

Artículos Originales

Instituto Finlay. Centro de Investigación – Producción
de vacunas y sueros

PASTEURIZACIÓN DE SOLUCIONES DE INMUNOGLOBULINAS DE USO INTRAVENOSO. 1. USO DE AZÚCARES COMO ESTABILIZANTES

Armando Cádiz Lahens,¹ Janhna Hernández Machín,² Lázaro Joó
Sánchez,³ Aniel Moya Torres⁴ y Amador Camero Santiesteban⁵

RESUMEN

Se realizó la pasteurización a partir de la unión de los sobrenadantes II de 4 lotes de plasma normal sometidos a fraccionamiento alcohólico, con la utilización de los estabilizantes siguientes: sorbitol, sacarosa y dextrosa al 30 %. El grado de agregación molecular se determinó por cromatografía en gel. Entre los estabilizantes utilizados, el sorbitol presentó los mejores resultados, con formación de polímeros que fluctúan entre el 10 – 15 %, valores que se corresponden con los reportados por otros autores. Estos polímeros según los requerimientos de la OMS deben ser eliminados por otros procedimientos para obtener valores inferiores al 10 %.

Descriptores DeCS: CALOR; ESTERILIZACION/métodos; INMUNOGLOBULINAS INTRAVENOSAS/aislamientos & purificación; IGG/aislamiento & purificación.

La sangre constituye un producto biológico, cuyo origen es sumamente variable, ésta es la razón fundamental por la cual puede ser causante de serios accidentes, entre ellos la transmisión de enfermedades virales de alto riesgo, como:

hepatitis B, hepatitis C, SIDA, citomegalovirus (CMV) y parvovirus, entre otros.¹

Aunque la selección del donante y los procedimientos de examen del material de partida, desempeñan una función

¹ Licenciado en Biología. Investigador Titular.

² Licenciada en Microbiología.

³ Licenciado en Biología y Bioquímica.

⁴ Licenciado en Bioquímica. Aspirante a Investigador.

⁵ Licenciado en Biología.

importante en la reducción de la contaminación con virus del *pool* de plasma, es aceptado que estas medidas sólo ofrecen una limitada seguridad al producto por:

- Limitada sensibilidad de las pruebas. (Falsos negativos).
- Período de ventana: tiempo del individuo infectado e infeccioso sin marcadores detectables. (Ejemplo: SIDA).
- Riesgo intrínseco del error del examen masivo.
- Virus que aún no poseen un método de pesquisaje adaptado a las donaciones de sangre.

El estudio de los lotes finales también presenta limitaciones, fundamentalmente por la limitada sensibilidad de los ensayos para detectar virus en tan bajas concentraciones, altas concentraciones del principio activo, presencia de anticuerpos contra el virus específico, además del error que introduce el propio muestreo de grandes lotes de productos.²

Por estas razones, los procedimientos de inactivación y/o remoción de virus desempeñan una función esencial en el establecimiento de la seguridad de un producto biológico, los cuales brindan una alta probabilidad de que cualquier virus desconocido no sospechado y peligroso sea removido o inactivado.³⁻⁶

El calentamiento en solución (60 °C durante 10 h) es un método que en adición al fraccionamiento etanólico del plasma muestra resultados seguros en la inactivación viral.^{7,8} Este calentamiento ha sido combinado con el uso de estabilizantes para evitar la agregación de la molécula de IgG durante el calentamiento.⁹⁻¹²

En el presente trabajo utilizamos algunos de estos estabilizantes con vistas a estudiar la agregación durante el calentamiento en soluciones de IgG.

MÉTODOS

A partir de la unión de los sobrenadantes II (Sob. II) de 4 lotes de plasma normal sometidos a fraccionamiento alcohólico,¹³ se efectuaron los procedimientos siguientes:

Pasteurización en un rango de pH de 4,0 a 7,0 con intervalos de 0,5 unidades y la utilización de sorbitol 30 %, sacarosa 30 % y dextrosa 30 % como estabilizantes.

El calentamiento se realizó en un baño de agua (Precisterms - 138, Selecta), de temperatura controlada a 60 °C durante las 10 h establecidas.

