

Artículos Originales

Instituto Finlay. Centro de Investigación y Producción de Vacunas y Sueros

PASTEURIZACIÓN DE SOLUCIONES DE INMUNOGLOBULINAS DE USO INTRAVENOSO. 2. EL pH ÁCIDO COMO ELEMENTO ESTABILIZANTE

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

RESUMEN

Una solución de inmunoglobulinas de uso intravenoso (intacglobin®, Cuba), libre de estabilizantes, fue pasteurizada a baja fuerza iónica y pH ácidos. El contenido de polímeros se determinó por cromatografía en gel, y se obtuvo el mejor resultado a pH 3,5 con 3,8 % de polímeros y 72,7 % de monómeros. La estabilidad de la inmunoglobulina G (IgG), tratada a pH de 3,0 a 7,0, fue evaluada por espectrofotometría. La actividad antígeno-anticuerpo fue medida por un ELISA tipo Sandwich de doble antígeno, y se obtuvo como resultado una disminución del título de anticuerpos a los pH más ácidos. Se demostró que la baja fuerza iónica y el pH ácido son 2 condiciones necesarias para lograr un bajo nivel de polímeros durante la pasteurización de las soluciones de IgG. Se encontraron requisitos para que el proceso transcurra sin la adición de estabilizantes en mejores condiciones que las reportadas por otros autores.

Descriptor DeCS: CALOR; INMUNOGLOBULINAS INTRAVENOSAS/aislamiento & purificación; ESTERILIZACION/métodos.

Dado que la sangre es la vía de transmisión de varias enfermedades, sobre todo para microorganismos que producen una viremia persistente y a elevados títulos, existe la necesidad de tomar medidas para prevenir la infección por el uso de productos del plasma.^{1,2}

Por esta razón la introducción de pasos de inactivación y/o remoción de virus en los procesos de fabricación de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV), cobran gran importancia y desempeñan una función esencial en la seguridad de los productos biológicos.^{3,4} La pasteurización de

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.

soluciones de inmunoglobulinas, es uno de los métodos que hasta el momento muestra resultados seguros en la inactivación viral, por lo que se hace necesario la búsqueda de condiciones ideales de calentamiento, para lograr que éste sea capaz de inactivar los virus presentes, sin afectar la estructura y función de las proteínas, teniendo en cuenta también que no sólo la seguridad de no transmitir virus es importante, sino que se pueden presentar reacciones adversas determinadas por los agregados moleculares que se forman por la acción del calor. Estos agregados poseen actividades biológicas propias que no se encuentran en los monómeros de inmunoglobulinas.⁵

El uso de pH ácido, como ha sido demostrado por varios autores,^{6,7} confiere una mayor estabilidad molecular a la inmunoglobulina G (IgG), a su vez la disminución de la fuerza iónica del medio, dado por un decrecimiento en las concentraciones de NaCl, evita el efecto desestabilizador de esta sal sobre las fuerzas no covalentes encargadas de mantener la conformación de la molécula. Este trabajo estudia la posibilidad de combinar ambos factores en el calentamiento del intacglobin® con vistas a aumentar la estabilidad de la molécula inmunoglobulínica.

MÉTODOS

Se tomaron 20 mL de un *pool* de intacglobin y diafiltramos con 6 volúmenes de agua, para lo que se empleó una membrana YM 100, en un sistema de ultrafiltración AMICON, con una presión de nitrógeno de 3,5 atm. Esta diafiltración se realizó con el objetivo de eliminar el 5 % de dextrosa que incluye la formulación final del intacglobin.⁸

Estos 20 mL fueron divididos en 4 alícuotas de 5 mL cada una y el pH fue

ajustado con HCl (1 M), a 3,0; 3,5; 4,0 y 5,0 respectivamente. El calentamiento se realizó en un baño, de temperatura controlada a 60 °C y al transcurrir las 10 h del proceso convencional de pasteurización, las muestras fueron analizadas por cromatografía en gel.

