

TIEMPO DE VIDA DEL INTERFERÓN ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE EN DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

✉ Daisy Barbería, Maribel Vega, Joel Ferrero, Lady Duany, Galina Moya, Tania Currás, Maida Martínez, Asterio Cruz, Miriela Gil y Marisel Quintana

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31 entre 158 y 190, Playa, Apartado postal 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.

ABSTRACT

This report shows the stability test studies under accelerated and normal storage conditions carried out with recombinant human alpha 2b interferon (hu-r alpha 2b IFN) in phosphate buffer 0.1M, pH 7.0, with and without albumin, in order to establish its shelf-life at refrigerating and frozen conditions. According to the accelerated study we concluded that no alterations will interfere the recognition of hu-r alpha 2b IFN in ELISA in at least five years when stored at -70 or -20 °C. Otherwise, when stored at 4 °C, a loss of a 10 % may occur in one year. We corroborated this when the presence of new structures which might affect the protein immunological recognition were detected by RP-HPLC. No stabilizing properties of albumin on hu-r alpha 2b IFN were observed at least when it is in phosphate buffer 0.1M, pH 7.0 and under accelerated storing conditions.

Key words: stability, inactivation, denaturation, alpha IFN

Biotecnología Aplicada 1996;13:190-194

RESUMEN

Este trabajo presenta un estudio de estabilidad acelerada realizado al interferón alfa 2b humano recombinante (IFN alfa 2b hu-r) en tampón fosfato 0,1M, pH 7,0 bajo condiciones reales de almacenamiento para determinar su tiempo de durabilidad en condiciones de refrigeración y de congelación. Se probaron dos variantes de almacenaje: en presencia o en ausencia de albúmina humana. Del estudio acelerado se obtuvo que en el ensayo ELISA después de cinco años almacenado a las temperaturas de -20 o -70 °C no ocurren alteraciones que impidan el reconocimiento del IFN alfa 2b hu-r. Si se almacena a 4 °C la pérdida del 10 % puede ocurrir al cabo de un año aproximadamente. Esto se corroboró por almacenamiento a 4 °C en tiempo real monitoreado por HPLC-RP donde se observó que al año aparecen nuevas estructuras que pueden interferir en el reconocimiento. Los resultados mostraron que la albúmina no posee propiedades estabilizantes sobre el IFN alfa 2b hu-r al menos cuando este se encuentra en tampón fosfato 0,1M, pH 7,0 y bajo condiciones aceleradas de almacenamiento.

Palabras claves: estabilidad, inactivación, desnaturalización, IFN alfa

Introducción

El interferón alfa es conocido por su efecto antiviral y antiproliferativo. Este se ha podido obtener por la vía del ADN recombinante (IFN alfa 2b hu-r). Con el objetivo de determinar el tiempo y la temperatura de almacenamiento de esta proteína se realizó un estudio de estabilidad bajo condiciones aceleradas (1). La importancia de este estudio radica en que se obtiene valiosa información en poco tiempo; en los estudios de preformulación, es el más usado para comparar la estabilidad de proteínas en presencia de distintos tipos de estabilizantes, excipientes o aditivos (2). Dado su carácter predictivo, es necesario llevar a cabo un estudio de estabilidad en tiempo real para verificar los resultados obtenidos. Este estudio es el que ofrece una información más exacta del comportamiento del producto a la temperatura de almacenamiento establecida (3). En este último caso, se hace necesario no solo determinar la pérdida de la actividad, potencia o concentración en el tiempo a una temperatura dada de almacenamiento,

sino también para detectar degradación se deben emplear otros métodos indicadores de la estabilidad del producto, algunos de los cuales han sido descritos para las proteínas recombinantes (4). Para ellas es necesario emplear un gran número de análisis rigurosos con vistas a asegurar que su estructura, pureza, potencia y actividad de la proteína sean similares a la inicial (5).

La función estabilizante de la albúmina humana sobre biomoléculas se ha destacado por diferentes autores (6). Se ha empleado para la estabilización de proteínas en la fase de investigación y muchas veces en los productos farmacéuticos, por ejemplo, un exceso de albúmina en la formulación final de interleucina 2 recombinante producida por Cetus Corporation (EE. UU.) logró estabilizar la preparación liofilizada (7).

