

# Caracterización del peso molecular del OS-PAMAM mediante el método de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para su control de calidad

Sergio Andrés Torres Pérez<sup>B</sup>, Horacio Hernández Salinas<sup>A</sup>, Luis Vallejo Castillo<sup>B,C</sup>, Said Vázquez Leyva<sup>B,C</sup>, Sonia Mayra Pérez Tapia<sup>B,C</sup>, Eva Ramón Gallegos<sup>A</sup>.

<sup>A</sup> Laboratorio de Citopatología Ambiental, Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Campus Zacatenco, Ciudad de México, México.

<sup>B</sup> Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

<sup>C</sup> Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i) para Farmoquímicos y Biotecnológicos (LANSEIDI-FarBiotec\_CONACyT), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.



## Link de transmisión

<https://meet.google.com/how-vvqv-yfi>

## Resumen

Los dendrímeros PAMAM son nanopartículas empleadas como una plataforma para la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías para la entrega de fármacos. Su síntesis consiste en una serie de reacciones consecutivas que dan lugar a la formación de ramificaciones o generaciones que crecen conforme aumenta el número de reacciones, esto emplea una importante cantidad de reactivos y tiempo en cada reacción, lo cual se reduce mediante la síntesis de PAMAM por el método de un solo paso (OS-PAMAM), patente MXA2018008247. El objetivo de este proyecto fue analizar el peso molecular (MW) de OS-PAMAM por método de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y determinar la reproducibilidad entre 3 lotes de producción de OS-PAMAM y su comparación con un dendrímero de generación 6 (G6), así como determinar su estabilidad acelerada. Las condiciones de estandarización del SEC fueron: 5  $\mu$ L (30  $\mu$ g/mL) de ambas muestras de dendrímero en un sistema Acquity UPLC equipado con una columna Acquity UPLC BEH SEC 200  $\text{\AA}$  (4.6 mm x 300 mm, 1.7  $\mu$ m), que se mantuvo a 30  $^{\circ}$ C durante el análisis. La fase móvil fue una solución tampón de fosfato 50 mM/NaCl 150 mM (pH 6.0), a 0.4 ml/min. Los datos se adquirieron a 215 nm y se procesaron utilizando el software Empower. El peso molecular se determinó mediante regresión lineal del valor máximo en unidades de absorbancia (AU) basado en el estándar de PM de 1.5 a 670 kDa, Cat 151-1901. Se compararon tres lotes de OS-PAMAM y G6 de Sigma-Aldrich. Se obtuvo que los OS-PAMAM y G6 tienen un peso promedio de 8.5 kDa y 86 kDa respectivamente en los tres lotes, siendo 10 veces menor el peso del OS-PAMAM al comercial.

## Introducción

Los dendrímeros son nanopartículas que han adquirido mayor importancia para el desarrollo de nuevas tecnologías en el área médica, pero su producción es tardada y costosa. Mediante el desarrollo del método de síntesis de un solo paso se logra solucionar esta problemática, sin embargo, para su utilización es necesario conocer sus características fisicoquímicas. Y de esta manera, cumplir las normativas nacionales e internacionales que avalen su seguridad y reproducibilidad para su uso. Los requisitos mínimos indispensables para la caracterización de una molécula nueva es conocer su 1) composición química, 2) tamaño promedio, 3) distribución del tamaño de la partícula, 4) morfología y 5) estabilidad. Por lo cual, es necesario realizar la caracterización de la nanopartícula como un requisito indispensable para su aprobación con el objetivo de lograr su aplicabilidad en el humano.