Este método cromatográfico se escogió dada su capacidad de separación de las moléculas según su peso molecular. El objetivo consistió en la determinación del porcentaje de polímeros, dímeros y monómeros de IgG, en intacglobin, antes y después de pasteurizado a baja fuerza iónica y pH ácido, lo que permitió conocer la estabilidad de la IgG obtenida.

Por la alta concentración de intacglobin (50 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.

Las condiciones para el desarrollo de esta cromatografía fueron: matriz 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.

Para el estudio de estabilidad de la inmunoglobulina presente en el intacglobin a diferentes pH por espectrofotometría, decidimos leer a 260 nm como forma de medir la contribución de fenil alanina en la absorción de la molécula.⁹

Partimos de 2,5 mL del *pool* y realizamos una dilución 1:10 por la elevada concentración del intacglobin, y los 25 mL resultantes fueron distribuidos en 5 alícuotas de 5 mL cada una, ajustamos el pH a 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y 7,0 respectivamente, mantuvimos las muestras en reposo 1 h y leímos densidad óptica (DO) a 260 nm en un

espectrofotómetro (Pharmacia LKB, ULTROSPEC III).

Realizamos un ELISA tipo Sandwich, de doble antígeno (Ag) para la detección y cuantificación de anticuerpos (Acs) contra el antígeno (Ag) de superficie del virus de la hepatitis B (HB_s) en el intacglobin, en un rango de pH de 3,0 a 7,0 con intervalos de una unidad.

El procedimiento desarrollado se describe en la Tesis de Residencia en Inmunología de *García M* (Desarrollo de un método inmunoenzimático para la detección de Ac contra el Ag de superficie del virus de la hepatitis B. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", 1994).

RESULTADOS

La diafiltración del intacglobin nos permitió obtener la solución de inmunoglobulinas libre de estabilizantes, para ser sometida a la pasteurización a baja fuerza iónica y pH ácido.

Las consecuencias de este calentamiento en la estabilidad de la molécula de IgG se analizan por medio de la proporción de polímeros, dímeros y monómeros, que se muestran en la tabla. Como se observa a pH 6,5, la muestra de intacglobin utilizada como material de partida consta del 3,19 % de polímeros, 0 % de dímeros y el 96,8 % de monómeros.

Los mejores resultados se obtuvieron a pH 3,0, donde los polímeros presentes en el producto original desaparecen con el tratamiento y a pH 3,5 el incremento en el

TABLA. Pasteurización del sobrenadante II (pool de 4 lotes) a baja concentración de NaCl y pH ácido

Muestras	% Polímeros	% Dímeros	% Monómeros
pH 6,5*	3,19	-	96,8
pH 3,0	-	41,9	56,4
pH 3,5	3,8	23,5	72,7
pH 4,0	16,3	49,0	40,8
pH 5,0	40,0	14,5	43,6

* Sobredonante B nativo. -: Ausencia.

contenido de polímeros con respecto al material de partida, es prácticamente insignificante y se obtiene la mayor proporción de monómeros; en ambos casos se observa un considerable incremento en el porcentaje de dímeros. Para los pH 4,0 y 5,0 el aumento en el contenido de polímeros es mucho mayor que a 3,0 y 3,5.

El resultado del ploteo de los valores de absorbancia contra los diferentes valores de pH, a 260 nm, se muestra en la figura 1, en la que se observa un aumento de los valores de absorbancia con el aumento del pH. Para pH 3,0; 4,0 y 5,0 los valores de absorbancia están por debajo de 0,05 nm y por encima de este valor para el pH 6,0 y 7,0.

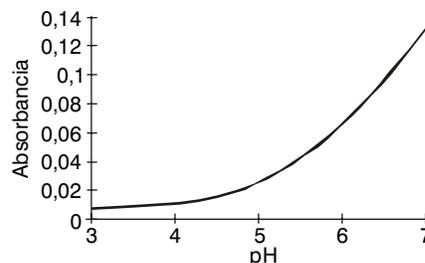


FIG. 1. Estudio de la estabilidad de la IgG a pH ácido por la lectura de absorbancia a 260 nm.