El presente trabajo muestra los resultados de un estudio de estabilidad del IFN alfa 2b hu-r bajo condiciones aceleradas y bajo condiciones reales de

1. Kirkwood TBL. Predicting the stability of biological standard and products. *Biometrics* 1970;33:736-742.

2. Wallerstein Jan-Olof. Methodological studies on the evaluation of drug stability in preformulation work. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Pharmacy, Uppsala 1986.

3. Tydeman MS, Kirkwood TBL. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards I. Properties of maximum likelihood estimators. *Journal of Biological Standardization* 1984;12:195-206.

4. Geiger J. Overview of the stability and handling of recombinant protein drugs. *Journal of Parenteral Science and Technology* 1989.

5. Evens, RP, Witcher M. *Biotechnology: An introduction to recombinant DNA technology and product availability*. *Ther Drug Monit* 1993;15 (6):514-520.

6. Shami, EY, Rothstein A, Ramjessingh M. Stabilization of biologically active proteins. *TIBTECH* 1989;7.

✉ Autor de correspondencia

almacenamiento (4, -20 y -70 °C) tanto en presencia como en ausencia de albúmina.

Materiales

IFN alfa 2b hu-r

Se estudió en tampón fosfato 0,1M, pH 7,0. El material se dividió en dos partes, a una se le adicionó albúmina humana como preservante. El envase se realizó en condiciones estériles.

Albúmina humana

Solución al 20 % en volumen (Infusión IV, IMEFA, Cuba).

Métodos

Elisa

La concentración del IFN alfa 2b hu-r en el tiempo de estudio se analizó mediante ensayo inmunoenzimático tipo "sandwich" para la cuantificación del IFN alfa 2b hu-r. El ensayo emplea 2 anticuerpos monoclonales producidos en el CIGB (Anti-Human Alfa 2 IFN CB-IFNA 2.3 y Anti-Human Alfa 2 IFN CB-IFNA HRP 2.4). La lectura de la placa se realizó a 492 nm en un MULTISKAN PLUS-ANTHOS (8).

Titulación

Este método se basa en la capacidad de los IFNs para prevenir la infección y destrucción de células Hep-2 (Carcinoma laríngeo humano, ATCC No. CCL 23) provocada por el virus mengo (9).

Electroforesis vertical con SDS en gel de poliacrilamida

Se utilizó el gel a una concentración de 12,5 % de poliacrilamida. Las muestras se procesaron en condiciones reducidas. Se aplicaron 20 µg de proteínas totales. La corrida electroforética se realizó bajo una intensidad de corriente constante de 30 mA y voltaje inicial de 120 volt, en una fuente de alimentación para electroforesis (PHARMACIA, Suecia). La tinción del gel se realizó con azul de Comassie G-250 (10).

Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

Se llevó a cabo según la técnica reportada por Moya G, et al. (11). Se utilizó un sistema de HPLC LKB (Bromma, Suecia). Las separaciones se efectuaron en columna Wide pore C8 (4,6 x 100 mm, 5µm) J.T. Baker (EE. UU.). Las soluciones empleadas fueron: A (ácido trifluoroacético-TFA- 0,1 % en agua para HPLC) y B (TFA 0,05 % en acetonitrilo), utilizando un gradiente desde 15 % de B hasta 60 % B, en 40 min con un flujo de trabajo de 0,8 mL/min. La temperatura se mantuvo a 34 °C y la absorbancia fue monitoreada a 226 nm. La adquisición y procesamiento de los datos se realizaron empleando el programa BIOCROM (CIGB, Cuba) (12).

Estabilidad acelerada

El estudio se basó en exponer las muestras a elevadas temperaturas (28, 45 y 55 °C), determinar los parámetros cinéticos de la degradación en cada temperatura y usarlos para el ploteo de la ecuación de Arrhenius. Los parámetros de esta última, determinados experimentalmente, fueron empleados para predecir la velocidad de degradación en condiciones de refrigeración (13).

Estabilidad bajo condiciones reales de almacenamiento

Se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura (4, -20 y -70 °C), para corroborar los requerimientos de almacenaje propuestos en el estudio de estabilidad acelerado. Se emplearon métodos validados para detectar variaciones de la actividad biológica y la estructura y pureza de la molécula durante el tiempo de almacenamiento (14).

