ESTUDIOS COMPARATIVOS DEL PROCESO DE LIOFILIZACION DE LA ESTREPTOQUINASA RECOMBINANTE (SK-r).

Vivian Pujol[1], Jorge Sotolongo[1], Tomás Moreira[2]

[1]*Departamento de Desarrollo Biofarmacéutico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba.* [2]*División de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.*

Recibido en febrero de 1994. Aprobado en noviembre de 1994

Key words: Estreptokinase, lyophilization, secundary dry

SUMMARY

Five different lyophilization cycles for lyophilize recombinant Streptokinase intended for pharmaceutical use, were experimented. Freezing temperatures assayed were -30°C and -50°C and shelves sublimation temperatures were -10°C, 0°C, 10°C and 20°C, and desorption temperature were 25°C and 30°C. Condenser temperature was -70°C. The chamber pressure during sublimation was about 100 µbar and during desorption 10 µbar. Best lyophilization cycle was found using -50°C for freezing temperature, 10°C for sublimation and 25°C for secondary drying. With this cycle, the lyophilization time was reduced from 39 h in the initial cycle to 20 h in the last one, saving 56.8% of the energy consumption. Residual humidity for the fourth doses assayed was less than 2%, with compact and uniform *cake*. The Streptokinase activity was full recovered after lyophilization in all the cases.

RESUMEN

En este trabajo se comparan cinco ciclos de liofilización para la estreptoquinasa recombinante en sus cuatro formas finales. Fueron ensayadas dos temperaturas de congelación -30°C y -50°C. Se estudiaron como temperaturas de platinas en la sublimación -10°C, 0°C, 10°C y 20°C, y como temperaturas de desorción 25°C y 30°C. En todos los ciclos la temperatura del condensador se fijó en -70°C. La presión de la cámara en la etapa de sublimación fue aproximadamente de 100 µbar y en la etapa de desorción de 10 µbar. La temperatura de congelación del ciclo seleccionado es de -50°C; la sublimación se realiza a 10°C y el secado secundario a 25°C. Con este ciclo se logró reducir el tiempo de liofilización de 39 h a 20 h, con un ahorro de 56.8% de la energía consumida en el ciclo largo. El por ciento de humedad residual de las cuatro dosificaciones liofilizadas es menor del 2%. Las ***pastillas*** obtenidas son compactas y uniformes.

INTRODUCCION

La estreptoquinasa recombinante se usa en tratamientos de infartos agudos del miocardio, trombosis venosa profunda, oclusión arterial, etc. Se obtiene mediante técnicas de recombinación del ADN del cultivo de una bacteria transformada por la inserción en su genoma del gen que codifica para la estreptoquinasa en el *Streptoccocus equisimilis* del grupo C de Lancefield (1). La proteína tiene un peso molecular aproximado de 47 000 Da.

La forma comercial de la estreptoquinasa recombinante es la Heberquinasa, comercializada por la firma Heber-Biotec S.A. y se presenta en forma liofilizada, pudiendo contener cada bulbo 100 000 UI, 250 000 UI, 500 000 UI ó 750 000 UI de estreptoquinasa recombinante. El aspecto final del producto lo constituye una ***pastilla*** uniforme, porosa, de color blanco y sin deformaciones estructurales.

La mayor desventaja de la liofilización está relacionada con los costos de energía y los largos tiempos de secado. Una reducción de los tiempos de secado puede disminuir los costos de producción, de energía y la disponibilidad del equipamiento (2, 3).

El proceso de liofilización se puede dividir en tres etapas: congelación, secado primario (sublimación del hielo) y secado secundario (desorción del agua). La congelación del material formulado se debe realizar a una temperatura inferior a la temperatura de solidificación total del producto (4, 5). El secado primario es la parte del proceso de liofilización que más tiempo consume y se realiza manteniendo controlada la presión en la cámara y suministrando calor al producto. Un incremento de la temperatura puede reducir el tiempo de sublimación, pero se corre el riesgo de que se produzca el fenómeno de hundimiento de estructura. Este secado primario se lleva a cabo, por lo tanto, a una temperatura inferior a la temperatura de fusión incipiente del producto. La optimización de este paso conduce a un proceso de tanteo y error, relacionando la temperatura y la presión de la cámara contra el tiempo (6).

