



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VARIABLES DE
PROCESO EN LA PURIFICACIÓN DEL
ANTÍGENO DE SUPERFICIE DE HEPATITIS B
(HBsAg).**

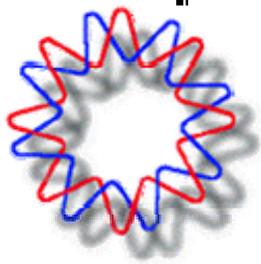
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

I.B.T. JULIO CÉSAR FABIÁN MACEDO

TUTOR: Dra. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA



Cuernavaca, Morelos.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

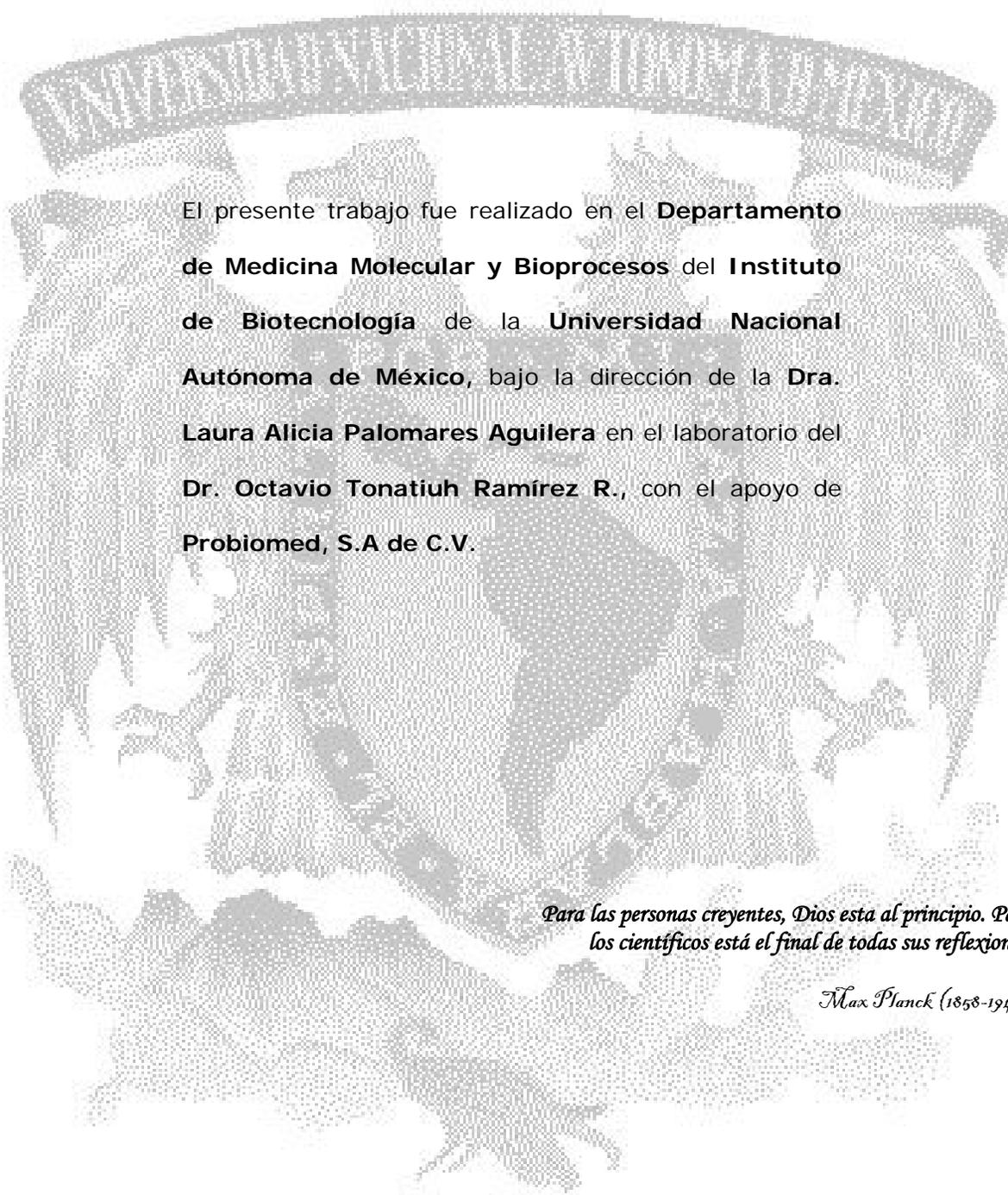


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo fue realizado en el **Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos** del **Instituto de Biotecnología** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, bajo la dirección de la **Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera** en el laboratorio del **Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez R.**, con el apoyo de **Probiomed, S.A de C.V.**

Para las personas creyentes, Dios está al principio. Para los científicos está el final de todas sus reflexiones.

Max Planck (1858-1947)

A mis padres dedico estos dos años de mi vida, en los que en todo momento me apoyaron y animaron a seguir adelante a pesar de los problemas que pudiéramos haber tenido. Por eso y mucho más quiero decirles que los AMO.

*A ti **Monica** porque sigues siendo un ejemplo a seguir y me siento sumamente orgulloso de ser tu hermano.*

*A **Iván** que a pesar de ser tan diferentes y discutir tanto, me siento sumamente contento cuando estamos justos en las buenas y en las malas. Gracias hermano.*

*A **Gabriela** y **José (Bubu)** mis hermanos menores., a quienes quiero mucho (aunque no se los digo seguido). Siempre estaré con ustedes.*

*A mis sobrinas **Sofía** y **Valeria** quienes han incrementado el tamaño de nuestra no perfecta pero si amada familia.*

*A mi abuelo **Ubaldo Fabián** a quien le debo el saber leer y escribir.*

*Y en especial a **Sara** quien llegó a mi vida a la mitad de mi jornada y quien es ahora parte de mi presente y futuro. Te Amo y gracias por estar con migo.*

Agradecimientos.

A la Dra. Laura A. Palomares por su valiosa ayuda, consejos, apoyo y comprensión. Creo no equivocarme al decir que no pude tener mejor asesor. Mil gracias por permitirme ser parte de su grupo e influir en mi formación profesional.

Al Dr. Octavio Tonatiuh por haberme permitido hacer mi postgrado en su laboratorio. Gracias por su confianza.

A Vanesa Hernández por su paciencia y asesoría en todo momento.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Dr. Abel Moreno, del Instituto de Química de la UNAM, por permitirnos el uso de sus equipos e instalaciones.

A las Dras. Guadalupe Zavala y Rosana Sanchez por su apoyo en el microscopio electrónico.

A Liliana Joachín, Esperanza Calderon, Luis Molina, Alfredo L., y en general a todo el departamento de control de calidad y producción de Probiomed por su gran ayuda.

Al Ing. Jaime Uribe por la oportunidad, tiempo y confianza de dejarme hacer mi postgrado.

A mis compañeros y amigos Lili, Yimy, German, Luis, Toño, Ruth, William, Álvaro, Vane y Mauricio por hacer de mi estancia más agradable, por esas desveladas y borracheras.

A mi comité tutorial, por su tiempo y gran aportación crítica en el desarrollo de mi proyecto:

Dr. Rafael Vazquez Duhalt.

Dr. Enrique Rudiño Piñera.

Y a los doctores que aceptaron ser parte de mi jurado de tesis:

Dr. Agustín López Murguía-Canales (Presidente).

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera (Secretaria).

Dr. Nestor Octavio Pérez Ramírez (Vocal).

Dr. Humberto Flores Soto (Suplente).

Dr. Eduardo Horjales Reboredo (Suplente).

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO.....	i
INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	7
2.1. El virus de la hepatitis B.....	7
2.2. Vacunas.....	13
2.3. Purificación.....	14
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.2. Objetivos específicos.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg).....	21
5.2. Purificación del antígeno de superficie de hepatitis B por cromatografía de exclusión en gel.....	21
5.3. Métodos analíticos.....	22
5.3.1. Cromatografía analítica.....	22
5.3.2. Electroforesis en gel.....	23
5.3.3. Western blot.....	23
5.3.4. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	24
5.3.5. Determinación de HBsAg por el método de hemaglutinación pasiva (PHA).....	25
5.3.6. Microscopía electrónica.....	25
5.3.7. Cuantificación de proteína.....	26
5.3.8. Cuantificación de lípidos.....	27
5.3.9. Cuantificación de carbohidratos.....	28
5.3.10. Estudio de la composición de la partícula del HBsAg.....	28
5.4. Caracterización Bioquímica.....	29
5.4.1. Estudio del efecto del pH.....	29
5.4.2. Estudio del efecto de la temperatura.....	29
5.4.3. Estudio del efecto al tiempo de almacenaje.....	29

5.4.4. Estudio del efecto de la fuerza iónica.....	30
5.4.5. Estudio del efecto de la concentración de proteína.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1. Cromatografía analítica de exclusión en gel.....	31
6.2. Caracterización de las muestras del biofármaco por HPLC-GP.....	36
6.3. Determinación del diámetro del HBsAg por Dispersión Dinámica de Luz.....	41
6.4. Caracterización del HBsAg durante el proceso de purificación.....	46
6.5. Purificación del HBsAg sin el empleo de la ultracentrifugación.....	53
6.5.1. Cromatografía preparativa de filtración en gel.....	53
6.5.2. Purificación del antígeno de superficie de hepatitis B por cromatografía de exclusión en gel.....	65
6.5.3. Determinación de la pureza y composición de la partícula de HBsAg purificada por SEC.....	67
6.6. Efecto de las variables de proceso sobre el HBsAg.....	71
6.6.1. Estudio del efecto de la temperatura.....	71
6.6.2. Estudio del efecto del pH.....	73
6.6.3. Estudio del efecto del tiempo de almacenaje.....	76
6.6.4. Estudio del efecto de la fuerza iónica.....	78
6.6.5. Estudio del efecto a la concentración de proteína.....	81
7. CONCLUSIONES.....	83
8. BIBLIOGRAFÍA.....	85

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Esquema del virus de hepatitis B donde se muestran las diversas estructuras que lo conforman (capside, nucleocapside (HBc), ADN de doble cadena, ADN polimerasa y proteínas X). (B y C) Subpartículas virales no infectivas en forma de filamentos y esferas. En todos los casos, las tres estructuras se encuentran conformadas por la proteína S (SHBs) también llamada antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y lípidos de la célula infectada. Modificada a partir de Kann *et al.*, 1997. 8
- Figura 2.** Estructura y organización del genoma del HBV (Mahoney, 1999). 9
- Figura 3.** Representación del gen que codifica para las proteínas de superficie que constituyen la envoltura del HBV y subpartículas virales, en donde se ilustra la posición de los tres codones de comienzo (ATG) permitiendo la posibilidad de tres diversos polipéptidos superficiales. 10
- Figura 4.** Modelo simplificado del ciclo de vida del HBV. Modificado a partir de Schaefer *et al.*, 2002. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 5.** Topología de las proteínas de superficie del HBV en la membrana del retículo endoplásmico (a) y en la envoltura del virion (b). Tomado de Bruss *et al.*, 1996. 12
- Figura 6.** Esquema de la topología de la proteína S (M) del HBV en la que se muestra las cuatro cadenas α -hélices (A, B, C y D) y su interacción con la bicapa lipídica, así como el llamado “determinante a”. Modificado a partir de Mahoney y Marck, 1999; Prange *et al.*, 1995. 13
- Figura 7.** Perfil cromatográfico del HBsAg en HPLC de filtración en gel. Tomada de Tleugabulova *et al.*, 1998b. 15
- Figura 8.** Representación del radio hidrodinámico “ R_H ” de la lisozima. Modificada a partir de Mattison *et al.*, 2001. 32
- Figura 9.** Perfiles de elución de las proteínas: lisozima, tripsinógeno, EGFP, ovalbúmina, albúmina bovina, IgG y tiroglobulina), nanoesfera fluorescente 30 nm de diámetro. Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm y fluorescencia λ_{EXC} 505 nm y λ_{EM} 515 nm, fosfato dibásico 10 mM como eluyente a un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección. 34
- Figura 10.** Curva de calibración para proteínas de radio hidrodinámico conocido en Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel.

Lisozima, tripsinógeno, EGFP, ovalbúmina, albúmina, IgG y tiroglobulina, y nanoesfera fluorescente “FluoSpheres” (15 nm de radio).	35
Figura 11. Perfiles de elución de las proteínas: lisozima, tripsinógeno, EGFP, ovalbúmina, IgG y tiroglobulina), nanoesfera fluorescente 30 nm de diámetro. Condiciones: Ultrahydrogel 2000 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm y fluorescencia λ_{EXC} 505 nm y λ_{EM} 515 nm, fosfato dibásico 10 mM como eluyente a un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección.	35
Figura 12. Curva de calibración para proteínas de radio hidrodinámico conocido en Ultrahydrogel 2000 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel. Lisozima, tripsinógeno, EGFP, ovalbúmina, IgG y tiroglobulina, y nanoesfera fluorescente “FluoSpheres” (15 nm de radio). Se muestra media entre número de inyecciones.	36
Figura 13. Perfiles cromatográficos del HBsAg (biofármaco) en HPLC-GP. Lotes: VPPP 04019, 04020, 04026, 04027, 04029, 04030, 04036, 04037, 05001, 05002, 05003, 05014, 05015, 05016, 05017, 05018, 05019, 05020, 05021, 06005, 06007 06011 y 06012. Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel. Fosfato dibásico 10 mM como eluyente con un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección.	37
Figura 14. Perfil cromatográfico del biofármaco de HBsAg correspondiente al lote VPPP 04020 en donde se muestra el criterio de integración para las tres diferentes fracciones o picos. Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel. Fosfato dibásico 10 mM como eluyente con un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección.	38
Figura 15. Análisis cromatográfico del HBsAg en HPLC-GP empleando una columna Ultrahydrogel 2000. guarda-columna Ultrahydrogel. Fosfato dibásico 10 mM como eluyente con un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección.....	40
Figura 16. Análisis del HBsAg por dispersión dinámica de luz.	41
Figura 17. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida del HBsAg (biofármaco) con diferentes tratamientos. Condiciones reductoras: 10% 2-mercapto-etanol, 4% SDS. Condiciones desnaturalizantes: 4% SDS, hervido por 10 min. (B) Confirmación de la identidad de las bandas por medio de su Western blot.	44

