

Influencia del pH sobre la estabilidad de preparados de inmunoglobulinas intravenosas para uso humano durante el almacenamiento

Armando Cádiz, M^a Esther Castellano, Janhna Hernández, J.R. Castillo, Pavel Mustelier, Ana Teresa Ramírez.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: acadiz@finlay.edu.cu

La eliminación o disociación de los agregados de IgG, es uno de los requisitos que debe poseer cualquier método de purificación de inmunoglobulinas para uso intravenoso. Se demostró con el uso de la Cromatografía en Gel y la Espectrofotometría, que el pH ácido (4,5), confiere una mayor estabilidad molecular a la IgG, permitiendo la disociación de la mayor parte de los agregados durante el almacenamiento prolongado utilizando dextrosa (5%) como estabilizante, fenómeno que está influido por la fuerza iónica del medio para cada uno de los pH. Muestras con contenido de polímeros entre 1% y 3% pierden los mismos en un período inferior a los seis meses. A su vez el uso de pH 4,0, mostró ventajas en la no formación de polímeros durante el calentamiento, en comparación con los pH más básicos. A los 5 minutos de calentamiento, la absorbancia de la muestra a pH 7,0, aumentó en un 60% en comparación con la muestra a pH 4,0.

Palabras claves: Inmunoglobulinas intravenosas, agregados, polímeros, dímeros, monómeros, almacenamiento, calentamiento, estabilizantes

Introducción

Las preparaciones convencionales de inmunoglobulinas de uso intramuscular obtenidas por el método de alcohol frío contienen cantidades variables de agregados de inmunoglobulina G (IgG).

Estos agregados poseen actividades biológicas propias que no se encuentran en los monómeros de inmunoglobulinas como son: actividades anticomplementarias (1-3) y antigénicas (4) así como la posibilidad de aumentar la producción endógena de prostaglandina E por células mononucleares en cultivo y por monocapas de monocitos. Esta producción de prostaglandina puede inhibirse con la administración de aspirina o indometacina.

Inicialmente se creyó que las reacciones adversas de los preparados de uso intravenoso (IGIV) para humanos, estaban causadas por la activación del complemento por estos agregados.

El hecho de que la aspirina y la indometacina alivien algunos de los efectos secundarios producidos por la administración de IGIV parece confirmar también la validez de la hipótesis de producción de prostaglandinas (5).

Cualquiera que sea la función de estos agregados en las reacciones adversas el hecho cierto es la necesidad de su eliminación. El contenido de polímeros de una IGIV para humanos debe ser obligatoriamente menor que el 10% (6).

Se han reportado algunos métodos para la eliminación o disociación de los agregados y obtener así preparaciones de IgG convenientes para su uso intravenoso. Podemos mencionar el tratamiento con polietilenglicol (PEG), con pepsina a pH 4,0, Cromatografía de intercambio iónico con diethylaminoethyl (DEAE) Sephadex A-50, Cromatografía en

gel y el tratamiento a pH ácido que es uno de los métodos que puede provocar la disociación de los mismos.

Los primeros resultados experimentales (7) demostraron que la IgG humana agregada, se disocia por el tratamiento ácido a pH 3.0 en presencia de glicina. La cuestión radica en qué extensión este tratamiento ácido de la IgG le permite retener sus propiedades físico-químicas y biológicas.

Este trabajo estudia bajo qué pH es más estable la IgG durante su almacenamiento prolongado en estado líquido y la influencia del pH ácido en otras condiciones.

Materiales y Métodos

En la purificación de la IgG se utilizó como material de partida plasma humano normal y como método, el fraccionamiento alcohólico de Cohn modificado.

La pasta II fue liofilizada y posteriormente este liofilizado se formuló como una solución al 5% de concentración de proteínas, la cual se utilizó para el desarrollo de todas las pruebas. La muestra fue separada en diferentes alícuotas para el ajuste del pH entre 4,0 y 9,0, con intervalos de 0,5 unidades, utilizando ácido clorhídrico (HCl, Merck, Alemania) 2 N o hidróxido de sodio (NaOH, Merck, Alemania) 2 N, según fuera necesario. A su vez, cada alícuota fue dividida en tres partes para el estudio de la estabilidad:

- Durante el almacenamiento desde 1 hasta 6 meses, a temperatura entre 2 °C y 8 °C, utilizando dextrosa (Riedel de Haën, Alemania) al 5%, como estabilizante.

