución de los tamaños de partícula para poblaciones polidispersas. En DDL, su valor oscila entre 0 y 1, siendo la unidad, un indicador de un alto grado de polidispersión, es decir, que las poblaciones de tamaños de partículas son completamente heterogéneas entre sí.

2.6.5. Fluorescencia Intrínseca.

En el espectro de radiación electromagnética, la luz visible abarca desde los 400 a los 750 nm de longitud de onda; de los 150-400nm se encuentra la región del ultravioleta y después de los 750nm, la radiación infrarroja. La luz al ser un tipo de energía puede ser absorbida selectivamente por diferentes sustancias de acuerdo a su estructura molecular.

Cuando un fotón de luz incide sobre algún electrón de un átomo o molécula, promueve la transición de un estado basal de energía a uno de mayor energía, el cual se conoce como estado excitado. El retorno de ese estado excitado al basal se logra por dos vías, por medio del mismo camino (emisión de un fotón al retornar el electrón excitado al estado original) o por un fenómeno conocido como relajaciones vibracionales. Al primer fenómeno se le conoce como fluorescencia si éste tiene una duración de emisión de fotones del orden de 10^{-5} a 10^{-10} s, o bien, si es de 10^{-4} a 10s o más, se conoce como fosforescencia. La fluorescencia ocurre cuando existe una transición del estado electrónico de la molécula de sencillo excitado (S^*) a sencillo (S) y la fosforescencia ocurre cuando se parte de un estado conocido como triple excitado (T^*) a sencillo (S). (Skoog et al. 2010, [B])

Las moléculas que presentan fluorescencia o fosforescencia generalmente tienen sistemas electrónicos de tipo pi (π), esto es que presenten dobles enlaces en su estructura química, de los cuales destacan los sistemas aromáticos, tales como los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina. La siguiente tabla muestra algunas propiedades de estos.

Tabla 3. Algunos parámetros de fluorescencia para los aminoácidos aromáticos.

Especie	λ EX (nm)	λ EM (nm)	Eficiencia Cuántica*	Tiempo de vida (ns)
Fenilalanina	260	280	0.02	6.8
Tirosina	275	304	0.14	3.6
Triptófano	295	353	0.13	3.1

*Eficiencia cuántica se establece como la fracción de moléculas excitadas que emiten fluorescencia respecto al total de moléculas excitadas, λ , es la longitud de onda, EX, excitación, EM, emisión, ns, nanosegundos.

Dentro de las aplicaciones de la emisión de fluorescencia destacan la elucidación de cinéticas de formación de agregados, predicción cambios conformacionales de la estructura terciaria, imagenología médica, entre otros.

2.6.6. Cristalografía de Rayos X. Estructura terciaria y cuaternaria.

Dentro de las metodologías más robustas para la caracterización de proteínas tenemos a la Cristalografía. Sus bases fueron establecidas por distintos personajes, desde Wiess, Hessel, y Braavis, por sus contribuciones de sistemas cristalinos y grupos espaciales (siglo XIX), hasta Linus Pauling, considerado el padre de la biología molecular y fundador de la química estructural moderna, así como Max Perutz y John Kendrew durante mediados del siglo XX. La técnica consiste en hacer interferir un haz de rayos X sobre una agrupación ordenada y periódica de moléculas idénticas, un cristal propiamente dicho. (Giacovazzo 1992)

2.6.6.1. Química del estado sólido. Conceptos de Simetría

La estructura cristalina está determinada por la periodicidad del arreglo y las características espaciales de los constituyentes, para describirlos cuantitativamente

es necesario establecer medidas angulares y vectores de traslación de puntos o nodos dentro de una red. La simetría concierne al estudio de las propiedades del espacio que son invariantes bajo un grupo dado de transformaciones. (Mendoza et. al., 2015)

2.6.6.2. Celda unitaria y Redes.

La característica primordial de un cristal es su periodicidad, para definirla se usa el concepto red de traslación. Una red se genera sustituyendo los objetos del arreglo periódico por puntos o nodos. La estructura fundamental de esta red que conserva todas sus propiedades y que por operaciones de simetría y traslación reproducen a la red se conoce como celda unitaria y está definida por las magnitudes de sus lados y ángulos (Mendoza et. al., 2015). Ésta puede existir en dos o tres dimensiones.

2.6.6.3. Sistemas y Clases Cristalinos

Los cristales pueden clasificarse en un sistema cristalino a partir del análisis de la simetría de la estructura. Cada sistema está formado por una simetría mínima y una celda unitaria. En 2D existen cuatro sistemas y 3D son siete. Las clases cristalinas hacen referencia a los elementos de simetría, esto es las combinaciones posibles entre el plano de simetría, eje de rotación y centro de inversión, en 3D tenemos 32 clases. Esto viene dado de manera puntal, es decir, sin traslaciones. Si además se agregan vectores de posición surgen las redes de Braavis, donde existen 14 tipos diferentes. (Giacovazzo 1992)

Cuando se conoce el sistema cristalino, la clase y el vector de traslación de una red surge el concepto de grupo espacial, esto es, la descripción más completa de un cristal. Existen 230 grupos espaciales, pero para proteínas, dado que únicamente están formadas en su mayoría por L-aminoácidos, existe un impedimento estérico que restringe a 65 los posibles grupos espaciales. (Wukovitz & Yeates 1995)

2.6.6.4. Formación de un Cristal

El crecimiento cristalino en solución se ha propuesto que sucede en dos etapas: un núcleo cristalino aparece en el seno de aglomerado metaestable de líquido denso de varios cientos de nanómetros (Vekilov, 2010). Cuando el cambio en la energía libre total del sistema presenta un máximo a cierto valor de radio este valor se conoce como radio crítico del núcleo. Posteriormente, la existencia de este fenómeno es indicativo de fluctuaciones en la agregación de partículas por lo que pueden suceder dos cosas, crecimiento o disminución del núcleo.

Los principales modelos del mecanismo de crecimiento son el modelo cinético molecular o VKS (por Volmer, Kossel y Stranski) y el modelo de crecimiento espiral o BCF (por Burton, Cabrera y Frank). El primero propone que en la superficie existen discontinuidades que aportan varios sitios posibles para la ocupación de iones o moléculas. El segundo propone que las dislocaciones helicoidales que emergen a la superficie del cristal son sitios privilegiados de crecimiento. Las partículas adsorbidas en las superficies planas y lisas de las dislocaciones producen la propagación de escalones que se extiende por la superficie del cristal. (Burton et al. 1951)

La solubilidad de una proteína repercute de manera importante en la formación de cristales. Ésta propiedad se ve influenciada por la temperatura, pH, sales, detergentes, disolventes, entre otros, además de los residuos de aminoácidos que estén presentes en la periferia de su estructura. De manera general, para proteínas solubles en agua, los residuos hidrofóbicos (no polares) se encuentran hacia el centro y los residuos hidrofílicos (polares) se orientan hacia la superficie. (Giegé & Mikol, 1989)

El cambio de solubilidad de una proteína en función de concentración de sales (agente precipitante) se describe por la ecuación de Green:

$$\text{Log } C_e = \text{Log } C_0 + k_i (C_s)^{1/2} - k_0 C_s$$

Donde:

C_e es la solubilidad (concentración de proteína en el equilibrio)

C_0 es la solubilidad de la proteína en agua pura

K_i y K_0 , son las constantes de salting-in y salting-out

C_s es la concentración de agente precipitante.

A partir de esta ecuación se puede obtener un diagrama que ubica por zonas las diferentes regiones de existencia de fases en sistemas de dos componentes siendo sólido (proteína) y líquido (solvente). Este diagrama tiene por nombre Ostwald-Miers (García-Ruiz, 2003), y sirve para entender el camino de la cristalización de la mayoría de las moléculas biológicas.

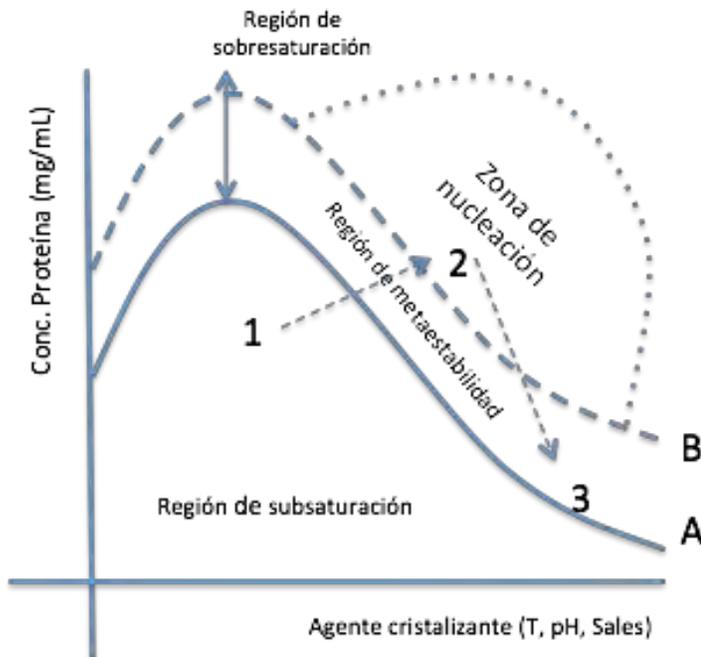


Figura 7. Diagrama de Ostwald-Miers para el estudio de la solubilidad de una proteína con respecto a un agente cristalizante. La curva A, representa la solubilidad de la proteína en determinado disolvente. La curva B, representa el límite de supersolubilidad y delimita a la región de metaestabilidad. La zona de nucleación puede ser paralela a la de metaestabilidad y mucho más pequeña.

A partir de la figura 7, los números representan el camino que se sigue para una proteína cristalice. La proteína primero se encuentra en un entorno soluble (región de subsaturación) posteriormente se busca llevar las condiciones a la región de nucleación en la que se forman núcleos semilla y finalmente el sistema tiende al equilibrio al pasar por la región de metaestabilidad que es donde se propicia el crecimiento de los núcleos por transporte de masa a partir de corrientes convectivas. (Lin et al., 1989)

2.6.6.5. Caracterización Preliminar.

Una vez formado un monocristal de tamaño considerable (≥ 0.03 mm de lado), se debe corroborar que éste es de proteína. Para ello se procede a evaluar la dureza de cristal mediante herramientas de siembra de cristales, generalmente se usan fibras animales. Si el cristal presenta una baja dureza, es decir se fragmenta con poca manipulación, es alta la probabilidad de que sea de proteína. Por otro lado, la retención del colorante azul de metileno también es otra forma de corroborarlo.

Estos fenómenos se deben a que el nivel de empaquetamiento de un cristal de proteína es menor con respecto al de un cristal de sales, de modo que existe una mayor cantidad de moléculas de disolvente presentes por celda unitaria, lo cual genera alta fragilidad y permite la entrada del colorante hacia el interior. (McPherson & Gavira 2014)

La prueba definitiva de que se trata de un cristal de proteína es a través de la generación de un patrón de difracción por incidencia de un haz de rayos X sobre el cristal en condiciones criogénicas (100K) para minimizar la energía cinética de las moléculas y permitir la generación de patrones poco difusos.

El análisis de cristales por rayos X es un método indirecto que permite observar la materia a escala atómica. Este tipo de radiación electromagnética interacciona con la nube electrónica de los átomos del cristal. Cuando alcanza a un electrón cargado, lo pone en un estado excitado que, al retornar a su estado basal, se convierte en una fuente de radiación secundaria que cambia el ángulo incidente en todas

direcciones y esto sucede solo si el espacio entre los dos objetos es igual a la longitud de onda de la radiación incidente. Max Von Laue y su equipo sugirieron en 1912 que los átomos de un cristal están espaciados por una distancia similar a la longitud de onda de los rayos X.

Un patrón de difracción se observa como una disposición regular de puntos sobre un plano, y se genera a partir de la dispersión de los rayos X por las nubes electrónicas que rodean a los átomos de un cristal resultado de la interferencia constructiva y destructiva de las ondas de radiación. La disposición de los puntos resultantes depende de las disposiciones relativas de los átomos del cristal.

El patrón de difracción permite:

- Identificar el cristal (si se conoce su espectro previamente)
- Reconocer simetría del cristal y determinar las dimensiones de su celda unitaria
- Determinar las posiciones de los átomos del cristal, esto es, determinar su estructura tridimensional.

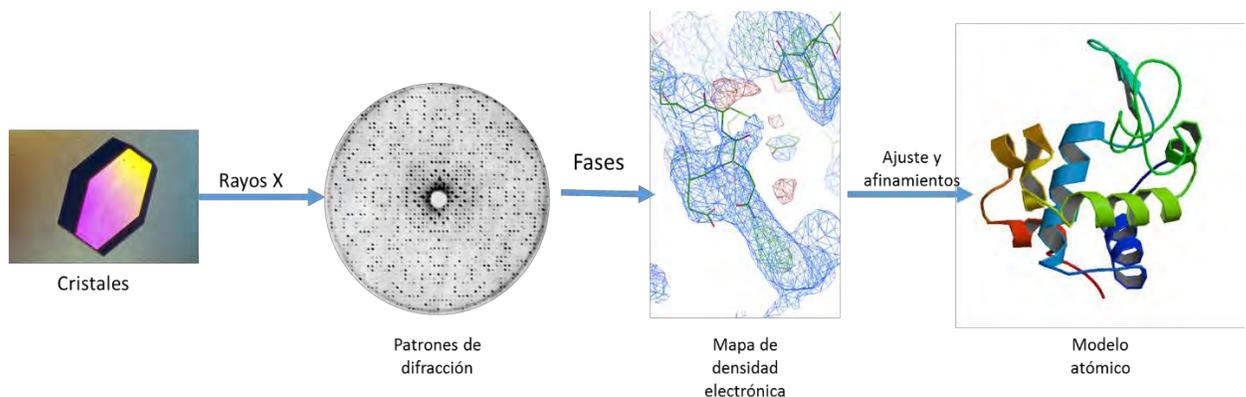


Figura 8. Representación general del proceso para determinar la estructura de una proteína a partir de los datos de difracción de un cristal.

3. Planteamiento del problema

En apego a la reciente regularización en la comercialización de los fármacos biotecnológicos en México, es necesaria una batería de metodologías analíticas, bioquímicas y moleculares que ayuden a demostrar la biocomparabilidad.

4. Justificación

Aunque la industria farmacéutica busca caracterizar sus productos de manera exhaustiva, esto no sucede en el caso de los medicamentos biotecnológicos biocomparables.

En consecuencia, se han documentado efectos adversos en los pacientes que requieren de este tipo de medicamentos, causados probablemente por la falta de estudios rigurosos.

El obtener la mayor cantidad de información sobre un biofármaco que no sea de patente permitiría a éste obtener el grado de biocomparable y con ello establecer las bases sobre una posible intercambiabilidad entre ellos, puesto que se conocen mejor sus propiedades. Además, implica una disminución de los costos para el paciente debido a que aumenta la competencia entre industrias y no prevalece la generación de monopolios farmacéuticos y como resultado, se tiene la seguridad de que el producto está mejor caracterizado y tiene la calidad necesaria para su consumo.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Realizar un análisis de medicamentos biotecnológicos mediante la implementación de un panel de metodologías analíticas con el fin de caracterizarlos fisicoquímicamente y proponer su uso en estudios de biocomparabilidad.

5.2. Objetivos Particulares

Caracterizar tres análogos de insulina de referencia a diferentes niveles estructurales mediante las siguientes metodologías analíticas:

- Electroforesis SDS-PAGE.
- Fluorescencia Intrínseca.
- Dispersión Dinámica de Luz (DLS).
- Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento (CLAR).
- Espectroscopía de masas.
- Cristalogénesis y cristalografía de Rayos X.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. EQUIPOS

- Espectrómetro de Masas: 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer Applied Biosystems MDS Sciex
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Waters Separations Module 2695, Waters Photodiode Array Detector, 220 nm y 280 nm
- Difractómetro de Rayos X: Rigaku, Detector: Raxis IV ++, con flujo de nitrógeno en gas a 100K
- Equipo de Dispersión Dinámica de Luz: Malvern Zetasizer Nano S.
- Fluorímetro: Fluorolog Horiba Jobinyvon con controlador de Temperatura Modelo 350B
- Balanza Analítica Mettler Toledo AB204
- Potenciómetro pH213 microprocessor pH meter HANNA Instruments.
- Microscopio Estereoscópico Olympus S261
- BIO-RAD GS-900 Calibrated Densitometer
- Centrifuga Mini Spinplus Eppendorf
- Sistema de Electroforesis Mini-Protean Tetra System BIO-RAD con fuente de poder BIO-RAD PowerPac
- Micropipetas Eppendor Research Plus 1000,100 y 10 μ L
- Sistema de Purificación de Agua Milli-Q Advantage A10 y Elix Advantage A10
- Termobloque ThermoStat Plus Eppendorf
- Concentrador por vacío Eppendorf 5301.
- Fotodocumentador Gel Doc XR, Bio Rad.

6.2. REACTIVOS

- Agua tipo I (Mili Q) y tipo II (Elix).
- Acetonitrilo grado HPLC, Sigma Aldrich
- Etanol 96%. Grado Reactivo Analítico, CIVQP
- Ácido Trifluoroacético (TFA) 99%, Fluka
- Ácido Acético Glacial. Grado Reactivo Analítico, Reasol
- CHCA: ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, Sigma Aldrich
- Tris Base, Grado Biología Molecular, IBI Scientific
- SDS (dodecil sulfato de sodio), grado biología molecular, solución 10%, Jena Bioscience.
- Buffer de carga 2X Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad
- Buffer de Corrida 10X Tris/Glycine/SDS, Bio-Rad
- TEMED (N, N, N, N' tetrametiletilendiamina), IBI Scientific
- Aceite de inmersión tipo FF, Golden Bell
- Acetato de Sodio Anhídrido. Grado Reactivo Analítico, Sigma-Aldrich
- Bicarbonato de Amonio. Grado Reactivo Analítico, Sigma Aldrich
- 2-mercaptoetanol. Grado biología molecular, Fluka
- Azul brillante de Coomassie R-250 ultrapure. Grado electroforesis, GIBIOBRL.
- Persulfato de Amonio (APS). Grado biología molecular. Bio-Rad
- Glicerol anhídrido. Grado Biología molecular. Applichem
- Enzima Proteasa V8 de Staphylococcus aureus (Glu-C), vial con 10 µg, Promega.

6.3. MUESTRAS. Análogos de insulina.

- Insulina Aspártica Novorapid 100 U/mL (3.5mg/mL) solución inyectable. Novo Nordisk, lote DZF0594
- Insulina Glargina Lantus 100 U/mL (3.63mg/mL) solución inyectable. Sanofi-Aventis, lote 5F183A

- Insulina Lispro Humalog 100 UI/mL (3.5mg/mL) solución inyectable. Lilly, lote 556873.