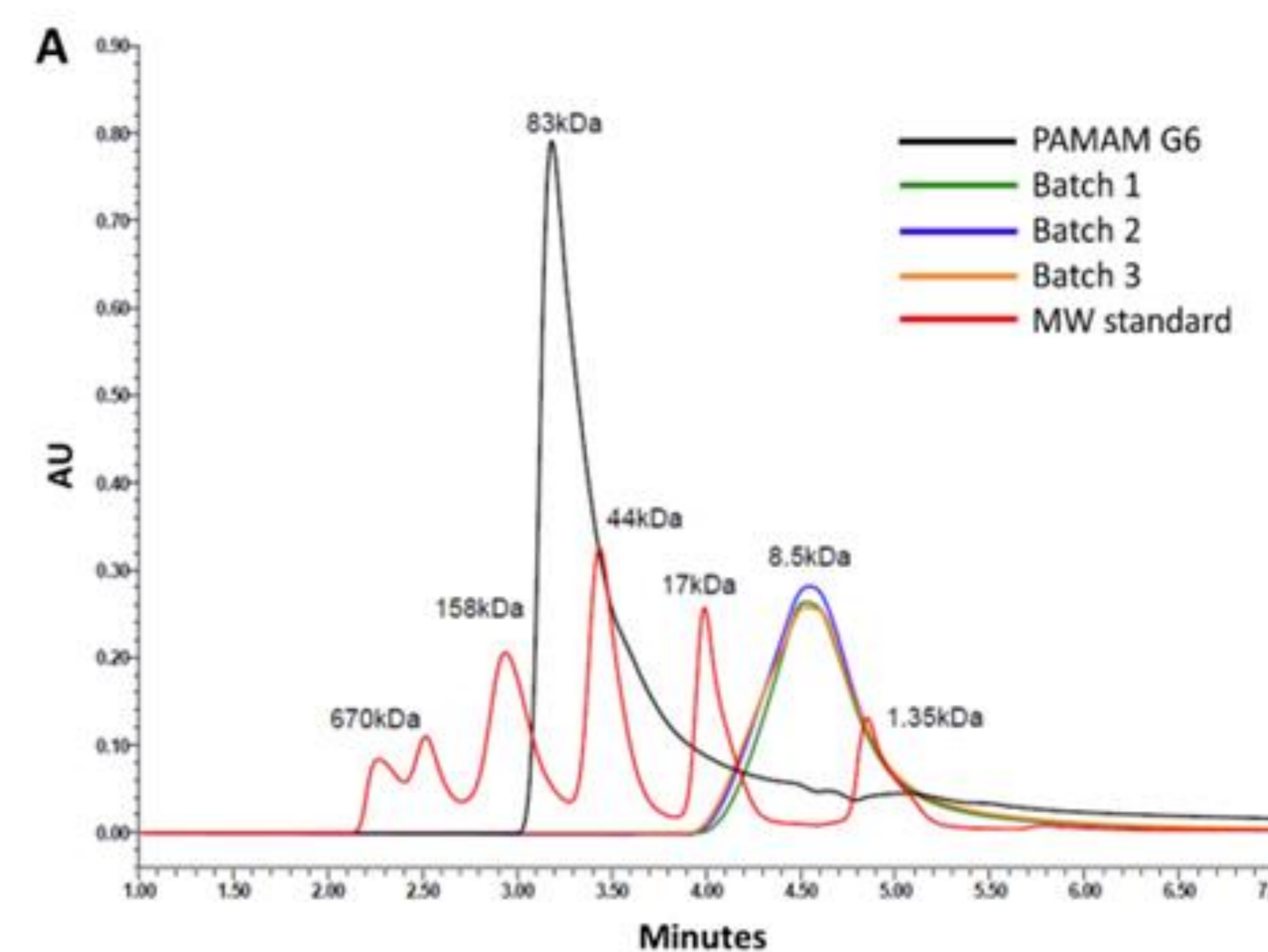
## Objetivo

Establecer el peso molecular de los dendrímeros OS-PAMAM comparado con dendrímeros comerciales PAMAM-G6 mediante el método de cromatografía de exclusión por tamaño.

