

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR CUANTITATIVA: NUEVAS APLICACIONES EN EL ANÁLISIS DE INGREDIENTES FARMACÉUTICOS ACTIVOS, INTERMEDIOS Y RESIDUALES EN VACUNAS BASADAS EN CARBOHIDRATOS

Autoría principal: Raine Garrido Arteaga¹

Otros autores: Vicente Vérez Bencomo, Hermán Vélez Castro, Anaís Fernández Villalobo y Alain Puyada Pérez

Colaboradores: Majela González Miró, Yohanna Serrano Rodríguez, Ubel Ramírez González, Leonid Torres Amaro, Darielys Santana Mederos, Yury Valdés Balbín, Jean Pierre Sourbal Mora, Janet Lora García, Félix Cardoso San Jorge y Violeta Fernández Santana

Centro de Química Biomolecular (CQB), BioCubaFarma. Ave 21 esq. 200, Atabey, La Habana. Telef. 2713994.

¹Autor de correspondencia. Correo electrónico raine.garrido@cqb.cu

Dr. Raine Garrido Arteaga (40%). Este autor es el ejecutor principal del trabajo que constituye la Propuesta de Premio. Es Investigador y Jefe del Grupo de Análisis del Centro de Química Biomolecular, donde se desarrolló y se aplicó el cuerpo fundamental de esta investigación. Es además, autor de los artículos científicos y los reconocimientos por la Introducción del Resultado Científico – Técnico que sustentan la propuesta de Premio. Fue el autor de la Tesis Doctoral que incluye varios de los resultados de investigación aquí descritos.

Dr. Vicente Vérez Bencomo (20%). Este autor es Director del CQB. Fue Tutor de la Tesis Doctoral que incluye varios de los resultados de investigación. Contribuyó directamente con ideas y diseño de estrategias de análisis debido a su reconocida experiencia en el campo de los Carbohidratos y en el área de la vacunología. Es co-autor de todos de los artículos y reconocimientos presentados.

Dr. Hermán Vélez Castro (20%). Este autor es Investigador retirado del CQB. Fue Tutor de la Tesis Doctoral que incluye varios de los resultados de investigación. Contribuyó y asesoró científicamente la investigación y el diseño de estrategias de análisis debido a su reconocida experiencia en el campo de la Resonancia Magnética Nuclear. Es co-autor de tres artículos y los reconocimientos presentados.

MSc. Anaís Fernández Villalobo (10%). Esta autora es Investigadora y Jefa del Laboratorio de Control de Calidad del CQB. Contribuyó directamente realizando trabajo experimental para la estandarización de varios de los procedimientos desarrollados. Adicionalmente, aportó desde su experiencia en la técnica de RMN. Es co-autora de un artículo científico y tres reconocimientos aquí presentados.

Lic. Alain Puyada Pérez (10%). Este autor contribuyó directamente realizando trabajo experimental para la estandarización y la aplicación de varios de los procedimientos desarrollados. Es co-autor de un artículo científico y varios de los reconocimientos aquí presentados. Este autor fue trabajador del CQB durante el período de septiembre 2010 y hasta enero 2013. Desde abril del presente año trabaja en el Instituto de Materiales y Reactivo para la Electrónica (IMRE).