- Figura 18.** Perfil cromatográfico del HBsAg lote VPPP 05016, tratado con SDS y hervido por diez minutos (línea azul fuerte) y misma muestra sin tratar utilizada como control (línea azul claro). Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm, fosfato dibásico 10 mM como eluyente con un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección..... 45
- Figura 19.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de los diferentes picos I, II, III y IV, obtenidos de la muestra de HBsAg lote VPPP 05016 tratada con SDS y hervida por 10 minutos. Condiciones descritas arriba..... 46
- Figura 20.** Perfil cromatográfico del pico II después de 24 horas de ser colectado, correspondiente a la muestra de HBsAg tratada con SDS y hervida por 10 minutos (línea naranja). Muestra del HBsAg lote VPPP05016 utilizada como control (línea azul). 46
- Figura 21.** Diagrama de proceso para la purificación del HBsAg (**A**). Esquema general del sistema HPLC-GP: a) reservorio para buffer, b) válvulas, c) sistema de bombeo, d) sensor de presión, e) mezclador, f) sistema de inyección, g) columna Ultrahydrogel 500, h) detector de UV, i) vertedero, j) colector de fracciones, k) unidad de procesamiento de datos y l) cromatograma (**B**). En cada etapa de purificación se inyectó una muestra a la columna Ultrahydrogel 500 para la cuantificación del HBsAg con base en su tiempo de elución. 48
- Figura 22.** Perfiles cromatográficos de cada una de las etapas de purificación del HBsAg. (A) rompimiento celular. (B) precipitación ácida. (C) intercambio iónico. (D) ultracentrifugación. (E) cromatografía de exclusión en gel (SEC) correspondiente a la fracción 10. (F) SEC correspondiente a la fracción 24. (G) SEC correspondiente a la fracción 35. (H) SEC correspondiente al “pool” fracciones 4-35. (I) biofármaco de HBsAg. En todos los casos se inyectaron 50 μ L de muestra en las condiciones ya descritas..... 49
- Figura 23.** Remoción de carbohidratos a través de cada etapa en el proceso de purificación. RC, ruptura celular; PA, precipitación ácida; II, intercambio iónico; UC, ultracentrifugación; SEC, cromatografía de filtración en gel. 52
- Figura 24.** Remoción de lípidos a través de cada etapa en el proceso de purificación. RC, ruptura celular; PA, precipitación ácida; II, intercambio iónico; UC, ultra centrifugación; SEC, cromatografía de filtración en gel fracción..... 53

Figure 25. Diagrama de proceso para la purificación del HBsAg sin el empleo de la ultracentrifugación con gradiente de densidad.....	55
Figura 26. Trazo de la conductividad (mS/cm) para la prueba de asimetría y determinación del número de platos teóricos de la resina Sephacryl S-500.	57
Figura 27. Análisis cromatográfico de una muestra de HBsAg correspondiente a la etapa de intercambio iónico a diferentes flujos, empleando la resina Sephacryl S-500. Como fase móvil se utilizó solución de fosfato dibásico 10 mM.	58
Figura 28. Perfil cromatográfico de exclusión en gel del HBsAg procedente de la etapa de intercambio iónico. Se muestra la concentración de proteína con respecto a la fracción cromatográfica y la antigenicidad por PHA y título específico. Condiciones: columna XK 16/70, resina Sephacryl S-500, fosfato dibásico 10 mM como eluyente.	59
Figura 29. Perfiles cromatográficos en HPLC-GP de fracciones obtenidas en la cromatografía preparativa de exclusión en gel empleando la resina Sephacryl S-500 empacada en la columna XK-16/70, las cuales presentaron mayor antigenicidad. Condiciones descritas arriba.	60
Figura 30. Trazo de la conductividad (mS/cm) para la prueba de asimetría y determinación del número de platos teóricos para la resina HW-65F.	61
Figura 31. Perfiles cromatográficos en HPLC-GP de fracciones obtenidas en la cromatografía preparativa de exclusión molecular empleando la resina HW-65F empacada en la columna XK-16/70. Se observa la aparición del HBsAg (pico 1 y 2) y de la proteína mal ensamblada o contaminante (pico 3) conforme el número de fracción incrementa.	62
Figura 32. Trazo de la conductividad (mS/cm) para la prueba de A_s y determinación del <i>HEPT</i> para la resina HW-65F, empacada en la columna XK-26/100.	63
Figura 33. Representación gráfica de la concentración de proteína y título específico contra el volumen de elución de la muestra de HBsAg procedente de la etapa de II. Condiciones: columna XK 26/100, resina HW-65F, altura de cama de 73 cm. Solución de fosfato dibásico 10 mM como fase móvil, flujo de 3 mL/min, 2 mL volumen de fracción.	64
Figura 34. Perfiles cromatográficos en HPLC-GP de fracciones obtenidas en la cromatografía preparativa de exclusión molecular empleando la resina HW-65F empacada en la columna XK-26/100.	64

- Figura 35.** A) Perfil cromatográfico de la muestra de HBsAg proveniente de la etapa de intercambio iónico en donde se muestra la relación $[\text{HBsAg}]_{\text{PHA}}/[\text{HBsAg}]_{\text{Bradford}}$. B) SDS-PAGE de las diferentes fracciones obtenidas de la SEC-preparativa. Los números bajo el cromatograma y encima del SDS-PAGE indican el número de fracción..... 66
- Figura 36.** Análisis cromatográfico del “pool” obtenido en la purificación del HBsAg por SEC-preparativa a partir de la etapa de intercambio iónico..... 67
- Figura 37.** Determinación de la pureza de la muestra de HBsAg (“pool”) por SDS-PAGE (A), Western blot (B) y densitometría (C). Carril 1 y 9; Marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4 muestra de HBsAg a una concentración de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Carril 5; Control positivo de HBsAg a 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Carril 6 y 7; muestra de HBsAg a una concentración de 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Carril 8; Control positivo de HBsAg de Probiomed a 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 68
- Figura 38.** Microscopía electrónica de transmisión de la partícula de HBsAg con tinción negativa, purificada por cromatografía de exclusión molecular inmunomarcada con un anticuerpo de ratón anti-HBsAg ligado a oro coloidal de 10 nm de diámetro. Amplificación a 140,000x..... 69
- Figura 39.** Pérdida de la capacidad de hemaglutinación del HBsAg con respecto a la temperatura. Cada dato representa la media (barras) y la desviación estándar (línea delgada) de por lo menos dos mediciones. Las muestras sometidas a -3, 10, 30 y 50 °C fueron incubadas hasta 320 minutos; 70 y 90 °C por 160 minutos..... 72
- Figura 40.** Análisis cromatográfico del HBsAg en HPLC-GP del efecto a la temperatura. HBsAg incubado a 90 °C (A). HBsAg incubado a 70 °C (B). HBsAg incubado a 50 °C (C). HBsAg incubado a -3 °C (D). Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm, fosfato dibásico 10 mM como fase móvil a un flujo de 0.9 mL/min; 30 μL volumen de inyección. 73
- Figura 41.** Pérdida de la capacidad de hemaglutinación del HBsAg con respecto al pH, normalizada con respecto a una muestra no tratada. Cada dato representa la media (barras) y la desviación estándar (línea delgada) de por lo menos dos mediciones. Las muestras fueron sometidas a diferentes pHs por un periodo de 360 minutos..... 74
- Figura 42.** Perfiles cromatográficos del HBsAg en HPLC-GP en donde se observa el efecto del pH sobre el HBsAg. En círculo rojo se muestra que apareció un pico a los 6.1 min. Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7 mm),

guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm, fosfato dibásico 10 mM como fase móvil a un flujo de 0,9 mL/min; 30 µL volumen de inyección.	76
Figura 43. Perfiles cromatográficos del HBsAg en HPLC-GP en donde se observa el efecto del tiempo de almacenaje a -4 °C sobre el HBsAg por periodos de 4, 8, 10, 13, 15 y 19 semanas. Mismas condiciones que en Figura 42..	77
Figura 44. Perfiles cromatográficos del HBsAg en HPLC-GP en donde se observa el efecto de la fuerza iónica Mismas condiciones que en Figura 42. Para cada concentración de NaCl a la que fue sometida la proteína se utilizó la misma concentración salina en la fase móvil.	79
Figura 45. Efecto de la concentración de NaCl sobre el área bajo la curva del perfil cromatográfico del HBsAg, donde el 100 % es el área obtenida del cromatograma del HBsAg sin la presencia de NaCl. Las condiciones cromatográficas son las mismas que en la figura 44.....	80
Figura 46. Perdida de hemaglutinación del HBsAg con respecto al tiempo de incubación a diferentes concentraciones de NaCl.	80
Figura 47. Efecto de la concentración de NaCl sobre el área bajo la curva del perfil cromatográfico del HBsAg, donde el 100 % es el área obtenida del cromatograma del HBsAg sin la presencia de NaCl. Fosfato dibásico 10 mM como eluyente sin NaCl.	81
Figura 48. Análisis por HPLC-GP del HBsAg a diferentes concentraciones. Todos los cromatogramas fueron normalizados con respecto a la concentración inicial. Mismas condiciones que en la Figura 42.	82
Figura 49. Efecto de la capacidad de hemaglutinación del HBsAg a diferentes concentraciones de proteína.	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferentes tipos de proteínas que se pueden generar a partir del codon de inicio y modificaciones postraduccionales del ORF de HBV (Heermann <i>et al.</i> , 1984).	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2. Proporción de proteína con base en su tiempo de elución. Pico 1, pico 2 proteína no ensamblada de las muestras de biofármaco.....	39
Tabla 3. Radio y diámetro hidrodinámico de las tres diferentes estructuras o picos resultantes de la interpolación de su volumen de elución en la gráfica de R_H y $(1-K_D)$, utilizando la columna Ultrahydrogel 500.....	39
Tabla 4. Cantidad y por ciento de remoción de contaminantes a través de las etapas de purificación.	50
Tabla 5. Masa, factor de pureza, rendimientos global y después de cada etapa en la recuperación y purificación del HBsAg.....	52
Tabla 6. Cuantificación de proteína durante el fraccionamiento del HBsAg proveniente de la etapa de intercambio iónico a través de cromatografía en la resina Sephacryl S-500 empacada en la columna XK-16/70. Se resaltan las fracciones que fueron seleccionadas como HBsAg purificado.	60
Tabla 7. Rendimientos obtenidos con las diferentes resinas y modalidades en la purificación del HBsAg a partir de la etapa de intercambio iónico.....	65
Tabla 8. Cuantificación de proteína, lípidos, carbohidratos, identidad por SDS-PAGE y pureza de dos lotes de producción purificados a partir de la etapa de intercambio iónico sin el uso de ultracentrifugación. La columna derecha muestra las especificaciones para este producto.....	69
Tabla 9. Rendimientos del HBsAg de 5 diferentes lotes purificados por Probiomed empleando UC comparados con los obtenidos por SEC sin el empleo de UC.....	70
Tabla 10. Masa, factor de pureza, rendimientos global y después de cada etapa en la recuperación y purificación del HBsAg sin el empleo de la ultracentrifugación.	71
Tabla 11. Efecto del tiempo de almacenaje a 4 °C en la formación de agregados o cambios estructurales.	78

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.
As: factor de asimetría.
BSA: albúmina sérica bobina.
DLS: Dispersión dinámica de luz.
EGFP: proteína verde fluorescente mejorada.
ELISA: Análisis de inmunoadsorción ligado a enzima
HETP: Altura equivalente de plato teórico.
HBsAg: Antígeno de superficie de hepatitis B.
HBV: Virus de Hepatitis B.
HPLC-GP: Cromatografía líquida de alta presión de filtración en gel.
I₁: Intercambio iónico
kDa: kilo Daltons.
K_D: coeficiente de partición.
MP: marcador de peso molecular.
mS: mili Siemens.
N: Número de platos teóricos.
PA: Precipitación ácida
pb: Pares de bases.
PBS: Buffer salino de fosfatos.
PHA: Hemaglutinación pasiva.
PVDF: Fluoruro de polivildeno.
R_H: Radio hidrodinámico.
SDS-PAGE: Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.
SEC: Cromatografía de exclusión en gel.
UC: Ultracentrifugación.
λ_{EXC}: Longitud de onda de excitación

λ_{EM}: Longitud de onda de emisión.

RESUMEN

La hepatitis B es una grave enfermedad causada por el virus de la hepatitis B (HBV), el cual ataca células del tejido hepático causando su destrucción. El HBV está constituido en su parte más externa por una proteína denominada antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg). Esta proteína no sólo es incorporada en el virión, sino que también es secretada como subpartícula viral, en forma de filamentos y esferas de aproximadamente 22 nm de diámetro, estas últimas eran originalmente purificadas a partir del plasma de portadores crónicos y utilizadas como vacuna por su alta capacidad inmunogénica. Actualmente por medio de la ingeniería genética, el HBsAg es producido de forma recombinante en levaduras. El HBV tiene una distribución mundial y la enfermedad producida por este organismo ha sido identificada como uno de los problemas más importantes de salud pública, con alta mortalidad asociada a daño hepático agudo, crónico y hepatocarcinoma. En Latinoamérica el impacto de la infección por el HBV es significativo, existiendo una distribución heterogénea de áreas de endemia alta, intermedia y baja, aún en un mismo país.

El desarrollo de vacunas anti-HBV constituye una de las estrategias de inmunización más seguras y eficaces, induciendo inmunidad duradera (≥ 10 años). Su impacto ha sido enorme en países en que se administra al recién nacido y la meta de OMS y otras organizaciones, es una vacunación universal en este grupo etario. Sin embargo, para lograr esto, deben ser superados los problemas de producción, acceso y costo, por lo que se requiere del desarrollo y mejora de los procesos de producción y purificación, en términos de su capacidad para producir un HBsAg altamente puro. En este proceso de producción, la etapa de purificación debe ser capaz de eliminar la mayor cantidad de los contaminantes intrínsecos (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos), mantener la integridad, composición y estabilidad de la subpartícula viral en todas las etapas de la purificación para garantizar su alta inmunogenicidad y debe requerir a la vez el menor tiempo de proceso, con bajos costos de producción. Como consecuencia disminuiría el costo de producción, reduciendo el precio en el mercado, lo que favorecería los programas de inmunización.

Se ha reportado que durante la purificación del HBsAg la etapa de ultracentrifugación (tradicionalmente utilizada para la purificación de este tipo de macromoléculas) puede ocasionar la agregación y desestabilización de la partícula con la consecuente pérdida de su antigenicidad, asimismo resulta en una etapa limitante por su prolongado tiempo de proceso, además de ser tanto costoso como difícil de escalar.

En el presente trabajo se desarrollaron y determinaron las condiciones de operación para la implementación de un método cromatográfico a nivel preparativo, basado en cromatografía de exclusión en gel (SEC) para omitir la etapa de ultracentrifugación. Además de realizar la caracterización del proceso de purificación y efectuar estudios de estabilidad al pH, temperatura, fuerza iónica, concentración de proteína y tiempo de almacenaje del HBsAg purificado. El análisis de estas variables es mostrado aquí, dando como resultado la generación de datos que pueden servir como sugerencia en el control de proceso durante la producción y purificación de la vacuna.

Lo anterior se llevó a cabo utilizando técnicas fisicoquímicas e inmunoquímicas, tales como SEC analítica, microscopía electrónica, electroforesis, Western Blot, hemaglutinación pasiva, dispersión dinámica de luz y métodos espectrocolorimétricos para la cuantificación de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Como resultado del presente estudio podemos establecer que: utilizando la resina HW-65F (Tosoh Bioscience) con un intervalo de exclusión $4 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ Da, empacada en una columna de 73 cm de altura por 2.6 cm de diámetro interno, fosfato dibásico 10 mM como fase móvil a un flujo lineal de 0.5 cm/min, se logra la purificación del HBsAg procedente de una etapa de intercambio iónico. Se implementó una metodología para la caracterización del HBsAg, encontrando que el producto purificado como HBsAg exhibe una amplia polidispersión al presentar subpartículas de 19 a 34 nm de diámetro. Este método puede ser aplicable también en el control de calidad durante todo el proceso de purificación no solo de la vacuna de HBsAg, si no de otras macromoléculas como pseudopartículas virales.