6.4. MATERIALES

- Placas de poliestireno de tipo Terasaki de 72 pozos de 83.3 x 58 x 10 mm para cristalogénesis por microbatch, Grenier bio-one.
- Placas de Vidrio de Borosilicato para Cristalogénesis de 9 pozos, Pyrex & Corning.
- Jeringas estériles de 5 y 1 mL con aguja, BD plastipak
- Tubos para microcentrifuga de 2 y 1mL, Eppendorf.
- Puntas para micropipeta de 1000,100 y 10 μ L, Eppendorf & Axygen.
- Celdas de cuarzo de 0.5 mL.
- Columna para HPLC tipo C18, dimensiones 150 x 4.6 mm, Varian Pursuit 5
- Unidades de filtración estéril para jeringa de 0.22 μ m PES Membrane Millex GP. Millipore Express.
- Geles de Acrilamida PRECAST de Gradiente de 4-15 %C de 1mm de espesor. Bio-Rad
- Geles de Acrilamida 20 %C de 1mm de espesor.

6.5. KITS

- Crystal Screen Lite 1-96. Hampton Research. No. Cat.: HR2-128
- Salt Rx 1-48. Hampton Research. No. Cat.: HR2-108
- Crystal Screen 1 y 2. Hampton Research No. Cat.: HR2-110 y 112, respectivamente.

6.6. SOFTWARE

- CCP4 suite v.6.5
- PyMOL.Molecular Graphics Systems. Version 1.7.4.5. Educational License
- Protein Pilot v.2 con Paragon Algorithm como motor de búsqueda.
- Spartan '10 v.1.1.0., Wavefunction, Inc.

6.7. METODOLOGÍA

6.7.1. Obtención de las muestras

Las muestras procedieron de farmacias locales, para ello se adquirió un vial para cada análogo (3) que presentaron un volumen de 10mL con una concentración de 3.5mg/mL ó 3.64mg/mL, dependiendo del análogo. Se verificó la apariencia de las muestras de acuerdo a lo que indicaba el marbete. Posteriormente se realizó una toma de alícuotas de 1mL en tubos para microcentrífuga de cada análogo con jeringas estériles de 1mL, conservándose en refrigeración a 4°C hasta su uso.

6.7.2. Integridad y pureza de las muestras

Estos criterios se evaluaron mediante una electroforesis SDS PAGE en geles de poliacrilamida al 20 %T, 2.6 %C con gel concentrador al 5 %T (solución comercial marca Bio-Rad de acrilamida-bisacrilamida 30 %T, TRIS 1.5M pH 8.8, SDS 10%, APS al 10% y 4uL de TEMED como catalizador de la polimerización) de 1 mm de espesor, así como en geles de poliacrilamida de gradiente tipo PRECAST de 4-15 %T marca Bio-Rad. A partir de la concentración indicada en el marbete se cargaron por duplicado 20 µg de cada análogo, 5 µg de marcador de peso molecular de 250kDa a 10 kDa tipo Kaleidoscope Bio-Rad y 5 µg de marcador de bajo peso molecular: Polypeptide SDS-PAGE de 26.6 kDa a 1.4KDa marca Bio-Rad. El volumen variable de cada muestra se diluyó en proporción 1:1 con buffer de carga Laemmli 2X marca Bio-Rad y se corrieron muestras con y sin β-mercaptoetanol (agente reductor).

La electroforesis se realizó utilizando 1L de buffer de corrida 1X marca Bio-Rad (25mM Tris, 192mM Glicina, 0.1% w/v SDS, pH 8.3) en una cámara electroforética Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad) a un voltaje inicial de 80 Volts/15 minutos y posteriormente 200 Volts/35 min sobre una cama de hielo.

A continuación, se tiñeron los geles con una solución de azul de Coomassie R-250 base etanol caliente (0.1% m/v Azul de Coomassie r-250, 10% v/v ácido acético, 40%

v/v etanol, 50% v/v Agua tipo I) por una hora con lavados subsecuentes de agua tipo I.

Concluido la electroforesis, se escanearon los geles resultantes con fotodocumentador Gel Doc XR, Bio Rad, y partir de las imágenes generadas se midió el frente de corrida (Rf) para cada banda y se aproximó la masa respecto al marcador de peso molecular. Posteriormente se cortó cada banda para un análisis posterior por espectrometría de masas, conservándose en tubos para microcentrífuga a 4°C.

6.7.3. Determinación del perfil cromatográfico y perfil de digestión enzimática.

Se determinó el perfil cromatográfico por triplicado para cada análogo utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) en un equipo Waters Separations Module 2695 con un detector UV de arreglo de diodos tipo Waters Photodiode Array Detector.

Condiciones de Corrida. Fase Reversa

- Buffer A: Agua grado HPLC + 0.1% de TFA
- Buffer B: Acetonitrilo grado HPLC + 0.1% de TFA
- Columna: C18 Varian Pursuit 5 150x4.6 mm
- Volumen de inyección: 20 µL
- Flujo: 0.5 mL/ min
- Presión ≈ 600 psi

Tiempo (min)	% de A	% de B	Longitudes de onda:	
5	95	5	220	nm

25	5	95	280	nm
30	0	100		
32	95	5		

Tabla 3. Gradiente utilizado para el enriquecimiento de los análogos.

Posteriormente se colectaron los picos observados de manera manual en tubos para microcentrífuga de 1mL y se les evaporó la fase orgánica utilizando un concentrador Eppendorf Concentrator 5301, almacenándose a 4 °C para su posterior análisis.

6.7.4. Digestión enzimática en solución.

Se procedió a digerir cada análogo con la enzima de tipo proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (Glu-C) de la empresa Promega para determinar su huella peptídica por CLAR. Para ello, la enzima se reconstituyó en 1000 μL de buffer de bicarbonato de amonio 100mM (se preparó una solución de 10 mL, 0.0791g de Bicarbonato de amonio, pH 8) para llegar a una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente se procedió como indica la siguiente tabla.

Tabla 4. Condiciones para la digestión enzimática de los análogos de insulina.

Análogo	Aspart	Glargina	Lispro
Concentración (mg/mL)	3.50	3.63	3.50
Relación enzima/ muestra	1/100	1/100	1/100
volumen de enzima (μL)	175	181.5	175
volumen de muestra (μL)	50	50	50
volumen de buffer (μL)	22.5	23.1	22.5
vol total (μL)	247.5	254.6	247.5
pH final	8	8	8

La reacción se incubó por aproximadamente 15 horas a 37°C y se detuvo ajustándola a pH ácido (≈ 3) con ácido acético 5% (c.b.p.)

Subsecuentemente se realizaron inyecciones de 20 μL por triplicado de cada análogo en el cromatógrafo de líquidos utilizándose las mismas condiciones de corrida descritas en el apartado 6.7.3. Adicionalmente se analizó un blanco con fase móvil (50A:50B) + 5 μL de enzima Glu-C.

6.7.5. Determinación de perfil de decaimiento tridimensional. Fluorescencia Intrínseca.

Para cada uno de los tres análogos se midió la fluorescencia intrínseca emitida por los residuos de aminoácidos aromáticos mediante un equipo Fluorolog Horiba Jobinyvon con controlador de Temperatura Modelo 350B (Fluorímetro). Se tomó un volumen de 500 μL (concentración de 3.64 ó 3.5 mg/mL, dependiendo del análogo) a partir de una alícuota de cada análogo y se colocó en una celda de cuarzo de 0.5 mL, procurando evitar la formación de burbujas. Adicionalmente se restó la fluorescencia emitida por el disolvente (agua tipo I) puesto que el equipo no permite la lectura de un blanco.

Condiciones de corrida:

- Temperaturas de lectura: 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 42°C, 44°C, 46°C, 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C.
- λ de excitación: 280 nm
- Intervalo de λ de colecta: 300 nm – 410 nm.

Una vez obtenidos los resultados, se les hizo el ajuste matemático pertinente para establecer el mejor modelo matemático que ajustara con el fenómeno observado, usando el máximo de emisión para el residuo de tirosina (304 nm).

6.7.6. Determinación del radio hidrodinámico y agregados. Dispersión Dinámica de Luz.

A partir de un equipo de dispersión dinámica de luz Malvern Zetasizer Nano S, se determinó el radio hidrodinámico de los tres análogos, tomando un volumen de 500 μL ((concentración de 3.64 o 3.5 mg/mL, dependiendo del análogo) de cada uno y trasvasándose a una celda de cuarzo especial para este equipo, con previo lavado de la celda con agua tipo I entre lecturas.

Condiciones de corrida:

- Temperatura de lectura: 25 °C
- Tiempo de equilibrio: 5 min
- Dispersante: Agua. Viscosidad: 0.8872 cP. Índice de Refracción: 1.330
- Tipo de muestra: Proteína. Índice de Refracción: 1.450
- Número de lecturas: Tres por análogo.

Se registraron los valores de radio hidrodinámico por triplicado y se hizo un promedio. Adicionalmente se aproximó la masa molecular por interpolación mediante una curva de calibración interna precargada en el software de análisis, construida a partir de estándares de radio hidrodinámico conocido con tamaño molecular conocido. Su valor sirvió para aproximar el tipo de agregados presentes en solución.

6.7.7. Determinación identidad por masa intacta. Espectroscopia de masas.

El siguiente procedimiento se planteó para la identificación de péptidos generados por digestión enzimática. Se procedió desde el punto 6 debido a que únicamente se cuentan con resultados de masa intacta y aplica para cada banda observada en los geles SDS-PAGE. Sin embargo, puede adaptarse para proteínas en solución.

Soluciones previas

- Solución A: Bicarbonato de Amonio 50 mM, disuelto en una solución de ACN, grado HPLC al 50%, la cual permite remover al colorante azul de Coomasie.
- Solución B: Bicarbonato de Amonio 50 mM, disuelto en agua grado HPLC
- Solución C: Bicarbonato de Amonio 50 mM, disuelto en ACN 10% grado HPLC
- Solución D: Acido Fórmico 5%v/v disuelto en ACN 50%.
- Solución DTT: Solución de Ditiotretitol 100mM, disuelto en solución de bicarbonato de amonio 50 mM. Su función es de agente reductor de residuos de cisteína.
- Solución I: solución de Iodoacetamida 100mM, disuelto en solución de bicarbonato de amonio 50 mM. Su función es de agente alquilante de puentes disulfuro.

- Solución Dig: Solución de la Enzima Glu-C, suspendida en agua tipo I (Milli-Q) a 20 µg/mL
- Solución L: TFA 0.1% v/v, en agua Grado HPLC (lavado)
- Solución E: ACN 50%, TFA 0.1%, en agua grado HPLC (elución).
- Solución M: Solución de CHCA 10mg/mL disuelto en TFA 0.1% (matriz), sonicar hasta observar disolución completa.

Procedimiento

1. Se corta la banda de interés con un bisturí limpio, libre de cualquier traza de posible contaminante. Se tritura el fragmento cortado y se coloca en un tubo para microcentrífuga.
2. Se realizan ciclos de enjuague con la solución A, a 50°C en agitación durante 5 min hasta observar transparencia completa.
3. Se agrega ACN 100% grado HPLC para secar la muestra y posteriormente se retira el disolvente, dejando evaporar el remanente a T.A.
4. Agregar 30 µL de Solución DDT, dejando incubar 30 min a T.A., retirando dicha solución pasado el tiempo de incubación
5. Agregar 30 µL de Solución I, dejando incubar 30 min a T.A., retirando dicha solución pasado el tiempo de incubación
6. Repetir paso 3, seguido de un ciclo de enjuague con solución B, y nuevamente repetir paso 3.
7. Agregar 10-20µL de solución Dig, retirando el exceso si es necesario y agregar 20 µL de solución C y dejar incubar 12 horas a 37°C. (únicamente si aplica el usar o no enzima de digestión)
8. Terminado el tiempo de incubación agregar 20 µL de solución B y agitar por 10 min.
9. Centrifugar a 1000 rpm, 2 min y recolectar el sobrenadante.
10. Agregar 20µL de solución D.
11. Reducir volumen de trabajo hasta 10µL en un equipo Concentrador por vacío Eppendorf 5301 o similar.

12. Repetir 3 ciclos desde el paso 8 al 11.
13. A partir de este volumen final $\approx 10\mu\text{L}$, con una columna cromatográfica C-18 tipo ZipTIP marca Millipore, equilibrada previamente con 3 lavados de ACN 100% y 3 lavados de TFA 0.1% v/v con agua Milli-Q, se hace una toma del mismo volumen 8 veces para asegurar la retención de los péptidos.
14. Se procede al lavado de la muestra con solución L, 3 veces.
15. Se procede a la elución de la muestra con solución E, 1 vez.

El procesamiento de la muestra para llevar a cabo el experimento de determinación de Masa Intacta (o de los péptidos generados) fue mediante el equipo 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer Applied Biosystems, MDS Sciex equipado con un láser Nd: YAG a 355 nm usando el software 4000 Series Explorer versión 3.5.3. El instrumento se operó en modo de ion positivo, y se calibró de manera interna usando un digerido peptídico estandarizado de la enzima Beta-galactosidasa de *Escherichia coli*. La potencia del láser se ajustó hasta alcanzar 10^4 cuentas con una energía de colisión de 2 kV.

La identificación de los péptidos y las proteínas se realizó mediante el software Protein Pilot versión 2.0 (AB Sciex) usando el algoritmo de Paragon como motor de búsqueda.

6.7.8. Determinación de estructura de orden superior. Cristalogénesis y Cristalografía de Rayos X.

Para poder determinar la estructura de orden superior de los análogos por medio de cristalografía de rayos X se necesitan monocristales. Para ello se procedió a buscar la condición óptima de cristalización mediante placas de poliestireno de tipo Terasaki de 72 pozos de 83.3 x 58 x 10 mm (microbatch). En cada uno se procedió a colocar gotas de 4 μL a partir de diferentes kits para cristalización de proteínas de Hampton Research. En cada pozo se colocaron 2 μL del medicamento y 2 μL de agente precipitante (relación 1:1) y se sellaron con 20 μL de aceite de inmersión.

Los kits utilizados tienen por número de catálogo HR2-112, HR2-108, HR2-128, Hampton Research, donde se puede conocer a detalle sus características en el ANEXO I. Se procedió a evaluar la formación de cristales a las 2 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas a temperatura ambiente (22°C) y a 4°C, donde se seleccionaron los cristales que cumplieran mejor los criterios de fragilidad, tamaño y retención del colorante azul de metileno. Se continuó con la optimización del tamaño de estos mediante variación de las proporciones de proteína y agente precipitante, además de técnicas como macroseeding, acupuntura en geles y sembrado en placas de difusión en fase vapor.

Los cristales candidatos se llevaron al Instituto de Química de la UNAM para su análisis mediante difracción de rayos X en el Laboratorio Nacional de Estructura de Proteínas utilizando un Difractómetro de Rayos X Rigaku con un detector RAXIS IV ++, con un flujo de nitrógeno en gas para enfriar los cristales a una temperatura de 100K. La fuente de rayos X procedió de un ánodo rotatorio tipo Cu- κ - α con una longitud de onda de 1.5418 Å, a una distancia del cristal con respecto al detector de 100 mm.

Los cristales fueron previamente sumergidos en un crioprotector de glicerol al 30% v/v para el análogo Glargina, solución de sulfato de litio sobresaturada (4 M) para la

insulina Aspart, y solución de formiato de sodio con 10 % de glicerol para la insulina Lispro.

Estas fueron preparadas con respecto a la condición de agente precipitante candidata para evitar la formación de cristales de hielo. Posteriormente se hizo la colecta de dos patrones de difracción considerando un ángulo de giro del cristal de 90° para cada uno a modo de obtener el grupo espacial del cristal y generar la estrategia de colecta pertinente para obtener patrones de difracción suficientes para proceder a la resolución de la estructura de los análogos.

6.7.9. Resolución de la estructura tridimensional de los análogos de insulina a partir de los resultados de difracción de rayos X.

Una vez se recolectaron los datos, se procedió mediante el siguiente algoritmo general de trabajo mediante software bioinformático para el tratamiento de los datos:

(NOTA: Este procedimiento varía, dependiendo del grupo espacial del cristal, el número de moléculas en la unidad asimétrica, la masa molecular de la proteína, y otros factores que se omiten por cuestiones prácticas de simplicidad para la explicación del algoritmo de trabajo)

1. A partir del software CCP4 v6.5.019 se abre la rutina “iMosflm” y se seleccionan las imágenes procedentes de la colecta de los patrones de difracción.
2. Se realiza un primer indizado con cuatro imágenes, preferentemente una por cada 45° de giro. Se selecciona la solución (grupo espacial) de mayor simetría y menor número penalizaciones
3. Se procede al refinamiento de las dimensiones de la celda unitaria, dejando fija la distancia del detector, rayo Y, y escala en Y.
4. Se asigna un nombre para el archivo con extensión “. mtz”, se excluye el procesamiento de anillos de hielo y el tratamiento para datos anómalos.
5. Se procede con la integración de las imágenes en un solo archivo con extensión “. mtz”

6. Se corre la rutina Matthews para estimar el número de moléculas en la unidad asimétrica a partir de la masa molecular de la proteína. Este dato funciona para un paso posterior.
7. Se cierra la rutina iMosflm y se abre la rutina Scala, que permite una integración de las intensidades de los puntos observados.
8. Se selecciona el archivo mtz de entrada, (generado por iMosflm) y se asigna un nombre al archivo de salida.
9. Posteriormente se corre la rutina y se espera que finalice.
10. Se abre la rutina "truncate", el cual convierte las intensidades en factores de estructura y se asigna el número de moléculas en la unidad asimétrica, calculado en el paso 6.
11. Se crean las fases a partir de SAD, MAD, o remplazo molecular (MR), en este caso se realizan por MR mediante la rutina "phaser_MR" y se generan dos archivos iniciales: un ".pdb" (las coordenadas de nuestra proteína) y otro ".mtz", el cual contiene los datos índices de Miller (h,k,l, coordenadas en el espacio recíproco de las intensidades del cristal) y factores de estructura (F, sigma de F) que mediante el cálculo del inverso de la transformada de Fourier, permite generar mapas de densidad electrónica.
12. Se corre un primer afinamiento de las fases generadas por el reemplazo molecular (phaser_MR) con la rutina Refmac5, se asignan como archivos de entrada el '. mtz' y el '.pdb' generado en el paso 11 y se asigna nombre a los archivos de salida. Subsecuentemente se establece un afinamiento de cuerpo rígido (suave) y se establecen de 5 a 10 ciclos de afinamiento iniciales.
13. Se abre el programa WinCoot 0.8.2 y se abre el archivo ".pdb" generado por Refmac5 y el archivo ". mtz". Se debe observar un solapamiento de la estructura de la proteína sobre la nube de densidad electrónica. Posteriormente se asigna diferencia en "sigmas" de uno para el mapa de densidad y una de 2.5 para el mapa de diferencias.
14. Se procede a realizar asignaciones de la posición del modelo dentro de nube de densidad electrónica y se generan pasos subsecuentes de afinamiento

(rutina Refmac) hasta alcanzar un valor de R y R free ≤ 0.25 . (ver el pdb generado después de cada ciclo de afinamiento) y se guarda el archivo pdb final.