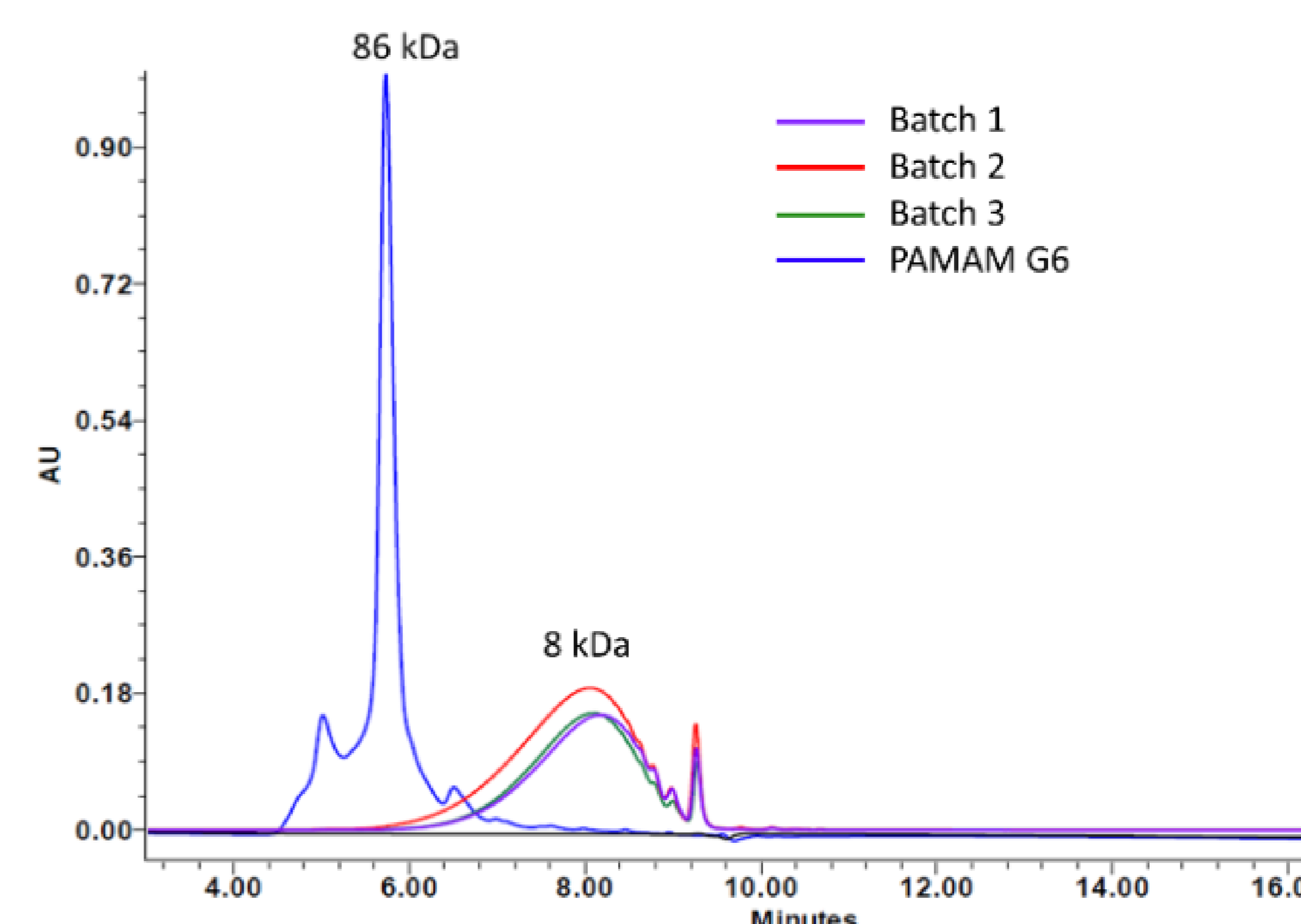
## Metodología

Se inyectó un volumen de dendrímeros OS-PAMAM y PAMAM-G6, ambas una concentración de 30 mg/mL en un sistema Acquity UPLC. Equipado con una columna Acquity UPLC BEH SEC 200  $\text{\AA}$  (4,6 mm x 300 mm, 1,7  $\mu$ m), que se mantuvo a 30  $^{\circ}$ C durante el análisis. La separación se logró utilizando una solución tampón de fosfato 50 mM / NaCl 150 mM (pH 6.0) como fase móvil a 0.4 mL/min. Los datos se adquirieron a 215 nm y se procesaron utilizando el software Empower. El peso molecular se determinó mediante regresión lineal del valor máximo en unidades de absorbancia (AU) basado en el estándar de PM de 1.5 a 670 kDa, Cat 151-1901.