Las muestras pasteurizadas fueron sometidas a cromatografía en gel, para determinar el porcentaje de polímeros y dímeros originados por el calentamiento.

Por la alta concentración del Sob. II (26,27 mg/mL), realizamos a las muestras una dilución 1:4, para desarrollar corridas dentro del rango de concentraciones establecidas para este método y la sensibilidad seleccionada, y así obtener una mayor resolución en el cromatograma.

La matriz utilizada fue el Sephacril S -300, columna Pharmacia XK 16/70, sensibilidad 0,2, velocidad del papel 0,01 mm/min, flujo 30 mLh⁻¹ y como *buffer* de corrida solución salina tamponada con fosfato (0,1 M) o solución tamponada con acetato (0,1 M) en dependencia del rango de pH de las muestras.

El porcentaje de polímeros, dímeros y monómeros fue determinado por el cálculo del peso del área bajo la curva.

RESULTADOS

Conforme a las regulaciones de la OMS, el *pool* de Sob. II utilizado como material de partida para este trabajo consta del 3,8 % de polímeros, el 5,12 % de dímeros y el 91 % de monómeros.

La formación de polímeros de IgG durante la pasteurización con sorbitol fue determinada por cromatografía en gel; obsérvese la mayor proporción de polímeros a pH 4,5 y la menor a pH 6,5 (tabla 1).

TABLA 1. *Pasteurización del intactoglobin con sorbitol como estabilizante*

Muestras	Porcentaje de polímeros	Porcentaje de dímeros	Porcentaje de monómeros
pH 4,0	20,9	39,1	40,0
pH 4,5	32,1	-	67,9
pH 5,0	18,0	-	82,0
pH 5,5	13,0	12,0	75,0
pH 6,0	18,0	-	82,0
pH 6,5	12,0	11,0	77,0
pH 7,0	12,8	6,7	80,5

* Gelificado. ____: Ausencia.

Empleando sacarosa como estabilizante los mayores porcentajes de polímeros se obtuvieron a pH 4,0 y 4,5, con valores relativamente constantes y menores para pH de 5,0 a 7,0 (tabla 2).

TABLA 2. *Pasteurización del intactoglobin con sacarosa como estabilizante*

Muestras	Porcentaje de polímeros	Porcentaje de dímeros	Porcentaje de monómeros
pH 4,0	72,8	-	27,2
pH 4,5	43,9	-	56,1
pH 5,0	18,0	4,0	78,0
pH 5,5	18,0	2,0	80,0
pH 6,0	18,0	12,0	70,0
pH 6,5	20,0	7,0	73,0
pH 7,0	18,0	3,0	79,0

* Gelificado. ____: Ausencia.

En este estudio el tercer estabilizante utilizado fue la dextrosa, con el mayor porcentaje de polímeros a pH 4,0 y el menor a pH 5,5 (tabla 3).

TABLA 3. *Pasteurización del intactoglobin con dextrosa como estabilizante*

Muestras	Porcentaje de polímeros	Porcentaje de dímeros	Porcentaje de monómeros
pH 4,0	45,6	14,2	40,2
pH 4,5	23,0	13,9	63,1
pH 5,0	28,3	-	71,7
pH 5,5	15,0	20,0	65,0
pH 6,0	16,8	11,2	72,0
pH 6,5	16,0	3,4	80,6
pH 7,0	16,0	20,3	63,3

* Gelificado ____: Ausencia.

Los patrones sin estabilizantes también muestran el mayor porcentaje de polímeros a pH 4,0 y el menor a pH 5,0; obsérvese la gelificación total de ellos a partir de pH 5,5 (tabla 4).

TABLA 4. *Pasteurización del intactoglobin sin estabilizante*

Muestras	Porcentaje de polímeros	Porcentaje de dímeros	Porcentaje de monómeros
pH 4,0	87,6	-	12,4
pH 4,5	69,8	-	30,2
pH 5,0	58,0	-	42,0
pH 5,5	*	*	*
pH 6,0	*	*	*
pH 6,5	*	*	*
pH 7,0	*	*	*

*Gelificado ____: Ausencia.