15. Se procede de manera similar para cada análogo considerando previamente las posibles variables, como tamaño de celda, grupo espacial, coeficiente de Matthews, peso molecular, número de reflexiones, entre otros, el procedimiento se verá modificado en función de éstas y más variables.

7. RESULTADOS

Se muestran a continuación los resultados provenientes de la implementación de las metodologías, su interpretación y descripción detallada se muestra en el apartado de Discusión de Resultados (ver más adelante).

7.1. Monitoreo de pureza e integridad de las muestras

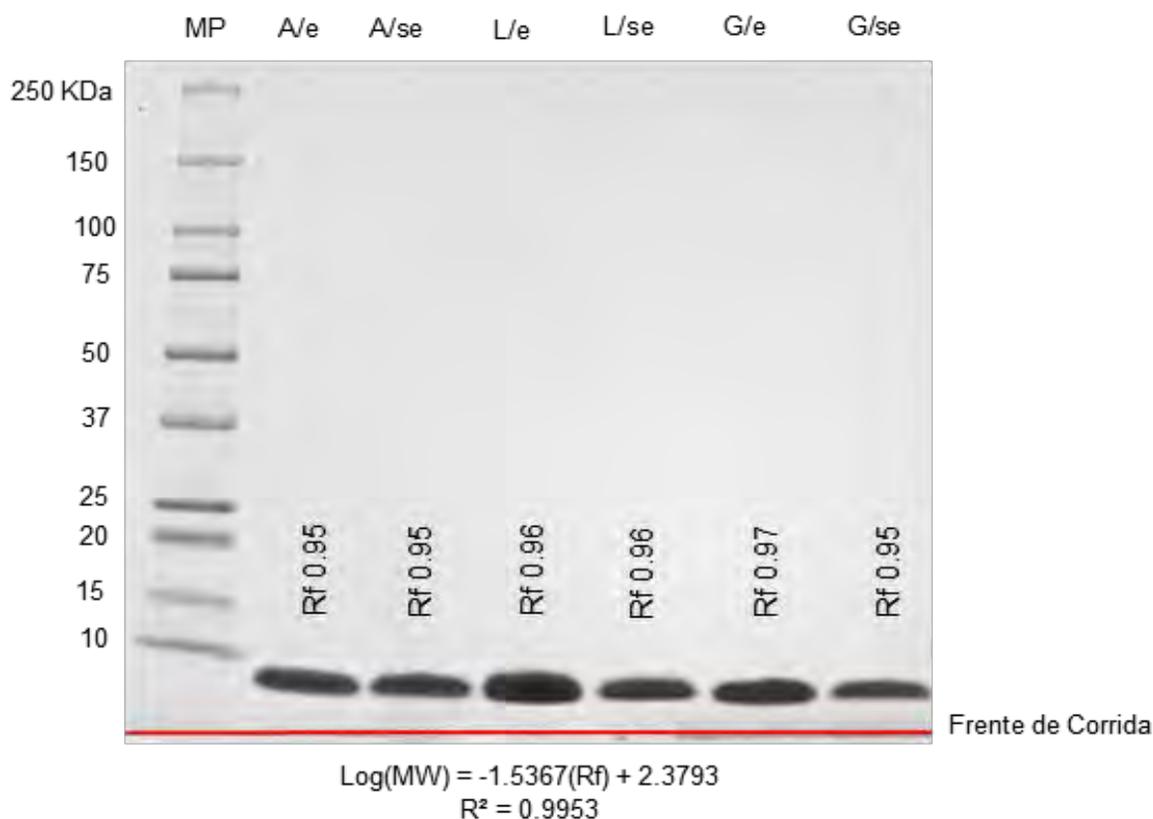


Figura 8. Gel de gradiente 4-15% SDS-PAGE en ausencia de condiciones reductoras. Cantidad cargada 20 μg . Las muestras sin excipiente se sometieron a una remoción de estos mediante CLAR en fase reversa, comprobándose así su integridad con esa otra técnica, para las muestras con excipiente únicamente se calculó una cantidad de 20 μg a partir de lo indicado en el marbete de cada análogo y de igual manera se observa integridad y pureza de los medicamentos. De izquierda a derecha: Aspart con excipiente (A/e), Aspart sin excipiente (A/se), Lispro con excipiente (L/e), Lispro sin excipiente (L/se), Glargina con excipiente (G/e), Glargina sin excipiente (G/se). Además, se muestra la ecuación para estimar la masa molecular de cada banda.

7.2. Resultados de remoción de excipientes y huella peptídica por HPLC. Se estableció un gradiente de elución de 95% de Buffer A y 5% de Buffer B, ambos con 0.1%v/v de TFA y se ajustó la lectura de absorbancia a 280nm.

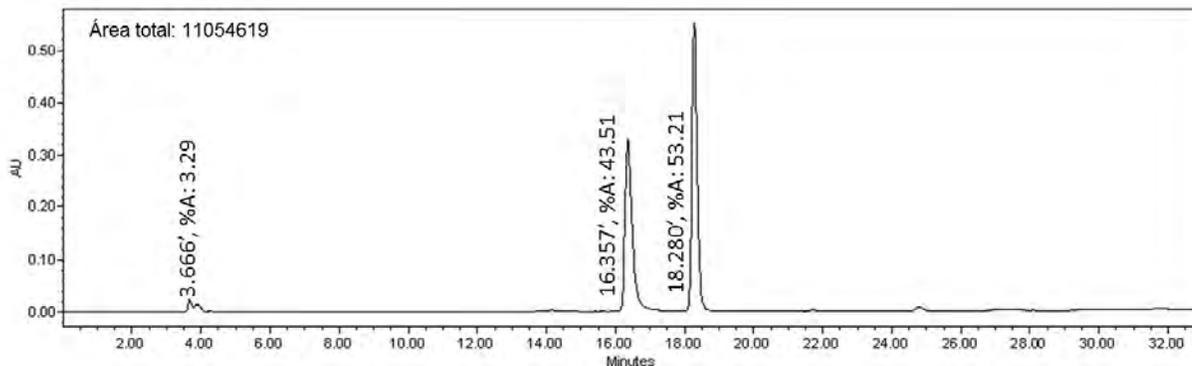
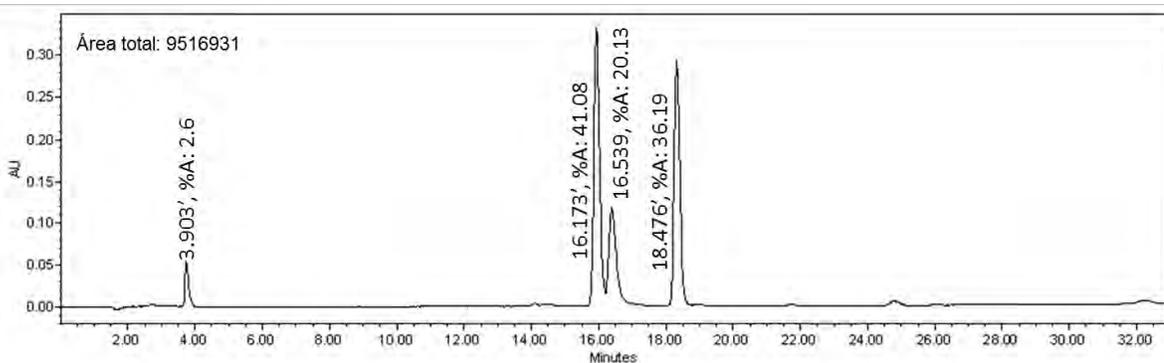


Figura 9. Cromatograma representativo de la elución del análogo Glargina. Se observan dos picos principales. El primer pico eluye a un tiempo de retención de 16.36 min, y el segundo pico corresponde a los excipientes, eluyendo a un tiempo de 18.28 min, %A, porcentaje de área del pico. Volumen de inyección 20 μ L (72.6 μ g)



μ g

Figura 10. Cromatograma representativo del análogo Aspart. Se observan tres picos principales (a partir de Tr =16 min) donde el primer pico eluye a un tiempo de retención de 16.17 min, el segundo pico a 16.54 min y el tercer pico a 18.48 min, los últimos dos corresponden a los excipientes, %A, porcentaje de área del pico. Volumen de inyección 20 μ L (70 μ g)

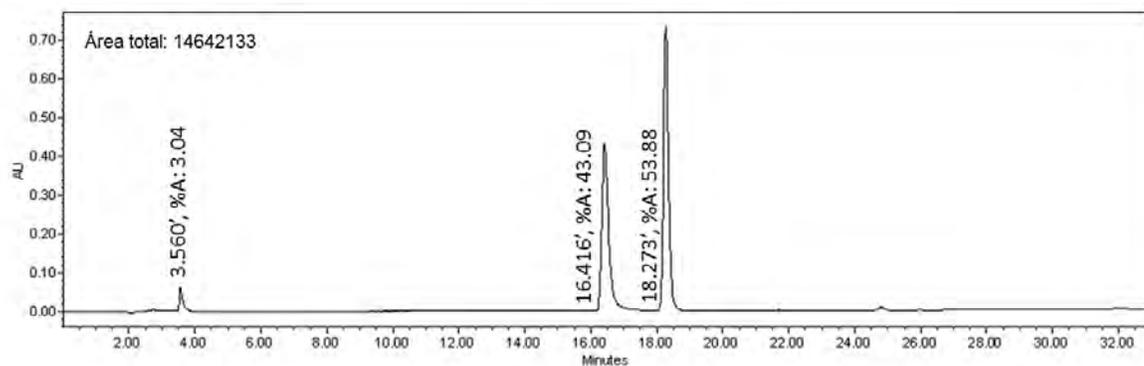


Figura 11. Cromatograma representativo del análogo Lispro. Se observan dos picos principales donde el primer pico eluye a un tiempo de retención de 16.42 min, el segundo pico a 18.27 min. Éste último corresponde a los excipientes, %A, porcentaje de área del pico. Volumen de inyección 20 μ L (70 μ g)

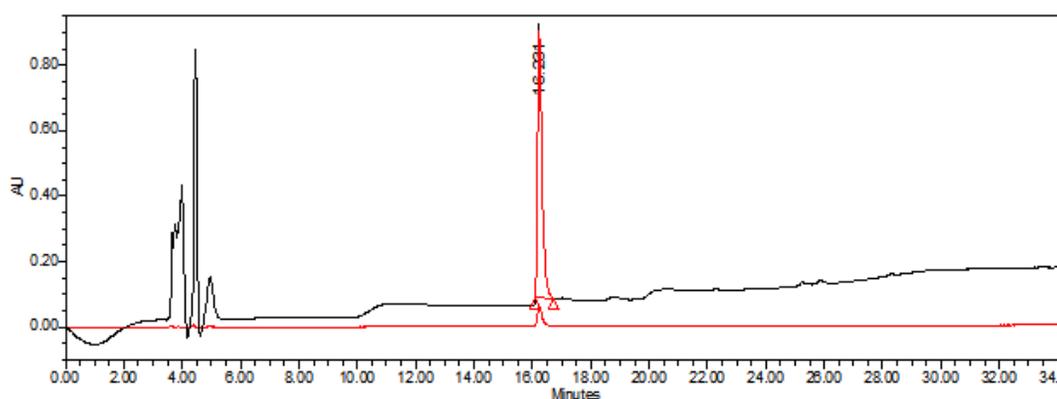


Figura 11B. Blanco de reactivos. El pico observado a los 16.23 min corresponde a la enzima de digestión (0.05 μ g enzima). En negro se observa 220 nm y en rojo a 280 nm.

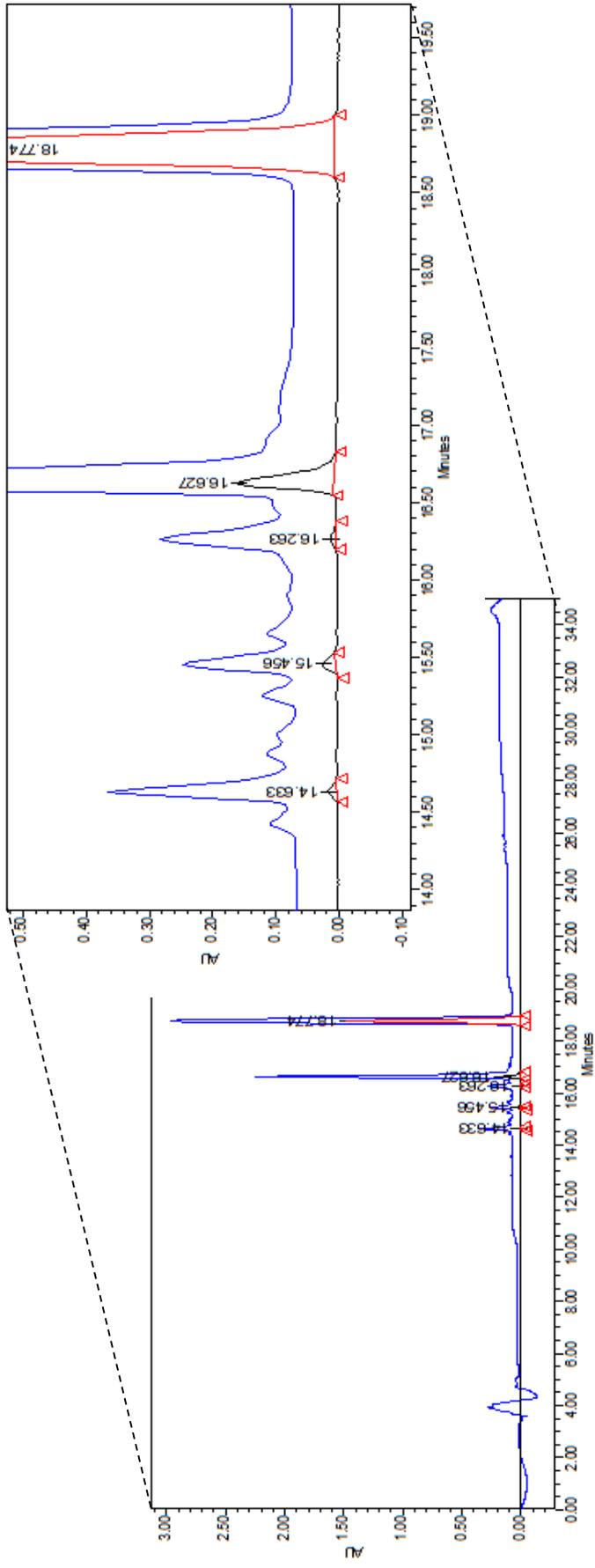


Figura 12. Cromatograma representativo de digestión de Glargina. Se observan 5 picos predominantes donde el último pico corresponde a excipiente (rojo) junto con un acercamiento de la zona del cromatograma de los cinco picos predominantes para la digestión enzimática para Glargina. Se sobrelapan dos cromatogramas, uno tomado a 280 nm (negro) y otro tomado a 220 nm (azul) Cantidad de muestra analizada : 14.26 µg, cantidad de enzima 0.142.µg.

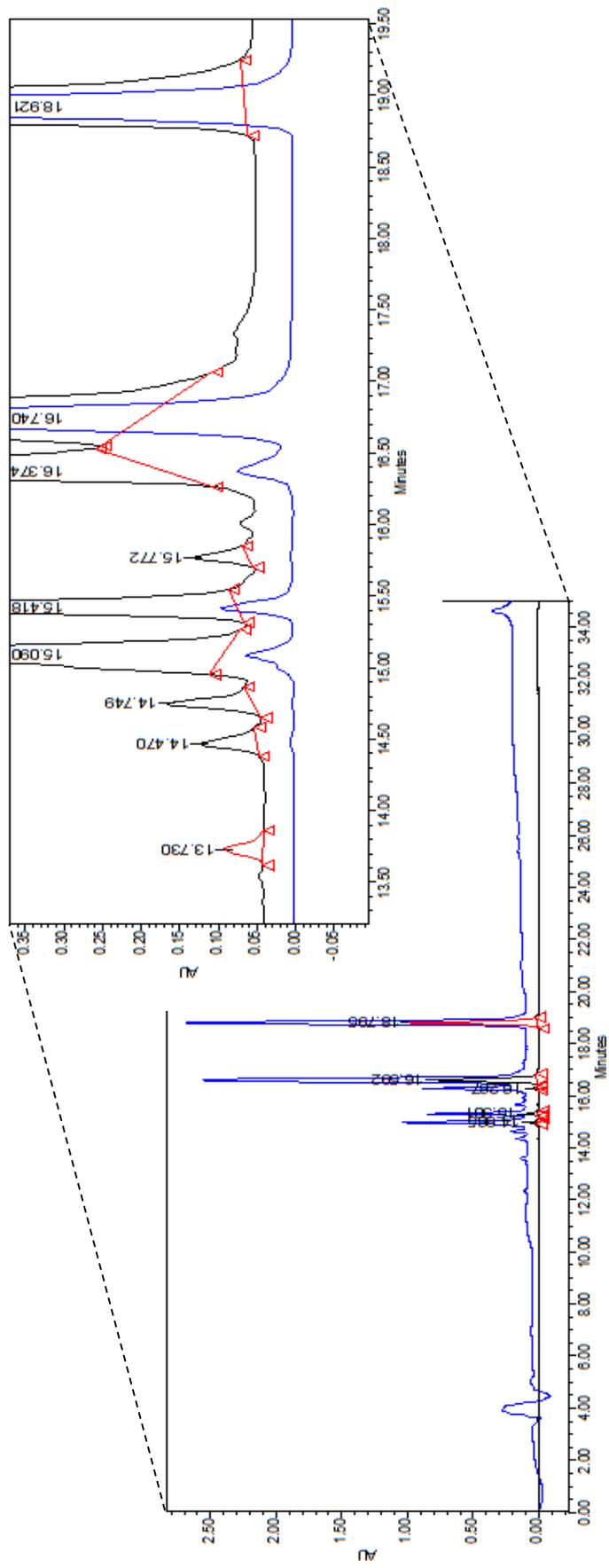


Figura 13. Cromatograma representativo de la digestión del análogo Aspart donde se observan al menos 9 picos. También se muestra un acercamiento de la zona y además se sobrelapan dos cromatogramas, uno tomado a 280 nm (azul) y otro tomado a 220 nm (negro). Cantidad de muestra analizada: 14.14µg, enzima 0.141µg.