Resultados y Discusión

El estudio de estabilidad acelerada se realizó al IFN alfa 2b hu-r en presencia o en ausencia de albúmina humana. Las concentraciones de IFN alfa 2b hu-r determinadas en las muestras durante el almacenamiento se procesaron por el programa BIOEST2 (15). Este programa calcula las constantes de la velocidad de degradación para cada temperatura estudiada a partir del gráfico \ln de la concentración vs. tiempo (Figura 1) con las cuales ajusta gráficamente la ecuación de Arrhenius (3). Extrapolando en este gráfico se estima la constante de velocidad de degradación de la temperatura de almacenamiento propuesta para predecir el tiempo de vida útil del producto. Según el BIOEST2 la cinética de degradación

7. Hora MS, Rana RK, Wilcox CL, Katre NV, Hirtzer P, Wolfe NS, Thomson JW. Development of lyophilized formulation of interleukin-2. Development biological standardization 1991;74:295-306.

8. Pérez E, Pérez LC, Marañón V, Mella CM. Tratamientos analíticos de muestras de interferón alfa 2b humano recombinante para su cuantificación por ELISA. Biotecnología Aplicada 1991; 8(3):392-399.

9. Johnston M. Dye uptake method for assay of interferon activity. Methods in Enzymology 1981;78.5.

10. Hames BD and Rickwood. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL Press 1981.

11. Moya GM, Costa LC, González EM. HPLC studies of a purified alfa interferon preparation. Biotecnología Aplicada 1994;11(1):64-67.

12. BIOCROM. User's manual. Automation Division 1991, CIGB.

13. Kirkwood TBL. Design and analysis of accelerated degradation test for the stability of biological standard III. Principles of design. Journal of Biological Standardization 1984;12:215-224.

14. Commission of the European Communities. The rules governing medicinal products in the European Community: Guideline on the quality, safety and efficacy of medicinal products for human use. 1989;3:21.

15. Álvarez E, Moreira T, Cabrera L. Sistema para la predicción de la estabilidad de productos biológicos. Versión 2.0. 1992. CNIC.

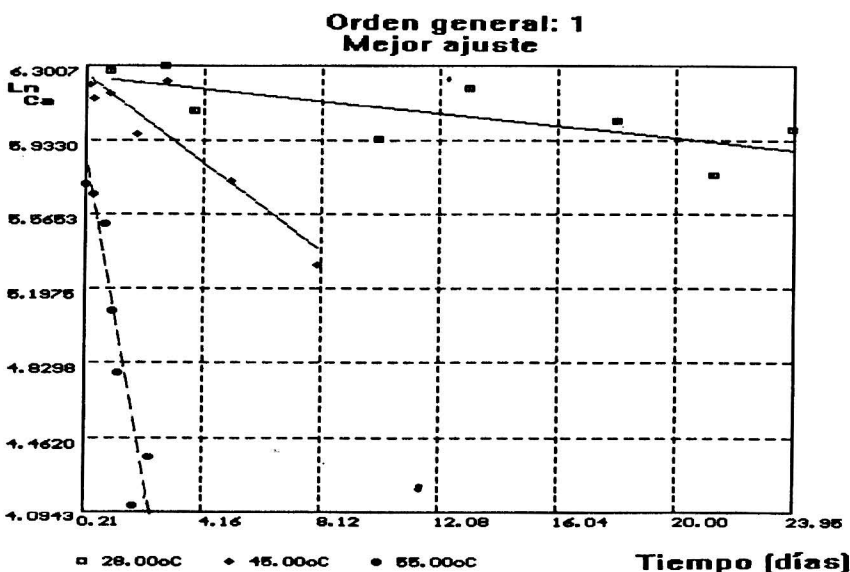


Figura 1. Variación de la concentración (µg/mL) del interferón alfa humano recombinante en tampón fosfato (0,1M) para cada temperatura con respecto al tiempo (días). Temperaturas: (x) 28 °C ($k = 0,0154 \text{ días}^{-1}$), (♦) 45 °C ($k = 0,0827 \text{ días}^{-1}$), (●) 55 °C ($k = 0,7795 \text{ días}^{-1}$).

Eje x: Ln de la concentración

Eje y: Tiempo expresado en días

correspondió a una reacción de primer orden. Esto implica que la velocidad con que decrece el número de moléculas que no sufren cambios es proporcional al número de ellas que permanecen intactas, es decir, el parámetro evaluado decae de forma exponencial con el tiempo (1).