RESUMEN

La presente Propuesta de Premio describe la optimización de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear Cuantitativa (RMNc) para su aplicación como método de análisis en varios proyectos de investigación y dos producciones de vacunas. Desde hace cuatro años cuando comenzó la aplicación de la RMNc en el CQB, esta se reveló como una poderosa herramienta analítica en Investigación, Desarrollo y para el Control de la Calidad. La RMNc incluye experimentos de RMN con algunos parámetros modificados con el objetivo de obtener señales cuantificables. Los experimentos estándar de RMNc suelen durar entre veinte minutos y algunas horas, en dependencia de la cantidad de analito y referencia en la muestra. Sin embargo, los parámetros para la adquisición pueden ser optimizados experimentalmente con una marcada repercusión en el descenso de los tiempos de adquisición de la técnica resultante. Esta alternativa cobra una especial importancia para métodos que soportan los diferentes controles en la industria. La posibilidad de disponer de procedimientos multipropósito, que permitan evaluar directamente cualitativa y cuantitativamente productos e intermedios de alto valor agregado, le imprime un atractivo especial al concurso de la RMN como técnica de elección. Desde 2009 se comenzó la evaluación de los principales parámetros a tomar en consideración para garantizar la efectividad de la técnica de RMNc. Como resultado, desde entonces, se diseñaron unos catorce procedimientos de RMNc para la evaluación cuantitativa de un total de nueve productos, seis de estos pertenecientes a tres proyectos de investigación – desarrollo de vacunas y otros tres a producciones de interés en el CQB. Otros cuatro procedimientos se optimizaron y se estandarizaron para 16 impurezas residuales en los tres intermediarios principales y el Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) del proceso de obtención de la vacuna Quimi-Hib. Así mismo, se perfiló y se redactó una propuesta de algoritmo con el objetivo de facilitar la obtención de otros procedimientos similares. A través de los resultados obtenidos y algunos experimentos complementarios realizados se resaltó la capacidad y la inmediatez de respuesta que tiene la RMNc ante necesidades analíticas de elevado impacto en la industria biofarmacéutica. Los resultados se incluyen en 4 publicaciones científicas referenciadas en la Web de la Ciencia y seis reconocimientos por la Introducción del Resultado Científico-Técnico. Adicionalmente, esta investigación fue la base de la defensa de una Tesis Doctoral en Química.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

La obtención de vacunas conjugadas contra numerosos patógenos requiere de modificaciones químicas en los polisacáridos capsulares para poder llevar a cabo la conjugación. Lo anterior demanda un conocimiento molecular preciso de estas estructuras que permita demostrar en cada paso de modificación la preservación de los elementos claves para el reconocimiento por los anticuerpos(1, 2). Adicionalmente, existe la necesidad de cuantificar los polisacáridos involucrados, no siempre satisfecha por los métodos tradicionales. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una de las técnicas más empleadas en la evaluación de principios activos e intermedios de alto valor agregado en la industria farmacéutica. La RMNc consiste en la adquisición de un experimento de RMN monodimensional que incluye mucha información estructural del analito, pero con varios parámetros modificados, con el objetivo de obtener espectros con señales cuantificables (más del 99,9 % de recuperación de la magnetización de equilibrio)(3). Existen valores teóricos que conducen a los experimentos de RMNc estándar. Estos experimentos fueron validados como parte de los trabajos de Tareq Al Deen en 2002 para el empleo de la RMNc como un estándar primario relativo de cuantificación(4). Algunos de los experimentos estándares de RMNc suelen durar más de veinte minutos, incluso horas, en dependencia de la cantidad de analito y referencia en la muestra. Sin embargo, los parámetros para la adquisición pueden ser optimizados experimentalmente con una marcada repercusión en el descenso de los tiempos de adquisición de la técnica resultante. Esta alternativa cobra una especial importancia para métodos que soportan los diferentes controles en la industria. La posibilidad de disponer de procedimientos multipropósito, que permitan evaluar directamente cualitativa y cuantitativamente productos e intermedios de valor farmacéutico, le imprime un atractivo especial al concurso de la RMN como técnica de elección para la evaluación cuantitativa. El presente trabajo ilustra la capacidad de la RMNc para evaluar cuantitativamente compuestos basados en carbohidratos de elevada complejidad estructural. En el trabajo se desarrolla un algoritmo que permite implementar y optimizar procedimientos de cuantificación por RMN para productos de interés biofarmacéutico. Mediante el empleo de esta metodología, se desarrollaron varios procedimientos de RMNc. En la actualidad, la mayoría de estos se emplean como ensayos de rutina de Investigación y en Control de la Calidad en el CQB.

Discusión y resultados

Procedimientos de RMNc optimizados

Los parámetros a modificar para RMNc dependen notablemente de los tiempos de relajación de los núcleos a evaluar en el analito y la referencia empleada(5).

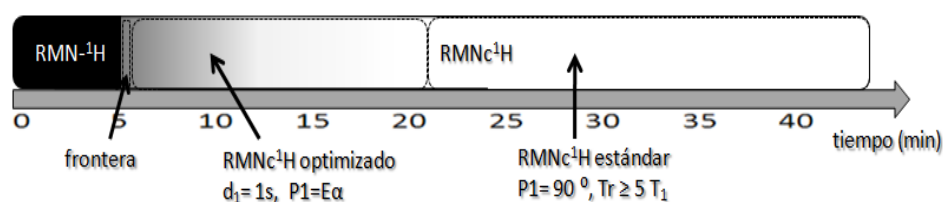


Figura 1. Esquema de transición de la RMN protónica de rutina a la RMN protónica cuantitativa.