DISCUSIÓN

Las inmunoglobulinas de uso intramuscular presentan una larga vida y segura historia de uso sin transmitir virus.¹⁴ Sin embargo, en la última década se han presentado algunas comunicaciones de transmisión de hepatitis C en inmunoglobulinas intravenosas (IGIV).⁵⁻¹⁸

En la búsqueda de métodos complementarios al fraccionamiento alcohólico del plasma para la obtención de IGIV cada vez más seguros, realizamos la

pasteurización de preparaciones de IgG a diferentes pH y estabilizantes, y estudiamos el efecto de estos preservantes en la estabilidad térmica de la IgG humana y la formación de agregados durante el período de calentamiento, teniendo en consideración los requerimientos de la OMS.¹⁹

Es conocido desde la década de los 60 que los agregados de IgG pueden activar el sistema complemento y causar reacciones adversas;²⁰ el material de partida utilizado en estos estudios poseía el 3,8 % de polímeros, por lo cual teníamos solamente un margen de aproximadamente el 6 % de incremento de esta cifra.

Los 3 estabilizantes estudiados protegieron al producto pero no con la misma efectividad; se observaron diferencias en el porcentaje de polímeros, dímeros y monómeros, y en el grado de turbidez, con marcada diferencia en el control sin estabilizante (tablas 1-4).

Para todas las variantes de estabilizantes utilizadas, el porcentaje de polímeros aumenta con la disminución de pH; de manera que los mayores porcentajes se encuentran a pH 4,0 y 4,5, ya que a estos pH existe una gran disociación de la IgG, lo que la hace más susceptible al calor y por tanto a la desnaturalización. A medida que aumentamos el pH, dentro de las condiciones igualmente ácidas, se produce una disminución en la formación de polímeros.

Una vez analizadas todas las variantes de estabilizantes y pH aplicadas a las muestras, la realizada con sorbitol a pH

5,0 resultó ser la mejor, con el 12 % de polímeros (tabla 1).

En otros trabajos donde se utiliza este estabilizante, se reporta que el sorbitol previene la desnaturalización masiva, pero que la formación del 10 % de polímeros de elevado peso molecular (PM) no puede ser evitado, cuando el calentamiento es por 10 h a 60 24 °C. Estas experiencias corroboran las nuestras ya que llegan a iguales resultados en condiciones muy similares. El éxito del sorbitol como estabilizante puede deberse al mecanismo por el cual éste induce estabilidad térmica, que se explica por una interacción no favorable del cosolvente con la superficie proteica. El efecto que conlleva el polialcohol se basa en una hidratación preferencial en la superficie proteica con la exclusión de las moléculas aditivas provenientes de la interfase. Como la conformación enrollada tiene menos área expuesta al solvente que la conformación no enrollada, la consecuencia de la interacción no favorable con el aditivo, es la estabilización de la estructura nativa de la proteína. El sorbitol previene la agregación masiva después del desenrollamiento.¹²

Los resultados muestran que aun cuando el sorbitol parece ser un agente estabilizante efectivo, por el largo tiempo de calentamiento que requiere el proceso de pasteurización no es suficiente para prevenir la agregación y la solución de inmunoglobulinas pasteurizada requeriría de un procedimiento adicional para la eliminación de polímeros.

SUMMARY

Pasteurization from the union of II supernatants of 4 batches of normal plasma subjected to alcoholic fractionation was carried out using following stabilizers: sorbitol, saccharose and 30 % dextrose. The level of molecular aggregation was determined by gel- filtration chromatography. Sorbitol exhibited the best results with polymer formation ranging from 10 - 15 %; the values match those

reported by other authors. According to WHO requirements, these polymers should be eliminated through other procedures for obtaining values under 10 %.