Con el análisis del estudio de la estabilidad a las diferentes variables de proceso se determinó que el HBsAg mantiene su capacidad de hemaglutinación a temperaturas menores a los 70 °C. A pH menores o iguales a 5.5, el HBsAg presentó tendencia de agregación y su capacidad de hemaglutinación disminuyó en un 50 % y hasta un 75% a pH de 3.5. El HBsAg fue estable por tiempos de almacenaje a 4 °C no mayores a 2 meses. La capacidad de hemaglutinación del HBsAg se vio afectada en un 50% a concentraciones mayores a 0.9 M de NaCl a tiempos de exposición ≥ 7 horas. A concentraciones de proteína ≤ 11.5 mg/mL, el HBsAg no presentó problemas de solubilidad, tendencia a la agregación y su capacidad de hemaglutinación no se vio afectada. Finalmente se logró la purificación de la subpartícula viral, la cual cumple con las especificaciones del biofármaco.

1. INTRODUCCIÓN

La **HEPATITIS** es una enfermedad que ocasiona la inflamación del tejido hepático (hígado), la cual puede ser producida por diferentes causas. Puede ser una enfermedad que se cure rápidamente sin dejar secuelas en este órgano o transformarse en una enfermedad de carácter crónico. En este caso existe el peligro de una degeneración progresiva del hígado que puede conducir a una cirrosis, insuficiencia hepática o cáncer. La hepatitis es una enfermedad mundialmente distribuida y es la causa principal del mal funcionamiento del hígado. Las principales clases de hepatitis son las hepatitis causadas por virus: Existen los virus A, B, C, D, E y G, siendo los tres primeros los más habituales. Aunque también puede ser desencadenada por otras causas: alcohol, infecciones, fármacos, drogas o por un desarreglo del sistema inmune. La hepatitis viral causada por el virus de la **hepatitis B (HBV)** puede ser extremadamente grave e incluso fatal, llegando a ser la principal causa de hepatocarcinoma.

El HBV es un virus pequeño de ADN de doble cadena, en su genoma se encuentran cuatro marcos de lectura abiertos que codifican para su nucleocapside, ADN polimerasa, proteínas X y la proteína de superficie que conforma su capsido. La proteína de superficie también llamada antígeno de superficie de hepatitis B (**HBsAg**), no solamente es incorporada en la envoltura del virión sino que además, es secretada en gran cantidad como subpartículas virales en la forma de esferas y filamentos. Originalmente el HBsAg era purificado a partir del plasma de humanos infectados y usado como vacuna para la prevención de la infección del virus de hepatitis B. Los primeros reportes de inmunizaciones activas realizadas en humanos fueron hechos por Krugman y colaboradores en 1971 (Hollinger *et al.*, 1996), utilizando suero humano que contenía el HBsAg inactivado por calor a 98 °C durante un minuto y un año después Soulier y colaboradores (Focaccia R., 1989) efectuaron estudios en voluntarios, a quienes se aplicó plasma obtenido de portadores crónicos que contenía HBsAg, inactivado a 80 °C durante 10 horas. A estas primeras vacunas se les llamo

vacunas de primera generación (plasmáticas). Posteriormente, la aplicación de técnicas de ingeniería genética permitió contar con las vacunas de segunda generación (recombinantes), logradas a través de la inserción de un plasmido que codifica HBsAg, en *S. cerevisiae*. Actualmente, se han desarrollado nuevas vacunas llamadas de tercera generación las cuales son producidas en diferentes sistemas recombinantes tales como levaduras (*Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*), bacterias como *E. coli* y en células de mamíferos (células de ovario de hámster chino). Estas vacunas han mostrado ser sumamente seguras, inmunogénicas y efectivas en la prevención de la hepatitis B (Hollinger *et al.*, 1996; Macías *et al.*, 1996; Zunino M., 2002).

El HBsAg recombinante producido en levaduras es un polipéptido de 226 aminoácidos (proteína S) con una masa molecular de entre 22 y 25 kDa (Donald y Paiva, 1995; Tleugabulova *et al.*, 1999b). Aproximadamente 100 a 130 de estos polipéptidos se asocian intracelularmente y de manera espontánea con lípidos de la pared celular de la levadura, a través de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y puentes disulfuro para formar una subpartícula lipoproteica altamente inmunogénica de 17 a 25 nm de diámetro, aunque recientemente se han reportado distribuciones de 10 a 40 nm empleando HPLC-GP combinada con dispersión dinámica de luz (Huovila *et al.*, 1992; Bruss y Ganem, 1991; Kann y Gerlich, 1997; Zhou *et al.*, en prensa). En la actualidad, la estructura tridimensional detallada del HBsAg no es conocida, la hidrofobicidad, resistencia a la hidrólisis enzimática y su alto contenido de lípidos dificultan su caracterización fisicoquímica (Hemling *et al.*, 1988; Tleugabulova *et al.*, 2001).

La formación de estas subpartículas de HBsAg se realiza intracelularmente, siendo un proceso sumamente complejo que requiere la coordinación, síntesis y ensamblaje de proteínas S, triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos (Gavilanes *et al.*, 1982). Se piensa que dicho proceso involucra: 1) Transcripción y traducción del mRNA que codifica para proteínas S, 2) desplazamiento de las proteínas S a través de la membrana del retículo endoplásmico y formación de dímeros de proteína S, 3)

transporte transmembranal de los dímeros hacia un compartimiento post-retículo endoplásmico pre-Golgi donde las partículas de HBsAg son ensambladas (Bruss *et al.*, 1996; Huovila *et al.*, 1992). Por otra parte, aproximadamente la mitad del monómero S del HBsAg consiste en una serie de residuos hidrofóbicos (Pro, Trp, Phe, Leu y Ile) que dependiendo del organismo en el que es producido, pueden formarse de tres a cuatro dominios α -hélice (hélice A, B, C y D), los cuales interactúan con la bicapa lipídica de la partícula ensamblada (Bruss *et al.*, 1996).

Como una consecuencia de dicha topología, la separación y purificación del HBsAg resulta difícil y complicada. Se ha observado que durante la purificación de HBsAg, la proteína recombinante experimenta condiciones extremas a lo largo de las diferentes etapas de la purificación: altas y bajas temperaturas, variaciones de pH, interacción con agentes caotrópicos, cambios bruscos de solubilidad, esfuerzos de corte y exposición a interfaces sólido-gas durante la ruptura celular, concentración, centrifugación, cromatografía, filtración y bombeo. Estas condiciones pueden promover cambios estructurales indeseados que inducen la agregación y desnaturalización del HBsAg, con una consecuente disminución o pérdida de su función farmacológica (inmunogenicidad) (Gutiérrez *et al.*, 1992; Lewis y Nail, 1997; Li *et al.*, 1995; Maa y Hsu, 1996a, 1996b; Reis *et al.*, 1997; Tleugabulova *et al.*, 1998a, 1999a, 1999b). El estudio del impacto que pueden llegar a tener estas variables (temperatura, concentración, pH, solubilidad, etc.) en la formación de agregados o en la desnaturalización del HBsAg, puede ayudar a la selección o mejora de la metodología de purificación empleada para la obtención de un producto homogéneo, inmunogenicamente activo y con un alto grado de pureza.

Tradicionalmente, los procesos de purificación para este tipo de partículas han sido basados en la Ultracentrifugación (UC) o en la combinación de cromatografía y UC como últimos pasos. Sin embargo, para escalas de producción industriales (volúmenes grandes de producción) la UC resulta un cuello de botella por su alto costo, largos tiempos de proceso y su dificultad para escalar. Se ha reportado que esta metodología puede ocasionar agregación, deformación o daño en la estructura

con la consecuente pérdida de inmunogenicidad, por lo que en los últimos años se ha buscado la posibilidad de eliminar esta etapa en el tren de purificación por medio del desarrollo y combinación de métodos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular para la purificación tanto de pseudo como subpartículas virales (Rolland et al., 2001; Han et al., 1995).

En este trabajo se estudió la factibilidad que tiene la eliminación de la etapa de ultracentrifugación empleada durante la purificación del HBsAg, por medio de la implementación de una cromatografía de exclusión en gel (SEC). Lo anterior se realizó primero a través de la selección de una resina adecuada de exclusión molecular y posteriormente, la determinación de los mejores parámetros de operación para lograr la obtención de un producto que cumpla con las especificaciones del biofármaco¹ (pureza, identidad, inmunogenicidad, contenido de lípidos y carbohidratos) además de presentar los mismos o mejores rendimientos obtenidos con el proceso actual. Así mismo, se presenta un estudio sobre el efecto que tienen algunas variables de proceso como pH, temperatura, fuerza iónica, concentración y estabilidad al almacenaje, sobre la antigenicidad y la estabilidad de la subpartícula viral, para de esta forma recomendar o proponer alternativas en la purificación del HBsAg.

¹ **Biofármaco:** toda sustancia biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas y que reúna las condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento (NOM-164-SSA1-1998).

2. ANTECEDENTES

2.1. El virus de la hepatitis B.

El virus de la hepatitis B es el virus prototipo de la familia de virus de ADN *Hepadnaviridae*. Virus relacionados se encuentran en las marmotas, ardillas y patos (Ganem *et al.*, 1996). El HBV esta mundialmente distribuido y se ha identificado como uno de los problemas más importantes de salud pública por ser uno de los principales causantes de hepatitis. Se estima que aproximadamente 2000 millones de personas se encuentran infectadas en todo el mundo, cerca de 350 millones de individuos presentan una infección crónica por HBV de los cuales, un millón falleciera al año por cirrosis crónica o hepatocarcinoma. (Rolland *et al.*, 2001; Lavanchy, 2004; Huang *et al.*, en prensa). El HBV persiste hasta 7 días en el ambiente y es estable en superficies inertes hasta por un mes. Se inactiva a temperatura de 100 °C durante 2 minutos, o por acción de productos como alcohol, fenol, glutaraldehido, cloro y peróxidos (Zunimo, 2002).

El estudio de su estructura a partir del suero de portadores crónicos muestra tres morfologías distintas. La primera y única infectiva (**Figura 1A**), es una estructura de aproximadamente 42 a 47 nm de diámetro, que tiene una nucleocápside esférica con un diámetro de 22 a 25 nm y una envoltura externa (cápside) de 7 nm de grosor. La nucleocápside esta compuesta por dos tipos de proteínas que conforman los llamados antígenos virales “core” o central (HBcAg) y el antígeno soluble “e” (HBeAg), en su interior se encuentra el ADN viral, su ADN polimerasa y proteínas X (Ono *et al.*, 1983). La cápside esta compuesta por proteínas de superficie (proteína S, pre-S2 y pre-S1) que conforman al antígeno de superficie (HBsAg). Esta estructura también contiene lípidos, incluyendo fosfolípidos, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, colesterol, ácidos grasos y carbohidratos provenientes de la célula huésped (Yanada *et al.*, 2001; Gavilanes *et al.*, 1982; Hardy *et al.*, 2000).

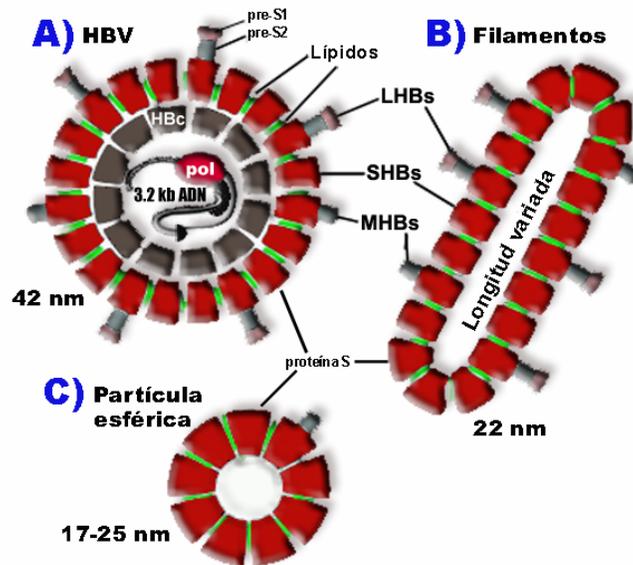


Figura 1. (A) Esquema del virus de hepatitis B donde se muestran las diversas estructuras que lo conforman (capside, nucleocapside (HbC), ADN de doble cadena, ADN polimerasa y proteínas X). (B y C) Subpartículas virales no infectivas en forma de filamentos y esferas. En todos los casos, las tres estructuras se encuentran conformadas por la proteína S (SHBs) también llamada antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y lípidos de la célula infectada. Modificada a partir de Kann *et al.*, 1997.

La segunda estructura (**Figura 1B**) tiene forma tubular filamentosa de longitud variable con un diámetro de 22 nm. La tercera estructura (**Figura 1C**), y también la más común, es una estructura pequeña, esférica con un tamaño de 17 a 25 nm, aunque se han reportado intervalos de 10 a 40 nm (Ardí *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2006). Estas partículas están constituidas por el HBsAg, lípidos y carbohidratos que provienen de la membrana de la célula infectada. Tienen una densidad aparente de 1.18 g/cm^3 en CsCl y 1.16 g/cm^3 en sacarosa, un peso molecular de $2 \text{ a } 4.5 \times 10^6 \text{ Da}$, y un coeficiente de sedimentación de 39 a 54 unidades Svedberg (Dreesman *et al.*, 1972; Hollinger *et al.*, 1996), son altamente inmunogénicas y son las que se utiliza como vacunas, ya que no son infectivas.

El genoma del virus de HBV es uno de los más pequeños de ADN circular con solo 3200 pb parcialmente bicatenario. Toda la información genética se halla presente en

la cadena de ADN completa, cuya polaridad es negativa (**Figura 2**). La cadena (-) contiene los genes que codifican para las proteínas estructurales de superficie (proteína S, pre-S2 y pre-S1), la de nucleocápside, las proteínas X y una ADN polimerasa (Mahoney., 1999; Núñez *et al.*, 2001). La cadena (+) del ADN del HBV es pequeña y de longitud variada. Durante su replicación *in situ*, la transcripción del HBsAg puede llevarse a cabo de varias formas, dando lugar a la formación de tres proteínas de superficie conocidas como pequeña (S), mediana (M) y larga (L). Estas son traducidas por un solo marco de lectura abierto (“ORF” por sus siglas en inglés) que contiene 3 codones de inicio que dividen el gen en tres secciones (**Figura 3**); (1) proteína S, proteína que constituye mayormente a la cápside del HBV con 226 residuos de aminoácidos, (2) proteína M, formada por una adición de 55 residuos de aminoácidos (región pre-S2) en el amino terminal de la proteína S, y (3) proteína L, compuesta por 108-119 residuos de aminoácidos (región pre-S1) unidos al amino terminal de la proteína M (Núñez *et al.*, 2001). Posteriormente, como resultado a modificaciones postraduccionales, 6 proteínas pueden producirse a partir de este ORF (**Tabla 1**). El tipo de proteína producida dependerá tanto de la secuencia genética utilizada, así como del sistema de expresión empleado (organismo recombinante). En el caso de levaduras, la más comúnmente producida es p24.

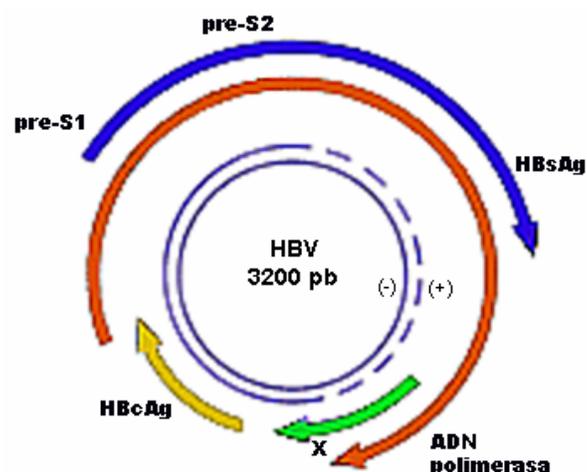


Figura 2. Estructura y organización del genoma del HBV (Mahoney, 1999).

