

Estudios de Estabilidad de la Gammaglobulina Sérica Humana elaborada por el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

PATRICIA M. CARRANZA, MARIA S. VITALI, MARIA J. MANFREDI
y ELDA B. GIAVEDONI*

*Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Valparaíso s/n,
Ciudad Universitaria, Casilla de Correo 736, Correo Central, 5000 Córdoba, Argentina.*

RESUMEN. La Gammaglobulina Sérica Humana elaborada por el Laboratorio de Hemoderivados fue analizada para determinar la proporción de agregados y/o fragmentos que posee. Las muestras fueron examinadas utilizando cromatografía en Sephadex G-200 y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. La actividad anticomplementaria fue determinada por el método de Kabat y Mayer. Los lotes recientemente preparados mostraron 20-30% de agregados cuando se analizaron por cromatografía y la actividad anticomplementaria varió entre 4,7 y 11,3 CH50/mg de proteína. Los valores encontrados fueron comparables a los obtenidos con una gammaglobulina de origen importado usada como comparación. El porcentaje de fragmentación fue investigado en muestras almacenadas entre 0-13 años a 4 °C. Las muestras analizadas mostraron degradación dependiendo del tiempo de almacenamiento: al cabo de 2 años se observó un 5% de fragmentos, un 31% después de 4 años y un 46% luego de 13 años. La electroforesis en gel de poliacrilamida fue más sensible que la cromatografía en Sephadex G-200 para detectar y separar fragmentos de la inmunoglobulina.

SUMMARY. "Stability of Standard Immune Serum Globulin Produced by the Laboratorio de Hemoderivados, National University of Córdoba, Argentina". Standard Human Immune Serum Globulin produced in the Laboratorio de Hemoderivados was analyzed to determine the proportion of aggregates and/or fragments in the preparations. Samples were examined by Sephadex G-200 chromatography and sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Anticomplementary activity was determined by Kabat and Mayer's method. All samples without previous storage showed between 20-30% aggregation when they were analyzed by gel permeation chromatography and the anticomplementary activity varied between 4.7-11.3 CH50/mg of protein. The values obtained were similar to those observed with an imported gammaglobulin used as comparison. The extent of fragmentation was investigated in samples stored from 0-13 years at 4 °C. The samples analyzed showed degradation depending on the time of storage, thus at the end of 2 years of storage only 5% fragments was observed, after 4 years 31% and after 13 years 46%. The polyacrylamide gel electrophoresis was more sensitive than Sephadex G-200 chromatography in detecting and separating fragments of immunoglobulin.

* Miembro de la Carrera del Investigador y a quien debe dirigirse la correspondencia.

PALABRAS CLAVE: Gammaglobulina sérica; Estabilidad; Intramuscular.

KEY WORDS: Immune Serum Globulin; Stability; Intramuscular.

INTRODUCCION

El Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba produce Gammaglobulina Sérica Humana para uso intramuscular a partir de plasma vencido. La purificación se realiza por fraccionamiento alcohólico¹ y cada lote proviene de aproximadamente 12.000 dadores voluntarios del país, por lo que contiene altas concentraciones de anticuerpos contra las infecciones más comunes en nuestro medio. La administración de esta gammaglobulina no puede realizarse por vía endovenosa debido a la actividad anticomplementaria que posee, la cual puede producir reacciones severas en el paciente^{2, 3}. Esta actividad está asociada a agregados de inmunoglobulina G (IgG) que aparecen de manera espontánea o como consecuencia del método de preparación; tales agregados producen activación del complemento de la misma manera que el complejo antígeno-anticuerpo⁴⁻⁷

Por otro lado las soluciones de IgG tienen tendencia a degradarse durante el período de almacenamiento, aún cuando se mantengan a 4 °C, efecto que ha sido atribuido a la presencia de pequeñas cantidades de plasmina en las preparaciones farmacéuticas⁸⁻¹⁰. Los principales fragmentos de IgG que se obtienen por digestión con plasmina son el Fc y Fab, cuyos pesos moleculares son de 50-60.000 daltons¹¹; además se ha observado también la aparición de un fragmento similar al F(ab)₂ de 110.000 daltons de peso molecular¹².

Nuestro producto cumple con los requerimientos mínimos de calidad establecidos por la Organización Mundial de la Salud¹³, pero hasta el momento algunas variables de estabilidad farmacéutica no habían sido evaluadas. Por esta causa, el presente trabajo fue dirigido a la determinación de agregados, fragmentos y actividad anticomplementaria de la forma farmacéutica final, en lotes de diferentes fechas de vencimiento.