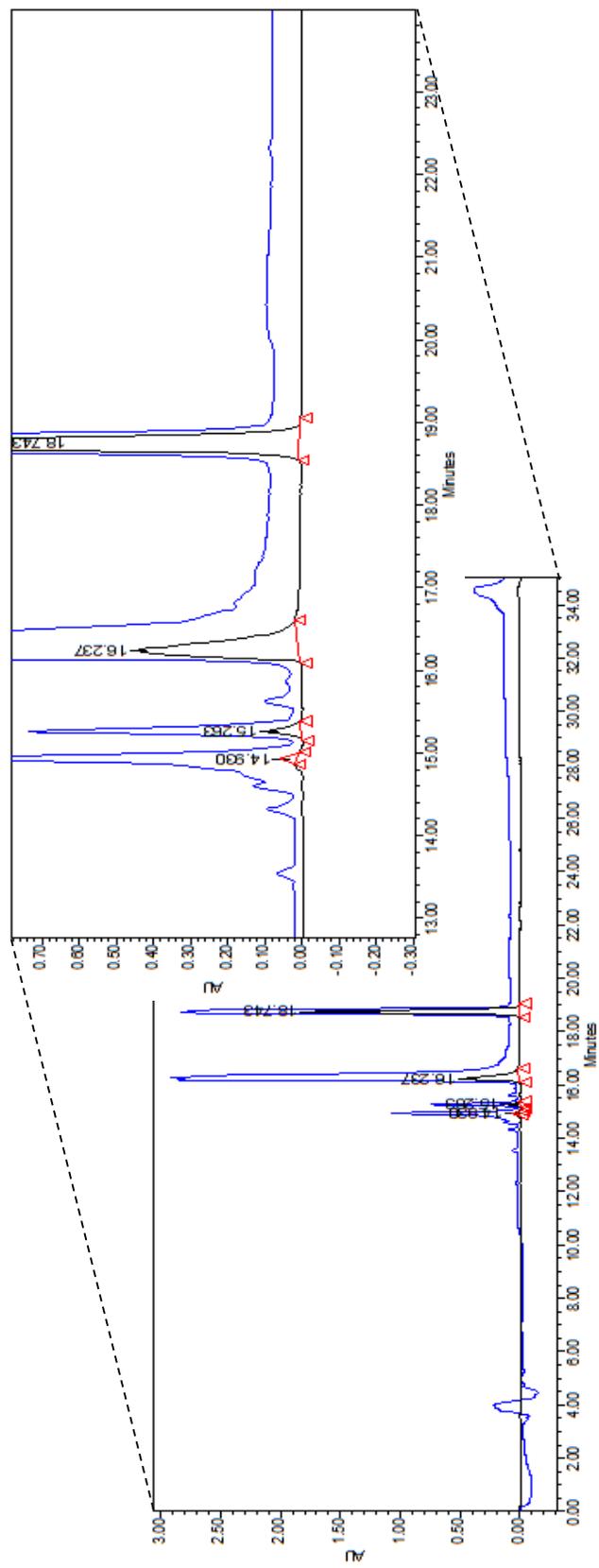


Figura 14. Cromatograma representativo de la digestión del análogo Lispro. Se observan al 4 picos. De igual manera se muestra un acercamiento de la zona y además se sobrelapan dos cromatogramas, uno tomado a 280 nm (negro) y otro tomado a 220 nm (azul). Cantidad de muestra analizada 14.14µg, enzima, 0.141µg.

7.4. Resultados de Fluorescencia Intrínseca

A continuación, se muestra los resultados de los experimentos de fluorescencia intrínseca para los tres análogos. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm que corresponde a la media de excitación de los residuos aromáticos, tales como triptófano, tirosina y fenilalanina. Para ver los patrones de emisión de 300-410 nm para cada análogo, véase el ANEXO II.

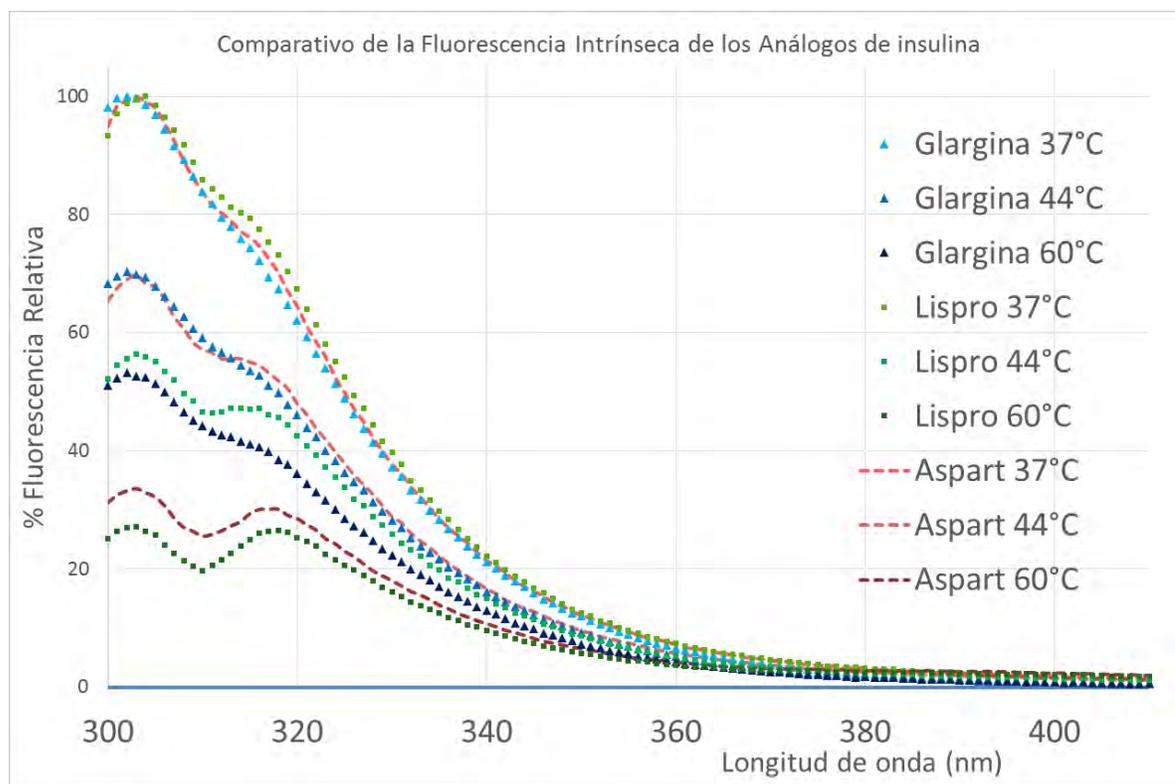


Figura 17. Comparación de la emisión de fluorescencia intrínseca (y relativa) en el intervalo de emisión de 300-410 nm entre los tres análogos de insulina, donde las curvas en azul corresponden a Glargina, verde para Lispro y rojo para Aspart. Se observó que el análogo Lispro tuvo un mayor apagamiento de la fluorescencia a 60°C. Cantidad de muestra analizada: 1750 µg por análogo.

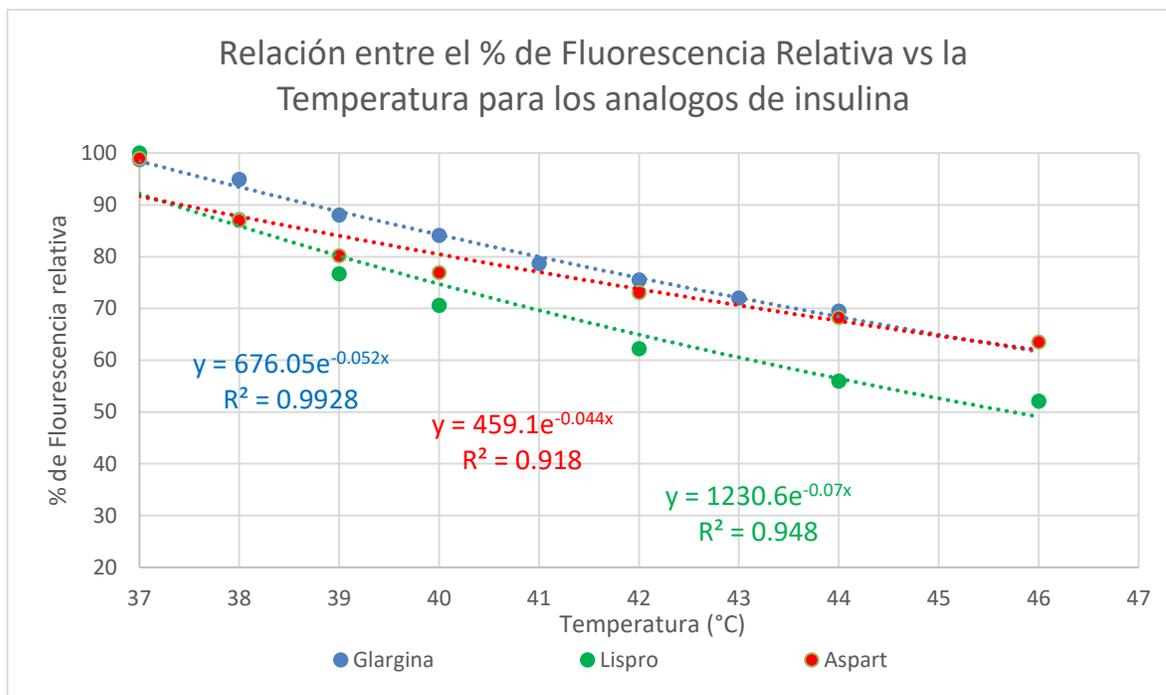


Figura 18. Comparación del comportamiento del % de Fluorescencia en función de la temperatura para los tres análogos de insulina a la longitud de onda de máxima emisión (280 nm). Se observa que la curva que mejor se ajusta es de tendencia exponencial y el análogo Lispro (verde) tuvo la pendiente de menor valor, lo que sugiere una mayor labilidad térmica.

7.5. Resultados de Espectrometría de Masas.

Tabla 6. Resultados de Masa Intacta para los análogos de insulina generados por MALDI/TOF.

Análogo	Masa experimental (Da)	Masa Reportada (Da)*	Error Relativo (%)
Aspart	5826.1221 ± 0.30	5825.8	0.0055
Glargina	6063.9721 ± 0.76	6063.0	0.0160
Lispro	5807.5245 ± 0.91	5808.0	0.0082

*Datos tomados de Drugbank database. Accession Number: DB01306, DB00047, DB00046, respectivamente.

Los espectrogramas de masas se encuentran en el **ANEXO IV**.

7.6. Resultados de Cristalogenésis.

A continuación, se muestra la siguiente tabla que resume las condiciones de cristalogenésis.

Tabla 7. Resultados de la cristalización de los análogos de insulina para difracción por rayos X.

Biofármaco	Condición*	Temperatura de crecimiento (°C)	Fragilidad*	Retención de colorante azul de metileno	Relación Biofármaco: Agente precipitante	Crioprotector*
Glargina	HR2-108, Salt Rx # 20: 0.7M Citrato de sodio tribásico dihidratado 0.1M TRIS pH= 8.5	4, 22	+++	sí	(1:1)	X + Glicerol 30%
Glargina	HR2-110, Cristal Screen # 31: 0.2M Sulfato de Amonio, 30% w/v Polietilenglicol 4,000	22	-	no	(1:1)	N.A.
Aspart	HR2-128, Cristal Screen Lite # 16: 0.1M HEPES Sódico, 0.75M Li ₂ SO ₄ *H ₂ O pH=7.5	4,22	+++	sí	(1:1)	X+ Li ₂ SO ₄ 3.64M
Aspart	HR2-108, Salt Rx # 82: Tartrato de amonio dibásico pH= 4.6	22	-	no	(1:1)	N.A.
Lispro	HR2-128, Cristal Screen Lite # 29: 0.1M HEPES Sódico, 0.4M Tartrato potásico de sodio tetrahidratado	4,22	+++	sí	(1:1)	X + Na ⁺ COO ⁻ + 10%Glicerol
Lispro	HR2-108, Salt Rx # 82: Tartrato de amonio dibásico pH= 4.6	22	+	no	(1:1)	N.A.

*: Se muestran resultados más representativos, en primer lugar, para cada análogo y un resultado de posibles variantes. X representa que el crioprotector se formuló con la condición indicada, % v/v, N.A., no aplica, signo (+), representa nivel de fragilidad, signo (-) representa ausencia de fragilidad.



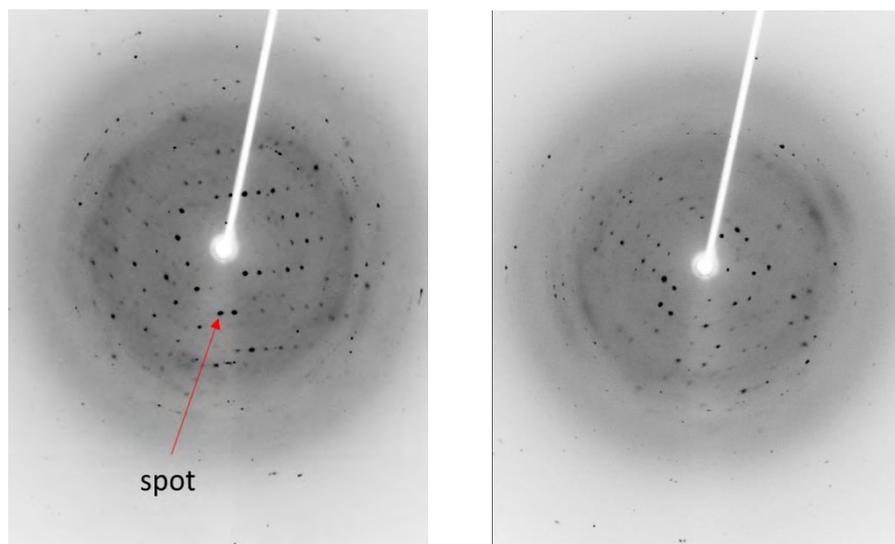
Figura 19. Campo al microscopio (40X) de un pocillo donde crecieron cristales del análogo Aspart, a temperatura ambiente. Se observa la presencia de maclas y monocristales, los cuales son ideales para difracción por rayos X.



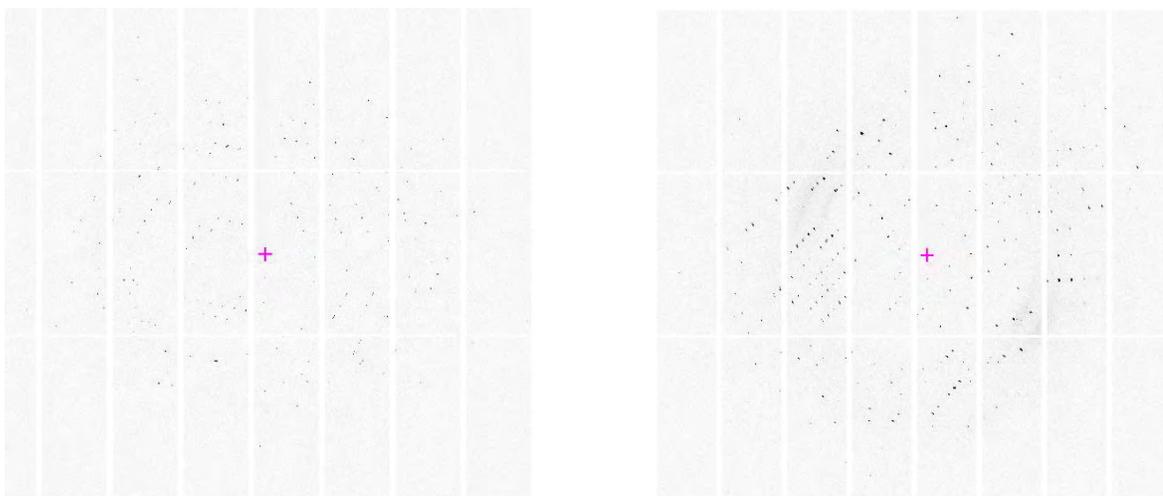
Figura 20. Campo al microscopio (40X) de un capilar donde crecieron cristales del análogo Glargina, a temperatura ambiente. Se observa la presencia de monocristales creciendo sobre una fibra contaminante.

7.7. Resultados de Cristalografía de Rayos X.

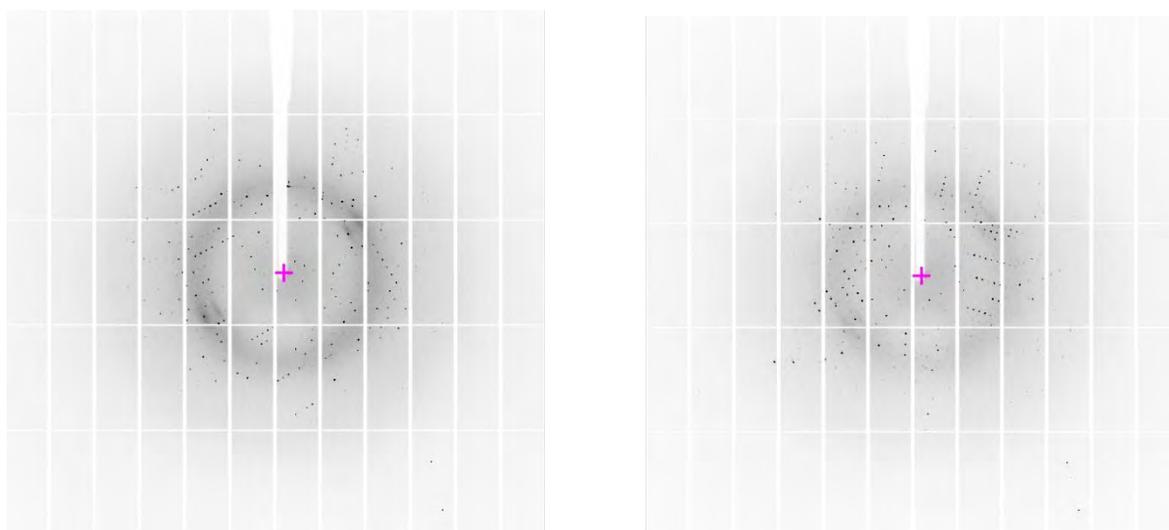
A continuación, se muestran algunas imágenes de los patrones de difracción de rayos X generados para cada análogo debido a que una colecta completa de cada cristal puede alcanzar más de 300 imágenes. Además, se muestran los parámetros de la celda unitaria, así como la asignación de su grupo espacial.



Figuras 21 y 22. Patrón de difracción por rayos X del análogo Aspart a 0° y 90° de giro, con una fuente de rayos de X de ánodo rotatorio. Cada mancha negra se conoce como reflexión o spot, originado por interferencia constructiva de las ondas difractadas por las nubes electrónicas de los átomos.



