

## INFLUENCIA DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTABILIDAD DEL PÉPTIDO SINTÉTICO ANTIMALÁRICO SPf66

*M<sup>a</sup> Jesús Dorta, Ana Santoveña, Alexis Oliva, Matía Llabrés, José B. Fariña*

*Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 38200, La Laguna, Tenerife, Sapin.*

### Introducción

El objetivo primordial que persigue el diseño y desarrollo de nuevas formas de dosificación para la administración de vacunas, es la elaboración y optimización de formulaciones que liberen los antígenos de acuerdo con una pauta previamente establecida y que consigan la inmunización tras la administración de una sola dosis (1). La alternativa más adecuada para la consecución de este fin la constituyen las formas de liberación controlada tales como: liposomas, vesículas unilamelares, emulsiones y sistemas poliméricos como microesferas e implantes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los medicamentos proteicos y peptídicos se caracterizan por poseer una estructura compleja y una elevada inestabilidad tanto física como química. Por lo tanto, el principal problema que plantea el desarrollo de estos sistemas es mantener intacta la estructura de la molécula y, por tanto, su capacidad inmunogénica durante su elaboración, almacenamiento, transporte, administración y liberación del antígeno en el lugar de acción (2-4).

El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la estabilidad del péptido sintético antimalárico SPf66 en las condiciones usuales de pH (2-7,4) y temperatura (5-70 °C) utilizadas en los ensayos de cesión del mismo y en aquellas que pueden darse durante su almacenamiento y transporte.

### Materiales y Métodos

El péptido sintético SPf66 (lote 15-7) fue suministrado por el Instituto de Inmunología San Juan de Dios, Bogotá, Colombia. La secuencia

de aminoácidos del péptido es GDELEAETQNVYAAPNYAAPNANPYSLFQKEK MVLPNANPPANKKNAG con dos residuos de cisteína en los extremos amino y carboxi terminales, que permiten la polimerización del mismo por oxidación, obteniéndose finalmente una molécula compuesta de péptidos individuales unidos entre sí mediante puentes disulfuro.

#### *Cromatografía de exclusión de tamaños (SEC)*

Se empleó un cromatógrafo Waters, compuesto por una bomba (modelo 600E, System Controller) y un sistema de adquisición de datos Máxima 820. La fase móvil consistió de una mezcla acetonitrilo/agua (30/70) y trifluoracético al 0.05%, a un flujo de 1.0 ml/min. las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de 214 nm.

#### *Estudios de estabilidad*

- *Influencia del pH:* los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C en un baño termostatizado en el que se introdujeron diferentes disoluciones del péptido SPf66 a una concentración de 400 µg/ml en distintos tampones isotonicados a pH 2, 4 y 7.4. Los ensayos se realizaron por triplicado. A intervalos de tiempo dependientes de la degradación observada se tomaron muestras que se diluyeron en fase móvil dentro del intervalo de concentraciones.

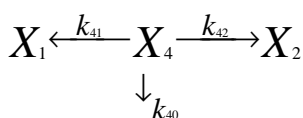
- *Influencia de la temperatura:* se estudió la estabilidad en disolución del péptido sintético SPf66 en fase móvil (pH 2) y una concentración de 40 µg/ml a 5, 25, 37 y 70 °C. Para ello se tomaron alícuotas de las muestras a diferentes

intervalos de tiempo dependientes de la magnitud de la degradación observada y, se analizaron directamente. Los ensayos se realizaron por duplicado.

**Resultados y Discusión**

Los péptidos y proteínas terapéuticos se diferencian de los convencionales en varios aspectos, pero entre los más relevantes se encuentra la complejidad de su estructura organizada en diferentes niveles y su estabilidad limitada. Por esta razón, no es posible detectar, mediante el empleo de un único método analítico, todos los posibles cambios físicos y/o químicos que pueden sufrir y que comprometen su actividad biológica y, por tanto terapéutica.

El péptido SPf66 fue previamente caracterizado en nuestro laboratorio mediante el empleo de técnicas tanto relativas (SEC) como absolutas (dispersión de luz láser multiángulo y espectrometría de masas MALDI-TOF). Los resultados muestran que este péptido está formado por subunidades individuales, en concreto monómero, dímero y mezcla de trímero-tetrámero, unidas mediante puentes disulfuro (5). Los estudios de estabilidad del péptido SPf66 llevados a cabo a 37 °C y diferentes pHs (2, 4 y 7.4) revelaron que la degradación pasa por la transformación de las especies de mayor peso molecular (mezcla trímero-tetrámero) en las de menor peso molecular (dímero y monómero) y en otras no detectadas anteriormente. Los resultados obtenidos se ajustaron al siguiente modelo cinético de degradación utilizando para ello el programa Mathematica 4.0 (Wolfram Research):



dónde  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_4$  son las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a el monómero, dímero y mezcla de trímero-tetrámero respectivamente, y  $K_{41}$ ,  $K_{42}$  y  $K_{40}$  las constantes de velocidad de degradación de cada proceso.