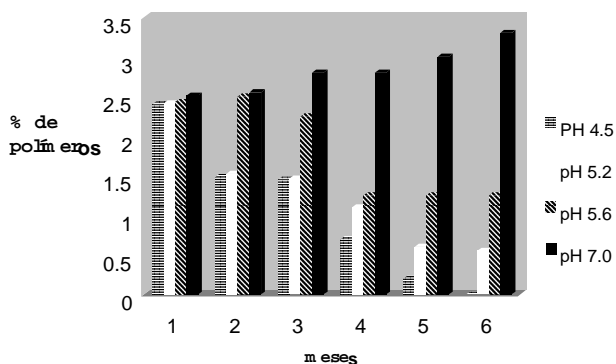
* Cádiz A. Primer Forum Nacional de Energía. Ciudad de La Habana, 1984.

- Durante el calentamiento con y sin dextrosa, 15 min a 60 °C en un baño termostático (Precisterms-138, Selecta).
- Durante la pasteurización a diferentes concentraciones de NaCl, como modulador de la fuerza iónica.

Las concentraciones de NaCl utilizadas fueron: 0%; 0,45%, 0,90% y 1,80%. Las muestras fueron observadas cada 2 h hasta la culminación de la pasteurización a las 10 h establecidas, con el objetivo de obtener un criterio visual del incremento de la turbidez en el tiempo.

Para las dos primeras experiencias se utilizó la Cromatografía en Gel, como forma de medir el contenido de polímeros, dímeros y monómeros, por integración automática del "printer / plotter" del equipo. Se utilizó una columna Superosa 6HR (FPLC, Pharmacia, Suecia) a una velocidad de 0,5 mm/min y como buffer de corrida solución salina tamponada con fosfato o solución tamponada con acetato en dependencia del rango de pH de las muestras.

Figura 1. Influencia del pH en el almacenamiento prolongado de preparados de inmunoglobulina para uso intravenoso, en presencia de dextrosa



Estos aumentos en turbidez en las soluciones no calentadas se corresponden con ligeros incrementos de los polímeros y los dímeros sobre la base de la disminución de los monómeros (Tabla 1).

En las soluciones calentadas este fenómeno fue mucho mayor, no pudiéndose cuantificar por gelificación de las muestras. En muestras calentadas a diferentes pH con

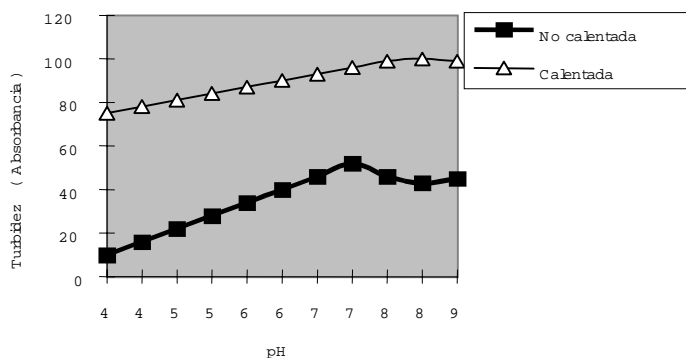
El análisis de la turbidez, se realizó por espectrofotometría a 650 nm y en términos de absorbancia, en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB ULTROSPEC III, Suecia) y agua destilada como referencia para las muestras calentadas y solución dextrosa al 5% para las muestras almacenadas.

Resultados

Muestras con un contenido de polímeros entre 1% y 3%, pierden los mismos en un período inferior a los seis meses de almacenamiento a temperatura entre 2 °C y 8 °C cuando el producto se estabiliza a pH 4,5 (Figura 1).

La Figura 2 presenta los cambios en la turbidez de la solución de IgG calentada con las variaciones de pH. Puede observarse cómo ambas curvas (la de inmunoglobulinas calentadas y no calentadas) siguen el mismo patrón de respuesta, hasta pH 7,5. El alto incremento en la turbidez a pH 7,0 sobre el correspondiente a pH 4,0 aunque resulta visible, no se traduce en la aparición de precipitados inmediatamente. Las soluciones calentadas no precipitan después del reposo toda la noche.