Figuras 23 y 24. Patrón de difracción por rayos X del análogo Glargina generado a partir de radiación de sincrotrón, a 0° y 90° de giro. La cruz rosa muestra el centro del patrón y las líneas blancas se deben a las características del detector.



Figuras 25 y 26. Patrón de difracción por rayos X del análogo Lispro generado a partir de radiación de sincrotrón, a 0° y 90° de giro. Se observan una menor intensidad en las reflexiones, este fenómeno es inherente a cada cristal y puede representar un decaimiento por radiación.

Tabla 8. Resultados de la asignación de grupo espacial a partir de los patrones de difracción por rayos X.

Análogo	Dimensiones de la celda unitaria (a, b, c, α, β, γ)	Grupo espacial	No. de moléculas por unidad asimétrica	Volumen (Å^3)	Vm ($\text{Å}^3/\text{Da}$)	Contenido de Solvente (%)	Límite de resolución
Aspart	78.49, 78.49, 36.80, 90°, 90°, 120°.	R3 (trigonal)	2	196589.4	1.87	34.39	1.87 Å
Lispro	46.1, 61.8, 58.6, 90.1°, 115.5°, 90°	P2 ₁ (monoclínico)	6	150686.5	2.16	43.11	1.6 Å
Glargina	78.16, 78.16, 78.16, 90°, 90°, 90°.	I23 (cúbico)	1	477478.3	3.28	62.52	1.8 Å

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Antes de proceder con un análisis formal de resultados cabe mencionar lo siguiente: El presente estudio no es un estudio de biocomparabilidad, únicamente abarca la propuesta de diferentes técnicas para que pudiesen ser utilizadas en este tipo de estudios, de modo que no hubo un análisis estadístico para diferentes lotes, se trabajó únicamente con un lote, por análogo, haciendo que las muestras no sean comparables entre sí puesto que se trata de entidades químicas diferentes a pesar de tener similitud estructural con la insulina humana. Tomando a consideración lo anterior, el análisis se aborda con una visión descriptiva puesto que es una caracterización fisicoquímica de los análogos.

8.1. Geles SDS-PAGE

Analizando en primer lugar lo observado en el gel de integridad, la presencia de una única banda por carril indica la presencia de una sola proteína. Con el carril correspondiente al marcador de peso molecular, se realizó una regresión lineal a partir de logaritmo base₁₀ de las correspondientes masas de los marcadores y sus correspondientes Rf (figura 8) para así estimar la masa de cada proteína.

Tabla 9. Resultados del cálculo de masa por regresión lineal de los análogos de insulina por gel SDS-PAGE.

Análogo	Rf	MW calculada (Da)	MW teórica (Da)
A/e	0.95	6905.02	5825
A/se	0.95	6905.02	
L/e	0.96	7153.72	5808
L/se	0.96	7153.72	
G/e	0.97	7411.38	6063
G/se	0.95	6905.02	

Sin embargo, de acuerdo a la literatura, esta masa no corresponde a la reportada para los diferentes análogos de insulina. Por lo que un análisis de este tipo solo permite discernir la pureza, integridad y una aproximación muy general de la masa de las proteínas, lo cual indica su bajo límite de resolución. Un patrón de bandeo

implica una mezcla de más proteínas, las cuales van quedando rezagadas en función de su masa, colocándose las de mayor, en la parte inicial del gel. Si se presentara un patrón de corrimiento a lo largo del gel, se infiere una degradación de la proteína probablemente por un mal manejo de la muestra durante la aplicación de la técnica, o proteínas de membrana, que, por su naturaleza predominantemente hidrófoba, tienden a precipitar y solubilizarse de manera continua a lo largo del carril. (Experimental Biosciences)

8.2. CLAR y digestión enzimática

Continuando con las metodologías, el análisis cromatográfico por CLAR, mostró dos picos para los análogos Glargina y Lispro, y tres para el análogo Aspart, (figuras 9 a 11), donde los primeros corresponden a la proteína y los segundos y terceros respectivamente, corresponden a los excipientes añadidos a la formulación de estos medicamentos. La siguiente tabla muestra los excipientes reportados para cada análogo.

Tabla 10. Excipientes reportados para los análogos de insulina.

Glargina/ Lantus 3.64mg/mL	ZnCl ₂	m-Cresol	Glicerol	Polisorbato 20	HCl	NaOH	Agua grado inyectable		
Lispro/ Humalog 3.5mg/mL	m-Cresol [3.15 mg/ml]	Glicerol	Fosfato dibásico*7H ₂ O	ZnO	NaOH	HCl	Agua grado inyectable		
Aspart/ Novorapid 3.5mg/mL	Glicerol	Fenol	m-Cresol	ZnCl ₂	Fosfato disódico*2H ₂ O	NaCl	HCl	NaOH	Agua grado inyectable

La siguiente tabla resume los resultados generados para cada análogo.

Tabla 11. Resultados del análisis promedio de los picos de los análogos.

$\lambda = 220 \text{ nm}$

Análogo	Pico	Tiempo de retención (min)	Área	% de área	Altura (U.A.x10 ⁶)	Ancho
Glargina	1	14.26	79611572.00	41.53	4.21116367	30.33

	2	16.94	111958673.00	58.47	4.17384433	40.33
Aspart	1	16.24	65829534.00	28.32	3.56260433	38.67
	2	16.90	83673086.00	36.11	3.31524200	47.33
	3	18.97	82440022.67	35.57	3.65817200	46.67
Lispro	1	16.27	66185431.00	40.14	4.20218967	37.00
	2	18.98	97553714.33	59.86	4.30398033	48.67
$\lambda =$ 280 nm						
Análogo	Pico	Tiempo de retención	Área	% de área	Altura (U.A.x10 ⁶)	Ancho
Glargina	1	14.29	33472704.67	30.52	2.78736333	26.67
	2	17.01	76098074.00	69.48	2.92795600	37.67
Aspart	1	16.24	32945485.33	19.81	3.68232433	28.67
	2	16.91	66455238.00	40.11	3.05748267	40.33
	3	18.96	66573355.33	40.07	3.71754667	38.67
Lispro	1	16.26	23997375.00	24.40	2.40432133	30.33
	2	18.98	67931326.67	75.60	2.99661533	42.33

La longitud de onda del detector se estableció en 220 y 280 nm puesto que en esta primera longitud de onda se presenta un máximo de absorción para el enlace de tipo amida (peptídico), sin embargo, se presenta absorbancia desde 180-230 nm. A 280 nm se presenta otro máximo para las cadenas laterales de residuos aromáticos esto es Tirosina, Fenilalanina y Triptófano.

Teniendo en cuenta el gradiente utilizado, el orden de elución de los componentes corresponde a aquellos con mayor polaridad seguidos por los menor polaridad.

La elucidación del pico correspondiente a la proteína se estableció mediante la colecta de los picos, desde su inicio hasta el final de la señal en el detector, seguido de una electroforesis SDS-PAGE. La presencia de una banda en el carril correspondiente a los primeros picos para cada análogo confirmó su naturaleza protéica.

Los segundos y terceros picos (Aspart únicamente) corresponde a los excipientes de naturaleza aromática (fenol y m-cresol, tabla 9) agregados en la formulación, los cuales utilizados en una concentración del 0.15 - 0.3% tienen la finalidad agentes

preservativos y antimicrobianos. (Raymond C R, Paul J S 2009). Para el caso del análogo Aspart, el cual presenta ambos excipientes, el orden de elución de los picos fue: Proteína, fenol y m-cresol, para los otros dos análogos fue, proteína y m-cresol.

En lo que respecta a los cromatogramas de digestión enzimática, la enzima Glu-C, es una serin-endoproteinasa obtenida de *Staphylococcus aureus* V8, expresada en *Bacillus subtilis*, la cual escinde a las proteínas de manera selectiva en residuos de ácido glutámico (Drapeau et al. 1972), sin embargo, también se ha demostrado que escinde en residuos de ácido aspártico a una velocidad 100-300 veces menor. A continuación, se muestra los mapas teóricos de digestión para cada análogo, establecidos por la plataforma bioinformática: web.expasy.org/_peptide_cutter, utilizando buffer de bicarbonato de amonio, puesto que la literatura sugiere que se aumenta la especificidad hacia los residuos de ácido glutámico.

Tabla 12. Algunas propiedades esperadas de la digestión por la enzima GLU-C

Análogo	Cadenas	Secuencia	Masa (Da)	Log P	Momento dipolar (debye)*	Pos estimada log p	
Glargina	Secuencia sin digerir	Cadena A	GIVEQCCTSICSLYQLENYCG	6063.0			
		Cadena B	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYPKTRR				
	Péptidos derivados	Cadena A	GIVE	416.4747	-1.67	5.17 a, 3.56 b	6
			QCCTSICSLYQLE	1490.7243	-8.98	39.92 a, 17.74 b	2
			NYCG	455.4858	-3.39	9.7 a, 5.86 b	4
		Cadena B	FVNQHLCGSHLVE	1482.677	-9.69	36.66 a, 4.85 b	1
			ALYLVCGE	867.0277	-1.87	19.58 a, 10.97 b	5
			RGFFYPKTRR	1428.6599	-6.05	29.45 a, 20.71 b	3
Aspart	Secuencia sin digerir	Cadena A	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	5825.8			
		Cadena B	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKT				
	Péptidos derivados	Cadena A	GIVE	416.4747	-1.67	5.17 a, 3.56 b	6
			QCCTSICSLYQLE	1490.7243	-8.98	39.92 a, 17.74 b	2
			NYCN	512.5377	-4.47	11.94a, 6.2 b	4
		Cadena B	FVNQHLCGSHLVE	1482.677	-9.69	36.66 a, 4.85 b	1
			ALYLVCGE	867.0277	-1.87	19.58 a, 10.97 b	5
			RGFFYTKT	1134.25	-4.65	24.32a, 8.10 b	3
Lispro	Secuencia sin digerir	Cadena A	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	5808.0			
		Cadena B	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT				
	Péptidos derivados	Cadena A	GIVE	416.4747	-1.67	5.17 a, 3.56 b	6
			QCCTSICSLYQLE	1490.7243	-8.98	39.92 a, 17.74 b	2
			NYCN	512.5377	-4.47	11.94 a, 6.2 b	3
		Cadena B	FVNQHLCGSHLVE	1482.677	-9.69	36.66 a, 4.85 b	1
			ALYLVCGE	867.0277	-1.87	19.58 a, 10.97 b	5
			RGFFYTKPT	1116.2849	-3.66	28.84 a, 10.06 b	4

* Digestión teórica de los análogos de insulina, se muestra el momento dipolar expresado en Debyes para la conformación alfa (a) y beta (b) de los péptidos generados.

Los datos correspondientes a la columna de log P y momento dipolar fueron calculados mediante el programa SPARTAN v10 (Hehre W.J., 2000), tanto en conformación alfa como beta (*a y b respectivamente). El valor Log P se define mediante la ecuación $Log P = \log\left(\frac{[analito]_{octanol}}{[analito\ no\ ionizado]_{H_2O}}\right)$, hace referencia al valor logarítmico base 10 del coeficiente de reparto del analito en un medio hidrofóbico respecto a un medio acuoso, por convención se establece en n-octanol vs agua y podría tomarse como una medida aproximada de su hidrofobicidad, por otro lado, el valor del momento dipolar hace referencia a la suma vectorial de las fuerzas de atracción debida a la electronegatividad de los átomos que conforman al analito. Con estos valores, se aproximó la posición en la que eluye de acuerdo al gradiente de acuerdo a una escala arbitraria, sin embargo, se prefirió el uso de log P, puesto que el valor de momento dipolar se encuentra en función de las conformaciones posibles, de modo puede variar, además, la similitud estructural entre el n-octanol con respecto a los grupos octadecil silano que conforman la fase estacionaria de la columna justifica mejor su utilización. Así pues, a los valores más bajos de hidrofobicidad (valores más negativos de log P) se les asignó a los analitos las primeras posiciones de elución. Sin embargo, las posiciones también están en función de las concentraciones de fase móvil en el instante de elución.

El ácido trifluoroacético es una herramienta útil en la cromatografía de líquidos debido a que se utiliza como agente de emparejamiento de iones, ya que permite una migración más uniforme de analitos iónicos, particularmente péptidos y proteínas, durante una cromatografía en fase reversa ya que se posiciona como contra ion en los residuos de aminoácido susceptibles por interacciones electrostáticas anulando cargas y mejorando la separación. (Pearson & McCroskey 1996; Petritis et al. 1999)

A pesar de poder estimar la posición de los péptidos mediante cálculos computacionales, un análisis más robusto se logra mediante su resolución por espectrometría de masas, idealmente de cada pico colectado. De manera que al

asignar la masa de cada fragmento es posible determinar a su vez la estructura primaria de los análogos, mejor conocido como mapeo peptídico.

8.3. Espectrometría de Masas. Masa intacta.

Se realizó un análisis por espectrometría de masas de los tres análogos de insulina para corroborar su identidad. Los resultados mostrados en la **tabla 6** confirmaron este supuesto y convergieron con las masas reportadas con un nivel de variación inferior a 1 Da. Además, se confirmó también la integridad de los análogos independientemente del proceso de manufactura.

Puesto que las proteínas son moléculas con alta capacidad de mantener multicargas, se observó este fenómeno en los espectrogramas de masas generados mostrados en el ANEXO IV, donde se muestra la relación m/z de los distintos estados de carga para la misma proteína.

8.4. Dispersión Dinámica de Luz. Tamaño de Partícula y agregados.

Continuando con las metodologías, los resultados mostrados en la **Tabla 7**, fueron generados por DLS para poder observar la formación de agregados presentes en las soluciones comerciales de los análogos de insulina, así como para estimar el tamaño de partícula.

Para los análogos Lispro y Aspart, el índice de polidispersidad expresado en porcentaje corresponde a un comportamiento de una población monodispersa, mientras que para el análogo Glargina, corresponde a una población polidispersa. Al observar la **figura 16**, destacan tres poblaciones para los tres análogos. Además, el tamaño molecular estimado permitió inferir que para el análogo Lispro, así como para el análogo Aspart, se encuentran formado de hexámeros a pentámeros en solución. Las poblaciones observadas a bajo peso molecular corresponden a los excipientes de naturaleza aromática añadidos a la formulación y las poblaciones de mayor peso son estadios temporales de agregados macromoleculares formados

probablemente por asociación hidrófoba y electrostática de hexámeros con tendencia a precipitar.

La importancia de la formación de agregados radica en que es uno de los mecanismos por los que se genera inmunogenicidad con el uso crónico de medicamentos biotecnológicos y es inherente al proceso de manufactura (Schellekens 2002a; Schellekens 2002b).

8.5. Espectroscopia de Fluorescencia.

Analizando los resultados mostrados en las **figuras 17 y 18**, así como en las figuras contenidas en el **ANEXO II**, se puede observar en primer lugar una disminución de fluorescencia intrínseca de los tres análogos en función del incremento de la temperatura, siendo el efecto de menor a mayor como se indica a continuación: Glargina<Aspart<Lispro.

Los máximos observados en la **figura 17**, de 304 nm y 318 nm, corresponden a las emisiones de los residuos de tirosina y los excipientes, m-cresol y fenol, respectivamente. (Rao 1961; Lakowicz 2008).

La longitud de onda de excitación se fijó a 280 nm, por lo tanto, los residuos de fenilalanina no fueron excitados por ésta, de modo que no se observa su contribución a los espectros graficados. De igual manera, no se apreció un efecto a 350 nm, ya que las proteínas en estudio carecen de triptófano y ésta es su zona de emisión. Además, se descarta la presencia de residuos de tirosina en estado tirosinato, que tienen una emisión baja en la misma zona. (Lakowicz 2008)

La importancia de la presencia de residuos de triptófano en una proteína es que éstos son mucho más sensibles al entorno que los otros residuos aromáticos debido a que tiende a establecerse en otras conformaciones alternas en función del pH, solventes, temperatura, fuerza iónica, etc., además de la mayor fluorescencia del grupo indol presente en su estructura.

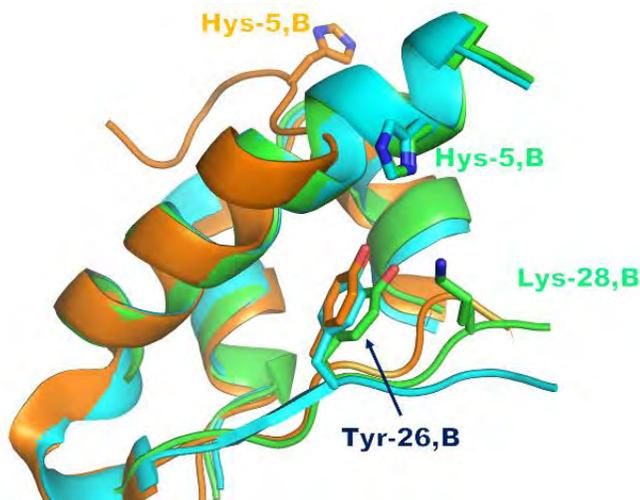
La fluorescencia, al ser una propiedad anisotrópica, depende directamente de estas conformaciones y por lo tanto, es posible establecer dinámicas estructurales, plegamientos así como reacciones de asociación.(Lakowicz 2008)

Posteriormente, se realizó un gráfico con los valores de % de Fluorescencia relativa en función de la temperatura para cada análogo generando las curvas observadas en la **figura 18**, donde el comportamiento observado indica que el mecanismo de apagamiento de la fluorescencia fue exponencial con el aumento de la temperatura en intervalo estudiado, sin embargo para poder establecer si este mecanismo cumple con los experimentos de Anfinson, se requiere de más pruebas en la que se lleve a cabo la medición de otras variables, como pH y fuerza iónica, y así poder seguir la cinética de apagamiento y exposición de los residuos aromáticos; en consecuencia, la emisión de su fluorescencia.

La disminución de la fluorescencia se debe principalmente a un fenómeno de naturaleza estructural dependiente de la temperatura. Donde al aumentarse, los residuos de aminoácidos hidrófobos (entre ellos los aromáticos) que se encuentran de manera nativa orientados hacia el interior, tienden a exponerse hacia el exterior, lo que propicia una transferencia de la radiación emitida al entorno, además en presencia de agua, se favorece su agregación y precipitación. Este mismo incremento de la temperatura, propicia un aumento de la energía cinética de las cadenas laterales de los residuos de aminoácido, generando un reordenamiento de las estructuras secundarias y terciarias debido a la disociación de los enlaces no covalentes (puentes salinos, puentes de hidrogeno, fuerzas de Wan der Waals, etc.).