En esta investigación, el grado de agregación fue establecido empleando cromatografía en Sephadex G-200, la fragmentación fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) y la actividad anticomplementaria fue determinada por el método de Kabat y Mayer. Estas tres variables de estabilidad fueron comparadas con las de una muestra de gammaglobulina de origen importado.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron distintos lotes de Gammaglobulina Sérica Humana del Laboratorio de Hemoderivados (LH) y de origen importado (MX). Ambas preparaciones contienen $16,5 \pm 1,5$ g% de proteína en solución 0,3 M de glicina; más del 95% de la proteína está constituida por gammaglobulina cuando se analiza por electroforesis en acetato de celulosa¹⁴.

La cromatografía de gel filtración se realizó utilizando una columna de Sephadex G-200 de 3,2 x 80 cm, las proteínas fueron eluidas con buffer fosfato de sodio-cloruro de sodio de pH 8,0, fuerza iónica 0,1 y con una velocidad de flujo de 20 ml/h. Se recogieron fracciones de 3 ml y el perfil cromatográfico se obtuvo midiendo la absorbancia de cada una de ellas a 280 nm. Como marcadores de peso molecular (PM) se utilizaron: anhidrasa carbónica (PM = 29.000 daltons), albúmina bovina (PM = 66.000 daltons) y dehidrogenasa alcohólica (PM = 150.000 daltons). El área correspondiente a cada pico y sus respectivos porcentajes fueron determinados manualmente de acuerdo al método de la Farmacopea de Estados Unidos¹⁵ y por el método de integración numérica utilizando la regla trapezoidal¹⁶.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se realizó en el aparato microzona de Beckman. Se utilizó acrilamida al

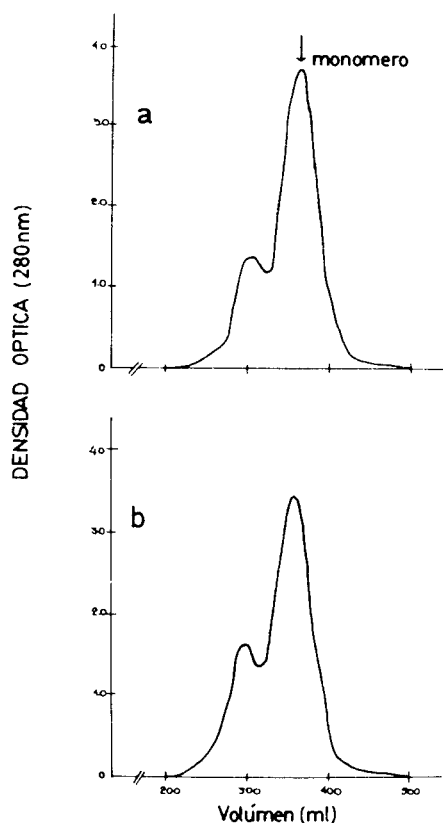


Figura 1. Cromatografía de Gammaglobulina Sérica Humana en Sephadex G-200. a) preparada en el Laboratorio de Hemoderivados; b) de origen importado.

7% y como buffer de corrida Tris-glicina de pH 8,3 con SDS al 0,1%. La muestra se calentó a 60 °C por 60 min en presencia de 0,1% de SDS. El colorante utilizado para la tinción de las proteínas fue Azul Brillante Coomassie. Como referencia se utilizó una muestra de albúmina humana conteniendo monómero y dímero.

La actividad anticomplementaria se determinó por el método de Kabat y Mayer¹⁷ utilizando suero de cobayo como fuente de complemento. Cincuenta CH50 se mezclaron con distintas diluciones de gammaglobulina, se incubaron a 37 °C por 90 min y el complemento residual se determinó utilizando eritrocitos de carnero sensibilizados

Preparación	CH50/mg	Tiempo de Almacenamiento
8304567	5,7	< 1 año
8308901	4,7	< 1 "
832122	10,5	1 "
831819	11,3	1 "
820708	7,5	2 "
M.X.	7,6	< 1 "
8118901	0,4	4 "
7356	0,6	13 "

Tabla 1. Actividad anticomplementaria de las preparaciones.

con 2U de hemolisina. La actividad anticomplementaria se expresó en CH50 consumidas por mg de proteína.

La determinación de proteínas se realizó por el método de Gornall *et al.*¹⁸ y el de Lowry *et al.*¹⁹.