El ciclo de replicación del HBV se lleva a cabo por medio de un mecanismo aun desconocido, en donde el HBV se une a un receptor en la superficie del hepatocito para posteriormente introducirse por endocitosis (**Figura 4**). En alguna parte del citoplasma la envoltura viral (cápside) es removida liberando la nucleocápside, de tal modo que la partícula puede trasladarse hacia los poros del núcleo en donde el ADN del virus sale de la nucleocápside y se importa hacia el núcleo (Kann *et al* 1997). En el núcleo, la cadena circular completa y cerrada (no covalentemente) de ADN junto con la cadena incompleta, son convertidas por un proceso enzimático a ADN de doble cadena circular covalentemente cerrado (cccADN). Este cccADN sirve como template para la transcripción de los RNAs viral. El mayor RNA mensajero (mRNA) de 3.5 kb es traducido en proteína HBcAg y en la polimerasa viral. Estas dos proteínas forman un complejo con su mRNA y es encapsidado como pregenoma viral en el citoplasma. El RNA encapsidado es transcrito por la polimerasa viral la cual también funciona como transcriptasa reversa para sintetizar una cadena de ADN completa. Posteriormente la capsida viral es envuelta en el retículo endoplasmático (RE) y secretado por exocitosis.

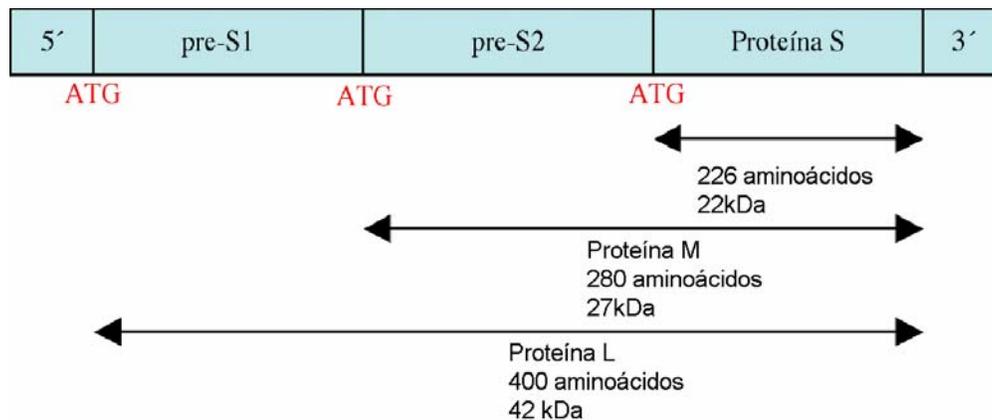


Figura 3. Representación del gen que codifica para las proteínas de superficie que constituyen la envoltura del HBV y subpartículas virales, en donde se ilustra la posición de los tres codones de comienzo (ATG) permitiendo la posibilidad de tres diversos polipéptidos superficiales.

Tabla 1. Diferentes tipos de proteínas que se pueden generar a partir del codon de inicio y modificaciones postraduccionales del ORF de HBV (Heermann *et al.*, 1984).

Proteína	Tipo de monómero	Sitios de glicosilación ocupados	Masa molecular kDa
gp42	L	Varios	42
p39	L	No	39
gp36	M	2	36
gp33	M	1	33
gp27	S	1	27
p24	S	No	24

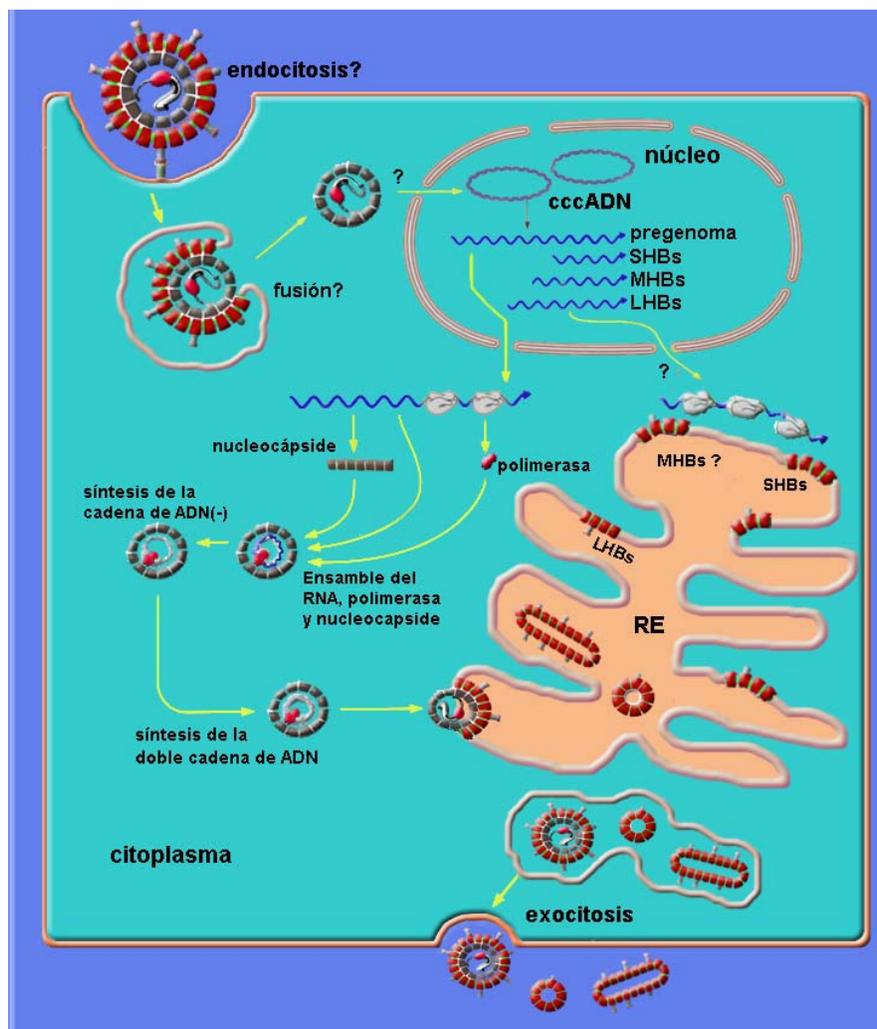


Figura 4. Modelo simplificado del ciclo de vida del HBV. Modificado a partir de Schaefer *et al.*, 2002.

Como ya se mencionó la proteína S está compuesta por 226 aminoácidos, contiene por lo menos 4 regiones altamente hidrofóbicas que forman cuatro cadenas α -hélice, las cuales dependiendo si se sintetiza o no la pre-S2 y/o pre-S1 se encontraran embebidas en el interior de la bicapa lipídica (**Figura 5**). En medio de estas cadenas (**Figura 6**), se encuentra el llamado “determinante a” comprendido en los residuos 124-147 el cual se piensa es crucial para la unión de anticuerpos (Weinberger *et al.*, 2000). Durante su síntesis en el RE, la inserción de la proteína S en la membrana es dirigida por las hélices A y B. El extremo carboxilo terminal hidrofóbico probablemente atraviesa dos veces la membrana. El posible sitio de glicosilación “G” (asparagina146) se encuentra localizado en un “loop” que da hacia el lumen del RE. Las proteínas L y M (pre-S1 y pre-S2) se piensa son plegadas hacia el citosol (los posibles sitios de glicosilación se muestran con asteriscos). Durante el ensamblaje del virion, aproximadamente la mitad de la proteína L cambia su topología transmembranal de tal forma que el dominio preS es expuesto en la superficie del virion (e-preS). De acuerdo a dicho modelo, el dominio interno i-preS media el contacto de la envoltura con la nucleocápside (Bruss *et al.*, 1996; Hilleman., 2003).

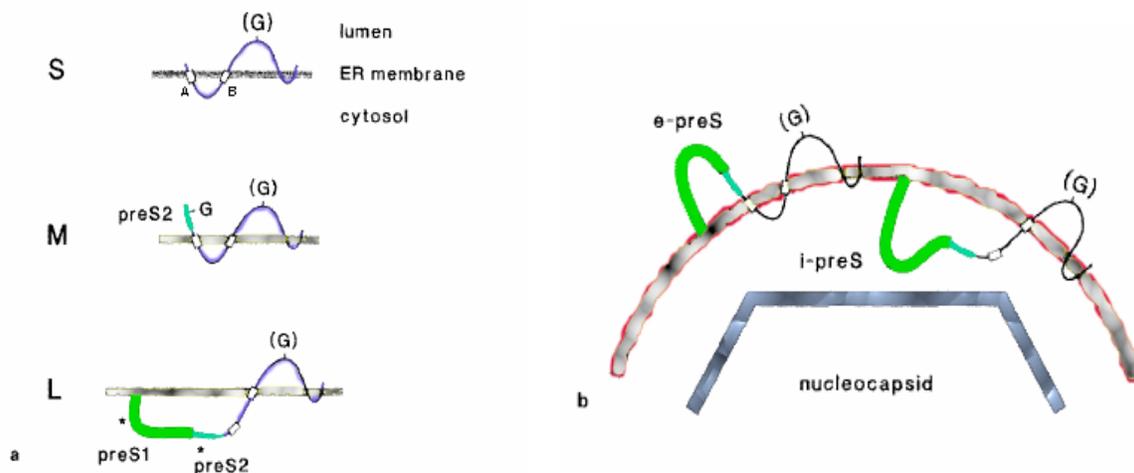


Figura 5. Topología de las proteínas de superficie del HBV en la membrana del retículo endoplásmico (a) y en la envoltura del virion (b). Tomado de Bruss *et al.*, 1996.

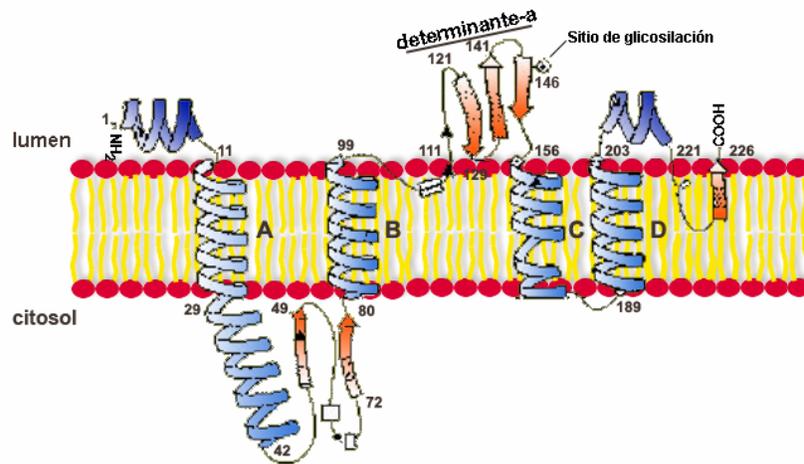


Figura 6. Esquema de la topología de la proteína S (M) del HBV en la que se muestra las cuatro cadenas α -hélices (A, B, C y D) y su interacción con la bicapa lipídica, así como el llamado “determinante a”. Modificado a partir de Mahoney y Marck, 1999; Prange *et al.*, 1995.

En resumen, el término "antígeno de superficie de hepatitis B" o "HBsAg" se refiere a la proteína en cualquiera de sus formas (L, M o S). Además, como se mencionó arriba, ciertos residuos de la proteína pueden ser modificados por glicosilación y a menudo pueden estar asociadas a lípidos. Finalmente, estas proteínas pueden existir en varios estados de asociación, tales como dímeros, trímeros, etc., incluyendo las estructuras esféricas de ≈ 22 nm de diámetro, con o sin las modificaciones ya mencionadas. Todas estas variantes pueden ser incluidas dentro de la definición de HBsAg (Hershberg, 1986).

2.2. Vacunas

La demostración de que el antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg) expresado en levadura podía autoensamblarse correctamente en la partícula antigénica de 22 nm de diámetro, dirigió la atención hacia la producción industrial de esta importante clase de partícula subviral. Sin embargo, el HBsAg producido por levaduras también contiene los monómeros, dímeros y similares, los cuales se asocian en partículas incompletas durante la purificación, mientras que el HBsAg

silvestre purificado a partir del plasma de personas infectadas se encuentra en su mayor parte como subpartícula de 22 nm. Por lo tanto, las moléculas de HBsAg derivadas de levadura tienen diversas composiciones conformacionales (monómeros, dímeros y partículas completas) a lo largo del proceso de purificación (Heermann et al., 1984). A pesar de que todas estas moléculas provocan una respuesta inmunológica contra el HBV, se ha observado que la partícula bien ensamblada de 22 nm es aproximadamente 1000 veces más inmunogénica que la proteína sin ensamblar (Han et al., 1995; Zhou *et al.*, en prensa). Partículas bien ensambladas de HBsAg producidas en levadura, fueron utilizadas para la inmunización de ratones generando una eficiente respuesta de CD8⁺ linfocitos T citotóxicos (LTC) y desarrollaron fácilmente altos títulos de anticuerpos contra determinantes conformacionales de la partícula o epitopes lineales del monómero. En contraste, la reducción de la partícula con SDS y 2-mercapto-etanol generó S-monómeros p24, los cuales fueron utilizados para la inmunización de ratones, generando la misma respuesta de LTC, pero no estimularon la generación de anticuerpos contra epitopes conformacionales o lineales del HBsAg ensamblado o desnaturalizado. Por lo tanto, una partícula antigénica íntegra de HBsAg no es necesaria para la generación de LTC *in vivo*, pero es esencial para estimular una respuesta humoral contra el HBsAg (Schirmbeck *et al.*, 1994, 1995). La adecuada respuesta inmunogénica que da el HBsAg es altamente dependiente de su estructura terciaria y posiblemente cuaternaria. La estructura terciaria es mantenida por interacciones intercatenarias y la cuaternaria por puentes disulfuro (Kobayashi *et al.*, 1988).

2.3. Purificación.

Idealmente lo que se busca, es la producción y aislamiento de grandes cantidades del HBsAg en la forma de partícula ensamblada de 22 nm con un alto grado de pureza, ya que es en esta forma que se obtiene la mayor respuesta inmunológica. Sin embargo, debido a la complejidad y características fisicoquímicas que presenta el antígeno de

superficie de hepatitis B, su purificación es difícil y complicada, y resulta muchas veces en una mezcla heterogénea de agregados, partículas bien ensambladas y subpartículas de menor peso molecular (monómeros, dímeros y partículas mal ensambladas), las cuales pueden ser observadas en los perfiles cromatográficos utilizando HPLC de filtración en gel (**Figura 7**). De esta forma, lo que en apariencia resulta ser un producto homogéneo de cierta pureza, es en realidad un producto heterogéneo, que puede representar un elevado rendimiento en la recuperación de proteína pero con una baja actividad inmunogénica.