Subsecuentemente, se realizó un análisis de las estructuras tridimensionales reportadas para los análogos Aspart (PDB-entry: 4GBC), Glargina (PDB-entry: 4IYF) y del análogo Lispro, (no reportada aún, resuelta por análisis de difracción, resultados no mostrados) seguidos de un alineamiento estructural mediante el software PyMol. Con esto, se pudo explicar el mayor apagamiento de la fluorescencia para el análogo Lispro mediante interacción del residuo Tyr-26 de la

cadena B por un fenómeno de apagamiento (quenching) intermolecular (Loewenthal et al. 1991) con el residuo Hys-5 de la misma cadena así como por



interacción por puente de hidrogeno con el residuo Lys-28 debido a la cercanía relativa entre estos residuos, fenómeno que no se presenta para el caso del análogo Glargina pero si en menor medida con el análogo Aspart.

Figura 27. Representación de los modelos tridimensionales de los análogos de Insulina, Aspart, en azul, Lispro en verde y Glargina en naranja. Se muestra los residuos que participan en el fenómeno de apagamiento. El residuo de Histidina (Hys-5, B) del análogo Glargina se encuentra más alejado de los residuos de Tirosina por lo no interviene en el proceso de transferencia energética.

8.6. Cristalogénesis

Para efectuar un análisis de estructura superior, se llevó a cabo la cristalización de los análogos de insulina a partir de las soluciones del producto terminado mediante la implementación sistemática de técnicas de siembra en placa por microbatch, difusión de vapor en placa con gota sedente y acupuntura en geles.

En la primera técnica (microbatch) se buscó encontrar la condición óptima de cristalización mediante una estrategia de alto rendimiento por matriz incompleta (McPherson & Gavira 2014) con las condiciones mostradas en el **ANEXO I** a temperatura ambiente (22°C), con un tiempo de equilibrio de 48 horas a un máximo de 10 días. Los inconvenientes de esta técnica fueron que cada condición probada corresponde a un punto en la curva de Ostwald-Miers (**figura 7**) de modo que el sistema se puede encontrar por encima o por debajo de la curva de sobresaturación y conlleva a la utilización de varios *kits*. Seguido de encontrar las condiciones de

cristalización se evalúa la dureza del cristal mediante contacto con fibras animales. La fragilidad proporciona información de que los cristales son de proteína, debido a que presentan gran cantidad de disolvente en su estructura interna, aproximadamente en un 50% o más. El volumen restante lo ocupa *per se* la proteína de modo que quedan grandes intersticios en el que se pueden difundir otras moléculas de menor tamaño. (McPherson & Gavira 2014)

Las condiciones en la **tabla 7** muestran el contraste entre dos situaciones posibles. Lo idóneo, que se trate de un cristal de proteína o, por el contrario, que sea un cristal de sal (principalmente agente precipitante) en el que éste último presenta un gran nivel ordenamiento interno y, por lo tanto, la cantidad de disolvente es mucho menor, confiriéndole una cantidad mayor de dureza con respecto a un cristal de proteína.

Las condiciones en donde se obtuvieron cristales de proteína fueron sometidas a pruebas de optimización del tamaño para su posterior análisis por difracción de rayos X mediante sembrado de microcristales (**Figura 19**), sembrado en placa de difusión de vapor con gota sedente a 4° C y contra-difusión por acupuntura en geles.

En el caso de las placas de difusión de vapor, se coloca una gota de 10 µL que consiste en una mezcla de proteína y condición de cristalización sobre un pedestal. Ésta tiene una menor concentración de agente precipitante con respecto a un reservorio de ≈500 µL situado en la parte inferior. La gota que contiene agente precipitante y proteína, tiende al equilibrio debido a un cambio de concentraciones entre la gota y el reservorio y, por tanto, se presenta una migración de vapor de agua para buscar igualar las concentraciones entre los dos sistemas. Durante este proceso, la concentración de la gota se encuentra en constante cambio debido a la pérdida de vapor de agua al tender al equilibrio y como resultado, en función del tiempo, las condiciones de sobresaturación se van moviendo a lo largo del diagrama de fases lo que en determinado instante provoca la nucleación y crecimiento de los cristales.(Chayen 1998)

En la técnica de acupuntura en gel (**Figura 20**), se puede utilizar un capilar de 0.1 mm de diámetro interno por 100 mm de largo, el cual se llena con la proteína en solución y se inserta en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, saturado con la condición de cristalización encontrada en el primer paso. Con el tiempo, el agente precipitante difunde a través del capilar estableciéndose un gradiente y llevando la concentración de la proteína hacia sobresaturación, si esto resulta exitoso, se observarán microcristales en la porción inicial del capilar con tendencia a incrementar su volumen en la porción final, ya que el flujo de agente precipitante es más controlado por la geometría intrínseca del dispositivo al minimizar las corrientes convectivas. (García-Ruiz 2003; Otálora et al. 2009).

Las variables que afectan la cinética de la cristalogénesis pueden agruparse en tres ramas principales: Factores Físicos, Químicos y Bioquímicos.

En el primer bloque por mencionar algunos se encuentran variaciones de la temperatura, perturbaciones mecánicas, propiedades dieléctricas del medio, así como viscosidad. En el segundo, tenemos pH, tipo de precipitante, fuerza iónica, concentración de la macromolécula, concentración de detergente; mientras que para las variables bioquímicas se encuentran: pureza de la proteína, ligandos, estados de agregación, modificaciones postraduccionales, punto isoelectrico, contenido de α -hélices, etc.

Con lo anterior, se puede ver la gran cantidad de variables que interfieren en este proceso, así que en cierto grado las aproximaciones mediante estas técnicas se siguen abordando mediante evaluaciones de prueba y error.

8.7. Cristalografía de Rayos X y Niveles de Estructura Superior

La **tabla 8** resume la colecta de los datos de difracción de rayos X para los tres análogos estudiados. En ésta, se muestra las dimensiones de la celda unitaria, la cual está delimitada por los parámetros a, b y c, en angstroms y los ángulos que le dan dirección a las aristas de esa misma celda, que permite establecer el sistema cristalino. Se muestra el grupo espacial para cada análogo y los resultados fueron

concluyentes al encontrarse dentro de los 65 posibles grupos espaciales para proteínas, los cuales no tienen definidas operaciones de segunda clase, como inversiones o espejos debido a la naturaleza quiral de los aminoácidos. (Wukovitz & Yeates 1995). Siendo a su vez el grupo espacial P2₁ de los más frecuentes en las proteínas reportadas en la literatura.

Posteriormente se calculó el volumen de la celda unitaria con sus respectivas dimensiones, y con los datos de grupo espacial y peso molecular, se calculó el coeficiente de Matthews; el cual es un parámetro útil en la resolución preliminar de la estructura de una proteína. Se define como el volumen de cristal por unidad de masa molecular de la proteína (Matthews 1968) y su valor muestra información sobre el contenido de disolvente, puesto que mediante la siguiente fórmula, se calcula el % de disolvente:

$$V_{solv} = 1 - \frac{1.66 v}{V_m} = 1 - \frac{1.23}{V_m}$$

Donde *v* es el volumen parcial específico de la proteína en el cristal, que para la mayoría de las proteínas es aproximadamente 0.74 cm³/g.

Con esta información es posible estimar probabilísticamente el número de moléculas de proteína en la unidad asimétrica tomando en cuenta el valor del límite de resolución a la que difractó el cristal (Kantardjieff & Rupp 2003) y con ello se puede proceder a resolver la estructura de la proteína.

La rutina `Matthews_coef` del software CCP4 (Potterton E. 2003), facilita este cálculo utilizando como entrada los datos de grupo espacial, peso molecular y dimensiones de la celda, las cuales pueden ser leídas a partir del archivo de reflexiones '. mtz' generado a partir de los patrones de difracción del cristal. Se muestran en las **figuras 21 a 26** los patrones de difracción experimentales para dos ángulos de giro sobre el plano horizontal a 0° y 90° respectivamente para cada análogo. Es importante mencionar que se requiere de un número suficiente de patrones para generar un archivo '. mtz' único con el grupo espacial asignado correctamente para proceder a la resolución de la estructura, y dependiendo de la resolución en Å, será el nivel de detalle de la densidad electrónica calculada sobre la cual se generará el

modelo de la proteína. El límite de resolución reportada en la **tabla 8** corresponde con datos de alta resolución.

Lo que podría destacar más sobre cada metodología se enlista en la siguiente tabla:

Tabla 13. Propiedades clave de las metodologías utilizadas.

Metodología	Propiedad a evaluar
SDS-PAGE	Pureza, integridad
Fluorescencia	Perfiles de decaimiento, estudios de asociación.
Espectroscopia de Masas	Identidad, Estructura primaria
CLAR	Análisis de Excipientes, Huella Peptídica
DLS	Estimación de Agregados
Cristalogénesis	Condiciones de Cristalización
Difracción de Rayos X	Grupo Espacial, Estructura Terciaria.

8.8. Análisis sobre la factibilidad de aplicación de las metodologías.

Como bien se viene mencionando anteriormente en la descripción e interpretación de los resultados, existen varias aplicaciones potenciales de estas metodologías como oportunidades de negocio en el sector público o privado, enfocado principalmente al sector industrial de laboratorios de análisis como terceros autorizados o laboratorios estatales de salud pública a nivel nacional.

El manual de Oslo es un documento que sirve como guía para la realización de mediciones y estudios en actividades científicas y tecnológicas que define conceptos y establece cuales son innovación.

Se entiende por innovación a la concepción e implantación de cambios significativos en un producto, un proceso, la actividad de marketing, o en la organización de una empresa con el propósito de mejorar resultados. Con base en esta definición, la implementación y desarrollo de metodologías para el análisis de medicamentos biocomparables conlleva a brindar una ventaja competitiva sustentable a cualquier laboratorio tercer autorizado que quiera incursionar en esta nueva tendencia de los medicamentos biotecnológicos puesto que aborda un tipo innovación llamada: “de producto” al ofrecer un servicio que hasta el momento se no se ha implementado. Por ejemplo, hasta la fecha no existe al menos un análisis de resolución de estructura terciaria como parte de servicios disponibles en los laboratorios de tercería registrados ante COFEPRIS.

Al ser pioneros en materia de resolución de estructura de orden superior, las empresas que compartan el giro de laboratorios de prueba fomentan la inversión nacional y extranjera en temas de investigación y desarrollo de nuevos productos principalmente de tipo biotecnológico, difundiendo el uso y la adopción de nuevas tecnologías como la difracción de rayos X, abaratando en un futuro los costos de adquisición e implementación.

Por último, es importante mencionar y definir qué es y cómo se lleva a cabo un estudio de biocomparabilidad. En primer lugar, biocomparabilidad es una propiedad alcanzable de un medicamento biotecnológico, la cual busca tener el mayor grado de similitud en cuanto al uso, propiedades fisicoquímicas, farmacocinética, farmacodinamia, efecto terapéutico, entre otras propiedades, en comparación con el medicamento biotecnológico innovador. Esta propiedad es alcanzable únicamente después de que expira la patente del medicamento innovador y las empresas que se dedican a la producción de medicamentos biocomparables

primero necesitan obtener el registro sanitario ante las autoridades pertinentes para poder comercializar su producto.

Las empresas productoras del medicamento biocomparable primero solicitan pruebas de caracterización, aplicación, uso, efecto, de manera general, de la mayoría de propiedades de su producto ante un laboratorio de prueba, el cual primero desarrolla y valida sus métodos de análisis y genera un reporte que dictamina si el producto cumple en características con respecto al medicamento innovador. De ser positivo el resultado se emite su registro sanitario y puede salir al mercado el medicamento biocomparable.

Ahora bien, es necesario en primer lugar medicamento innovador y uno de prueba, además de diferentes lotes de cada uno para efectuar un análisis fisicoquímico con la variabilidad suficiente para generar un análisis estadístico que permita dictaminar la biocomparabilidad entre ellos, por tanto, esto no aplica al presente trabajo, ya que únicamente se propone el uso de metodologías de caracterización fisicoquímica, que pueden ser o no desarrolladas y validadas en estudios de esta magnitud.

9. CONCLUSIONES

- Se realizó análisis sistemático de análogos insulina mediante un conjunto de metodologías que permitieron obtener información sobre tres medicamentos biotecnológicos de referencia, la cual no es comparable entre sí puesto que se trata de medicamentos diferentes.
- Un estudio de biocomparabilidad requiere de un medicamento innovador que sea usado como referencia y otro de prueba para establecer si son o no biocomparables además de un mayor muestreo (varios lotes) a fin de incrementar la variabilidad estadística.
- Para explotar el uso y la importancia de estas técnicas deben someterse primero a un proceso de validación en el que evalúa su factibilidad de costos, tiempo, alcance, calidad del proceso, etc. Sin embargo, esto no debe ser un impedimento de adopción tecnológica.
- Aunque sea posible que algunas ya estén implementadas en laboratorios de prueba, la difusión de la implementación de una técnica de resolución de estructura terciaria como la Difracción de rayos X ofrecerá una ventaja competitiva a cualquier laboratorio de prueba.

10. PERSPECTIVAS

- La importancia de la difusión de estas metodologías radica en que pueden ser cruciales para establecer lineamientos de caracterización en materia de legislación farmacéutica y en obtener puntos clave para buscar biocomparabilidad entre dos productos.
- Concluir con la resolución de la estructura tridimensional del análogo Lispro y depositarla en el RCSB Protein Data Bank una vez que se concluya con la aprobación de los requisitos indicados, puesto que aún no se encuentra en esta base de datos.
- Generar procedimientos normalizados de operación aplicables a la caracterización de medicamentos biotecnológicos a modo de que agilicen la obtención de esta información y puedan ser explotada comercialmente como un servicio innovador en laboratorios de prueba.

11. REFERENCIAS

- Burton, W.K., Cabrera, N., Frank F.C. (1951) The growth of crystals and the equilibrium structure of their surfaces, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 243, pp 299-358.
- Aebersold, R. & Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. , 422(March).
- Chang, T.Y., 2000. Towards a quantitative model of immunogenicity: counting pathways in sequence space. *Journal of theoretical biology*, 206(2), pp.255–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966763>.
- Chayen, N.E., 1998. Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 54(1), pp.8–15.
- Creasy, D., 1999. Perkins DN , Pappin DJ , Creasy DM , Cottrell JS .. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data . *Electrophoresis* 20 : 3551-. *Electrophoresis*, 20(August), pp.3551–3567.
- Drapeau, G.R., Boily, Y. & Houmard, J., 1972. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry*, 247(20), pp.6720–6726.
- Ebbers HC, Crow SA, Vulto AG, S.H., 2012. Interchangeability, immunogenicity and biosimilars. *Nature Biotechnology*, 30(12), pp.1186–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23222784>.
- García-Ruiz, J.M., 2003. [8] Counterdiffusion Methods for Macromolecular Crystallization. *Methods in Enzymology*, 368(1997), pp.130–154.
- Guyton, C.A. & Hall, J.E., 2000. *Textbook of medical physiology*,
- Hirsch, I.B., 2005. Insulin Analogues. *New England Journal Of Medicine*, 352(2), pp.174–183.

- Jun, H.S. et al., 1999. Pathogenesis of non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus (NIDDM) - Genetic predisposition and metabolic abnormalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35(2–3), pp.157–177.
- Kantardjieff, K.A. & Rupp, B., 2003. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 12(9), pp.1865–71. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930986> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2323984>.
- L.C. Wade, J., 2004. Química Orgánica. In I. Capella, ed. p. 1282.
- Lakowicz, J.R., 2008. *Principles of fluorescence spectroscopy* Third., New York: Springer.
- Loewenthal, R., Sancho, J. & Fersht, a R., 1991. Fluorescence spectrum of barnase: contributions of three tryptophan residues and a histidine-related pH dependence. *Biochemistry*, 30(1990), pp.6775–6779.
- Lord, M., 2003. Gel Electrophoresis of Proteins. *Essential Cell Biology*, pp.197–268.
- Matthews, B.W., 1968. Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, 33(2), pp.491–497. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283668902052>.
- McPherson, A. & Gavira, J.A., 2014. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(1), pp.2–20.
- Nelson L.D. and Cox M.M., Lehninger. Principles of biochemistry, 5th edition, WH Freeman and company, USA 2008.

- Otálora, F. et al., 2009. Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 101(1–3), pp.26–37.
- Pearson, J.D. & McCroskey, M.C., 1996. Perfluorinated acid alternatives to trifluoroacetic acid for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 746(2), pp.277–281.
- Pearson Sue, Hepeng Jia, K.K., 2004. China approves first gene therapy. , 22(1), pp.3–4.
- Petritis, K.N. et al., 1999. Ion-pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent. *Journal of Chromatography A*, 833(2), pp.147–155.
- Rao, P.R., 1961. Spectroscopic Studies of the Cresols. *Proc. Indian Acad. Sci.*, (55 : 232), pp.232–248.
- Raymond C R, Paul J S, M.E.Q., 2009. Handbook of pharmaceutical excipients. *Handbook of pharmaceutical excipients, Sixth edition*, pp.549–553.
- Rubakhin, S.S. et al., 2005. Imaging mass spectrometry: Fundamentals and applications to drug discovery. *Drug Discovery Today*, 10(12), pp.823–837.
- Schellekens, H., 2002a. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(6), pp.457–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119747>.
- Schellekens, H., 2002b. Immunogenicity of therapeutic proteins: Clinical implications and future prospects. *Clinical Therapeutics*, 24(11), pp.1720–1740.
- Shi, Y. & Hu, F.B., 2014. The global implications of diabetes and cancer. *The Lancet*, 383(9933), pp.1947–1948. Available at:

[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60886-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60886-2).

Skoog, D., F., H. & S., C., 2010. *Principios de análisis instrumental*,

Weise, M. et al., 2011. Biosimilars-why terminology matters. *Nature biotechnology*, 29(8), pp.690–693.

Wharf, C., 2007. Guideline on Comparability after a change in the Manufacturing Process- Non-Clinical and Clinical Issues. , (July).

Wukovitz, S.W. & Yeates, T.O., 1995. Why protein crystals favour some space-groups over others. *Nature Structural Biology*, 2(12), pp.1062–1067. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nsb1295-1062>.