Las ecuaciones para cada uno de los picos detectados son:

$$X_4 = X_{40} e^{-(k_{40} + k_{41} + k_{42})t} \quad \text{ec.1}$$

$$X_2 = X_{20} + \frac{X_{40} (1 - e^{-(k_{40} + k_{41} + k_{42})t}) k_{42}}{k_{40} + k_{41} + k_{42}} \quad \text{ec.2}$$

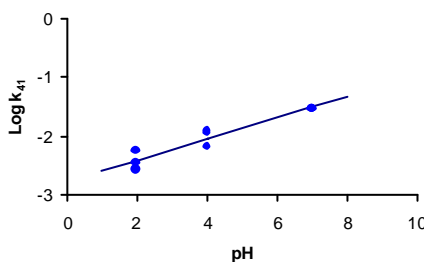
$$X_1 = X_{10} + \frac{X_{40} (1 - e^{-(k_{40} + k_{41} + k_{42})t}) k_{41}}{k_{40} + k_{41} + k_{42}} \quad \text{ec.3}$$

Como puede observarse en la tabla 1 los valores de las constantes de velocidad de degradación obtenidas aumentan con el pH, es decir, el péptido es más estable a pH ácido que a pH neutro.

**Tabla 1.** Constantes de velocidad de degradación (límites de confianza).

	pH 2	pH 4	pH 7.4
$K_{40}$ (h <sup>-1</sup> )	0	0	0.02 (0.005-0.036)
$K_{41}$ (h <sup>-1</sup> )	0.004 (0.003-0.005)	0.010 (0.008-0.013)	0.011 (0.002-0.019)
$K_{42}$ (h <sup>-1</sup> )	0	0	0

Como puede observarse en la figura 1 la representación gráfica de los valores del log $K_{41}$  vs pH mostró una línea recta (r: 0.96). Esto sugiere que la catálisis básica podría ser el mecanismo implicado en la degradación de las especies de mayor peso molecular.



**Figura 1.** Log  $K_{41}$  vs pH (puntos: valores experimentales; Línea continua: valores predichos).

Con respecto a los estudios de estabilidad realizados a pH 2 y diferentes temperaturas (5, 25, 37 y 70 °C), los resultados obtenidos no se ajustaron a ninguna cinética de degradación conocida, sin embargo permitieron concluir que

la velocidad de degradación aumenta con la misma.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten extraer las siguientes conclusiones: a) el péptido resulta inestable en las condiciones usuales de temperatura y pH (37 °C y pH: 2-7.4) que se utilizan en los ensayos de cesión, b) la degradación pasa por la transformación de las especies de mayor peso molecular en las de menor peso molecular, al parecer mediada por una catálisis básica, y c) el péptido resulta termolábil en el intervalo de temperaturas estudiado (5-70 °C).

#### Bibliografía

1. Cleland, J.L., Single-adminstration vaccines: controlled-release technology to mimic repeated immunizations, *Trends Biotechnol.*, vol. 17, 25 (1999).
2. Conti, S., Polonelli, L., Frazzi, R., Artusi, M., Bettiti, R., Coccoci, D., Colombo, P., Controlled delivery of biotechnology products, *Current Pharmaceutical Technology*, vol. 1, 313 (2000).
3. Sah, H., Protein behaviour at the water/methylene chloride interface, *J. Pharm. Sci.*, vol. 88, 1320 (1999).
4. Fu, K., Klibanov, A.M., Langer, R., Protein stability in controlled-release systems, *Nature*, vol.18, 24 (2000).
5. Santoveña, A., Oiva, A., Guzmán, F., Patarroyo, M., Llabrés, M., Farina, J.B., Chromatographic of antimalarial SPf66 peptide using MALDI-TOF MS, CD and SEC, *J. Chrom. B*, 766, 3 (2002).

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a el Dr. M. E. Patarroyo y a la Dra. Fanny Guzmán el habernos proporcionado el péptido sintético SPf66. Esta investigación ha sido financiada como parte del proyecto PI-082/2000.