El secado secundario se realiza por reducción de la presión en la cámara y por incremento de la temperatura. La optimización de esta etapa requiere información de los efectos de la temperatura en la descomposición del producto y en la velocidad de secado (7).

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnologia Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

El objetivo de este estudio es establecer un ciclo de liofilización corto que satisfaga los requerimientos de las cuatro dosificaciones de estreptoquinasa recombinante.

MATERIALES Y METODOS

Procedencia del principio activo

Se utilizó SK-r purificada obtenida mediante clonaje y expresión del gen en *E. coli.* (1).

Preparación de las muestras

Se realizaron pruebas de liofilización con placebo de las cuatro dosificaciones y con la proteína dosificada en 100 000 UI, 250 000 UI, 500 000 UI y 750 000 UI.

Las muestras que contenían SK-r en las cuatro dosificaciones estudiadas fueron filtradas de forma estéril en filtros de 0.2 µm (Millipore) y dispensadas para liofilizar en bulbos 6R norma DIN en un volumen de 2 mL. Los bulbos fueron llenados empleando una máquina llenadora semiautomática modelo Paxall, USA.

La SK-r pura se almacenó a -20°C hasta el comienzo del experimento. Se descongeló a 4°C, se formuló y se dispensó en bulbos para ser liofilizada. Una vez concluida la liofilización los bulbos fueron sellados al vacío dentro de la liofilizadora y retapados en condiciones estériles. Posteriormente se conservaron a 4°C hasta la realización de todos los análisis.

Liofilización

Para los estudios de liofilización se utilizó una liofilizadora (Edward Kniese, Inglaterra) modelo S-08 con una capacidad de evacuación de 20 kg de hielo.

En todos los experimentos realizados, la cámara de la liofilizadora se llenó completamente con aproximadamente 1 200 bulbos, colocándose solamente 200 bulbos que contenían la proteína para cada una de las dosificaciones estudiadas. En los estudios realizados con placebo todos los bulbos objeto de estudio se llenaron con los placebos correspondientes y los restantes se llenaron con agua en un volumen de 2 mL.

Durante todos los procesos realizados se midió y registró de forma continua las temperaturas de los productos, las platinas, el condensador y la presión en la cámara.

Los ciclos se consideraron concluidos cuando las temperaturas de los productos y las platinas se mantuvieron igualadas al menos 4 h. Se realizó además una prueba de presión en la cámara aislada considerándose satisfactoria una variación menor de 0.5 µbar.

Humedad residual

Para determinar el contenido de agua residual se seleccionaron 13 bulbos ubicados en distintas localizaciones dentro de la cámara de la liofilizadora.

El por ciento de humedad residual fue determinado por el método de Karl Fischer (8), empleándose un sistema de titulación DTS-830 (Radiometer, Dinamarca).

Determinación de la SK-r

La cantidad de SK-r presente en la formulación del producto antes y después de liofilizado fue determinada por los métodos de sustrato cromogénico y lisis del coágulo (9, 10, 11). Ambos métodos tienen un error estándar del 10%.

La actividad biológica de cada muestra se determinó en 8 réplicas en días diferentes realizando cada día tres réplicas del bulbo analizado.

Apariencia y reconstitución

La apariencia de la *pastilla* y el tiempo de reconstitución fueron observados después de cada experimento. Las muestras se reconstituyen en 2 mL de agua para inyección, a temperatura ambiente y con una ligera agitación manual del bulbo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de mantener un margen de seguridad que garantizara la seguridad del producto, se estableció un ciclo largo con una duración de 39 h. Los parámetros característicos de este ciclo se relacionan en la tabla 1.

Tabla 1
Parámetros de liofilización para el ciclo largo.

Eventos	Temperatura de las platinas (°C)	Rampa (h)	Tiempo de permanencia (h)
Congelación	-30	3.5	3.5
Sublimación del hielo	-15	2	12
Desorción del agua	25	4	13

Se comenzó a realizar vacío en la cámara 2 h después de estar la temperatura de las platinas en -30°C. La temperatura del condensador fue de -70°C. La presión de la cámara durante la sublimación se controló entre 90 y 110 µbar y en el secado secundario fue de aproximadamente 10 µbar.

En la tabla 2 se exponen los resultados de porcentaje de humedad residual y actividad para 10 lotes de SK-r liofilizados en las condiciones expuestas en la tabla 1. Es necesario señalar que los resultados de actividad no presentaron disminución respecto al valor inicial y que los porcientos de humedad residual aunque se encuentran dentro de los límites establecidos para este tipo de producto se pueden considerar elevados y podrían disminuirse optimizando las condiciones de liofilización.