Figura 2. Efecto del pH en la estabilidad de la IgG durante el calentamiento, sin estabilizante



dextrosa (Figura 3) se observa una menor agregación cuando se utiliza el pH 4,0, que con la misma dextrosa a pH superiores.

En experimentos donde se prueba la influencia de la fuerza iónica del medio variando las cantidades de NaCl a añadir a la solución, en la formación de polímeros; el aumento del pH implica aumento de la turbidez también (Tabla 2).

Tabla 1. Distribución de monómeros, dímeros y polímeros en muestras de inmunoglobulinas (no calentadas) a diferentes pH

pH	Polímeros	Dímeros	Monómeros
4,0	0,20	7,2	92,6
5,0	0,30	7,7	92,1
6,0	0,50	7,9	91,4
7,0	1,30	10,3	88,4
8,0	1,40	10,0	88,6
9,0	1,30	9,0	89,7

Figura 3. Influencia del pH en la agregación de la molécula durante el calentamiento, en presencia de un 5% de dextrosa

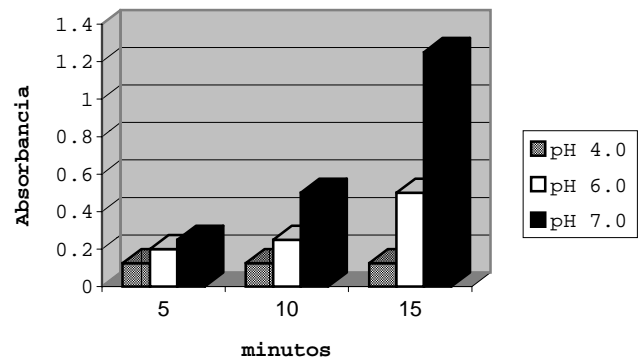


Tabla 2. Criterio visual de turbidez en una solución de inmunoglobulinas sometida a pasteurización con variaciones de la fuerza iónica y el pH

PH	% Cloruro de Sodio			
	0	0,45	0,90	1,80
4,0	-	++	++	++
4,5	-	++	++	++
5,0	-	++	+++	+++
5,5	+	+++	+++	+++
6,0	+	+++	+++	+++
6,5	+++	+++	+++	+++
7,0	+++	+++	+++	+++

- claro
 + ligeramente turbio
 ++ turbio
 +++ turbio y gelificación.

Discusión

Durante el desarrollo de un nuevo procedimiento para la producción industrial de una inmunoglobulina humana de uso intravenoso, ha sido imprescindible estudiar las condiciones en las cuales la IgG alcanza su mayor estabilidad, tratando de lograr un producto de molécula intacta (100% de monómeros).

La región Fc de la molécula de IgG es más lábil a pH ácido que la región Fab (8). Esta región Fc es esencial para la fagocitosis y para la fijación del complemento por los inmunocomplejos producidos.

En aquellos preparados donde el fragmento Fc está digerido o químicamente modificado estas propiedades biológicas son defectuosas (9-11), a pesar de que el producto puede cumplir

con otros parámetros como la seguridad y una cierta efectividad clínica.

La formación de polímeros se reduce durante almacenamiento superior a los 6 meses de 2 °C a 8 °C si el producto se estabiliza a pH 4,5 en presencia de dextrosa al 5%. Esto ocurre por una disociación de los polímeros formados que vuelven a su formación monomérica.

A pH inferiores a 4,0 puede ocurrir que todos los dímeros también se desplacen a la forma de monómeros (16). Esta formación dimérica es prueba de anticuerpos antidiotipos, uno de los mecanismos que explican las ventajas de las inmunoglobulinas en las enfermedades autoinmunes (17,18).

Las inmunoglobulinas son una familia de moléculas estrechamente relacionadas entre sí con rango amplio de puntos isoeléctricos (aproximadamente una unidad de pH) y con 40 cargas superficiales como promedio. Esto hace que a pH ácido presenten una mayor solubilidad que a pH neutro donde todavía un porcentaje de las mismas tienen sus cargas neutralizadas.