Como se muestra en la Fig.1, a partir del experimento ordinario de RMN-¹H (área negra) y tras el ajuste de un grupo de parámetros, se llega a una frontera o zona de transición (área gris) desde la cual el experimento comienza a ser cuantitativo para algunos de los núcleos de la muestra (área de degradado). A partir de un momento, se llega a la zona donde el experimento de RMN-¹H estándar es cuantitativo para todos los núcleos de la muestra (área blanca). Los experimentos desarrollados se ajustaron para lograr una adquisición adecuada en un tiempo razonable.

Este impacto en los tiempos para el completamiento de la obtención de la FID cobra una vital importancia cuando estos procedimientos se convierten en controles de proceso y calidad y se emplean con frecuencia.

Algoritmo

Para el desarrollo del trabajo experimental, dado la heterogeneidad de parámetros a ajustar para individualizar el método de RMNc, se propuso, y paulatinamente se mejoró, un algoritmo de cuatro etapas para el desarrollo de los procedimientos de RMNc, descrito en la tabla a continuación. Este algoritmo constituye el primer resultado del trabajo que facilitó el desarrollo de sucesivos métodos de cuantificación basados en RMNc. Las cuatro etapas del proceso propuesto permiten abordar paso a paso de una forma organizada el desarrollo de los métodos de cuantificación antes mencionados.

Tabla I. Algoritmo para RMNc

Etapas	Pasos	Etapas	Pasos
A	1. Evaluación cualitativa de la muestra.	C	7. Ajuste de las condiciones de preparación de la muestra.
	2. Selección del núcleo (o núcleos) a evaluar.		8. Cálculo del ángulo de Ernst.
	3. Selección de la referencia.		9. Ajuste de los parámetros de adquisición.
	4. Determinación de los tiempos de relajación.		10. Ajuste de los parámetros de procesamiento.
B	5. Calibración de la referencia.	D	11. Validación del procedimiento.
	6. Ajuste de la ecuación para cuantificar la muestra.		

Proyecto de obtención de una vacuna conjugada contra *Neisseria meningitidis*

Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. Vol.4, No.2, Año 2014 4

Este proyecto se encuentra en fase de desarrollo e incluye el trabajo con cinco polisacáridos A, C, X, Y y W135 para obtener una vacuna contra los serogrupos de mayor incidencia a nivel global. De estos, para A y X se desarrollaron un total de cuatro procedimientos por RMNc. Para el polisacárido del serogrupo A, primeramente se desarrolló un procedimiento estándar para la evaluación del contenido de O-acetilación en cada uno de los intermedios y en el conjugado monovalente. La evaluación de O-acetatos en este serogrupo es un parámetro de obligado monitoreo debido a que el contenido de O-acetatos influye directamente en la respuesta inmunológica del conjugado final.

Adicionalmente se desarrolló un procedimiento basado en RMNc de fósforo para cuantificar el polisacárido. Por su parte, para el serogrupo X se desarrollaron dos procedimientos alternativos que permiten la cuantificación del polisacárido, uno basado en RMNc de protones(6) y otro en RMNc de fósforo.

Proyecto de obtención de una vacuna conjugada contra *Streptococcus pneumoniae*

Este proyecto se encuentra en fase de ensayos clínicos e incluye el trabajo con siete polisacáridos. Como resultado se obtiene una formulación heptavalente preventiva contra infecciones causadas por siete serotipos de este patógeno en infantes. Al igual que el serogrupo A de *Neisseria meningitidis*, fue necesario desarrollar un procedimiento de RMNc para monitorear el contenido de O-acetatos en los intermedios del serotipo 1. Un segundo procedimiento se desarrolló para cuantificar el contenido de polisacárido C en cada uno de los siete polisacáridos trabajados en el proyecto. El polisacárido C es una impureza común que comparten todos los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, la sobre expresión de este polisacárido en la formulación de la vacuna puede traer complicaciones relacionadas con la respuesta inmunológica. El procedimiento propuesto combina la RMNc de fósforo con la de protones para solucionar la evaluación en cada uno de los siete polisacáridos capsulares.