Para permitir la reducción del ciclo se estudian los 4 parámetros relacionados a continuación:

- Temperatura de congelación.
- Velocidad de congelación.
- Temperatura de sublimación.
- Temperatura de desorción.

Se mantuvo constante la temperatura del condensador en todos los casos estudiados, igual a la del ciclo largo.

Combinando estas variables de diseño en los diferentes niveles escogidos se obtuvieron condiciones de liofilización para realizar cuatro ciclos experimentales. Las condiciones de liofilización estudiadas en cada ciclo se muestran en la tabla 3.

Tabla 2
Comportamiento de los lotes de SK-r atendiendo a su actividad biológica y por ciento de humedad residual (empleando el ciclo largo)

Lote	Actividad teórica inicial (UI/mL)	Actividad del liofilizado (UI/mL)	Humedad residual (%)
2001	500 000	556 694	2.23
2002	750 000	765 454	2.23
2003	250 000	298 016	3.20
2004	500 000	547 436	2.50
2005	500 000	560 578	2.00
2006	500 000	610 546	3.04
2007	100 000	110 340	3.90
2008	750 000	790 300	2.06
2009	500 000	550 235	2.00
2010	500 000	510 020	1.90

Tabla 3
Condiciones de liofilización ensayadas en las cinco variantes experimentales

Parámetros	I	II	III	IV	V
Rampa de congelación (h)	2	1.5	2	0.5	1
Temperatura de congelación (°C)	-30	-30	-30	-50	-50
Tiempo de reposo en la congelación (h)	2.5	3.5	2.5	4	2.5
Rampa de sublimación (h)	2.5	2.5	1.5	1	1.5
Temperatura sublimación (°C)	20	10	0	-10	10
Tiempo de sublimación (h)	9.5	10.5	7.5	9.5	9.5
Rampa de desorción (h)	0.5	0.5	0.5	1	0.5
Temperatura de desorción (°C)	30	25	25	25	25
Tiempo de desorción (h)	3.5	2	3.5	6	5
Tiempo total del ciclo (h)	21	21	18	22	20

La presión de la cámara durante la sublimación se mantuvo controlada en un rango de 90 a 110 µbar. El vacío se aplicó en todos los casos cuando el producto estaba totalmente congelado.

Se decidió estudiar el efecto de la velocidad y de la temperatura de congelación sobre la calidad y actividad biológica del producto liofilizado, ya que la velocidad y temperatura de congelación empleadas inicialmente en el ciclo largo provocaron una extensión innecesaria de las condiciones de liofilización. Además al liofilizar congelando más rápidamente, se logra obtener cristales más pequeños y por lo tanto un producto final con una estructura más homogénea.

Se decidió además estudiar el efecto de una temperatura de sublimación más alta, con el fin de poder disminuir la duración del secado primario del producto.

La temperatura de secado secundario se mantuvo a 25°C, puesto que la misma no provoca la desnaturalización térmica del producto.

Del análisis de los resultados obtenidos (tabla 4), utilizando placebos de las dosificaciones estudiadas, se puede plantear que las dosificaciones de 100 000 UI y 250 000 UI pueden ser liofilizadas con cualesquiera de las cuatro variantes inicialmente ensayadas, no siendo así con las dosis de 500 000 UI y 750 000 UI en las cuales se obtienen ***pastillas*** rajadas y ***cristalizadas*** (al realizar un corte transversal a las ***pastillas*** se observan dos capas de congelación, una de las cuales es en forma de finos cristales).

De acuerdo con estos resultados se decidió probar una nueva variante experimental (variante V), sublimando a 10°C, disminuyendo el tiempo en alcanzar la temperatura de sublimación y congelando a -50°C, realizándose en estas condiciones un nuevo ciclo con las características expuestas en la tabla 3. El producto así congelado manifiesta una apariencia homogénea.

Al comparar las figuras 1 y 2 se puede observar el comportamiento de los diferentes parámetros ensaya-

Tabla 4
Calidad del producto liofilizado obtenida para cada dosificacion estudiada en las cinco variantes experimentales.