RESULTADOS

Muestras de distintos lotes de gammaglobulina LH recientemente preparados y una gammaglobulina MX de origen importado fueron analizadas por cromatografía en Sephadex G-200. Como puede observarse en la Fig. 1, los resultados fueron similares para las gammaglobulinas LH y MX de reciente preparación. En ambos casos se obtuvieron dos picos de proteínas, uno correspondiente a un PM de 150.000 daltons que revelaría al monómero de IgG y otro de mayor PM, probablemente debido a la presencia de dímeros. En las distintas preparaciones que fueron analizadas, el porcentaje de monómero fue de 75-80% y el de dímeros de 25-20%. La presencia de agregados también pudo observarse cuando se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, pero los valores hallados en este último caso fueron inferiores a los obtenidos por cromatografía.

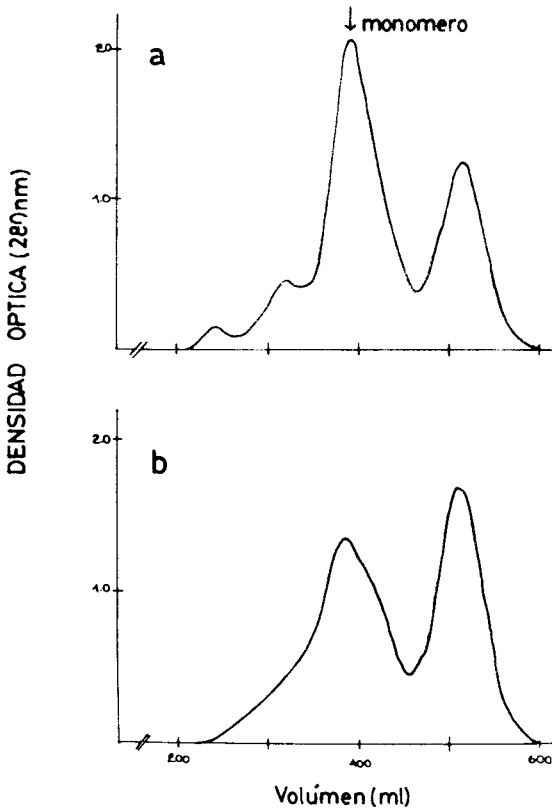


Figura 2. Cromatografía de Gammaglobulina LH en Sephadex G-200. a) 4 años de almacenamiento; b) 13 años de almacenamiento.

El estudio de la actividad anticomplementaria reveló que, efectivamente, nuestras preparaciones consumen complemento (Tabla 1). La actividad anticomplementaria varió entre 4,7 y 11,3 CH₅₀/mg de proteína, semejante al valor obtenido para la gammaglobulina MX (7,6 CH₅₀/mg). Esta actividad se vio notablemente disminuida en las preparaciones con más de 3 años de almacenamiento (lotes 81181901 y 7356).

El problema de la fragmentación de las inmunoglobulinas durante su almacenamiento fue analizado utilizando cromatografía de filtración y electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Se estudiaron lotes de gammaglobulina con almacena-

miento de 1 a 13 años. Por cromatografía (Fig. 2) pudo detectarse la aparición de un nuevo pico, además del de monómero y dímero, en la zona de PM de 50-60.000 daltons, que correspondería a los fragmentos Fc y Fab. La proporción de este pico dependió del tiempo del almacenamiento: en las gammaglobulinas con dos años de almacenamiento el porcentaje de productos de degradación fue del 5%, del 31% con 4 años y del 43% con 13 años de almacenamiento. Esta degradación se realizó no sólo a expensas del monómero sino también de los agregados de IgG. A pesar de no haber obtenido un pico correspondiente al PM del fragmento similar al F(ab)₂, en la Fig. 2 (b) puede observarse una desviación de la línea descendente del pico que corresponde al monómero, lo que indicaría una superposición de picos que no pueden ser separados por esta metodología.

Cuando se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS pudo observarse una buena separación de los fragmentos de PM similar al Fc, Fab y F(ab)₂; así en la Fig. 3, gel 3, pueden observarse dos bandas bien nítidas en la zona de PM correspondiente a 50-60.000 daltons como así también una banda entre estos fragmentos y la gammaglobulina intacta. Este perfil corresponde a una gammaglobulina LH con 4 años de almacenamiento; en cambio en los geles 2 y 4 correspondientes a las gammaglobulinas MX y LH recientemente preparadas no se observan estas bandas, lo cual indica la carencia de fragmentación de producto.

Por otro lado, el perfil densitométrico del gel de poliacrilamida de una gammaglobulina con 13 años de almacenamiento (Fig. 4) mostró no solamente una alta concentración de los fragmentos similares al Fc y Fab sino también otra serie de picos correspondientes a otros fragmentos de distinto peso molecular.