Proyecto de obtención de una vacuna conjugada contra *Salmonella typhi* serotipo Vi

Este proyecto incluye el trabajo con un polisacárido de elevada heterogeneidad estructural. El mismo tiene como alcance una vacuna preventiva contra la fiebre tifoidea. Al igual que en escenarios anteriores la respuesta del conjugado del serotipo Vi se ve afectada por bajos niveles de O-acetilación, por tanto se diseñó un procedimiento para la evaluación de O-acetatos en el polisacárido y en el conjugado monovalente. Por otra parte se desarrolló un procedimiento de RMNc de protones para la evaluación de residuales en el IFA. Como peculiaridad este procedimiento se basa en la deconvolución para el cálculo del área de las señales de interés debido su marcado solapamiento. Finalmente se ajustó el procedimiento de RMNc para determinar la cantidad de polisacárido en el conjugado.

Proyecto de obtención del gangliósido sintético N-acetil GM3

El proyecto de obtención de gangliósidos se concentra en el diseño de alternativas

sintéticas para la obtención de estas biomoléculas. El N-acetil GM3 fue uno de los primeros compuestos obtenidos por esta vía en el CQB y desde el 2012 se produce(7). En la actualidad se está organizando el control de la calidad de este producto y se diseñó un procedimiento basado en RMNc de protones para la cuantificación de este gangliósido; de esta forma se obtiene un criterio preciso de la pureza del producto final.

Evaluación cuantitativa de residuales del proceso de obtención de la vacuna Quimi-Hib

La vacuna Quimi-Hib es una formulación basada en un conjugado monovalente que incluye un antígeno que se obtiene por síntesis química enlazado a una proteína portadora. Esta formulación previene de las infecciones causadas por el *Haemophilus influenzae* serotipo b (*Hib*) en niños fundamentalmente. El proceso tiene definido cuatro puntos de Control de la Calidad donde se van evaluando escalonadamente los posibles reactivos residuales que puede incluir cada intermedio y el IFA.