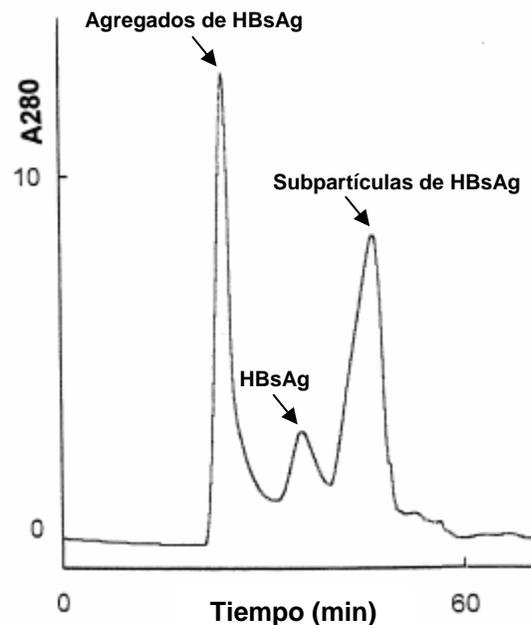


Figura 7. Perfil cromatográfico del HBsAg en HPLC de filtración en gel. Tomada de Tleugabulova *et al.*, 1998b.

Los métodos de purificación de estas estructuras multiproteicas aprovechan propiedades tales como la carga, tamaño, densidad y solubilidad. La recuperación de esta proteína implica la ruptura celular para su liberación, obteniendo una solución denominada extracto crudo. Una vez obtenido este extracto, se pueden utilizar diversas técnicas para su separación como: centrifugación diferencial o en gradientes,

ultrafiltración, precipitación, cromatografía, etc. Independientemente de la o las operaciones utilizadas, estas deben ofrecer reproducibilidad y garantizar la remoción de contaminantes intrínsecos (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos) a gran escala.

De forma general, una vez terminada la fermentación y tratándose de un metabolito intracelular, la biomasa es separada del caldo, frecuentemente por centrifugación para eliminar compuestos que quedaron en el medio de cultivo como vitaminas, hormonas antiespumantes, etc. La biomasa recuperada es resuspendida en una solución amortiguadora a pH generalmente neutro para su ruptura, la que resulta en la liberación del producto de interés. La ruptura puede llevarse a cabo por métodos mecánicos o químicos, los cuales de manera inevitable someten al producto a fuerzas de corte e interfases líquido-gas que pueden provocar la desnaturalización o agregación de la proteína (Maa y Hsu, 1996, 1997). Es posible también que la ruptura conlleve un aumento en la temperatura del extracto, lo que puede ocasionar inestabilidad en la estructura terciaria de la partícula al aumentar el grado de fluidez en las regiones lipídicas de la misma (Gavilanes *et al.*, 1990). Así, un cambio en el estado físico de los lípidos puede alterar la estructura o conferir un diferente grado de exposición de los determinantes antigénicos (epitopes) (Gutiérrez *et al.*, 1992).

Una vez obtenido el extracto crudo, puede optarse por una precipitación ya sea de contaminantes o de la proteína de interés. Los métodos más comunes de precipitación incluyen: pH, solventes orgánicos, cambio de fuerza iónica, polímeros no iónicos, metales iónicos polivalentes, temperatura y afinidad (anticuerpos específicos). Tales métodos pueden llegar a ser muy agresivos para la proteína al exponerla a variaciones de pH y a una disminución de la constante dieléctrica del medio por el uso de solventes orgánicos. Esto puede aumentar las interacciones electrostáticas intermoleculares favoreciendo la formación de agregados (Han *et al.*, 1995), o por el contrario, los solventes orgánicos pueden desestabilizar la partícula lipoproteica al favorecer la exposición de las cadenas hidrofóbicas.

El uso de la ultracentrifugación por gradientes de densidad para el aislamiento del HBsAg y en general de muchas biomoléculas es comúnmente empleada. Sin embargo, se ha reportado que puede alterar la composición de las partículas de HBsAg, en particular su contenido de lípidos (Tleugabulova *et al.*, 1998b) ocasionando su inmediata precipitación en soluciones acuosas (Mehdi *et al.*, 1996). Además se ha encontrado que la ultracentrifugación resulta en preparados con baja pureza y en la desestabilización de las partículas virales (Trudel *et al.*, 1981; Aurichio *et al.*, 2001; Rolland *et al.*, 2001; Mena *et al.*, 2005). Posterior a una ultracentrifugación es por lo general necesaria una ultrafiltración y diálisis para la eliminación de sales y ajuste de pH con una consecuente concentración de la partícula, tal concentración puede favorecer la formación de agregados por el incremento de las interacciones entre las partículas. Además, dependiendo del sistema de ultrafiltración empleado, la partícula puede exponerse a interfases sólido-líquido y/o gas-líquido favoreciendo un estrés oxidativo con la consecuente formación de agregados (Li *et al.*, 1995; Maa y Hsu, 1997; Tleugabulova *et al.*, 2000).

El empleo de técnicas cromatográficas ofrece grandes ventajas, como en el caso de la cromatografía de afinidad empleando anticuerpos monoclonales, en la que se pueden lograr los más altos niveles de pureza debido a su especificidad, pero las limitaciones para esta técnica casi ideal, se centran generalmente alrededor de la etapa de disociación, después de que la molécula se ha unido a la matriz. En general la eficiencia de la disociación y recuperación por ésta técnica depende del equilibrio entre la actividad específica y la cantidad de proteína recuperada. Un buen agente disociador puede dar altos rendimientos pero también una parcial desnaturalización, resultando en una baja actividad específica (Ibarra *et al.*, 1999). Otra limitante de la cromatografía de afinidad es su alto costo a una escala industrial. Metodologías previamente publicadas han sugerido la utilización de la cromatografía de fase reversa para la purificación de proteínas hidrofóbicas utilizando solventes orgánicos (Lerro *et al.*, 1993; O'Keefe y Paiva, 1995; Tarr y Crabb, 1983). Sin embargo, la aplicación de tales metodologías no siempre termina en resultados consistentes ya que se ha

observado que la proteína S se une irreversiblemente a las matrices comúnmente utilizadas en esta técnica (Tleugabulova, *et al.*, 1999).

El seguimiento de la pureza e integridad de la partícula requiere de diferentes técnicas, entre ellas el SDS-PAGE en condiciones reductoras, “immunoblotting”, centrifugación isopícnica en CsCl y microscopía electrónica. El SDS-PAGE e “immunoblotting” demuestran pureza e identidad de las subunidades del monómero, mientras que el análisis de sedimentación con CsCl y microscopía electrónica revelan importantes características del autoensamblado de las partículas, como densidad, forma y tamaño. Sin embargo, muchas veces estas herramientas son incapaces de detectar la heterogeneidad (polidispersión) de la muestra. Sin embargo, en los últimos años se ha desarrollado una metodología basada en la dispersión dinámica de la luz “DLS” por sus siglas en inglés (Dynamic Light Scattering). DLS es una herramienta utilizada para el análisis de tamaños de las partículas, determinación de la masa molecular, determinación de agregados, punto de fusión, estudio de condiciones para la cristalización, etc. El DLS es una técnica no invasiva ni destructiva, no requiere de estándares, permite el estudio de una gran población de partículas en periodos de tiempo muy cortos y requiere de una mínima cantidad de muestra pura (Moreno *et al.*, 2000). Equipos modernos de DLS pueden medir partículas tan pequeñas como 0.3 nm y tan grandes como 6 μm a través de una gran variedad de concentraciones (0.1mg/mL a 15 kDa) con un volumen mínimo de 12 μL . La medición se basa en el movimiento Browniano de las partículas y macromoléculas en solución. Dicho movimiento se presenta como resultado de colisiones entre las partículas y/o moléculas del solvente, como consecuencia de dicho movimiento, la luz que se dispersa a partir de un conjunto de partículas puede fluctuar con respecto al tiempo. El DLS mide estas fluctuaciones en intervalos de tiempo muy cortos para producir una curva de correlación a partir de la cual se determina el coeficiente de difusión de la partícula (y subsecuentemente el tamaño de la partícula).

Otra técnica muy utilizada para la determinación de masas moleculares y tamaños de partículas es la cromatografía de exclusión en gel (SEC). El aislamiento de HBsAg a

través del empleo de “SEC” ha demostrado ser una técnica poderosa para el análisis de agregación de proteínas. El uso de la SEC, en la purificación del HBsAg muestra la heterogeneidad de la misma al presentar hombros antes y después del pico principal en el cromatograma, sugiriendo la presencia de agregados solubles de HBsAg y proteínas de bajo peso molecular (partículas mal ensambladas) que se piensa son proteínas S mal o no totalmente ensambladas (figura 3) (Tleugabulova *et al.*, 1998b). El problema de la agregación del HBsAg, la cual sin duda afecta la recuperación del producto, es un fenómeno no muy bien entendido, no se sabe exactamente en dónde y qué origina esta agregación. Se ha propuesto que su generación es durante la fermentación (Tleugabulova *et al.*, 1998a, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000), estimulada por interacciones cooperativas de tipo hidrofóbicas. También es posible que sea producida por múltiples y variadas condiciones de proceso a la que es sometida durante la purificación, en donde la proteína sufre cambios conformacionales, que debido a la compleja estructura lipoproteica, podrían favorecer la agregación (Gavilanes *et al.*, 1990; Gómez *et al.*, 1992). En la actualidad, no existen suficientes datos que declinen una u otra hipótesis. Estudios realizados por Tleugabulova *et al.* (1998a, 1998b) sobre el efecto que tiene la concentración, almacenaje, inducción a la agregación por adición de agregados ya existentes, sugieren que la agregación se genera durante la fermentación. Otros estudios, que abordan el efecto del pH, temperatura, detergentes (SDS, Tween 80) y oxidación, llegan a contradecirse en el sentido de que los cambios conformacionales que sufre la partícula en su estructura secundaria nativa pueden mejorar, disminuir o eliminar por completo la antigenicidad de la partícula (Nath *et al.*, 1976; Gomez *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 2001). Es por esto que el conocimiento del efecto que tiene cada una de estas variables sobre la estructura y en la formación de agregados es de suma importancia para la elección de la estrategia a seguir en su purificación, la cual debe garantizar pureza, homogeneidad y una elevada respuesta inmunogénica.

3. HIPÓTESIS

La eliminación de la etapa de ultracentrifugación durante el proceso de purificación del HBsAg no disminuye la calidad del producto final y la cromatografía de exclusión molecular es suficiente para alcanzar las especificaciones del biofármaco.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar el proceso de purificación del HBsAg para crear un proceso alternativo en el cual se evite la etapa de ultracentrifugación.

4.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un sistema de purificación de HBsAg basado en cromatografía líquida.
- Evaluar el efecto y la estabilidad a la temperatura, tiempo de almacenaje, pH y fuerza iónica del HBsAg.
- Caracterizar el proceso de purificación.
- Estudiar la estructura y composición de las partículas de HBsAg.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg).

Para el efecto de las variables de proceso, se utilizó un HBsAg grado biofármaco purificado por Probiomed S. A de C. V. La producción a gran escala del antígeno de superficie de Hepatitis B empieza por la multiplicación de una cepa recombinante de *H. polymorpha* en cajas de petri, seguida de una serie de pases en matraces agitados bajo condiciones cuidadosamente controladas para su multiplicación, los cuales servirán como semillas para la inoculación del biorreactor industrial. Una vez finalizada la fermentación, el cultivo es rápidamente enfriado a 4 °C para minimizar la proteólisis y posteriormente las células son rotas por medio de un molino de perlas de vidrio para liberar la proteína intracelular de HBsAg, y así iniciar la purificación intermedia² y finalmente la de pulido³ del producto. Todos los experimentos se realizaron con HBsAg con no más de 30 días de haber sido purificado y almacenado a 4 °C. Para la purificación del HBsAg por cromatografía de exclusión en gel, se utilizaron muestras provenientes de la etapa de intercambio iónico, las cuales fueron mantenidas a 4 °C y procesadas a más tardar 12 h después de haber sido tomadas.

5.2. Purificación del antígeno de superficie de hepatitis B por cromatografía de exclusión en gel.

La purificación del HBsAg se llevó a cabo a través una cromatografía preparativa empleando de forma comparativa dos diferentes resinas de exclusión molecular: resina Sephacryl S-500 (Amersham Biosciences) con un intervalo de exclusión de

² El objetivo es la remoción de la mayor parte de impurezas. Se eliminan ácidos nucleicos, lípido, endotoxinas, y otras proteínas.

³ Eliminación de impurezas tales como trazas de proteínas similares.

4×10^4 – 2×10^7 Da, tamaño de poro de 500Å. Y la resina HW-65F (Tosoh Bioscience) con un intervalo de exclusión 4×10^4 – 5×10^6 Da, tamaño de poro de 1000Å. Empacadas por separado en dos diferentes columnas; XK-16/70 y XK-26/100 de Pharmacia Biotech, altura de cama de 45 y 73 cm, montadas en el sistema cromatográfico ÄKTA explorer o en el sistema de baja presión ÄKTA prime (Amersham Biosciences). La elución se realizó con solución de fosfato dibásico 10 mM, flujo lineal de 0.5 cm/min a temperatura ambiente. Una muestra proveniente de intercambio iónico (etapa utilizada durante la purificación industrial del HBsAg) fue inyectada a la columna (el volumen de inyección correspondió a un 5% del volumen de columna, a una concentración de proteína total de 10-13 mg/mL), se colectaron fracciones de 2 mL a las cuales se les determinó concentración de proteína por Bradford, se analizaron por cromatografía líquida de alta presión de filtración en gel (HPLC-GP), electroforesis bajo condiciones reductoras y no reductoras y se detectó la presencia de HBsAg por el método de hemaglutinación pasiva (PHA). En todos los casos se utilizaron reactivos grado analítico y agua grado Mili-Q filtrada por 0.45 y/o 0.22 μm .

5.3. Métodos analíticos

5.3.1. Cromatografía analítica.

Para la cromatografía analítica se utilizó un HPLC marca Waters™ con una columna de permeación en gel Waters Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Waters Ultrahydrogel, controlador Waters 600, sistema de bombas Waters 626S, detector de fluorescencia Waters 2475 (λ_{EXC} 280 nm y λ_{EM} 348 nm), detector de arreglo de diodos Waters 929 ($\lambda = 280$ nm) y software Empower™. Como fase móvil se utilizó una solución de fosfato dibásico 10 mM. La cromatografía se realizó en condiciones isocráticas con un flujo de 0.9 mL/min a 37 °C por 30 minutos.

5.3.2. Electroforesis en gel.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida según la técnica descrita por Laemmli (1970), con un gel concentrador al 4% y un gel separador al 12% preparados en un dispositivo de 7.5x10x0.1 cm contenido en una cámara electroforética marca Bio-Rad. Las muestras se trataron como sigue: las muestras que contenían el HBsAg puro en concentraciones menores a 8 µg/mL fueron concentradas en unidades Centricon YM-30 (Amicon, Millipore). Para la electroforesis en condiciones no reductoras, alícuotas de las muestras (15 µL) fueron incubadas a temperatura ambiente con 5 µL de buffer de tratamiento no reductor (0.25 M Tris-HCl pH 6.8 y 20% glicerol). Alícuotas de 10 µL fueron cargadas al gel.

Para la electroforesis en condiciones reductoras, alícuotas de las muestras (15 µL) fueron incubadas a 100 °C por 10 minutos con 5 µL de buffer reductor (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol y 10 % 2-mercapto-etanol). Alícuotas de 10 µL fueron cargadas al gel. Para ambas condiciones los geles se corrieron a 20 mA por gel a corriente constante, seguidas de una tinción con nitrato de plata.