Esto explica que a pH 4,0 se pueda encontrar mayor cantidad de IgG disociada desplazándose el equilibrio hacia la fracción monomérica (Tabla 1) (13).

Cuando las soluciones de IgG se calientan 15 min a 60 °C puede observarse un aumento marcado de la turbidez; este incremento de turbidez se acentúa a pH neutro lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por Mc Cue (12), el cual al estudiar el fenómeno por ultracentrifugación, demostró a pH 7,0 la formación de una matriz de agregados de bajo peso molecular, revelados por el ensanchamiento de la banda 7s y por la aparición de una banda 10s.

El calentamiento a tiempos variables en presencia de dextrosa demuestra como es mayor la estabilidad a pH ácido sobre el pH neutro (Figura 3).

El uso de azúcares implica varios riesgos, (1) requeriría de su eliminación por algún método, en el caso de que fuese a ser suministrada dicha inmunoglobulina a pacientes con dificultades metabólicas de este azúcar, como por ejemplo diabéticos, (2) riesgo de ocurrencia de la reacción de Maillard con el correspondiente cambio de color de la solución hacia el caramelo y la formación de productos de degradación que pueden causar reacciones adversas (14).

La no ocurrencia de este desagradable fenómeno en las soluciones de IgG calentadas puede ser originado por varias causas, entre ellas: tener la dextrosa una menor reactividad que otros azúcares, también el ser la IgG una glicoproteína le permite enlazar los azúcares a partir de puentes de hidrógeno

sustituyendo el agua de hidratación, lo que se observa sobre todo durante la liofilización (15).

El calentamiento con variaciones de la fuerza iónica (Tabla 2), donde existe una relación directamente proporcional entre la concentración de NaCl y la turbidez de la muestra, permitió encontrar aquellos pH donde puede realizarse una pasteurización efectiva que sea capaz de eliminar virus si estuvieran presentes, lo que permitiría tener un producto completamente seguro incorporando una etapa deliberada y especialmente diseñada para la inactivación viral (19-22).

A través de las experiencias desarrolladas en este trabajo, se puede concluir que el pH ácido es favorable para la estabilidad de las inmunoglobulinas, tanto durante su calentamiento como durante su almacenamiento; los valores ideales fluctúan entre 3 y 4, por lo que sería recomendable tanto en un caso como en el otro disminuir el rango, repitiendo las experiencias para pequeños intervalos entre estos dos valores. Por otra parte se concluye que la baja fuerza iónica del medio es favorable, en su combinación con el pH ácido durante el calentamiento de la IgG, eliminándose el efecto desestabilizante de esta sal sobre las fuerzas no covalentes que contribuyen a mantener la estructura conformacional de la molécula inmunoglobulínica, como son: las interacciones dipolo-dipolo, las fuerzas de Van der Waals y los puentes de Hidrógeno. Otra razón del poco éxito de esta sal como estabilizante, puede deberse a la acción negativa del ión cloruro sobre estas moléculas. El hecho de que en estas condiciones de pasteurización no se necesiten estabilizantes, los cuales pueden proteger la partícula viral y con el tiempo pueden cambiar las características organolépticas de la preparación, es una gran ventaja.

Finalmente se considera que el uso de la dextrosa como estabilizante es favorable en el almacenamiento, no siendo igual en el calentamiento.

Referencias

1. Ishizaka T, Ishizaka K. Biological activities of aggregated gammaglobulin. 1. Skin reactive and complement-fixing properties of heat denatured gammaglobulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1959;101:845-50.
2. Bing D. Complement interaction with immune serum globulin intravenous. *The Amer. J. of Med.* 1984; 76(3A):19-24.
3. Lundblad J, Schroeder D. Métodos de producción de IGIV y análisis de los preparados comerciales. En: *Aplicaciones clínicas del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas*. Yap PL. Barcelona: Editorial J. R. Prous S.A. 1993:15-36.
4. Henney C, Ellis E. Antibody production to aggregated human gamma G globulin in acquired hypogammaglobulinemia. *New Engl. J. Med.* 1968; 278:1144-46.
5. Yap P, Williams P. Perfil de seguridad de las inmunoglobulinas intravenosas. En: *Aplicaciones clínicas del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas*. Yap PL. Barcelona: Editorial J. R. Prous S. A. 1993;37-56.
6. 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 del plasma*. Ginebra, 1992; (27):91-6. (Serie Informes Técnicos; N° 840).
7. Hannson V. Inhibition and reversal of aggregation of IgG by freezing. *Acta Chem. Scand.* 1968;22:490-6.
8. Uemura Y., Uriyu K., Hirao Y, Takechi K, Ishikawa H, Nakajima T. Inactivation and elimination of viruses during the fractionation of an intravenous immunoglobulins preparation:

