

# INFLUENCIA DE LA GLICOSILACION SOBRE LAS CARACTERISTICAS HIGROSCOPICAS Y LA POLIMERIZACION DE ALBUMINAS HUMANA Y BOVINA LIOFILIZADAS

A. Gutiérrez, T. Moreira, Ch. Romay, H. Borrero\* y M. E. Castellano.\*

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, \*Planta de Hemoderivados "Aristides Viera", Avenida 51 No. 33012, km 19,5, Arroyo Arenas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de noviembre de 1994.

**RESUMEN.** Se estudiaron las características higroscópicas (isotermas de adsorción) de las albúminas humana (AH) y bovina (AB), así como sus formas glicosiladas (AHG y ABG), todas liofilizadas. El comportamiento de las isotermas de adsorción fue muy similar, al igual que el contenido de agua de la monocapa, calculado por los modelos de GAB y BET, encontrándose entre 0,065 y 0,077 g de agua por gramo de proteína seca. Se realizó el almacenamiento acelerado, a temperaturas comprendidas entre 50 y 60 °C y se comprobó que la polimerización de las albúminas correspondía a una cinética de primer orden. La velocidad de polimerización de la AB fue superior a la de la AH, mientras que las glicosiladas se degradaron más que las anteriores. El efecto de la humedad residual sobre la polimerización de las formas de albúmina bovina evidenció que a contenidos de agua en el producto superiores al correspondiente a la monocapa, el proceso de polimerización se acelera.

**ABSTRACT.** Hygroscopic characteristics (sorption isotherms) of freeze-dried human and bovine albumins (HSA and BSA) and their glycosylated forms (HSAG and BSAG) were studied. The shape of all the isotherms was the same and the monolayer water content was very similar when calculated by means of BET or GAB models, ranging from 0,065 and 0,077 g of water per gram of dried protein. An accelerated storage test at temperatures of 50, 55 and 60 °C, showed that albumins polymerization behaved as a first order kinetics. BSA polymerization was higher than HSA one, while BSAG polymerization was the highest, showing that polymerization is favored by glycosilation. The effect of residual humidity on polymerization of both BSA forms, showed that a humidity level upper than the monolayer content accelerates the process, mainly in BSAG.

## INTRODUCCION

La mayoría de las proteínas monoméricas purificadas, en dependencia del tratamiento empleado, contienen una fracción polimerizada que incluye, dímeros, trímeros, tetrámeros y polímeros de alto peso molecular.

La fracción polimerizada se detecta fácilmente por cromatografía de exclusión molecular en gel. Esta polimerización ocurre principalmente a través de grupos SH, como consecuencia de la formación de puentes disulfuros intermoleculares<sup>1</sup> o mediante pasos avanzados de la reacción de Maillard.<sup>2</sup>

La estabilización de las proteínas por liofilización resulta un proceso altamente complejo. Esto requiere de un análisis riguroso de los índices de estabilidad del producto y un acertado diseño de la formulación que garantice la fácil administración.

La mayor razón para la producción de liofilizados está relacionada con la inestabilidad de muchas proteínas en estado líquido. La liofilización de proteínas disminuye su velocidad de degradación, pero no la elimina.

La importancia del contenido de humedad residual del producto liofilizado tampoco puede ser subestimada. Muchos productos a determinados valores de humedad residual pueden agregarse o dar lugar, a soluciones opalescentes en el proceso de reconstitución<sup>3</sup> correspondiente.

La degradación de la proteína puede ocurrir a diferentes niveles en la estructura y traer consecuencias adversas tales como pérdida de potencia, de antigenicidad, etcétera.

Un problema crítico en el almacenamiento y liberación de proteínas farmacéuticas en estado sólido, es la agregación inducida por la humedad y por las altas temperaturas.

El efecto de las altas temperaturas ha sido evaluado para proteínas tales como rbSt y albúmina sérica bovina a niveles de hidratación inferiores al de la monocapa.<sup>4</sup> La mayor vía de descomposición resulta la formación de agregados enlazados covalentemente.

Para garantizar la estabilidad de las proteínas en estado sólido debe tenerse en cuenta tanto las condiciones de obtención como las de envase y almacenamiento.