La figura 2 muestra la presencia de Acs contra el Ag de superficie de la hepatitis B a diferentes pH del intacglobin. El mayor título se corresponde con pH 6,0 y los menores valores a los pH 3,0 y 4,0.

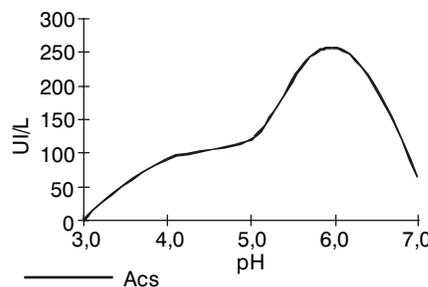


FIG. 2. Comportamiento de los Acs contra el Hb_s Ag en el intacglobin tratado a diferentes pH.

DISCUSIÓN

Para evitar el efecto desestabilizante del NaCl sobre las fuerzas no covalentes, que contribuyen a mantener la estructura conformacional de la inmunoglobulina, como son: las interacciones dipolo - dipolo, las fuerzas de Van der Waals y los puentes de H y evitar la acción negativa del ion cloruro sobre estas moléculas, realizamos esta pasteurización a baja concentración de NaCl.¹⁰

El pH es otro parámetro que al igual que la fuerza iónica está comprometido en la estabilidad de la molécula y que en condiciones extremas puede provocar desnaturalización. Durante la pasteurización obtuvimos los mejores resultados, determinados por cromatografía en gel, con los pH más ácidos, preferiblemente a pH 3,5, donde se obtuvo un valor bajo de polímeros y el mayor porcentaje de monómeros. Esto corrobora que el uso del pH ácido confiere una mayor estabilidad molecular a la IgG, permitiendo la disociación de los agregados. Este fenómeno está influido por la fuerza iónica del medio para cada uno de los pH.¹¹

Condiciones similares de calentamiento han sido desarrolladas en trabajos de inactivación y eliminación de virus durante el fraccionamiento de preparaciones de inmunoglobulinas para uso intravenoso,¹² y se han obtenido resultados comparables con los nuestros respecto a la no utilización del NaCl como estabilizante, aunque utilizan otras sales y el trabajo a pH ácido con ligeras diferencias a las nuestras, donde en uno de los trabajos se reportan valores de 5 a 6 y en el otro valores de pH de 4,8.⁶ Estas diferencias pudieran estar dadas también por las condiciones de obtención de estas inmunoglobulinas.

La pasteurización a baja fuerza iónica y pH ácido, resulta ser un método muy

efectivo para la inactivación y eliminación de virus, ya que además de incrementar la seguridad viral, no se necesita de estabilizantes los cuales pueden proteger la partícula viral y con el tiempo pueden cambiar las características organolépticas de la preparación, ejemplo: sacarosa, dextrosa, etc. Además, según los exámenes hay una buena tolerancia clínica de estas preparaciones de inmunoglobulinas.⁶

Los buenos resultados obtenidos en esta pasteurización a pH ácido y baja fuerza iónica, nos condujo al análisis del comportamiento de las inmunoglobulinas presentes en el intactoglobin a pH ácidos, por otros métodos.

El valor de absorbancia de una solución de inmunoglobulinas es una medida de su turbidez y a su vez ésta, es una medida de su agregación y desnaturalización. Los valores de absorbancia a 260 nm del intactoglobin tratado a diferentes pH, muestran un incremento del grado de turbidez con el aumento del pH (fig. 1), lo que demuestra que el uso del pH ácido confiere una mayor estabilidad molecular a la IgG, esto es debido a que las inmunoglobulinas son una familia de moléculas estrechamente relacionadas entre sí con un rango amplio de puntos isoeléctricos (aproximadamente una unidad de pH) y con 40 cargas superficiales como promedio, confiriendo mayor solubilidad de éstas a pH ácido que a pH neutro donde todavía un gran porcentaje de ellas tienen neutralizadas sus cargas.¹³