	Dosificación			
Variante	500 000		750 000	
Experimento No.	Defecto	%	Defecto	%
I	*pastilla* rajada	80	*pastilla* rajada y cristalizada	94
II	*pastilla* rajada	88	*pastilla* rajada y cristalizada	92
III	*pastilla* rajada	90	*pastilla* rajada y cristalizada	90
IV	*pastilla* rajada	82	*pastilla* rajada y cristalizada	95
V	-	-	-	-

Para las dosificaciones de 100 000 UI y 250 000 UI se obtienen *pastillas* liofilizadas sin ningún defecto al emplear cualesquiera de los ciclos experimentales propuestos.

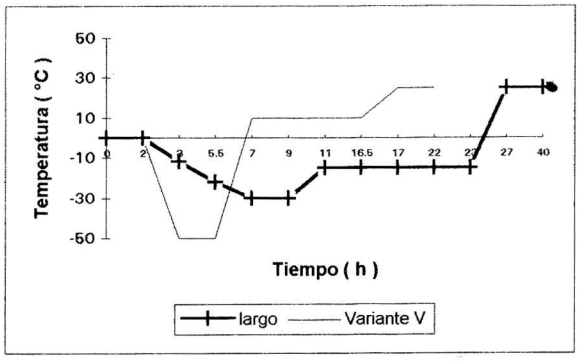

Fig. 3: Comparación de los ciclos de liofilización de la SK-r (largo y variante V)

Las ***pastillas*** se disolvieron rápidamente en 2 mL de H_2O para inyección, no presentándose diferencias en cuanto a tiempo de reconstitución entre las cuatro dosificaciones existentes.

CONCLUSIONES

Las dosificaciones de 100 000 UI y 250 000 UI pueden ser liofilizadas con cualesquiera de los cinco ciclos de liofilización propuestos, obteniéndose con el ciclo V las condiciones de por ciento de humedad residual, actividad biológica y apariencia del producto liofilizado requeridas para este tipo de producto.

Las dosificaciones de 500 000 UI y 750 000 UI se obtienen con las condiciones requeridas de calidad del producto liofilizado al emplear el ciclo correspondiente a la variante experimental V.

El ciclo para las cuatro dosificaciones de SK-r correspondiente a la variante número V, con un tiempo de duración total de 20 h implica un ahorro de tiempo de aproximadamente 19 h por cada proceso de liofilización, lo que significa un aumento de la productividad y un ahorro energético del 56.8% del consumo respecto al ciclo largo por cada liofilización.

REFERENCIAS

1. ESTRADA, M.P.; L. HERNÁNDEZ; A. PÉREZ; P. RODRÍGUEZ; R. SERRANO; R. RUBIERA; A. PEDRAZA; G. PADRÓN; W. ANTUCH; J. DE LA FUENTE and L. HERRERA (1992). High level of expression of Streptokinase in *Escherichia coli*, *Biotechnology* **10**:1138-1142 October.
2. REY, L. (1990). New ventures in freeze-drying, *Nature* **345**:185-186.
3. VEMURI, S. (1991). Lyophilization cycle development for Interleukin-2, *Develop. Biol. Standard* **74**:341-351.
4. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL PRODUCT (1990). Freeze-Drying and Formulation.
5. INAZU, K. (1991). Freeze-Drying and quality evaluation of protein drugs, *Develop. Biol. Standard* **74**:307-322.
6. PIKAL, M.J. (1990). Freeze-Drying of proteins, *Biopharm* 635-650.
7. PIKAL, M.J. (1990). The secondary drying stage of freeze-drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *International Journal of Pharmaceutic* 60:203-217.
8. MAY, J.C. (1982). Determination of residual moisture in freeze-dried viral vaccines: Karl Fischer, gravimetric and thermogravimetric methodologies, *J. of Biological Standardization* **10**:249-259.
9. FARMACOPEA BRITÁNICA (BP) (1988). Apéndice XIV **E**:230-235.
10. FARMACOPEA BRITÁNICA (BP) (1990). Apéndice XIV **F**, XIV **O**.
11. HERNÁNDEZ, L.; P. RODRIGUEZ; A. CASTRO; R. SERRANO; M.P. RODRIGUEZ; R. RUBIERA; M.P. ESTRADA; A. PEREZ; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1990). Determinación de actividad Estreptoquinasa utilizando un ensayo cuantitativo. *Biotecnología Aplicada* **7(2)**:153-160.