DISCUSION

En este estudio se demuestra en nuestras preparaciones de gammaglobulina la presencia de agregados en proporción semejante a la del producto importado utilizado como referencia. La agregación de la gammaglobulina se debe principalmente a la desnaturalización que se produce durante el fraccionamiento alcohólico y las distintas preparaciones muestran variabilidad en el contenido de agregados^{2, 5, 20}. La presencia de estos últimos produce activación del complemento y es una de las causas por las cuales el uso de la gammaglobulina obtenida por el método de Cohn se limita a la vía intramuscular^{2, 21, 22}. Se ha demostrado una considerable variación en la actividad anticomplementaria de las distintas preparaciones^{3, 23}; nuestros resultados muestran una actividad anticomplementaria de 4,7 a 11,3 CH50/mg de proteína, coincidente con lo publicado por Habeeb *et al.*⁷, pero con un rango de variación menor al informado por estos autores. La actividad anticomplementaria disminuye a valores menores de 1 CH50/mg en las gammaglobulinas vencidas, las cuales poseen un 30-50% de degradación. Una de las metodologías utilizadas para la preparación de gammaglobulina de uso endovenoso es precisamente la digestión limitada de la IgG con plasmina para eliminar la actividad anticomplementaria espontánea de las preparaciones^{10, 24}.

La inestabilidad de las preparaciones LH debida a la contaminación con plasmina puede ser fácilmente demostrada en los lotes vencidos, donde pudo observarse la aparición de fragmentos de PM similar al Fc, Fab y F(ab)₂ en distinta proporción, dependiendo del tiempo de almacenamiento. Tanto por cromatografía (Fig. 2) como por electroforesis en gel de poliacrilamida (Figs. 3 y 4) se observó degradación, pero la separación de los fragmentos fue más evidente en el gel de poliacrilamida, el cual

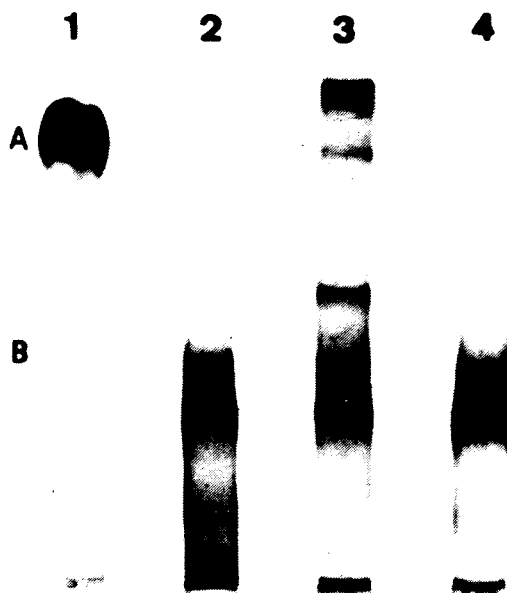


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. 1) Albúmina humana, A) monómero, B) dímero; 2) Gammaglobulina MX; 3) Gammaglobulina LH, 4 años de almacenamiento; 4) Gammaglobulina LH recientemente preparada.

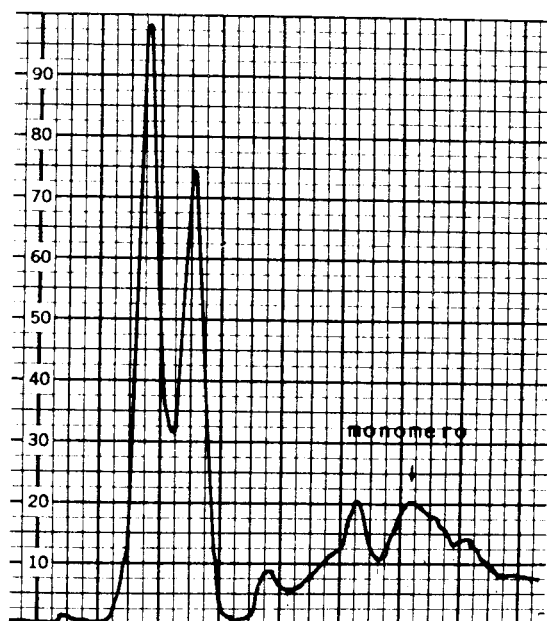


Figura 4. Perfil densitométrico de gel de poliacrilamida. Muestra: gammaglobulina LH con 13 años de almacenamiento.

es más sensible que la cromatografía y la ultracentrifugación analítica¹². Estos dos últimos métodos no separan los fragmentos Fab y Fc y la resolución del fragmento F(ab)₂ es muy pobre (Fig. 2, b).