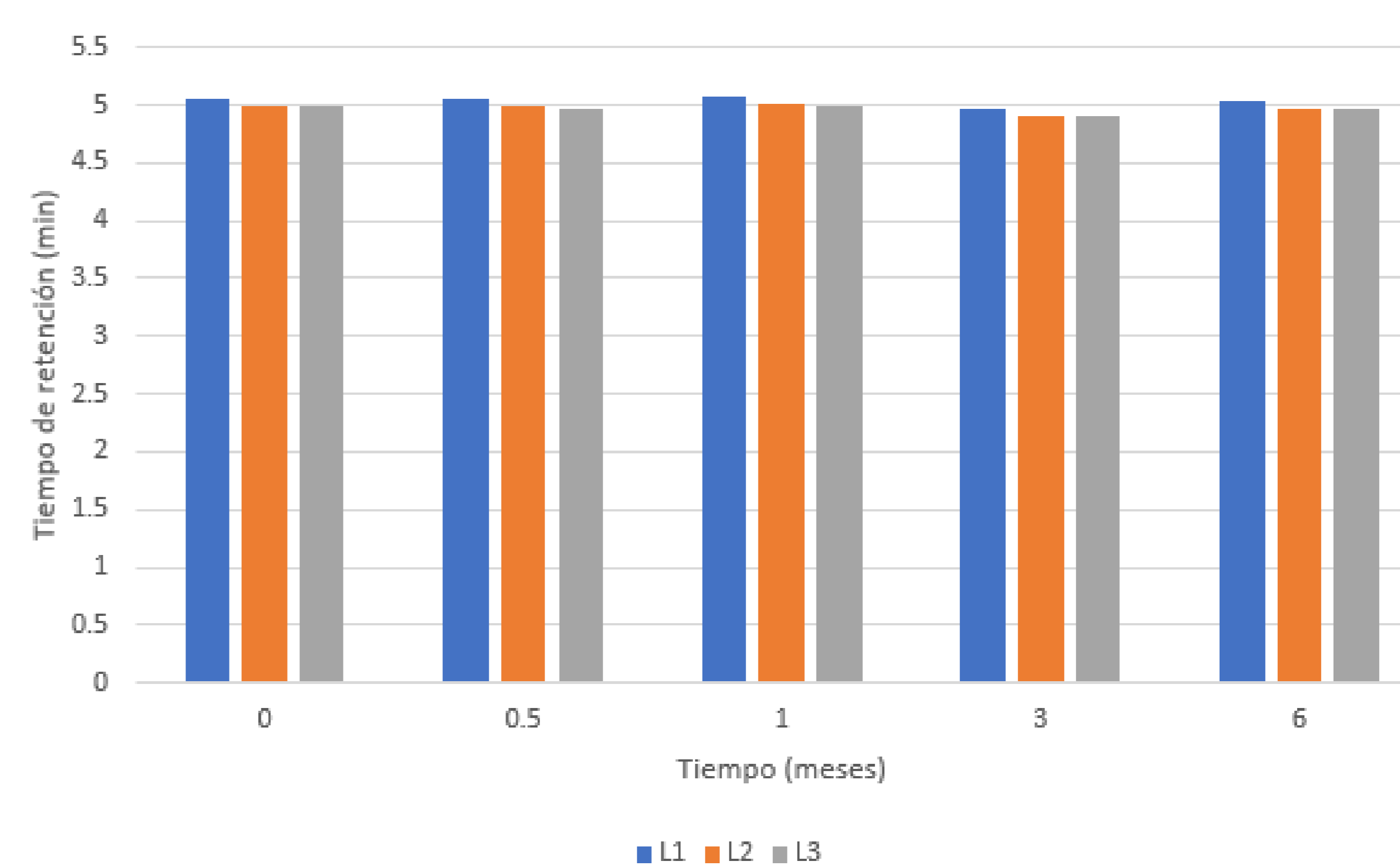
## Resultados



**Figura 1. Peso molecular (MW) entre lotes OS-PAMAM y PAMAM G6 por SEC.** (A) Se comparó el cromatograma del dendrímero PAMAM-G6 a 215 nm (línea negra) con tres lotes independientes de OS-PAMAM (línea verde, azul y naranja) a pH 6,8. El MW se determinó mediante regresión lineal del valor máximo en unidades de absorbancia (UA) con base a la curva estándar de MW (datos no mostrados).



**Figura 2. Peso molecular (MW) de OS-PAMAM y PAMAM G6 por SEC.** Cromatograma a 215 nm de dendrímero PAMAM-G6 (línea azul) en comparación con 3 lotes independientes de OS-PAMAM (línea verde, roja y violeta) a pH 2,5 después de cinco meses de almacenamiento en condiciones comerciales (metanol a  $5 \pm 3$   $^{\circ}$ C). Se calculó el MW de los lotes OS-PAMAM considerando como referencia PAMAM-G6.



**Figura 3. Pruebas de estabilidad acelerada de dendrímeros OS-PAMAM en diferentes tiempos.**

## Conclusión

Podemos concluir que existe una reproducibilidad en la síntesis de dendrímeros OS-PAMAM entre los diferentes lotes, con un peso molecular promedio de 8.5 kDa, 10 veces menor que el comercial (86 kDa). Al mismo tiempo, se encontró una adecuada estabilidad de la nanopartícula OS-PAMAM a lo largo de 6 meses bajo condiciones de estabilidad acelerada.

## Bibliografía

- Gupta, A., Dubey, S., & Mishra, M. (2018). Unique structures, properties and applications of dendrimers. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(6-s), 328-339.
- Torres-Pérez, S. A., Vallejo-Castillo, L., Vázquez-Leyva, S., Zepeda-Vallejo, L. G., Herbert-Pucheta, J. E., Severac, C., Dague, E., Pérez-Tapia, S. M., & Ramón-Gallegos, E. (2022). Structural and physicochemical characteristics of one-step PAMAM dendrimeric nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 633, 127819.