Se ha comprobado en la albúmina bovina la formación de agregados, al ser expuesta a la acción de altas humedades. Esta proteína se descompone más rápidamente en forma pura que en presencia de aditivos.<sup>1</sup>

En el plasma sanguíneo, tanto humano como animal, se encuentran presentes glicoproteínas de diferente naturaleza. Algunas de estas glicoproteínas una vez purificadas, son sometidas a la liofilización como método de estabilización. Su manipulación y almacenamiento depende en parte de las características higroscópicas que presentan (isotermas de adsorción), así como de la tendencia a la polimerización que manifiesten durante su almacenamiento.

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar el comportamiento higroscópico de las albúminas humana y bovina, puras o glicosiladas, conservadas por liofilización, así como evaluar la tendencia a la polimerización de dichas proteínas liofilizadas cuando son sometidas a diferentes temperaturas de almacenamiento.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

Las proteínas empleadas para la liofilización fueron la albúmina bovina (AB), SIGMA y la albúmina humana (AH), proveniente de la Planta de Hemoderivados de La Habana y obtenida por precipitación alcohólica del plasma sanguíneo (fracción V, empleando el método de Cohn modificado), así como las correspondientes proteínas glicosiladas (ABG y AHG), todas liofilizadas en forma de solución al4%.

Para la glicosilación, las soluciones de albúmina bovina y humana al 4 %, se incubaron a 37 °C durante 72 h en presencia de glucosa. Las muestras glicosiladas se dializaron para eliminar la glucosa libre.<sup>2</sup>

### Experimentos

**Liofilización de las muestras.** Las soluciones de las albúminas, se liofilizaron en un equipo SERAIL (Francia) empleando frascos de 5 mL de capacidad, que contenían 2 mL de solución.

La presión de trabajo fue de 10Pa y la temperatura de placas para el secado primario fue de 10 °C durante 12 h, así como 25 °C durante 8h para el secado secundario. En el caso de la AB y ABG, se efectuó una experiencia adicional, reduciendo el tiempo de secado secundario a 4 h para incrementar la humedad residual.

**Determinación de la humedad residual del producto liofilizado.** El contenido de agua en las muestras se determinó, empleando el método de K. Fischer<sup>5,6</sup> usando la reacción del H<sub>2</sub>O con el I<sub>2</sub> y el SO<sub>2</sub> en presencia de una solución de piridina.

La valoración de las muestras se realizó en un equipo de la Baird and Tatlock (Inglaterra).

**Determinación de las isothermas de adsorción y de la cantidad de agua adsorbida (monocapa) por el material liofilizado.** Aproximadamente, 0,5 g de cada muestra se colocaron en desecadoras pequeñas que contenían respectivamente diferentes soluciones salinas saturadas con distintas humedades relativas de equilibrio a una temperatura controlada de 25 °C.

Las soluciones utilizadas fueron: LiCl (HR 11 %), MgCl<sub>2</sub> (40 %), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (49 %), NaBr (58 %), NaCl (75 %), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (80 %), K<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> (93 %), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96 %).

Las muestras se pesaron a intervalos regulares de tiempo hasta llegar al equilibrio.

El contenido de agua adsorbida correspondiente a la monocapa fue calculado mediante el modelo de Brunauer-Emmet-Teller (BET) y el de Guggenheim-Anderson-De Boer (GAB).<sup>6</sup>

### Cinética de degradación de las muestras

Las muestras liofilizadas se colocaron a 50, 55 y 60 °C durante períodos suficientemente prolongados que garantizaran la ocurrencia de alteraciones al material [disminución del contenido de monómeros (%)].

### Cromatografía de exclusión molecular

Se empleó un sistema FPLC (LKB-Pharmacia) para la cromatografía de exclusión molecular en gel. Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

Matriz: superosa 12 HR 10/30; velocidad de flujo: 0,5 mL/min; fase móvil 0,05 mol/L de amortiguador fosfato + 0,15 mol/L NaCl (pH 7); medición de la absorbancia a 280nm a temperatura ambiente.

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

### Características de las muestras liofilizadas

La tabla I muestra la humedad residual de cada producto liofilizado, así como el contenido de monómeros correspondientes.