5.3.3. Western blot

Después de la electroforesis y separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular, estas fueron electrotransferidas a una membrana de fluoruro de polivildeno (PVDF) o Inmobilon-NC durante 1.5 h a 400 mVolts corriente constante, a través de un sistema semiseco (Owl Scientific,) utilizando un sistema discontinuo de soluciones amortiguadoras. Después de la transferencia, los sitios de unión no específicos de la membrana fueron bloqueados toda la noche con una solución de 2% albúmina sérica bovina (United States Biologica) y 5% leche descremada (Carnation Nestle) disueltos en agua Milli Q. Después de tres lavados con PBS-Tween_{0.05%} (80 mM fosfato de sodio dibásico, 20 mM fosfato de sodio monobásico, 100 mM cloruro de sodio, 0.05% Tween 20) por cinco minutos, el HBsAg se identificó a partir de una inmunodetección

("Western blot"). La membrana se incubó 2.5 h con un suero que contenía anti-HBsAg acoplado a peroxidasa (proporcionado por Probiomed S.A de C.V.) a una dilución 1:5 en PBS-Tween_{0.05%}. Después de dos lavados con PBS-Tween_{0.05%} por cinco minutos y uno con PBS durante 10 minutos, la membrana se reveló utilizando una solución de DAB-H₂O₂ (5 mg Diaminobencidina, 5 µL peróxido de hidrógeno al 30% en 10 mL de PBS-Tween_{0.05%}) hasta la aparición de las bandas correspondientes. La reacción se paró adicionando agua desionizada y se dejó secar la membrana.

5.3.4. Dispersión dinámica de luz (DLS).

Para el estudio de la dispersión dinámica de luz se empleó un equipo Zetasizer Nano (Malvern Instruments) con fuente de luz láser de 530 nm, volumen de celda de 50 µL y control de temperatura. Localizado en el laboratorio de bioquímica 3, del Instituto de Química de la UNAM. Las muestras fueron filtradas a través de 0.22 µm antes de someterlas al DLS. Múltiples mediciones fueron realizadas a partir de varias muestras a temperatura ambiente. Los datos fueron colectados y analizados usando el software Dispersión Technology versión 4.10.

Partículas y macromoléculas en solución sufren un movimiento Browniano. Dicho movimiento se presenta a partir de colisiones entre las partículas y/o moléculas del solvente, como una consecuencia de dicho movimiento, la luz que se dispersa a partir de un conjunto de partículas puede fluctuar con respecto al tiempo. El DLS mide estas fluctuaciones en intervalos de tiempo muy cortos para producir una curva de correlación a partir de la cual el coeficiente de difusión de la partícula (y subsecuentemente el tamaño de la partícula) es determinado (Mattison et al., 2003).

5.3.5. Determinación de HBsAg por el método de hemaglutinación pasiva (PHA).

Para la detección y evaluación cualitativa de la antigenicidad de una muestra de HBsAg, se utilizaron eritrocitos sensibilizados α' -HBsAg (proporcionados por Probiomed S.A de C.V.), resuspendidos en una solución salina (9% NaCl) y 0.1 % de Tween 20.

La preparación de la microplaca de fondo cónico (96 pozos) se realizó colocando 90 μ L de la solución salina en las dos primeras columnas de la placa, y se adicionaron 50 μ L al resto de los pozos. En la columna 1 se colocaron y homogenizaron 10 μ L de la muestra a analizar (dilución 1:10), tomar 10 μ L de la columna 1 y colocarlos en la columna 2 (dilución 1:100), homogenizar y transferir 50 μ L a la columna 3 (dilución 1:200). Repetir la transferencia de 50 μ L y la homogenización hasta llegar a la última columna de la placa (diluciones 1:400:800:1600:3200:6400:12800:25600:51200 y 1:102400). Después de homogenizar la columna 12, tomar 50 μ L y desecharlos, tomar 40 μ L de la columna 1 y desecharlos para ajustar el volumen de todos los pozos a 50 μ L. Una vez realizadas las diluciones, se colocaron 25 μ L de la solución de eritrocitos y se dejó en reposo total por 30 min. En todos los casos se tiene un control negativo (solución salina) y un control positivo (sustancia de referencia).

5.3.6. Microscopía electrónica.

Las muestras se prepararon por tinción negativa: Colocar 10 μ L de muestra sobre parafilm. Flotar una rejilla (malla 200 con formvar y carbón) sobre la gota y dejar 1 min. Retirar la rejilla y eliminar la solución por contacto sobre papel. Las muestras se contrastan con acetato de uranilo al 2% por un minuto y se lavan sobre una gota de agua por 10 segundos. Se elimina el exceso de agua y se deja secar bajo la lámpara. Se observan las muestras en el microscopio electrónico a aumentos de 50,000 X, 85,000 X y 124,000 X. Para facilitar la detección, se realizó un inmunomarcaje

empleando un anticuerpo de ratón anti-HBsAg acoplado a un anticuerpo secundario unido a oro coloidal de 10 nm de diámetro. Una vez colocada la muestra en la rejilla, semisecarla de 10 a 15 min a temperatura ambiente, flotar la rejilla por 5 min en una gota de TBS-BSA (100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2% albúmina sérica bovina) en una cámara humidificada. Flotar la rejilla por 30 min en una gota de TBS-3% gelatina (Sigma). Poner una gota de TBS-BSA para lavar el exceso de gelatina. Incubar la rejilla por 60 min en una gota de solución de anticuerpo primario en TBS-BSA (dilución 1:20). Lavar la rejilla 3 veces con tres gotas independientes de TBS-BSA. Incubar la rejilla por 60 min en una gota de anticuerpo secundario (dilución 1:20 en TBS-BSA). Lavar la rejilla 3 veces en tres gotas separadas de TBS-BSA. Lavar la rejilla una vez en una gota de TBS. Eliminar la rejilla de la cámara húmeda. Eliminar el exceso de TBS inclinando la rejilla en un papel filtro. Colocar una gota de ácido fosfotugsténico al 2% pH 7 en la rejilla. Después de 30-40 seg remover el exceso de ácido fosfotugsténico en una papel filtro para secar. Observar en microscopio electrónico.

5.3.7. Cuantificación de proteína.

La cuantificación de proteína total de las diferentes muestras se realizó por el ensayo de Bradford (1976), empleando un reactivo comercial BioRad, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar a diferentes concentraciones (10, 20, 40, 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$) y solvente como blanco. Colocar 150 μL de cada muestra (curva estándar, muestra problema y blanco) en una placa de ELISA (una muestra por pozo y por duplicado), seguida de la adición de 50 μL del reactivo de Bradford, homogenizar y dejar incubar a temperatura ambiente por 15 min para su posterior lectura a 570 nm.

5.3.8. Cuantificación de lípidos.

La cuantificación de lípidos se realizó por el método Merckotest (Merck Chemical, Darmstadt, Germany; Frings *et al.*, 1970). Los lípidos de la muestra reaccionan con ácido sulfúrico concentrado, en baño María, para formar iones carbonio que reaccionan con el grupo carbonilo del ácido fosfórico-vainilla produciendo un complejo de color rosa, cuya intensidad es medida en el espectrofotómetro, el color es directamente proporcional a la cantidad de lípidos presentes en la muestra, y al comparar esta intensidad con una curva estándar de concentración conocida, se puede conocer su contenido lipídico.

La curva estándar se realizó con una solución de trioleína⁴-tripalmitina⁵ a diferentes concentraciones (0.45, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6 y 4.2 mg/mL) y solvente como blanco. Se transfirieron 40 μ L de cada muestra (curva tipo, muestra problema y blanco) a un tubo de ensayo y posteriormente se adicione 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Tapar y colocar en baño María durante 10 min. Sacar los tubos y permitir que alcancen la temperatura ambiente. Tomar por triplicado 67 μ L de cada tubo a una nueva serie de tubos. Adicionar a cada tubo 1 mL de ácido fosfórico-vainillina al 0.2%. En este punto se observa la aparición de un color rosado en los tubos, siendo este mayor en los tubos con más concentración de lípidos. Agitar los tubos y dejar incubando por 30 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz para su posterior lectura en el espectrofotómetro a 520 nm.

⁴Trioleina: triacilglicérido insaturado cuyo ácido graso es el ácido oleico (C18:1). Este tipo de aceite se encuentra comúnmente en las aceitunas (49-84%), cacahuete (50-70%), maíz (43-49%) y en depósitos de grasa en el cuerpo humano (45-50%).

⁵ Tripalmitina: triacilglicérido saturado cuyo ácido graso es el palmítico (C16). Este tipo de grasa se encuentra en la manteca (75%), tocino (40%) y en depósitos de grasa en el cuerpo humano (23-26%).

5.3.9. Cuantificación de carbohidratos.

La cuantificación de carbohidratos se realizó por el método de fenol-ácido sulfúrico para hexosas y pentosas (Manzi *et al.*, 2000). El ensayo se basa en el hecho de que los carbohidratos al ser calentados en presencia de un ácido fuerte, estos son convertidos a furfural y sus homólogos por un proceso de oxidación, reducción y condensación. Estos productos reaccionan con el fenol para formar compuestos coloridos. El tipo y relación de productos varía de carbohidrato a carbohidrato y también depende de la concentración de los reactantes, temperatura y del tiempo de reacción.

La curva estándar se realizó con una solución de D-(+)-galactosa a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 $\mu\text{g/mL}$) y solvente como blanco. Transferir por duplicado 150 μL de la muestra (curva estándar, muestra problema y blanco a un tubo de ensayo. Adicionar 150 μL de fenol al 5% (w/v) en cada tubo y homogenizar. Adicionar rápidamente 750 μL de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo. Incubar los tubos por 10 minutos a temperatura ambiente, agitar y volver a incubar por 30 minutos a temperatura ambiente para su posterior lectura en el espectrofotómetro a 490 nm.

5.3.10. Estudio de la composición de la partícula del HBsAg.

Para determinar si existe o no una polidispersión en el HBsAg después de su purificación, el antígeno de superficie del virus de hepatitis B proporcionado por la industria biofarmacéutica Probiomed S. A de C. V. fue cargado a la columna preparativa XK26 empacada con la resina HW-65F (Tosohaas) para su fraccionamiento. Cada fracción fue analizada por HPLC-GP, PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, Western Blot y PHA.

5.4. Caracterización Bioquímica.

5.4.1. Estudio del efecto del pH.

El estudio del efecto del pH en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg se realizó incubando el antígeno a diferentes valores de pH (3.5 a 10) en intervalos de 0.5 unidades de pH, usando soluciones reguladoras 0.01 M a temperatura ambiente por 10, 20, 40, 80, 160 y 320 minutos. Se determinara cambios estructurales o agregación por HPLC-GP y PHA.

5.4.2. Estudio del efecto de la temperatura.

El estudio del efecto de la temperatura en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg se realizó incubando el HBsAg a diferentes temperaturas (-3, 10, 30, 50, 70 y 90 °C) por periodos de 10, 20, 40, 160 y 320 minutos. Se determinaron cambios estructurales o agregación por HPLC-GP y PHA.

5.4.3. Estudio del efecto al tiempo de almacenaje.

El efecto del tiempo de almacenaje en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg se realizó incubando a 4 °C el antígeno a diferentes periodos de tiempo (1, 4, 8, 10, 13, 15 y 19 semanas). Se determinaron cambios estructurales o agregación por HPLC-GP.

5.4.4. Estudio del efecto de la fuerza iónica.

El efecto de la fuerza iónica en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg se realizó incubando a temperatura ambiente el antígeno a concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.2 y 1.5 M de NaCl por diferentes periodos de tiempo (1, 10, 20, 40 hasta 440 minutos). Se determinaron cambios estructurales o agregación por HPLC-GP y PHA.

5.4.5. Estudio del efecto de la concentración de proteína.

El efecto de la concentración de proteína en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg se realizó concentrando a temperatura ambiente el antígeno desde 1x, 2x, 4x, 8x, 16x hasta 32x por medio de una celda de ultrafiltración (Amicon-Millipore) utilizando una membrana de celulosa regenerada con un corte molecular de 30 kDa. Se determinaron cambios estructurales o agregación por HPLC-GP y PHA.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cromatografía analítica de exclusión en gel.

Para lograr el estudio del HBsAg es necesario contar con una herramienta robusta que nos permita caracterizar las estructuras formadas. Con este fin se ha propuesto la cromatografía líquida de alta presión utilizando columnas de exclusión en gel (Mena *et al.*, 2005). La cromatografía de exclusión en gel es una herramienta analítica ampliamente utilizada para separar proteínas o para estimar la masa molecular de macromoléculas. Sin embargo, es comúnmente aceptado que el comportamiento de elución de una proteína esta mejor relacionado con su radio hidrodinámico (R_H) que con su masa molecular, debido a que el volumen de elución de una proteína dada no solo depende de su masa sino también de efectos de hidratación y forma (Hartmann *et al.*, 2004). Las proteínas y/o enzimas en solución presentan una gran diversidad de tamaños y formas irregulares, sin embargo ya que dichas bioestructuras tienen un movimiento Browniano a través del solvente, es posible por medio de la ecuación de Stokes-Einstein determinar su radio a partir de mediciones del coeficiente de translación D .

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \Rightarrow R = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Donde η es la viscosidad del medio, R es el radio de la partícula presente en el medio, k es la constante de Boltzmann⁶ y T es la temperatura absoluta.

Para una estricta definición, el radio derivado a partir del coeficiente de translación es el de una esfera sólida hipotética, que se mueve a la misma velocidad que la proteína

⁶ La **constante de Boltzmann** (k) es la constante física que relaciona la energía con la temperatura y cuyo valor en el sistema internacional es $k \approx 1.3806503 \times 10^{-23} \text{ J/K}$

en estudio. Esta definición es algo confusa y difícil de visualizar, por lo que en la práctica y tomando las consideraciones de que las proteínas en solución son no esféricas, dinámicas (difunden) y están solvatadas (hidratadas), el radio calculado a partir de las características difusionales de las mismas se denomina radio hidrodinámico " R_H ", el cual se define como el radio de una esfera sólida que se mueve a la misma velocidad que una proteína de un mismo tamaño. R_H es un indicativo del tamaño aparente de la dinámica e hidratada/solvatada proteína. En la **Figura 8** se da un ejemplo con la lisozima, donde se muestra el efecto de la asimetría e hidratación sobre el radio calculado a partir de la ecuación de Stokes-Einstein. A partir de estudios de cristalografía, la lisozima ha sido descrita como un enzima de forma esferoide de 2.6×4.5 nm, con un radio axial de 1.73 nm (Mattison *et al.*, 2001), mientras que su R_H reportado por Grigsby y colaboradores (2000) es de 1.86 nm. Concluyendo que la diferencia de 0.14 nm en el radio entre la hidrodinámica y cristal estructura se debe a la película que forma el agua en su superficie y posiblemente a la unión de Mg^{2+} -proteína.