- Liquid heat treatment and PEG fractionation. *Vox San.* 1989;56:155-61.
9. Eibl M, Wedgwood R. *Intravenous immunoglobulin: A review on immunodeficiencies*. En: Rosen F., Seligman M. eds. *Harwood Academic Pubs.* Switzerland, 1993;659.
 10. Thorpe R, Brasher M, Tarelli E, Dilger P, Page M. Análisis de laboratorio de los preparados de inmunoglobulinas intravenosas. En: *Aplicaciones clínicas del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas*. Yap PL, ed. J.R. Prous Barcelona, 1993;239-48.
 11. Perry R. Application for a product licence under the EC. Extension directives for human IGIV administration. *SNTBS* p.0000208, July, 1992.
 12. Mc Cue J, Hein R, Tenold R. Three generations of IgG preparations of clinical use. *Rev Infect Dis.* 1986; (8):374-81.
 13. Uemura Y. Dissociation of aggregated IgG and denaturation of monomeric IgG by acid treatment. *Tohoku J. Exp. Med.* 1983;141:337-49.
 14. Means G, Chang M. Non-enzimatic glycosylation of proteins Structure and function changes. *Diabetes.* 1982; 31(suppl3):1-4.
 15. Carpenter J, Crowe J. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry.* 1989;28:3916-22.
 16. Takahashi H. pH dependent conformation change of Bence Jones protein. *J. Biochem* 1970;67:795-99.
 17. Macey M, Newland A. Eficacia de las inmunoglobulinas intravenosas en las citopenias. En: *Aplicaciones clínicas del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas*. Yap PL. *Aplicaciones clínicas del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas*. Barcelona: Editorial J.R. Prous S.A. 1993;87.
 18. Hammarstrom L, Lundkvist I, Pettersson A, Edvart S. Eficacia de las inmunoglobulinas intravenosas en las enfermedades inmunológicas. En: Yap PL, *Aplicaciones clínicas del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas*. Barcelona: Editorial J.R. Prous S.A. 1993;87.
 19. Uemura Y, Katuhiro U, Takechi K. Method of producing immunoglobulins preparations for intravenous injection. European Patent Applications 0 246579 A2 1987.
 20. Yukata H, Takechi K, Uemura Y. *Gammaglobulin injectable solutions*. European Patent Applications 0 278422 A2, 1988.
 21. Hamamoto Y, Harada S, Naoki Y, Uemura Y, Takashi G, Tadakazu S. Elimination of viruses from an intravenous immunoglobulins preparation. *Vox Sang.* 1987;53:65-9.
 22. Uemura Y, Joy Y, Heldebrant Ch, Takechi K, Kazumasa Y. Inactivation and elimination of viruses during preparation of human intravenous immunoglobulin. *Vox Sang.* 1994;(67):246-54.

The influence of pH in the stability during the storage of intravenous immunoglobulins for human use

Abstract

One of the most important requirements that all methods of protein purification for intravenous use must fulfil is the elimination or dissociation of the immunoglobulin aggregates. The use of gel filtration and espectrophotometric techniques showed that acid pH (4.5), gives greater molecular stability to the IgG, dissociating most of the aggregates during lengthy storage using dextrose (5%) as stabilizer, this fact is influenced by the ionic strength of the medium for each pH. Samples with polymers (1–3%) lose them in 6 months. At the same time the use of pH 4.0 showed advantages as the non formation of polymers during the heat of the immunoglobulins, as compared to more basic pH. After 5 minutes of heating the sample at pH 7.0 the absorbance increased in 60% in comparison with the sample at pH 4.0.

Key words: Intravenous immunoglobulins, aggregates, polymers, dimers, monomers, storage, heating, stability