**TABLA I**  
**Características de cada albúmina liofilizada**

| Proteína         | Humedad residual | Contenido de monómeros |
|------------------|------------------|------------------------|
|                  | (%)              |                        |
| AH               | 3,2              | 88                     |
| AHG              | 3,5              | 87                     |
| AB <sup>1</sup>  | 3,4              | 87                     |
| ABG <sup>1</sup> | 3,7              | 85                     |
| AB <sup>2</sup>  | 7,08             | 7                      |
| ABG <sup>2</sup> | 6,8              | 86                     |

1 y 2 niveles de humedad residual.

AB Albúmina bovina ABG Albúmina bovina glicosilada

AH Albúmina humana AHG Albúmina humana glicosilada.

### Determinación de las isothermas de adsorción y de los valores de la monocapa de agua adsorbida

Las isothermas de adsorción presentaron la forma sigmoïdal característica (Fig. 1). No se observaron diferencias sustanciales entre las albúminas, glicosiladas o no.

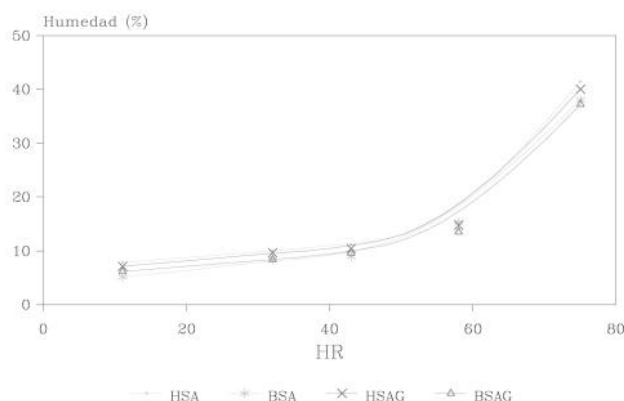


Fig. 1. Isothermas de adsorción de las albúminas humana y bovina, glicosiladas o no y liofilizadas.

Estas curvas presentan tres regiones con puntos de inflexión que representan el paso de una forma de adsorción de agua a otra. La primera región es la correspondiente a la monocapa, o sea, aquella en que el agua se une fuertemente a los sitios altamente activos de la proteína: grupos cargados y altamente polares.

Empleando ambos procedimientos (Tabla II) se comprobó, que la cantidad de agua adsorbida por las muestras analizadas, resulta muy similar entre sí, alcanzando un valor que fluctúa entre 0,065 y 0,77 g de agua/gramos de proteína seca.

Tanto el contenido de agua de la monocapa como el similar comportamiento a lo largo de toda la isoterma de adsorción, demuestran que la glicosilación no incrementa significativamente el número de sitios activos para la adsorción de

agua. También se han observado invariables, otras propiedades de algunas proteínas después de la glicosilación.<sup>7</sup>

**TABLA II**  
**Niveles de humedad en la monocapa para cada producto**

| Producto | Niveles de humedad de la monocapa<br>(gramos de agua/gramos de proteína seca) |       |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
|          | BET                                                                           | GAB   |
| AB       | 0,074                                                                         | 0,076 |
| ABG      | 0,065                                                                         | 0,072 |
| AH       | 0,068                                                                         | 0,077 |
| AHG      | 0,071                                                                         | 0,077 |

AB Albúmina bovina    ABG Albúmina bovina glicosilada  
AH Albúmina humana    AHG Albúmina humana glicosilada

El contenido promedio de agua en la monocapa concuerda con la presencia de los residuos de aminoácidos con mayor polaridad. La albúmina es un ejemplo. El valor medio de su monocapa, calculada por BET y por GAB, asciende a 0,072 g de agua por gramo de proteína, o lo que es lo mismo, 265 mol de agua por mole de proteína.

La molécula de albúmina<sup>8</sup> contiene 38 residuos de ácido aspártico, 15 de asparagina, 58 de ácido glutámico, 25 de glutamina, 23 de serina, 59 de lisina, 16 de histidina y 23 de arginina, que hacen un total de 257 residuos hidrofílicos sobre los cuales las moléculas de agua podrían fijarse en primer término, constituyendo una monocapa de 257 mol de agua por mole de proteína. Teniendo en cuenta los posibles errores experimentales en la determinación de la monocapa, la coincidencia de los valores es notable.

En el caso de la albúmina glicosilada, las moléculas de glucosa incorporadas a ella, parecen mantener la misma afinidad por el agua que el residuo aminoacídico al cual se fijaron. Fenómenos similares parecen tener lugar en la AB y la ABG.