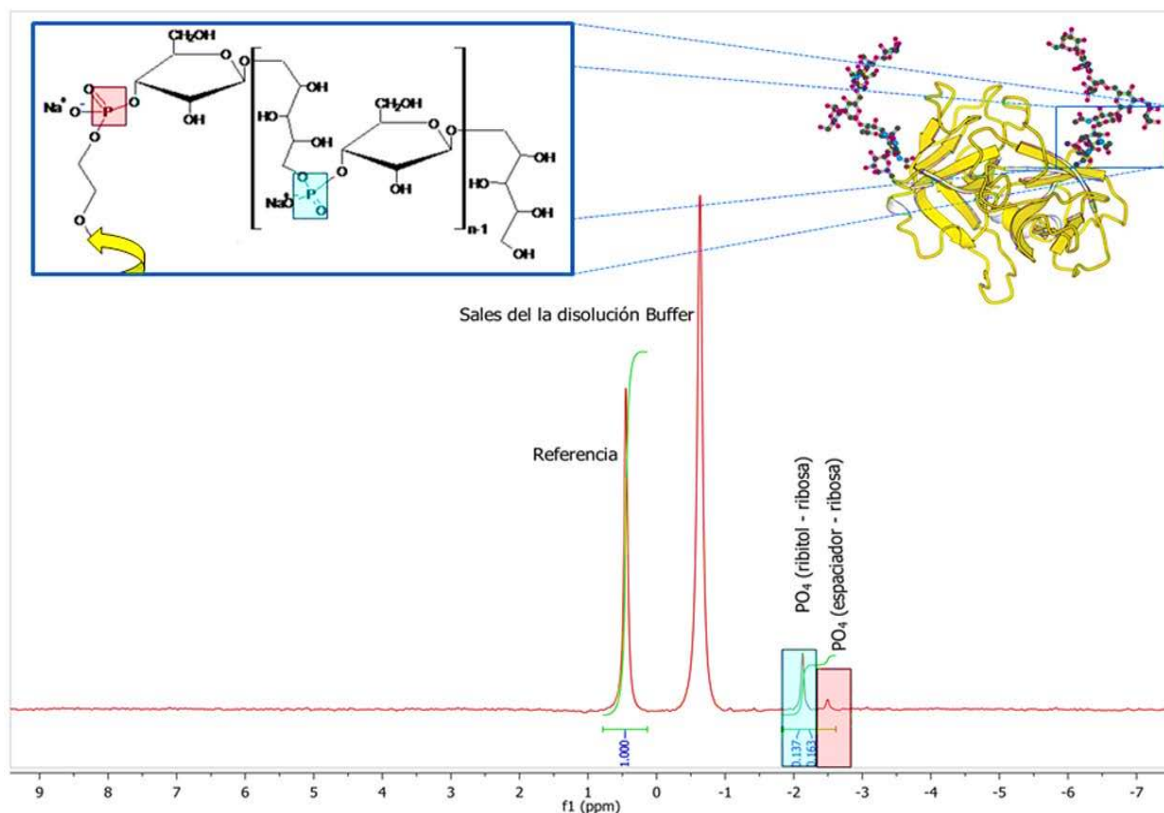


Figura 2. Espectro de RMNc de fósforo para el IFA de la vacuna Quimi-Hib

Desde el registro de la vacuna se diseñó un procedimiento semi-cuantitativo donde se realizaba una comparación visual de la señal de impureza contra una similar en un espectro de referencia (criterio de aceptación) con el objetivo de resolver este requerimiento regulatorio. Sin embargo, con el cambio de tecnología desde 2010 en la unidad de RMN del CQB se comenzó a trabajar en procedimientos cuantitativos para brindar una solución definitiva al análisis de impurezas. Así se optimizaron cuatro procedimientos de RMNc de protones para la evaluación de impurezas en los intermedios y el IFA de Quimi-Hib(8).

Adicionalmente se desarrolló un procedimiento de RMNc de fósforo para la cuantificación del polisacárido total en el IFA (Fig. 2).

Conclusiones

En este trabajo se describieron los principales resultados de algunos años de investigación dirigida al desarrollo y optimización de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear Cuantitativa (RMNc) para su aplicación como método de análisis en varios proyectos y producciones de vacunas basadas en carbohidratos; la novedad del trabajo radica en la aplicación de esta técnica para evaluar cuantitativamente diferentes compuestos basados en carbohidratos de elevada complejidad estructural. Como parte del trabajo se desarrolló un algoritmo que permite implementar y optimizar procedimientos de cuantificación por RMN para productos de interés biofarmacéutico. Mediante el empleo de esta metodología, se desarrollaron catorce procedimientos de RMNc los cuales constituyen herramientas para el avance de varios proyectos de investigación y en los controles de calidad de dos procesos productivos.

Referencias bibliográficas

- (1) Chang J, Serrano Y, Garrido R, Rodríguez LM, Pedroso J, Cardoso F, et al. Relevance of O-Acetyl and Phosphoglycerol Substituent in the Antigenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 18C Capsular Polysaccharide. *Vaccine*. 2012;30 7090-6.
- (2) Chang J, Serrano Y, Garrido R, Pedroso J, Cardoso F, García D, et al. Caracterización de conjugados inmunogénicos de polisacárido capsular *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14. *VacciMonitor*. 2013;22(1):15-21.
- (3) Garrido R, Vélez H, Vérez V. Resonancia Magnética Nuclear Cuantitativa, Nuevas aplicaciones en vacunas basadas en polisacáridos. *VacciMonitor*. 2013;22(1):35-42.
- (4) Al-Deen T. Validation of Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) as a Primary Ratio Analytical Method for the Assessing the Purity of Organic Compound: a Metrological Approach. Sydney: The University of New South Wales; 2002.
- (5) Pauli GF, Jaki BU, Lankin DC. Quantitative ^1H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. *J Nat Prod* 2005;68(1):133-49.
- (6) Garrido R, Puyada A, Fernández A, González M, Ramírez U, Cardoso F, et al. Quantitative nuclear magnetic resonance analysis and total assignment of the capsular polysaccharide *Neisseria meningitidis* serogroup X. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012;70:295-300.
- (7) López López M, Regalado Calderín A, Mesa Hernández M, Chávez Piñeiro D, González Serpa R, Monteserín Castanedo L, et al. A New and Efficient Approach to Prepare N-acetyl GM Ganglioside Via Trisaccharide [1→4] Lactone. *Org Process Res Dev*. 2013;17 (1):53–60.

(8) Garrido R, Cardoso F, Rodríguez MC, Fernández V, Vélez H, Vérez V. Quantitative proton magnetic resonance determination of N,N dimethylformamide in one intermediate of the Quimi Hib vaccine. . MagnResonChem. 2012;50(8):525-8.