12. ANEXOS

ANEXO I

1. Formulaciones del kit para cristalización Hampton Research, número de catálogo **HR2-112, parte 1.**

1. 0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

2. 0.4 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate

3. 0.4 M Ammonium phosphate monobasic

4. 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium sulfate

5. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

6. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000

7. 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 1.4 M Sodium acetate trihydrate

8. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% v/v 2-Propanol

9. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000

10. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000

11. 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 1.0 M Ammonium phosphate monobasic

12. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v 2-Propanol

13. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% v/v Polyethylene glycol 400

14. 0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 28% v/v Polyethylene glycol 400

15. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000

16. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 1.5 M Lithium sulfate monohydrate

17. 0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000

18. 0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 20% w/v Polyethylene glycol 8,000

19. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% v/v 2-Propanol

20. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 25% w/v Polyethylene glycol 4,000

21. 0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

22. 0.2 M Sodium acetate trihydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000

23. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v Polyethylene glycol 400

24. 0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 20% v/v 2-Propanol

25. 0.1 M Imidazole pH 6.5, 1.0 M Sodium acetate trihydrate

26. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

27. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 20% v/v 2-Propanol

28. 0.2 M Sodium acetate trihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000
29. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
30. 0.2 M Ammonium sulfate, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000
31. 0.2 M Ammonium sulfate, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
32. 2.0 M Ammonium sulfate
33. 4.0 M Sodium formate
34. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 2.0 M Sodium formate
35. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.8 M Potassium phosphate monobasic
36. 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 8% w/v Polyethylene glycol 8,000
37. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 8% w/v Polyethylene glycol 4,000
38. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
39. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 2% v/v Polyethylene glycol 400, 2.0 M Ammonium sulfate
40. 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 20% v/v 2-Propanol, 20% w/v Polyethylene glycol 4,000
41. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 10% v/v 2-Propanol, 20% w/v Polyethylene glycol 4,000
42. 0.05 M Potassium phosphate monobasic, 20% w/v Polyethylene glycol 8,000
43. 30% w/v Polyethylene glycol 1,500
44. 0.2 M Magnesium formate dihydrate
45. 0.2 M Zinc acetate dihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 18% w/v Polyethylene glycol 8,000
46. 0.2 M Calcium acetate hydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 18% w/v Polyethylene glycol 8,000
47. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 2.0 M Ammonium sulfate
48. 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium phosphate monobasic
49. 1.0 M Lithium sulfate monohydrate, 2% w/v Polyethylene glycol 8,000
50. 0.5 M Lithium sulfate monohydrate, 15% w/v Polyethylene glycol 8,000

2. Formulaciones del kit para cristalización Hampton Research, número de catálogo **HR2-112, parte 2.**

1. 2.0 M Sodium chloride, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000
2. 0.5 M Sodium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.01 M Hexadecyltrimethylammonium bromide
3. 25% v/v Ethylene glycol
4. 35% v/v 1,4-Dioxane
5. 2.0 M Ammonium sulfate, 5% v/v 2-Propanol
6. 1.0 M Imidazole pH 7.0
7. 10% w/v Polyethylene glycol 1,000, 10% w/v Polyethylene glycol 8,000
8. 1.5 M Sodium chloride, 10% v/v Ethanol
9. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 2.0 M Sodium chloride
10. 0.2 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
11. 0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 1.0 M 1,6-Hexanediol
12. 0.1 M Cadmium chloride hydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v Polyethylene glycol 400

13. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
14. 0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 2.0 M Ammonium sulfate
15. 0.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 1.0 M Lithium sulfate monohydrate
16. 0.5 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 2% v/v Ethylene imine polymer
17. 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 35% v/v tert-Butanol
18. 0.01 M Iron(III) chloride hexahydrate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 10% v/v Jeffamine M-600
19. 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 2.5 M 1,6-Hexanediol
20. 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 1.6 M Magnesium sulfate heptahydrate
21. 0.1 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.1 M Potassium phosphate monobasic, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 2.0 M Sodium chloride
22. 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 12% w/v Polyethylene glycol 20,000
23. 1.6 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 10% v/v 1,4-Dioxane
24. 0.05 M Cesium chloride, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 30% v/v Jeffamine M-600
25. 0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 1.8 M Ammonium sulfate
26. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
27. 0.01 M Zinc sulfate heptahydrate, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 25% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
28. 1.6 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 6.5
29. 0.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
30. 0.1 M HEPES pH 7.5, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000, 5% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
31. 0.1 M HEPES pH 7.5, 20% v/v Jeffamine M-600
32. 0.1 M Sodium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.6 M Ammonium sulfate
33. 0.1 M HEPES pH 7.5, 2.0 M Ammonium formate
34. 0.05 M Cadmium sulfate hydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.0 M Sodium acetate trihydrate
35. 0.1 M HEPES pH 7.5, 70% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
36. 0.1 M HEPES pH 7.5, 4.3 M Sodium chloride
37. 0.1 M HEPES pH 7.5, 8% v/v Ethylene glycol, 10% w/v Polyethylene glycol 8,000
38. 0.1 M HEPES pH 7.5, 20% w/v Polyethylene glycol 10,000
39. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 3.4 M 1,6-Hexanediol
40. 0.1 M Tris pH 8.5, 25% v/v tert-Butanol
41. 0.01 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 1.0 M Lithium sulfate monohydrate
42. 1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 12% v/v Glycerol
43. 0.2 M Ammonium phosphate monobasic, 0.1 M Tris pH 8.5, 50% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
44. 0.1 M Tris pH 8.5, 20% v/v Ethanol
45. 0.01 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
46. 0.1 M Sodium chloride, 0.1 M BICINE pH 9.0, 20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
47. 0.1 M BICINE pH 9.0, 2.0 M Magnesium chloride hexahydrate
48. 0.1 M BICINE pH 9.0, 2% v/v 1,4-Dioxane, 10% w/v Polyethylene glycol 20,000

3. Formulaciones del kit para cristalización Hampton Research, número de catálogo HR2-108, parte 1.

1. 1.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
2. 2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
3. 1.5 M Ammonium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
4. 1.5 M Ammonium chloride, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
5. 1.5 M Ammonium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5
6. 3.5 M Ammonium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
7. 3.5 M Ammonium chloride, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
8. 3.5 M Ammonium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5
9. 2.2 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
10. 2.2 M Sodium chloride, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
11. 2.2 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5
12. 3.2 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
13. 3.2 M Sodium chloride, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
14. 3.2 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5
15. 1.0 M Ammonium citrate dibasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
16. 1.8 M Ammonium citrate dibasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
17. 1.0 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
18. 2.0 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
19. 0.7 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
20. 0.7 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
21. 1.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
22. 1.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
23. 0.4 M Magnesium formate dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
24. 0.4 M Magnesium formate dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
25. 0.4 M Magnesium formate dihydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
26. 0.7 M Magnesium formate dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
27. 2.0 M Sodium formate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
28. 2.0 M Sodium formate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
29. 2.0 M Sodium formate, 0.1 M Tris pH 8.5
30. 3.5 M Sodium formate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
31. 3.5 M Sodium formate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
32. 3.5 M Sodium formate, 0.1 M Tris pH 8.5
33. 1.2 M DL-Malic acid pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
34. 2.2 M DL-Malic acid pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
35. 1.4 M Sodium malonate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
36. 2.4 M Sodium malonate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
37. 2.5 M Ammonium nitrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
38. 2.5 M Ammonium nitrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
39. 2.5 M Ammonium nitrate, 0.1 M Tris pH 8.5
40. 6.0 M Ammonium nitrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
41. 6.0 M Ammonium nitrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
42. 6.0 M Ammonium nitrate, 0.1 M Tris pH 8.5
43. 1.5 M Sodium nitrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6

44. 1.5 M Sodium nitrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
45. 1.5 M Sodium nitrate, 0.1 M Tris pH 8.5
46. 4.0 M Sodium nitrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
47. 4.0 M Sodium nitrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
48. 4.0 M Sodium nitrate, 0.1 M Tris pH 8.5

4. Formulaciones del kit para cristalización Hampton Research, número de catálogo **HR2-108, parte 2.**

1. 1.0 M Ammonium phosphate monobasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
2. 1.8 M Ammonium phosphate monobasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
3. 1.5 M Ammonium phosphate dibasic, 0.1 M Tris pH 8.5
4. 2.4 M Ammonium phosphate dibasic, 0.1 M Tris pH 8.5
5. 1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 5.0
6. 1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 6.9
7. 1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 8.2
8. 1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 5.0
9. 1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 6.9
10. 1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 8.2
11. 0.5 M Succinic acid pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
12. 1.0 M Succinic acid pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
13. 1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
14. 1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
15. 1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5
16. 2.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
17. 2.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
18. 2.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5
19. 0.8 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
20. 0.8 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
21. 0.8 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
22. 1.5 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
23. 1.5 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
24. 1.5 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
25. 1.0 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
26. 1.0 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
27. 1.0 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
28. 1.8 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
29. 1.8 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
30. 1.8 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
31. 0.7 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
32. 0.7 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
33. 0.7 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Tris pH 8.5
34. 1.0 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
35. 1.3 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
36. 1.4 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Tris pH 8.5

37. 0.6 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
38. 1.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
39. 0.6 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
40. 1.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
41. 0.5 M Potassium thiocyanate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
42. 0.5 M Potassium thiocyanate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
43. 0.5 M Potassium thiocyanate, 0.1 M Tris pH 8.5
44. 4.0 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
45. 4.0 M Ammonium acetate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
46. 4.0 M Ammonium acetate, 0.1 M Tris pH 8.5
47. 35 % v/v Tacsimate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
48. 60 % v/v Tacsimate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0

5. Formulaciones del kit para cristalización Hampton Research, número de catálogo HR2-128.

1. 0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 15% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
2. 0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
3. 0.2 M Ammonium phosphate monobasic
4. 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 1.0 M Ammonium sulfate
5. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 15% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
6. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 15% w/v Polyethylene glycol 4,000
7. 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 0.7 M Sodium acetate trihydrate
8. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 15% v/v 2-Propanol
9. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 15% w/v Polyethylene glycol 4,000
10. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 15% w/v Polyethylene glycol 4,000
11. 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 0.5 M Ammonium phosphate monobasic
12. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 15% v/v 2-Propanol
13. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 15% v/v Polyethylene glycol 400
14. 0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 14% v/v Polyethylene glycol 400
15. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 15% w/v Polyethylene glycol 8,000
16. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.75 M Lithium sulfate monohydrate
17. 0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 15% w/v Polyethylene glycol 4,000
18. 0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v Polyethylene glycol 8,000
19. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 15% v/v 2-Propanol
20. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 12.5% w/v Polyethylene glycol 4,000

21. 0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 15% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

22. 0.2 M Sodium acetate trihydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 15% w/v Polyethylene glycol 4,000

23. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 15% v/v Polyethylene glycol 400

24. 0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 10% v/v 2-Propanol

25. 0.1 M Imidazole pH 6.5, 0.5 M Sodium acetate trihydrate

26. 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 15% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

27. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 10% v/v 2-Propanol

28. 0.2 M Sodium acetate trihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 15% w/v Polyethylene glycol 8,000

29. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.4 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate

30. 0.2 M Ammonium sulfate, 15% w/v Polyethylene glycol 8,000

31. 0.2 M Ammonium sulfate, 15% w/v Polyethylene glycol 4,000

32. 1.0 M Ammonium sulfate

33. 2.0 M Sodium formate

34. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 1.0 M Sodium formate

35. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.4 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.4 M Potassium phosphate monobasic

36. 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 4% w/v Polyethylene glycol 8,000

37. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 4% w/v Polyethylene glycol 4,000

38. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.7 M Sodium citrate tribasic dihydrate

39. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 1.0 M Ammonium sulfate, 2% v/v Polyethylene glycol 400

40. 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 10% v/v 2-Propanol, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000

41. 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 5% v/v 2-Propanol, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000

42. 0.05 M Potassium phosphate monobasic, 10% w/v Polyethylene glycol 8,000

43. 15% w/v Polyethylene glycol 1,500

44. 0.1 M Magnesium formate dihydrate

45. 0.2 M Zinc acetate dihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 9% w/v Polyethylene glycol 8,000

46. 0.2 M Calcium acetate hydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 9% w/v Polyethylene glycol 8,000

47. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 1.0 M Ammonium sulfate

48. 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 1.0 M Ammonium phosphate monobasic

49. 0.5 M Lithium sulfate monohydrate, 2% w/v Polyethylene glycol 8,000

50. 0.5 M Lithium sulfate monohydrate, 7.5% w/v Polyethylene glycol 8,000

ANEXO II

Resultados de Emisión de Fluorescencia intrínseca de cada análogo, frente a un margen de emisión de 300 – 410 nm.

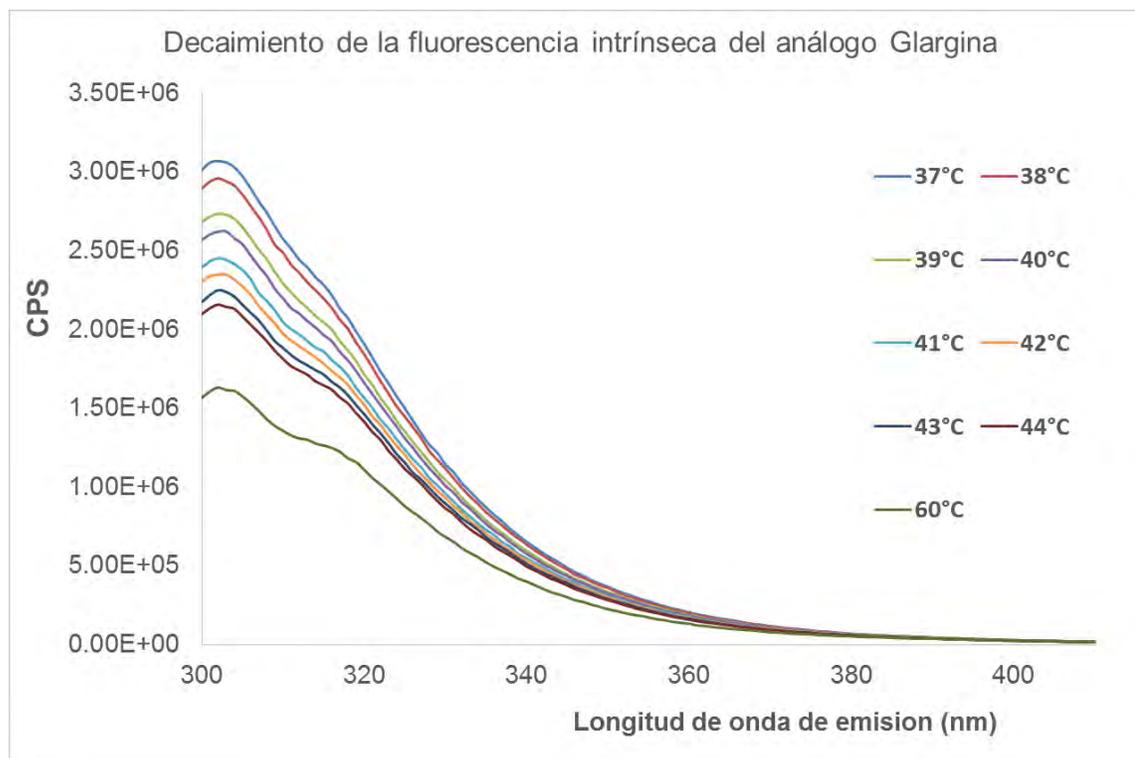


Figura A1. Patrones de emisión de fluorescencia intrínseca del análogo Glargina a la longitud de onda de excitación de 280nm en función de la temperatura. Se observa a 303 nm aproximadamente un máximo de emisión. CPS, cuentas por segundo.

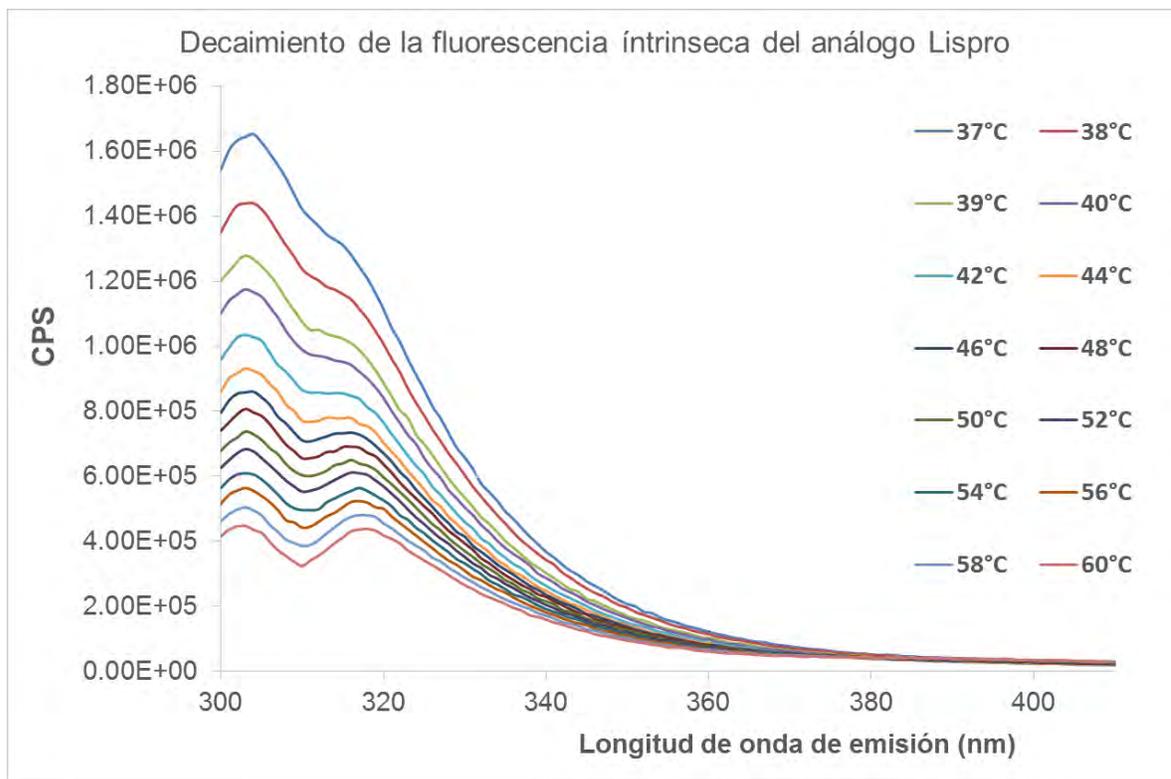


Figura A2. Espectros de fluorescencia intrínseca del análogo Lispro a la longitud de onda de excitación de 280nm en función de la temperatura. Se observan a 303 y 316 nm aproximadamente máximos de emisión. CPS, cuentas por segundo.