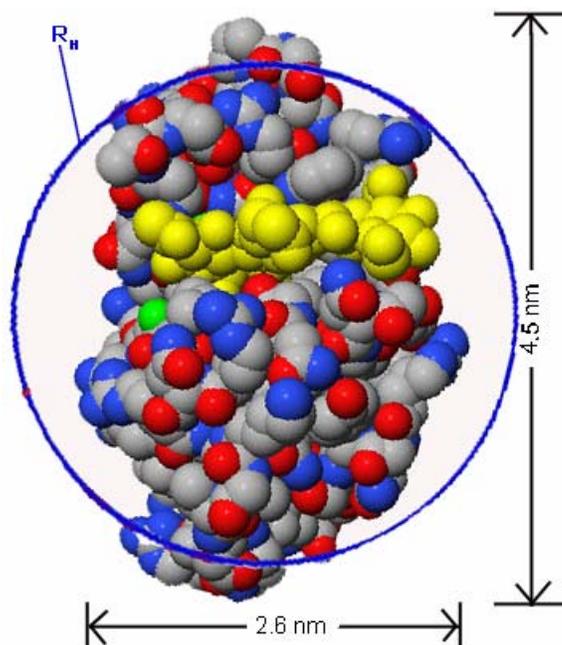


Figura 8. Representación del radio hidrodinámico " R_H " de la lisozima. Modificada a partir de Mattison *et al.*, 2001.

Sin embargo, se ha de tener mucha precaución en el uso de la cromatografía de filtración en gel para la determinación del R_H , cuando proteínas de diferentes conformaciones han sido empleadas. Se ha reportado que proteínas asimétricas tales como fibrinógeno, miosina y proteínas ligadas a SDS penetran el gel de agarosa de manera diferente (volumen de elución) comparadas con proteínas globulares de similar masa molecular. Por lo que una columna calibrada con proteínas globulares puede tender a sobrestimar el R_H de moléculas asimétricas y viceversa. Así, las columnas deben ser calibradas con macromoléculas de la misma conformación que la muestra problema (le Maire et al., 1986) y empleando en lo más posible la misma fase móvil debido a que un cambio en la fuerza iónica del solvente puede repercutir en el tiempo de elución de la biomolécula.

Basados en trabajos anteriores de nuestro grupo, utilizamos la columna Ultrahydrogel 500 para caracterizar las partículas formadas por HBsAg. En estos trabajos se ensayaron varias condiciones de separación, encontrando que un flujo de 0.9 mL/min empleando Na_2HPO_4 20 mM como fase móvil, es el adecuado para separar las distintas estructuras presentes en preparaciones de HBsAg, por lo que en este trabajo se utilizaron dichas condiciones de corrida.

Para terminar de caracterizar el sistema analítico se procedió a calibrar la columna Ultrahydrogel 500 con proteínas globulares de conocido R_H (**Figura 9**): lisozima (1.8 nm), tripsinógeno (2.2 nm), proteína verde fluorescente mejorada “EGFP” (2.4 nm), ovalbúmina (2.8 nm), albúmina (3.55 nm), IgG (5.3 nm) y tiroglobulina (8.5 nm); así, como nanoesferas fluorescentes “FluoSpheres” (Invitrogen U.S.A., de 30 nm de diámetro). El volumen vacío de columna (V_0) fue determinado usando una nanoesfera de 100 nm de diámetro y el volumen total (V_t) fue determinado usando azida de sodio. El coeficiente de partición (K_D) de cada proteína en la columna fue calculado usando la ecuación $K_D = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, donde V_e es el volumen de elución de la muestra problema. Por lo tanto, el R_H del HBsAg puede ser calculado al interpolar su volumen de elución en la grafica obtenida de R_H versus $(1 - K_D)$ de los estándares (**Figura 10**).

Además de la columna Ultrahydrogel 500 se probó y calibró de la misma manera una columna Ultrahydrogel 2000 (300 x 7.8 mm), con la finalidad de comparar los resultados arrojados por la Ultrahydrogel 500 (**Figura 11** y **Figura 12**).

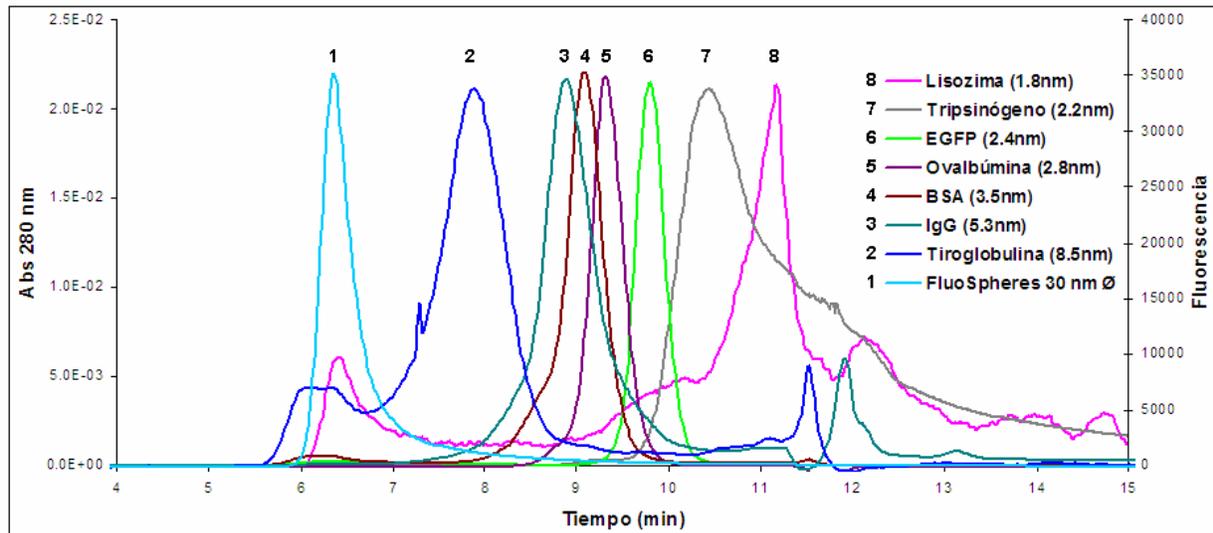


Figura 9. Perfiles de elución de las proteínas: lisozima, tripsinógeno, EGFP, ovalbúmina, albúmina bovina, IgG y tiroglobulina), nanoesfera fluorescente 30 nm de diámetro. Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm y fluorescencia λ_{EXC} 505 nm y λ_{EM} 515 nm, fosfato dibásico 10 mM como eluyente a un flujo de 0.9 mL/min; 50 μL de volumen de inyección.

Al comparar las **Figuras 10** y **12** podemos observar que se obtiene una pendiente mayor en la columna ultrahydrogel 2000 que en la Ultrahydrogel 500 para la zona que comprende proteínas con un R_H mayor a 3 nm. Esto es un indicativo de una mejor resolución. Sin embargo, la Ultrahydrogel 2000 mostró una muy baja resolución para las proteínas intermedias EGFP y ovalbúmina, sin poder resolver entre ovalbúmina y albúmina.

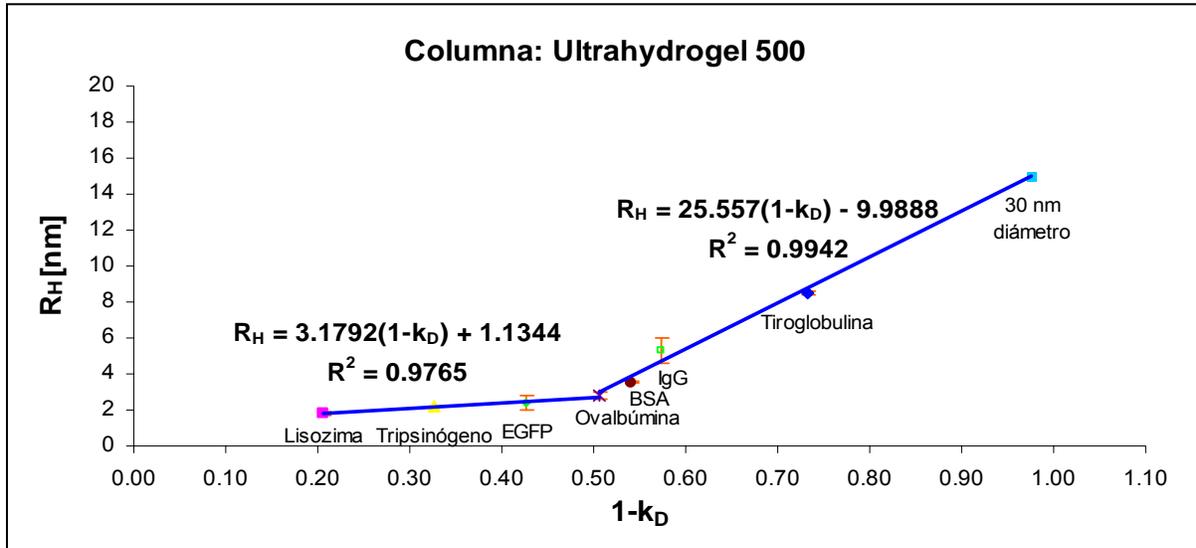


Figura 10. Curva de calibración para proteínas de radio hidrodinámico conocido en Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel. Lisozima, tripsinógeno, EGFP, ovalbúmina, albúmina, IgG y tiroglobulina, y nanoesfera fluorescente “FluoSpheres” (15 nm de radio).

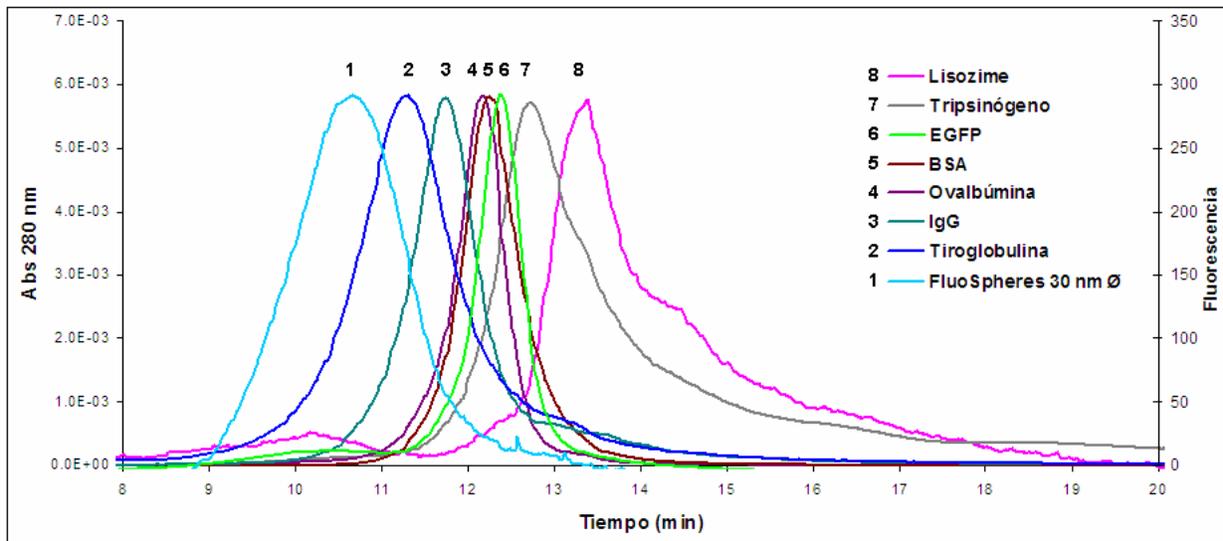


Figura 11. Perfiles de elución de las proteínas: lisozima, tripsinógeno, EGFP, ovalbúmina, IgG y tiroglobulina), nanoesfera fluorescente 30 nm de diámetro. Condiciones: Ultrahydrogel 2000 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm y fluorescencia λ_{EXC} 505 nm y λ_{EM} 515 nm, fosfato dibásico 10 mM como eluyente a un flujo de 0.9 mL/min; 50 μL de volumen de inyección.

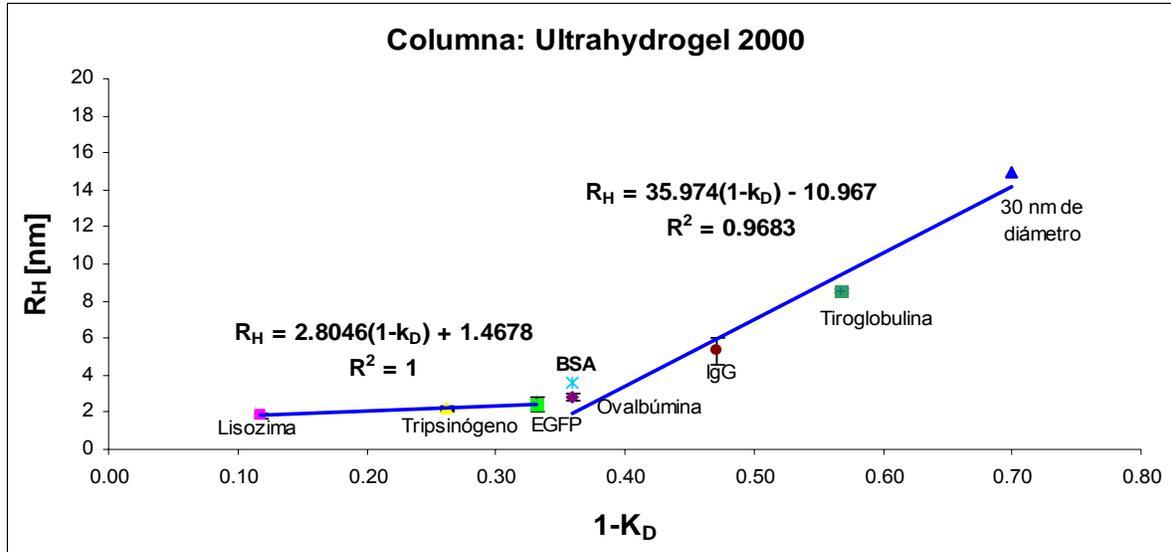


Figura 12. Curva de calibración para proteínas de radio hidrodinámico conocido en Ultrahydrogel 2000 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel. Lisozima, tripsinógeno, EGFP, ovalbúmina, IgG y tiroglobulina, y nanoesfera fluorescente “FluoSpheres” (15 nm de radio). Se muestra media entre número de inyecciones.

Por otra parte es claro que el radio de Stokes o R_H de la partícula inyectada no tiene una total dependencia lineal con respecto a su coeficiente de partición (k_D). Al menos dos zonas lineales se presentan en ambas columnas. Este comportamiento fue explicado por Harlan y colaboradores (1995) los cuales asumieron que la distribución de tamaño de poro de una columna de exclusión molecular (tanto analítica como preparativa) se puede describir por la suma de dos distribuciones Gaussianas.

6.2. Caracterización de las muestras del biofármaco por HPLC-GP.

Una vez caracterizada la columna Ultrahydrogel 500, se procedió analizar muestras de biofármacos de HBsAg purificado en Probiomed, aprobados y cuyo título en su capacidad de hemaglutinación es ≥ 12800 . El HBsAg analizado corresponde a los lotes VPPP 04019, 04020, 04026, 04027, 04029, 04030, 04036, 04037, 05001, 05002, 05003, 05014, 05015, 05016, 05017, 05018, 05019, 05020, 05021, 06005, 06007, 06011 y 06012. La **Figura 13** muestra los perfiles cromatográficos correspondientes a

cada uno de estos lotes. En todos los casos se inyectaron 50 μL de muestra y se identificaron e integraron por separado tres poblaciones principales (**Figura 14**), las cuales se muestran en la **Tabla 2**. Al analizar esta tabla no se observa una relación del tiempo o antigüedad del lote con respecto a la distribución de sus poblaciones, tampoco se encuentran tendencias o fluctuaciones no naturales al no presentarse valores que salgan fuera de 3 veces su desviación estándar.