Según Hageman<sup>4</sup>, el contenido de humedad de la monocapa, representa el límite superior para asegurar la estabilidad. A niveles de humedad superiores o iguales al valor de la monocapa, tienden a perder su estabilidad biológica. Precisamente, el valor óptimo de humedad residual requerido para el balance físico y biológico, según Hsu<sup>3</sup>, debe ser similar a los valores de la monocapa de agua.

**Almacenamiento acelerado**

Para todos los productos estudiados, la desaparición de las formas monoméricas se comportó fenomenológicamente como una cinética de primer orden (Fig. 2).

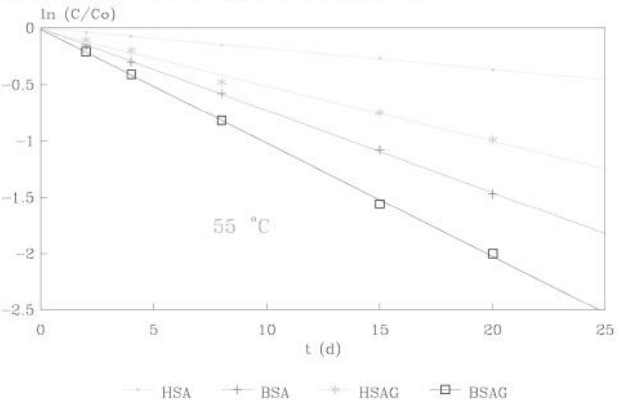


Fig 2. Reducción del contenido de monómeros con relación al contenido inicial (C/Co) en las albúminas liofilizadas almacenadas a 55 °C.

Se constató una mayor estabilidad en la molécula de albúmina humana que en la bovina (Tabla III). Estas proteínas, aunque presentan una estructura similar, sólo coinciden en el 78 % de los residuos<sup>8</sup>, pudiendo ser ésta la causa de las diferencias encontradas. Las formas no glicosiladas resultaron más estables que las glicosiladas, bajo altas temperaturas.

**TABLA III**  
**Constantes aparentes de velocidad de degradación correspondientes a cada proteína liofilizada almacenada**

| Proteína         | k(d <sup>-1</sup> ).10 <sup>3</sup> |       |       |
|------------------|-------------------------------------|-------|-------|
|                  | Temperatura (°C)                    |       |       |
|                  | 50                                  | 55    | 60    |
| AB <sup>1</sup>  | 19,1                                | 42,2  | 74,5  |
| ABG <sup>1</sup> | 34,8086                             | ,7    | 124,0 |
| AH               | 16,0                                | 30,3  | 58,1  |
| AHG              | 22,3                                | 34,07 | 7,9   |
| AB <sup>2</sup>  | 30,0                                | 47,5  | 84,2  |
| ABG <sup>2</sup> | 65,3                                | 100,5 | 168,4 |

1 y 2 niveles de humedad residual.

AB Albúmina bovina    ABG Albúmina bovina glicosilada  
AH Albúmina humana    AHG Albúmina humana glicosilada

En el caso de la albúmina bovina, se comprobó que a valores de humedad inferiores al de la monocapa de agua (AB<sup>1</sup> y ABG<sup>1</sup>), las velocidades aparentes de degradación son del mismo orden para una misma temperatura, ya fueren glicosiladas o no las proteínas en cuestión, indicando una mayor estabilidad, sobre la que influye poco la glicosilación. Cuando la humedad residual sobrepasa el nivel de la monocapa (AB<sup>2</sup> y ABG<sup>2</sup>), el incremento de la polimerización con la glicosilación, para una misma temperatura, es notable, siendo las velocidades de degradación mucho mayores que las correspondientes a los productos liofilizados con menor contenido de humedad residual.

La influencia del incremento de la humedad residual sobre la polimerización, ya había sido puesta en evidencia sobre la AH liofilizada.<sup>9</sup>

Resulta de interés destacar que en las cuatro albúminas estudiadas, al ser sometidas por 15 d al efecto del almacenamiento bajo dos humedades relativas diferentes, a temperatura ambiente (Fig. 3), no se apreciaron diferencias notables entre ellas para una misma humedad, siendo la albúmina humana no glicosilada la que parece mostrar mayor estabilidad. Esta última, mantuvo prácticamente el mismo contenido de monómeros cuando se almacenó bajo un 75 % de humedad relativa, mientras que a un 93 % de humedad relativa, el contenido de monómeros cayó al 65 % del valor inicial.