Subject headings: HEAT; ESTERILIZATION/methods; IMMUNOGLOBULINS INTRAVENOUS/isolation & purification; IGG isolation & purification.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nowak T, Gregersen P, Klockmann U, Cummins L. Virus safety of human immunoglobulins: efficient inactivation of hepatitis C and other human pathogenic viruses by the manufacturing procedure. *J Med Virology* 1992;36:209-16.
2. Kuhl P, Seidl S, Bohm B. Reduction of virus load in blood donations by screening methods. *Hematol Blo Transfus* 1989;56:9-22.
3. Grun J, White E, Sito A. Viral removal/inactivation by purification of biopharmaceuticals. *Biopharm* 1992;5:22-30.
4. Hämäläinen E, Suomela H, Ukkonen P. Virus inactivation during intravenous immunoglobulin production. *Vox Sang* 1992;63:6-11.
5. Reid K, Cuthbertson B, Jones A, McIntosh R. Potential contribution of mild pepsin treatment at pH 4 to the viral safety of human immunoglobulin products. *Vox Sang* 1988;55:75-80.
6. Henin Y, Marechal F, Cherman J, Morgenthaler J. Inactivation and partition of human immunodeficiency virus during Kistler and Nitschmann Fractionation of human blood plasma. *Vox Sang* 1988;54:78-83.
7. Bridonneau P, Marcilly H, Vernois M, Goigoux P, Bourdel V, Laulan A, et al. Liquid pasteurization of an immunoglobulin preparation without stabilizer: effects on its biological and biochemical properties. *Vox Sang* 1996;70:203-9.
8. Uemura Y, Uriyu K, Hirao Y, Takechi K, Ishikawa H, Nakajima T, et al. Inactivation and elimination of viruses during the fractionation of an intravenous immunoglobulin preparation: liquid heat treatment and polyethylene glycol fractionation. *Vox Sang* 1989;56:155-61.
9. Hoofnagle J, Barker L, Thiel J, Gerety R. Hepatitis B virus and Hepatitis B surface antigen in human albumin products. *Transfusion* 1976;16:141-7.
10. Edsall J. Stabilization of serum albumin to heat and inactivation of the hepatitis virus. *Vox Sang* 1984;46:338-40.
11. Horowitz B, Prince A, Horowitz M, Watklevicz Ch. Preparation and characterization of virus sterilized blood components. *Actuar* 1992;20:49-52.
12. González M, Domingo A. Thermal stability of human immunoglobulins with sorbitol. *Vox Sang* 1995;68:1-4.
13. Cádiz A, Gutierrez A, Giraldivo I, García L. Ensayo de un método de obtención industrial en Cuba de una inmunoglobulina humana normal biológicamente activa por fraccionamiento etanólico. *Rev Cubana Farm* 1977;11:5-12.
14. Russell RH, Pennington JE. Antecedentes históricos del tratamiento con inmunoglobulinas: Aplicaciones clínicas del tratamiento con IGIV. Yap PL, ed. Barcelona: Editorial J.R. Prous S.A., 1993:8.
15. Williams P, Yap PL, Gillon J, Crawford R, Galea G, Cuthberton B. Non A non B hepatitis transfusion by intravenous immunoglobulin. *Lancet* 1988;27:501.
16. Weiland O, Mattson L, Glaumann H. Non A Non B hepatitis after intravenous gammaglobulins. *Lancet* 1986;1:976-7.

17. Williams P, Yap PL, Gillon J, Crawford R, Urbanisk S, Galea G. Transmission of non A non B hepatitis by pH 4.0 treated intravenous immunoglobulins. *Vox Sang* 1989;57:15-8.
18. Dodd R. Infection risk of plasma donations relationship to safety of intravenous immunoglobulins. *Clin Exp Immunol* 1996;104:31-4.
19. Organización Mundial de la Salud. Normas para la toma, la preparación y el control de calidad de la sangre, los componentes sanguíneos y los derivados de plasma. Ginebra, 1992;27:91-6. (Serie Informes Técnicos; No.840).
20. Barandum S, Kistler P, Jennet F, et al. Intravenous administration of human immunoglobulin. *Vox Sang* 1962;7:157-74.

Recibido: 20 de enero de 1999. Aprobado: 26 de febrero de 1999.

Lic. *Armando Cádiz Lahens*. *Instituto Finlay*. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ave 27 No. 19805, municipio La Lisa, AP 16017, Código 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.