Se ha demostrado que la fragmentación durante el almacenamiento puede alcanzar hasta un 60% de la inmunoglobulina y que el tratamiento con plasmina produce ruptura del 60-70% de las moléculas, mientras que el 40-30% restante son resistentes²⁵. Por otro lado el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de 68 lotes de inmunoglobulina, demostró que el 4% de los lotes recientemente preparados contienen un 5% de fragmentación y que al cabo de 6 meses el 18% de los lotes muestra este tipo de degradación²⁶. Todos estos datos coinciden con los encontrados en este estudio.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud¹³, al terminar el período de caducidad de cada lote, el 80% de la proteína debe estar intacta. En nuestro caso, lotes recientemente preparados no presentaron degradación, lotes con dos años de almace-

namiento presentaron alrededor de 5% de fragmentos y un lote con más de 4 años de almacenamiento, es decir más de 1 año de vencido, exhibió un 32% de fragmentos.

En nuestro laboratorio no se ha realizado una difusión muy importante de la Gammaglobulina Sérica Humana y por lo tanto hay acumulación de fracción II + III proveniente de la preparación de albúmina. Esta fracción es el material de partida para la obtención de gammaglobulina y se han estado utilizando fracciones que han sido mantenidas a -25 °C por dos años. Los resultados aquí presentados no dan indicación de una alteración del producto, excepto las comúnmente observadas en este tipo de preparaciones; por lo tanto el uso de fracciones con dos años de almacenamiento no parece ser una contraindicación en cuanto a la estabilidad de la forma farmacéutica final.

AGRADECIMIENTOS. Parte de este trabajo fue realizado con fondos otorgados por el CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Strong, L.E. (1948) *Encyclopedia of Chemical Technology*. Interscience Encyclopedia Inc., 2: 556-84
2. Barandun, S., P. Kistler, F. Jeunet y H. Isliker (1962) *Vox Sang.* 7: 157-74
3. Davis, B.D., E.A. Kabat, A. Harris y D.H. Moore (1944) *J. Immunol.* 49: 223-33
4. Ishizaka, T. y K. Ishizaka (1959) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101: 845-50
5. Christian, C.L. (1960) *J. Immunol.* 84: 112-6
6. Frommhagen, L.H. y H. Fudenberg (1962) *J. Immunol.* 89: 336-43
7. Habeeb, A.F.S.A. y R.D. Francis (1977) *Vox Sang.* 32: 143-58
8. Painter, R.H. (1967) *Vox Sang.* 13: 57-8
9. Skravil, F. (1960) *Nature* 185: 475-6
10. Sgouris, J.T. y M.J. Matz (1967) *Vox Sang.* 13: 59-71
11. Connell, G.E. y R.H. Painter (1966) *Can. J. Biochem.* 44: 371-9
12. Bertollini, M.J., M.H. Stryker y M.S. Horowitz (1980) *Vox Sang.* 39: 250-7
13. OMS (1982) "Toma, fraccionamiento, inspección de calidad y uso de la sangre y de los productos sanguíneos"
14. Henry, R.J. (1974) "Clinical Chemistry" (D.S. Cannon y J.W. Winkelman, Eds.) Harper y Row, N.Y., pág. 98
15. *U.S. Pharmacopeia* (1985) pág. 1229

16. Dixon, T.R. (1968) "*The computer and chemistry*", W.H. Freeman and Co., pág. 124
17. Kabat, E.A. y M. Mayer (1961) "*Experimental Immunochemistry*" C. Thomas, Springfield, Ill, pág. 209
18. Gornall, A.G., C.J. Bardawill y M.M. David (1949) *J. Biol. Chem.* 177: 751-74
19. Lowry, O.H., N.J. Rosebroug, A. Lewis Farr y R.J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-75
20. Hainski, M., J.H. Payne, G.A. Ordonez y E. Shanbrom (1971) *Vox Sang.* 20: 469-78
21. Richerson, H.B. y P.M. Seebohm (1966) *Arch. Intern. Med.* 117: 568-72
22. Christian, C.L. (1960) *J. Immunol.* 84: 117-21
23. Enders, J.F. (1944) *J. Clin. Invest.* 23: 510-30
24. Sgouris, J.T. (1967) *Vox Sang.* 13: 71-84
25. Art, G.P. y J.S. Finlayson (1969) *Vox Sang.* 17: 419-33
26. Kneapler, D. y P. Cohen (1977) *Vox Sang.* 32: 159-64