Existe pues, una tendencia a la disminución del contenido de monómeros a medida que se incrementa la actividad de agua del material biológico. Esto debe tenerse en cuenta a los efectos del almacenamiento de estos productos, cualesquiera que sean sus formas u orígenes respectivos.

Estos factores además de favorecer la polimerización mediante la formación de enlaces disulfuro intra e intercatenarios, pudieran a su vez, promover aún más la polimerización del material por el entrecruzamiento adicional de los productos de glicosilación avanzada en las especies glicosiladas.

El incremento de la polimerización al almacenar estas proteínas liofilizadas bajo altas humedades relativas, podría provocar variaciones en las isoterms de adsorción, fundamentalmente en la zona de altas humedades, puesto que

para llegar al equilibrio, las muestras toman entre 6 y 15 d . Esta es una razón adicional, además de la posible aparición de mohos, para que en este tipo de producto, las isotermas se obtengan sólo para humedades relativas inferiores al 75%.

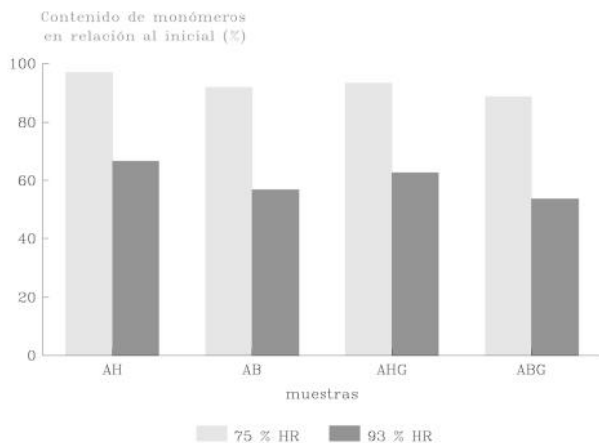


Fig. 3. Variación del contenido de monómeros relativo al valor inicial, en las albúminas liofilizadas, en dependencia de la humedad relativa (almacenamiento por 15 d).

AB Albúmina bovina ABG Albúmina bovina glicosilada  
AH Albúmina humana AHG Albúmina humana glicosilada

### CONCLUSIONES

A pesar de las diferencias que existen entre las moléculas de las proteínas estudiadas, el mecanismo de adsorción

de agua en cada caso, resulta semejante entre sí (las muestras exhiben un comportamiento análogo en las isotermas de adsorción, así como en el contenido de humedad de la monocapa de agua correspondiente).

La exposición de las muestras a altos valores de humedad relativa, bajo condiciones ambientales de temperatura, evidenció una mayor polimerización en todos los casos.

También se comprobó que la elevación de la temperatura conduce a la inestabilidad de la proteína liofilizada provocando la formación de agregados de alto peso molecular, cuya proporción se incrementa en las formas glicosiladas, probablemente por el aumento de la reactividad de los grupos reductores de los azúcares con los aminoácidos y la aparición de compuestos de glicosilación avanzada.

### BIBLIOGRAFIA

1. Liu W.R. **Biotechnology and Bioengineering**, **37**, 177, 1991
2. Moreira T. Romay Ch. y Gutiérrez A. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, **24**, 12, junio-julio, 1993
3. Hsu C.C. **Develop. Biol. Standard**, No. 74, 255, 1991.
4. Hageman M.J. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, **14**, 204, 1988
5. Hardon H. **Mitt. Gietelebensm Hig.**, **71**, 220, 1980.
6. Van den Berg C. In: *Properties of Water of Foods*. D. Simatos and J.L. Multon (Ed.), M. Nijhoff Pub., the Netherlands, 1985.
7. Means G.E. and Chang M.K. **Diabetes**, **31**, supplement 3, part 2, 1, 1982.
8. Andersson L.O. In: *Plasma Proteins*, Bombäck and Hanson Ed. Wiley Interscience Pub., 43-54, 1979.
9. Moreira T., Cabrera L., Gutiérrez A., Cádiz A. y Castellano M.E. **Acta Pharmaceutica Nordica**, **4**, 59, 1992.