Para la temperatura de refrigeración (2 -8 °C) se predijo que el producto puede perder un 10 % de su concentración al cabo del año aproximadamente. Los resultados fueron similares para el material en presencia de albúmina.

Igualmente no hubo diferencias para ambas condiciones de almacenamiento al hacer la predicción en condiciones de congelación (-70 °C). En este caso el almacenamiento se puede extender hasta cinco años.

La comparación estadística mediante análisis de varianza bifactorial (16) utilizando el estadígrafo F de Fisher se realizó utilizando los valores de velocidad de degradación de cada temperatura en ambas variantes de almacenamiento (Tabla 1) y demostró que no existen diferencias significativas entre las dos formulaciones estudiadas. En el estudio se tomaron como factores la temperatura y la presencia de albúmina, el primero con tres niveles y el segundo con dos. El análisis de varianza bifactorial (Tabla 2) demostró que:

- no existe diferencias significativas entre las constantes de degradación para cada temperatura en las dos formulaciones;
- las constantes de degradación son diferentes para cada temperatura, independientemente de la presencia de albúmina;
- la interacción albúmina-temperatura no ejerce efecto significativo sobre la estabilidad.

Para el análisis de la estabilidad bajo condiciones reales de almacenamiento (4, -20 y -70 °C) se utilizaron los valores reportados por actividad biológica (Tabla 3). Estos valores fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza (Tabla 4) y se demostró que a pesar de las variaciones propias del ensayo de actividad biológica la degradación en el tiempo no es significativa.

En la electroforesis (SDS-PAGE) no se observaron bandas de degradación en ambas formulaciones hasta 29 meses de almacenamiento (Figura 2).

El análisis del IFN alfa 2b hu-r mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) mostró dos especies principales, un pico mayoritario que corresponde a la molécula intacta y otro minoritario del IFN alfa 2b hu-r acetilado (17).

En los perfiles cromatográficos de los materiales almacenados a 4 °C por 16 meses se observó un cambio en el pico que corresponde al IFN alfa 2b hu-r acetilado (Figura 3) que se mantiene a los 28 meses. A diferencia de este resultado en las muestras almacenadas en condiciones de congelación (-20 y -70 °C), el perfil cromatográfico se mantuvo invariable hasta los 28 meses de almacenamiento (Figura 4), sin embargo se detectó la formación de

Tabla 1. Valores de las constantes de la velocidad de degradación para las variantes de formulación con y sin albúmina.

Temperaturas		1/T	k (variante I)	k (variante II)
(°C)	(K)			
28	301	0,00332	-0,01542	-0,01653
45	318	0,00314	-0,08274	-0,15279
55	328	0,00304	-0,77950	-1,12040

k: constantes de la velocidad de degradación expresado en días⁻¹

variante I: sin albúmina

variante II: con albúmina

Tabla 2. Análisis estadístico bifactorial realizado mediante un test de Anova. Este análisis se llevó a cabo empleando la F de Fisher.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	CM	F	F tabulada
Temperatura	2,650911	2	1,3254	18,821	5,143
Albúmina	0,33624	1	0,33624	4,7745	5,987
Interacción	0,585414	2	0,2927	4,1564	5,143
Error	0,422536	6	0,0704	-	-
Total	3,9951	11	-	-	-

Suma de cuadrados = $\sum (Y_{ijk})^2$

GL: grados de libertad

CM: cuadrado medio: $\frac{\text{Suma de cuadrados}}{\text{GL}}$

F: estadígrafo de Fisher: $\frac{\text{CM de cada fuente de variación}}{\text{CM del error}}$

Tabla 3. Valores de actividad biológica correspondientes a las muestras almacenadas a 4, -20 y -70 °C en presencia y ausencia de albúmina.

Tiempo (meses)	Actividad biológica inicial: $10,8 \times 10^6$ UI/mL					
	4 °C		-20 °C		-70 °C	
	SA	CA	SA	CA	SA	CA
1	2,41	3,16	6,39	8,27	5,04	4,91
2	3,28	3,95	2,76	2,56	3,57	5,69
3	12,24	11,22	12,60	9,00	12,90	16,50
9	3,20	4,52	2,26	2,26	3,26	3,26
12	9,40	6,40	7,40	9,90	7,30	8,00
17	5,48	5,91	4,05	5,74	6,32	5,21
29	6,77	7,36	6,38	7,13	7,18	5,70

Act. B: actividad biológica determinada por ensayo de titulación (función antiviral del IFN alfa) expresado en UI/mL.