No es sorprendente el hecho de que el pH influya sobre la capacidad de formación del complejo Ag-Ac (fig. 2), ya que los sitios activos de reacción de cada molécula (epítopes e idiotipos) están compuestos por grupos ionizables y diferentes condiciones de pH pueden no ser idóneos para mantener la conformación del centro activo y provocar la reacción. Esto no quiere decir que la

estabilidad de las moléculas estén afectadas por esta variación en el microambiente del sitio activo. Este fenómeno puede variar con distintos Ags y el idiotipo formado en respuesta a cada uno de ellos, por lo que pudiéramos encontrar diferentes resultados utilizando diferentes sistemas de moléculas. La región Fc de una inmunoglobulina es más lábil a pH ácido que la región F(ab)₂¹³ y

quedaría por demostrar si las funciones biológicas de la molécula, como la opsonización o la fijación del complemento no se afectan por la pasteurización a pH ácido ya que radican en el fragmento Fc. En la práctica clínica la preparación de intacglobin al entrar al torrente sanguíneo que se encuentra a pH neutro vuelve a tomar todo su potencial biológico al parecer sin afectación.¹⁴

SUMMARY

A stabilizer-free intravenous immunoglobulin solution (intacglobin®, Cuba) was pasteurized at low ionic force and acid pH. The content of polymers was determined by gel chromatography. The best result was obtained at pH 3.5 with 3.8 % of polymers and 72.7 % of monomers. The stability of immunoglobulin G (IgG), treated at pH from 3.0 to 7.0, was evaluated by spectrophotometry. The antigen-antibody activity was measured by a double antigen ELISA Sandwich. It was observed a reduction of the antibody titre at the most acid pH. It was proved that the low ionic force and the acid pH are two necessary conditions to attain a low polymer level during the pasteurization of IgG solution. Requirements were found for the process to go on without adding stabilizers under better conditions than the ones reported by other authors.

Subject headings: HEAT; INMUNOGLOBULINS; INTRAVENOUS/isolation & purification; STERILIZATION.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Auley C, Herring S, Uemura Y. Hepatitis C virus more resistant to inactivation than human immunodeficiency virus. *Vox Sang* 1992;63:289.
2. 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 Virol* 1992;36:209-16.
3. Wells M, Witteks Aepstein J, Marcus S. Inactivation and partition of human virus during ethanol fractionation of plasma. *Transfusion* 1986;26:210-3.
4. Henin Y, Marechal Fcherman J, Morgenthaler J. Inactivation and partition of human immunodeficiency virus during Kistler and nitschmann fractionation of human blood plasma. *Vox Sang* 1989;54:78-83.
5. Tomono T, Ikeda K, Suzuky T. A new intact immunoglobulin for intravenous use stabilized by chemically modified gelatin derivatives. *Vox Sang* 1986;51:81-6.
6. 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.
7. Dodd RY. Infectious risk of plasma donations: relationship to safety of intravenous immune globulins. *Clin Exp Immunol* 1996;104:31-4.
8. Cádiz A, Castellano ME, Castillo R y Melchor A. Comportamiento de algunos parámetros determinantes de efectos adversos inducidos por inmunoglobulinas intravenosas. *Rev Cubana Farm* 1995;29(2):109-16.
9. Chávez MA. Temas de enzimología (tomo II). La Habana: Universidad de La Habana. Facultad de Biología:1990.

10. Sjöberg B, Mortensen K. Structure and thermodynamics of nonideal solutions of colloidal particles: investigation of salt-free solution of human serum albumin by using small-angle neutron scattering and Monte Carlo simulation. *Biophys Chem* 1997;65(1):75-83.
11. Hämäläinen E, Suomela H, Ukkonen P. Virus inactivation during intravenous immunoglobulin production. *Vox Sang* 1992;63:6-11.
12. 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.
13. Uemura Y. Dissociation of aggregated IgG and denaturation of monomeric IgG by acid treatment. *J Med* 1983;141:337-49.
14. Cádiz A, Gutiérrez A, Giraldo I, García L. Ensayo de un método de obtención industrial en Cuba de una inmunoglobulina humana normal biológicamente activa por fraccionamiento etanoico. *Rev Cubana Farm* 1977;11:5-12

Recibido: 3 de mayo de 1999. Aprobado: 4 de junio de 1999.

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