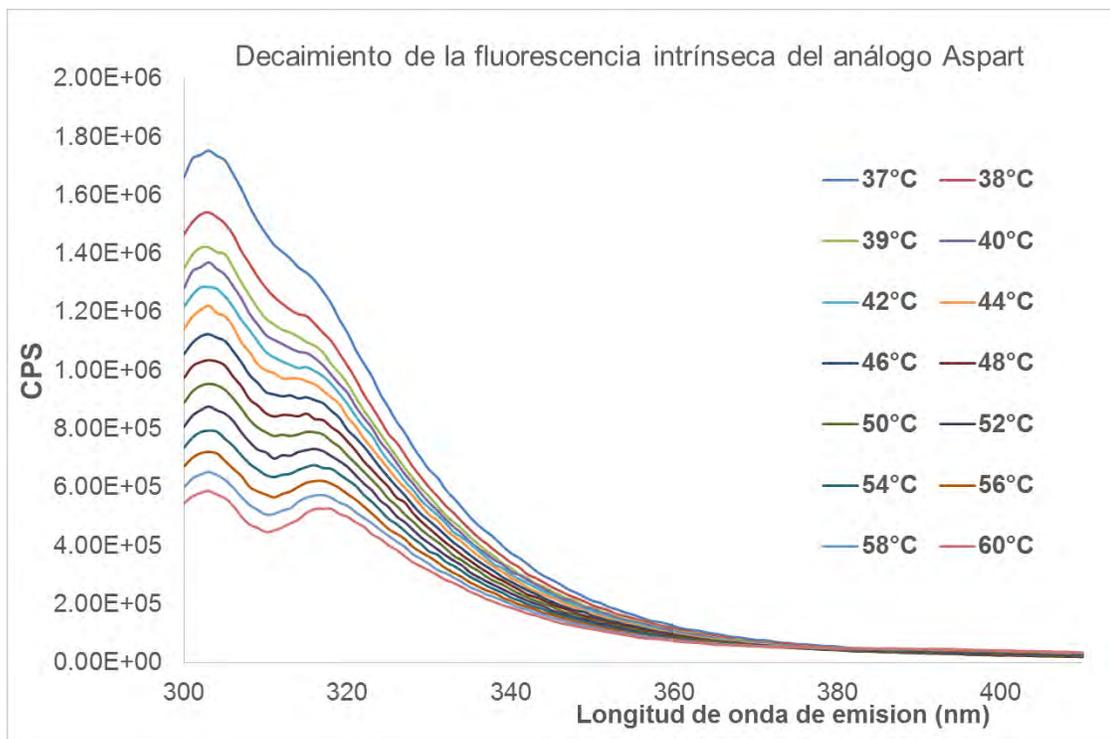


Figura A3. Espectros de fluorescencia intrínseca del análogo Aspart a la longitud de onda de excitación de 280nm en función de la temperatura. Se observan a 303 y 316 nm aproximadamente máximos de emisión. CPS, cuentas por segundo.

ANEXO III

Distribuciones del tamaño de partícula para cada análogo. Se muestran los gráficos generados a partir de la distribución en intensidad y en masa.

En los gráficos siguientes se observan picos que representan una distribución normal de los diferentes tamaños de partícula de los análogos de insulina en suspensión.

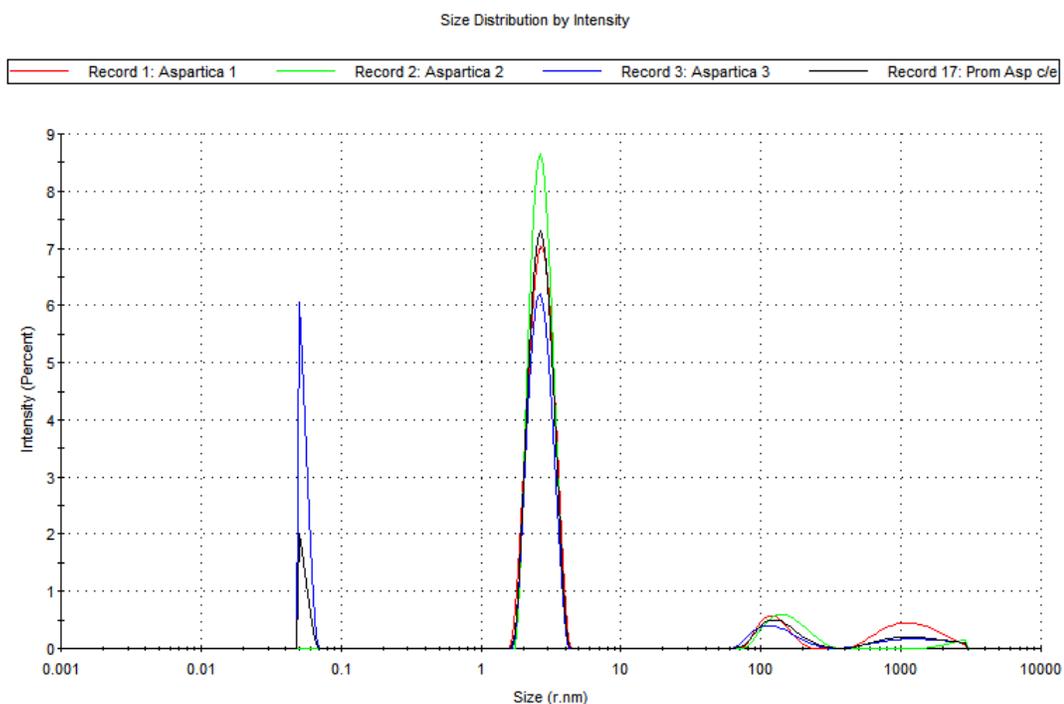


Figura A4. Distribución de las diferentes poblaciones partículas en suspensión de la insulina **Aspart**, mostrando datos en porcentaje de intensidad contra radio hidrodinámico. (Triplicado)

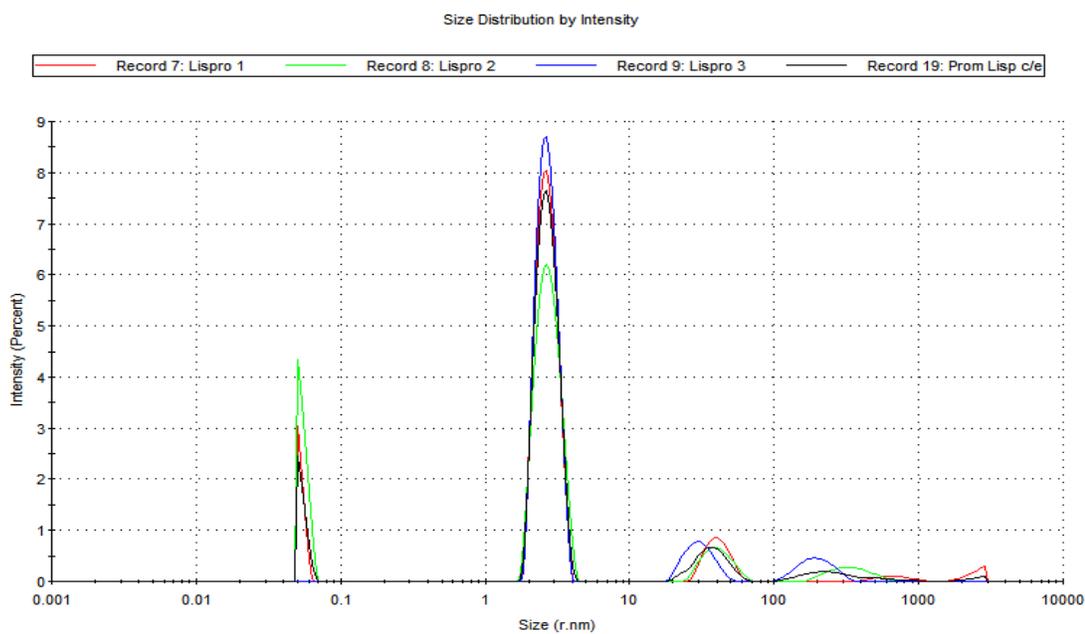


Figura A5. Distribución de las diferentes poblaciones partículas en suspensión de la insulina **Lispro**, mostrando datos en porcentaje de intensidad contra radio hidrodinámico. (Triplicado)

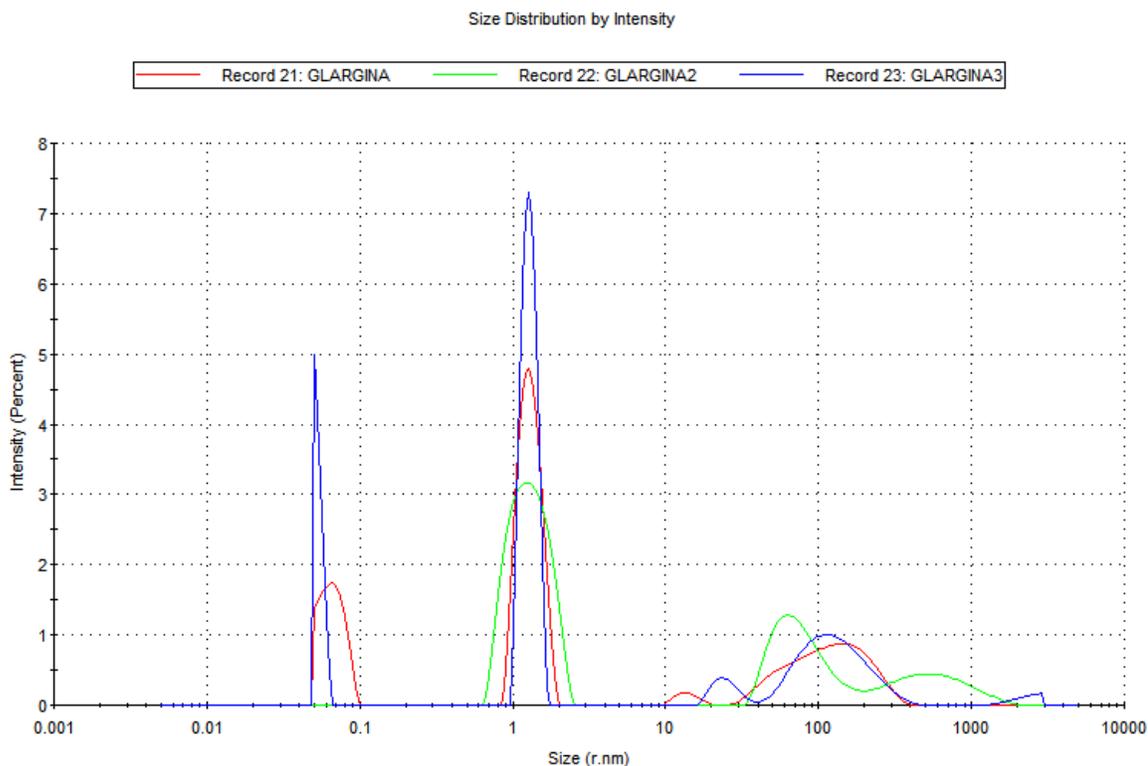


Figura A6. Distribución de las diferentes poblaciones partículas en suspensión de la insulina **Glargina**, mostrando datos en porcentaje de intensidad contra radio hidrodinámico. (Triplicado)

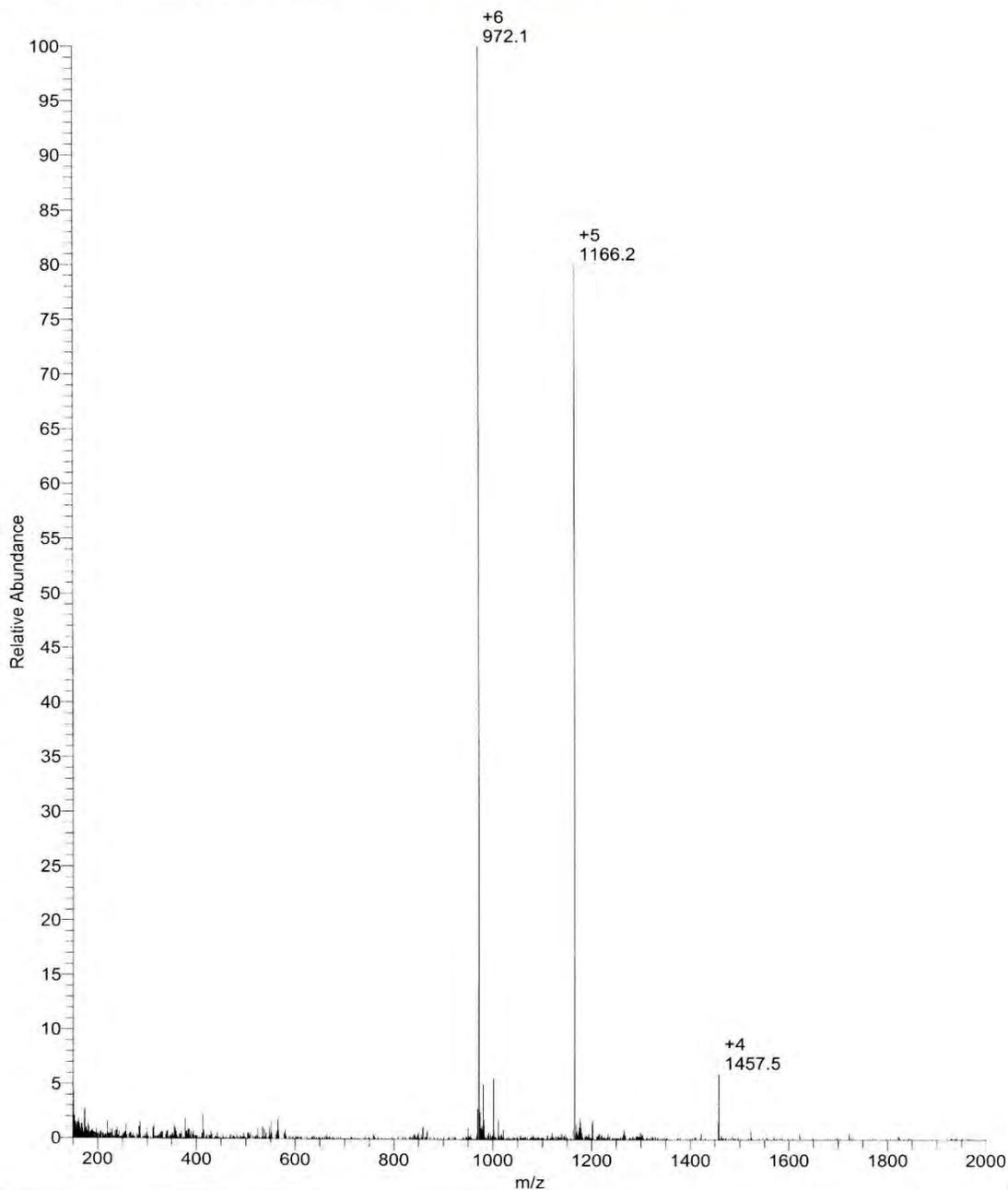
ANEXO IV

Espectrogramas de masas de los análogos Aspart, Glargina y Lispro.

Aspar_2_160211155021.raw

Page 1 of 1

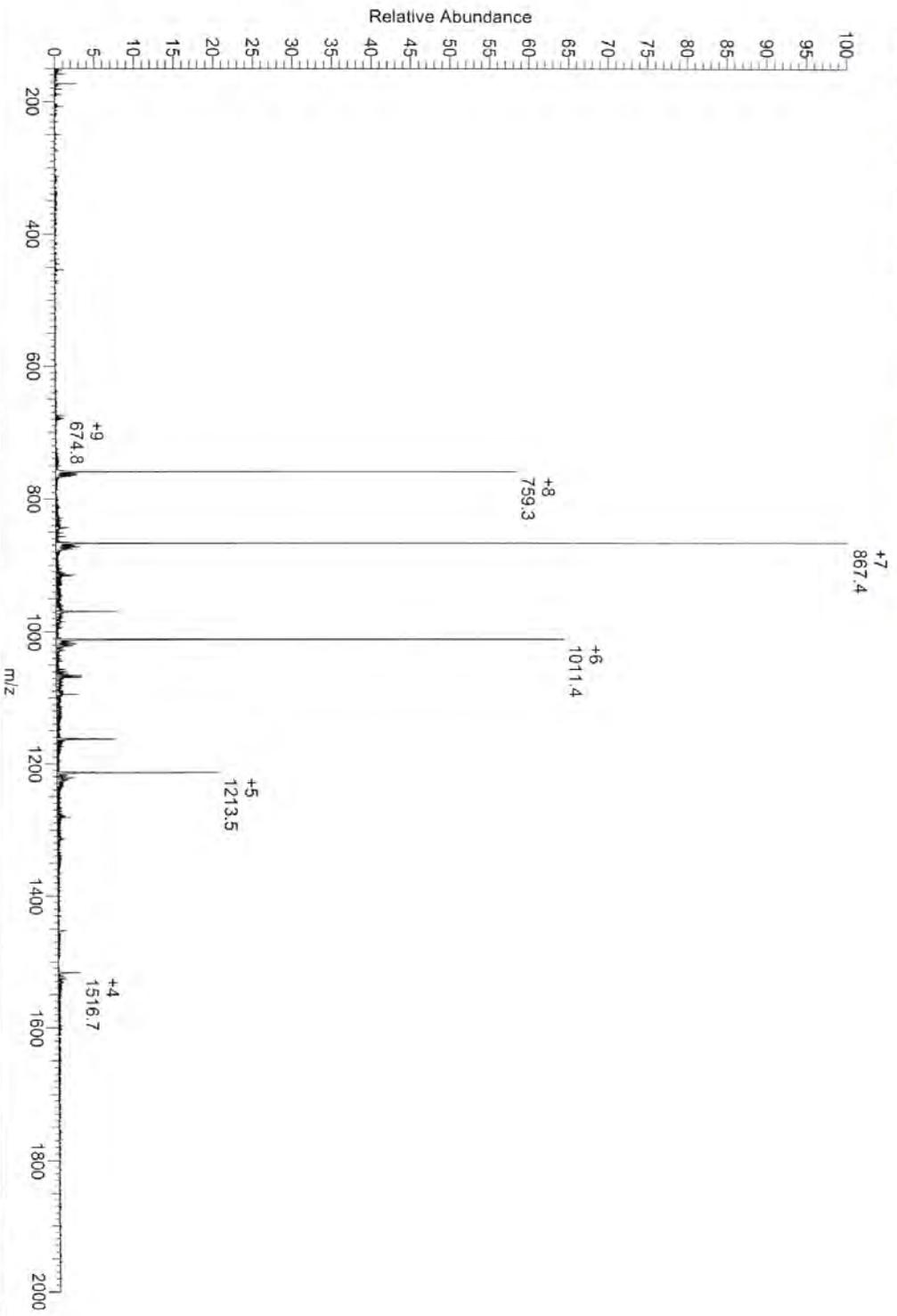
Aspar_2_160211155021 #49 RT: 0.16 NL: 1.29E5 Avg MW: 5826.1221 ± 0.30
F: ITMS + c NSI Full ms [150.00-2000.00]



BioworksBrowser rev. 3.2 EF2

2/12/2016 4:46:55 PM

Glac_1_160205163724 #44 RT: 0.15 NL: 1.60E5 Avg MW: 6063.9721 ± 0.76
F: ITMS + p NSI Full ms [150.00-2000.00]



Lyspro_1_160205163724 #680 RT: 2.70 NL: 2.08E5 Avg MW: 5607.5245 ± 0.91
F: ITMS + p NSI Full ms [150.00-2000.00]