SA: sin albúmina

CA: con albúmina

una nueva especie menos hidrofóbica que la especie principal (con menor tiempo de retención). Esta nueva especie apareció tanto en el IFN alfa 2b hu-r almacenado a -20 °C como almacenado a -70 °C.

La aparición de esta nueva especie puede ser debido a transformaciones ocurridas en los residuos

Tabla 4. Análisis de varianza de los valores de actividad biológica reportados en la tabla 3.

4 °C sin albúmina	Suma de cuadrado	GL	CM	F	Significación de F
Regresión	0,2675	1	0,267	0,0162	0,9027
Residuos	98,8898	6	16,481	-	-
Total	99,1573	7	-	-	-
4 °C con albúmina	Suma de cuadrado	GL	CM	F	Significación de F
Regresión	0,1549	1	0,154	0,0147	0,9027
Residuos	63,0718	6	10,511	-	-
Total	63,2268	7	-	-	-
-20 °C sin albúmina	Suma de cuadrado	GL	CM	F	Significación de F
Regresión	6,5053	1	6,505	0,4438	0,5300
Residuos	87,9476	6	14,857	-	-
Total	94,4533	7	-	-	-
-20 °C con albúmina	Suma de cuadrado	GL	CM	F	Significación de F
Regresión	0,8206	1	0,820	0,0689	0,8016
Residuos	71,4134	6	11,902	-	-
Total	72,2341	7	-	-	-
-70 °C sin albúmina	Suma de cuadrado	GL	CM	F	Significación de F
Regresión	1,3581	1	1,358	0,1043	0,7575
Residuos	78,0536	6	13,008	-	-
Total	79,4117	7	-	-	-
-70 °C con albúmina	Suma de cuadrado	GL	CM	F	Significación de F
Regresión	15,1344	1	15,134	0,8004	0,4054
Residuos	113,4508	6	18,909	-	-
Total	125,5852	7	-	-	-

$$\text{Suma de cuadrados} = \sum (Y_{ijk})^2$$

GL: grados de libertad

$$\text{CM: cuadrado medio: } \frac{\text{Suma de cuadrados}}{\text{GL}}$$

$$\text{F: estadígrafo de Fisher: } \frac{\text{CM de cada fuente de variación}}{\text{CM del error}}$$

aminoácidos con características hidrofóbicas lo cual conllevó a una disminución de la hidrofobicidad de la molécula como tal. No obstante, la actividad biológica del IFN alfa 2b hu-r no se afectó, probablemente debido a que no ocurrieron transformaciones en los residuos de cisteína que intervienen en la formación del puente disulfuro el cual está involucrado en la función biológica de la molécula.

Conclusiones

El IFN alfa 2b hu-r en solución de fosfato de sodio debe ser conservado preferiblemente en condiciones de congelación (-20 o -70 °C) por un tiempo no mayor de un año, tiempo en el cual no ocurren cambios

estructurales que modifican el perfil cromatográfico de la molécula en cuestión. No obstante ello se predice por el método de almacenamiento acelerado que no ocurrirán alteraciones que impidan el reconocimiento del IFN alfa 2b hu-r en el ensayo ELISA hasta alrededor de cinco años almacenado a las temperaturas de -20 o -70 °C. Si se almacena a 4 °C la pérdida del 10 % puede ocurrir al cabo del año aproximadamente. Esto se corroboró por almacenamiento en tiempo real monitoreado por cromatografía donde se observó que al año a 4 °C, aparecen nuevas estructuras que pueden interferir en el reconocimiento inmunológico de la molécula por sus anticuerpos específicos. Además con estos resultados se reafirmó la importancia de utilizar otros métodos

16. Bernard Ostle. Estadística Aplicada. Editorial Científico - Técnica. 1980:350.

17. Padrón G, Besada V, Agráz A, Quiñones, Herrera L. Mass spectrometric analysis of recombinant human α -2 interferon. Analytical Chimica Acta 1989; 361-369.

para monitorear la estabilidad de un producto biológico.

En cuanto al IFN alfa 2b hu-r, por los resultados obtenidos, no se observó propiedades estabilizantes de la albúmina al menos cuando se encuentra en tampón fosfato 0,1M, pH 7,0 y bajo condiciones aceleradas de almacenamiento.

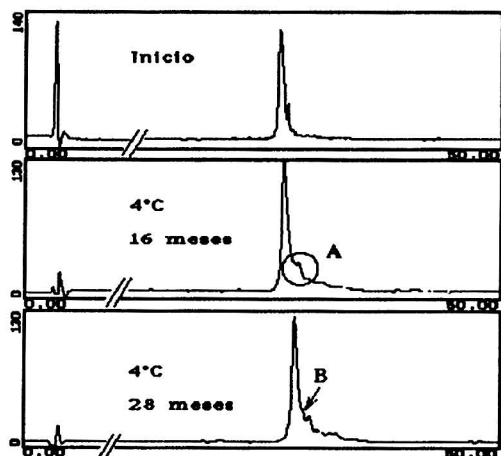


Figura 3. IFN alfa 2b hu-r almacenado a 4 °C. (A) cambios estructurales a nivel de IFN acetilado. (B) hombro que aparece entre el pico principal y el acetilado.

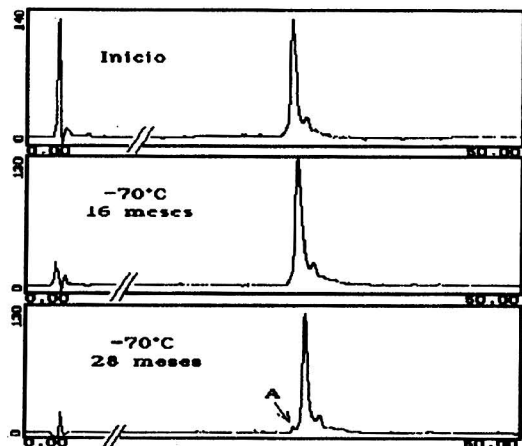


Figura 4. IFN alfa 2b hu-r almacenado a -70 °C. (A) nueva especie menos hidrofóbica y que antecede al pico principal con menor tiempo de retención.

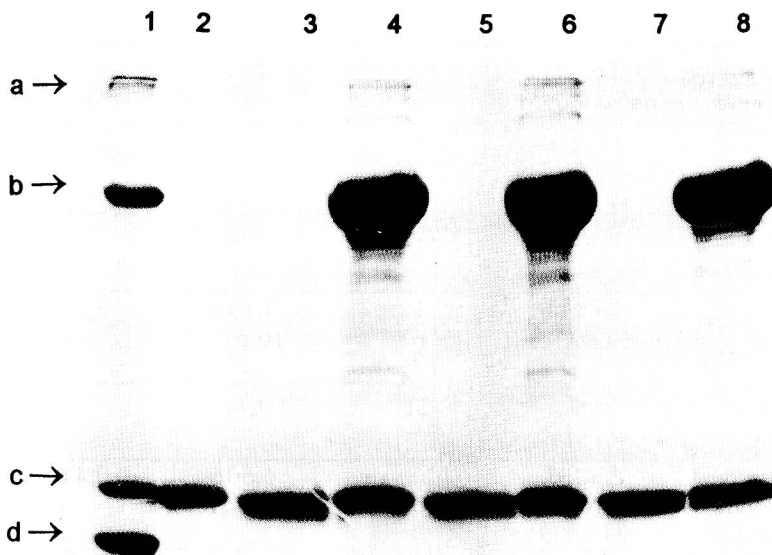


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS del interferón alfa humano recombinante almacenado a temperaturas de refrigeración y congelación durante 29 meses.

(1) Patrón de peso molecular

a- Fosforilasa B (94000)

b- Albúmina bovina (67000)

c- IFN alfa 2b hu-r (18000)

d- Lisozima (12000)

(2) Patrón de trabajo de interferón alfa confeccionado en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

(3) y (4) IFN alfa 2b hu-r almacenado a 4 °C sin y con albúmina

(5) y (6) IFN alfa 2b hu-r almacenado a -20 °C sin y con albúmina

(7) y (8) IFN alfa 2b hu-r almacenado a -70 °C sin y con albúmina

(A) Albúmina humana