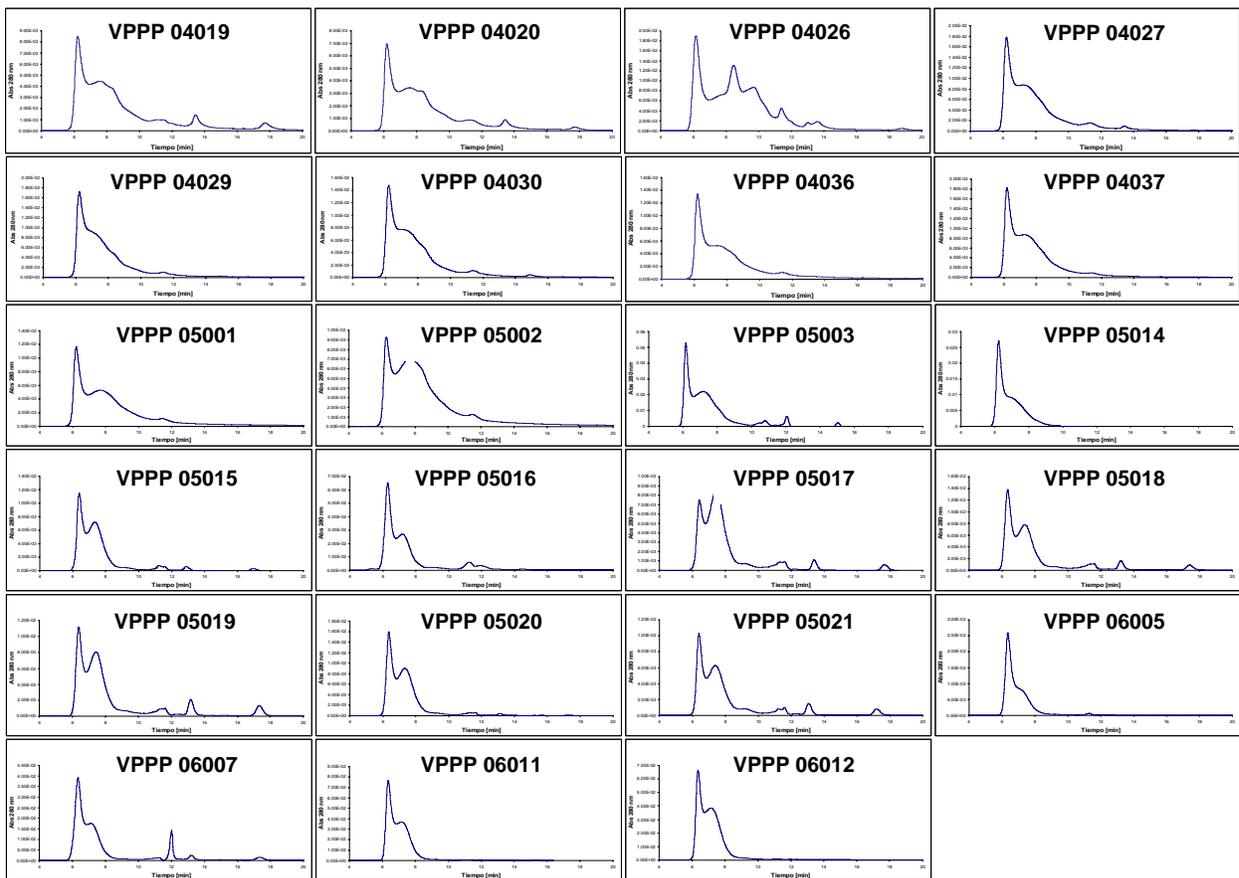


Figura 13. Perfiles cromatográficos del HBsAg (biofármaco) en HPLC-GP. Lotes: VPPP 04019, 04020, 04026, 04027, 04029, 04030, 04036, 04037, 05001, 05002, 05003, 05014, 05015, 05016, 05017, 05018, 05019, 05020, 05021, 06005, 06007, 06011 y 06012. Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel. Fosfato dibásico 10 mM como eluyente con un flujo de 0.9 mL/min; 50 μL de volumen de inyección.

Los tiempos de retención de estas poblaciones fueron 6.35 ± 0.08 (pico 1), 7.41 ± 0.15 (pico 2) y una fracción 3 más amplia (de 8 a 12 min), la cual suponemos en base análisis de SDS-PAGE y Western Blot, se trata de proteína mal ensamblada o degradada. El R_H de cada una de estas estructuras es determinado al interpolar su volumen de elución en la grafica obtenida de R_H versus $(1-K_D)$ de los estándares (**Figura 10**) tal y como se muestra en la **Tabla 3**.

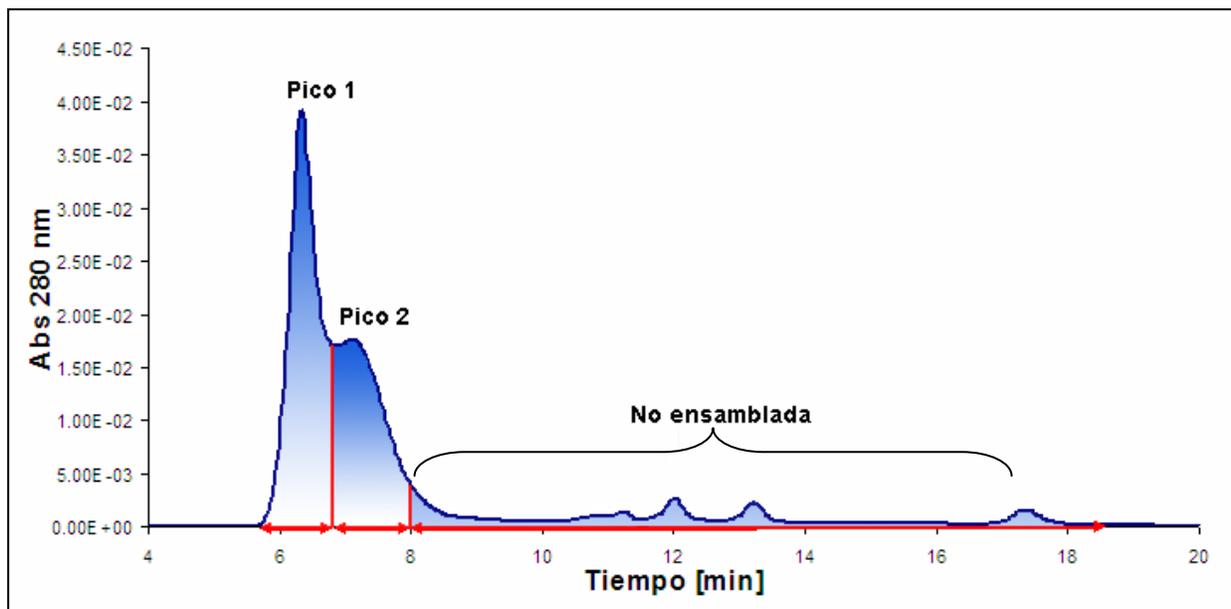


Figura 14. Perfil cromatográfico del biofármaco de HBsAg correspondiente al lote VPPP 04020 en donde se muestra el criterio de integración para las tres diferentes fracciones o picos. Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel. Fosfato dibásico 10 mM como eluyente con un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección.

Tabla 2. Proporción de proteína con base en su tiempo de elución. Pico 1, pico 2 proteína no ensamblada de las muestras de biofármaco.

Lote de biofármaco	% proteína "Pico 1"	% proteína "Pico 2"	% proteína no ensamblada
	Intervalo 5.9 a 6.8 min	Intervalo 6.8 a 8.0 min	Intervalo 8.0 a 12 min
VPPP 04019	30.80	50.70	18.50
VPPP 04020	28.80	54.70	16.50
VPPP 04026	19.90	58.00	22.10
VPPP 04027	35.70	54.50	9.80
VPPP 04029	36.40	57.50	6.10
VPPP 04030	37.50	54.80	7.70
VPPP 04036	19.96	24.69	55.35
VPPP 04037	38.90	57.80	3.30
VPPP 05001	34.30	59.60	6.10
VPPP 05002	21.90	70.20	7.90
VPPP 05003	29.91	40.31	29.78
VPPP 05014	48.00	39.70	12.30
VPPP 05015	35.56	50.70	13.74
VPPP 05016	31.17	49.07	19.76
VPPP 05017	24.17	57.76	18.07
VPPP 05018	38.36	44.79	16.85
VPPP 05019	31.4	48.69	19.91
VPPP 05020	40.36	50.68	8.96
VPPP 05021	32.19	47.79	20.02
VPPP 05021	32.19	47.79	20.02
VPPP 06005	59.02	36.53	4.45
VPPP 06007	49.1	39.96	10.94
VPPP 06011	49.76	48.55	1.69
VPPP 06012	43.52	52.48	4
Promedio	35.50	49.97	14.51
Desv. Est.	9.99	6.08	7.94

Tabla 3. Radio y diámetro hidrodinámico de las tres diferentes estructuras o picos resultantes de la interpolación de su volumen de elución en la gráfica de R_H y $(1-K_D)$, utilizando la columna Ultrahydrogel 500.

Pico	Tiempo (min)	R_H (nm)	Diámetro (nm)
1	6.35 ± 0.08	14.84 ± 0.30	29.68 ± 0.60
2	7.41 ± 0.15	10.73 ± 0.59	21.46 ± 1.18
no ensamblada	8 - 12	2 - 7.5	2.68 - 15.65

De la misma forma se inyectaron muestras de HBsAg purificado a la columna Ultrahydrogel 2000, encontrando una menor eficiencia y resolución al obtener prácticamente un solo pico muy amplio con un tiempo de retención de 10.5 ± 0.3 min (**Figura 15**), cuyas partículas corresponderían a esferas de 30 ± 5.3 nm de diámetro según la curva de calibración de la **Figura 12**.

Al comparar los resultados de R_H de ambas columnas estos muestran ser muy similares (29.7, 21.5 y 30 nm), estando todos dentro de lo reportado en la literatura. Sin embargo, es evidente por los perfiles cromatográficos de la Ultrahydrogel 500 que en la muestra se encuentran dos principales poblaciones (29 y 21 nm de radio), mientras que la Ultrahydrogel 2000 sugiera una mayor polidispersión al presentar un pico con una amplia distribución.

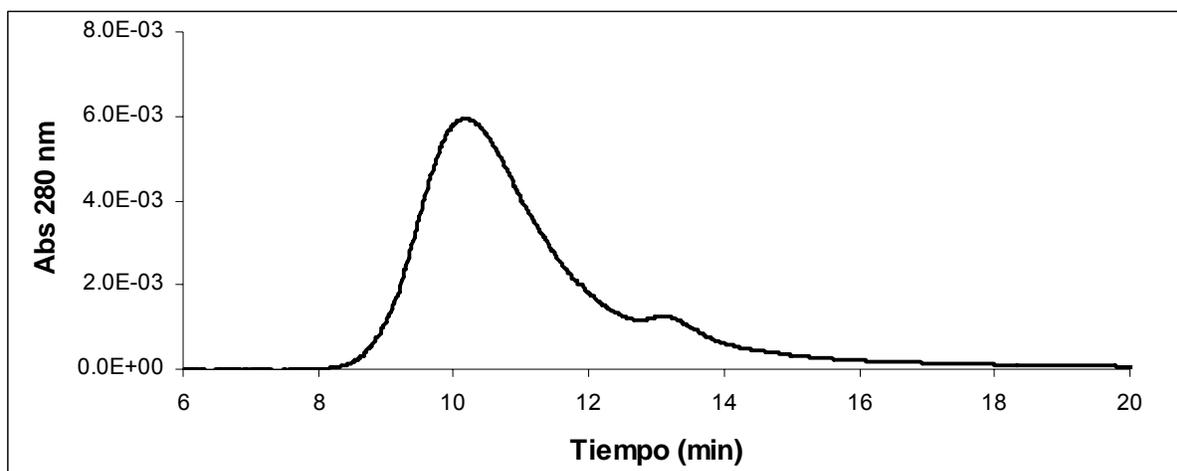


Figura 15. Análisis cromatográfico del HBsAg en HPLC-GP empleando una columna Ultrahydrogel 2000. guarda-columna Ultrahydrogel. Fosfato dibásico 10 mM como eluyente con un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección.

6.3. Determinación del diámetro del HBsAg por Dispersión Dinámica de Luz.

La determinación del diámetro de partícula del HBsAg por DLS, se realizó por medio del análisis de muestras compuesta tanto por el pico 1 como por el pico 2 de HBsAg. Dicho análisis proporciona una curva que presenta la distribución de partículas (diámetros) con respecto a su porcentaje (**Figura 16**), encontrando partículas desde 14 a 122 nm. No obstante a este amplio intervalo, más del 90 % de la población se encuentra entre los 20 y 80 nm de diámetro siendo la de 21 nm la más representativa con un 18%. De esta forma se confirma lo ya encontrado con el análisis por HPLC-GP, donde el HBsAg está presente como una macro estructura constituida por varios tamaños que van principalmente desde los 19 a los 30 nm de diámetro los cuales están dentro de lo reportado en la literatura.

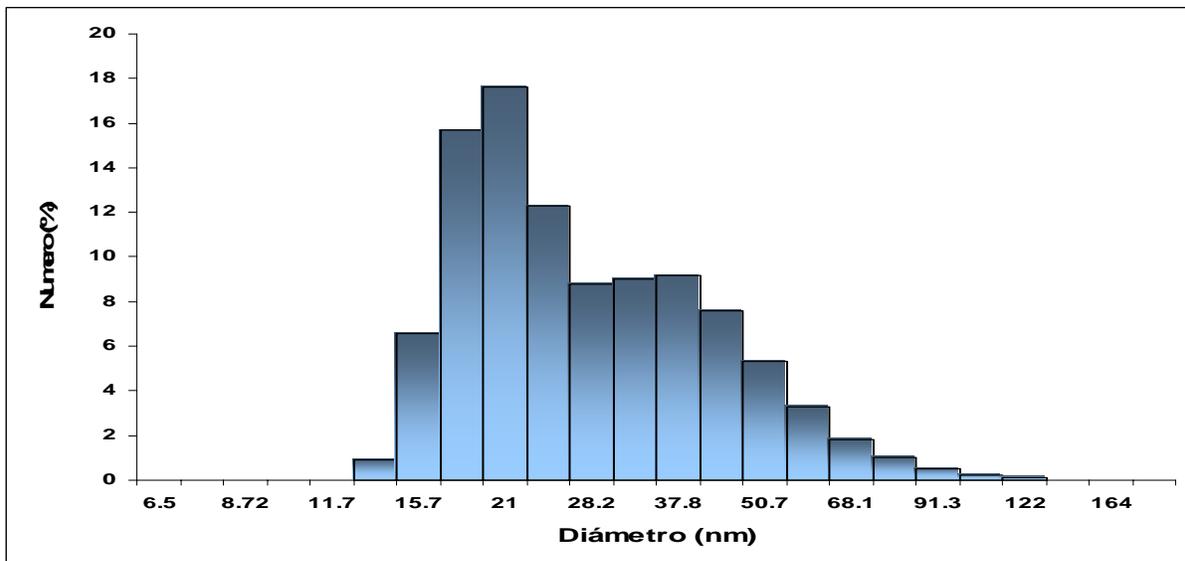


Figura 16. Análisis del HBsAg por dispersión dinámica de luz.

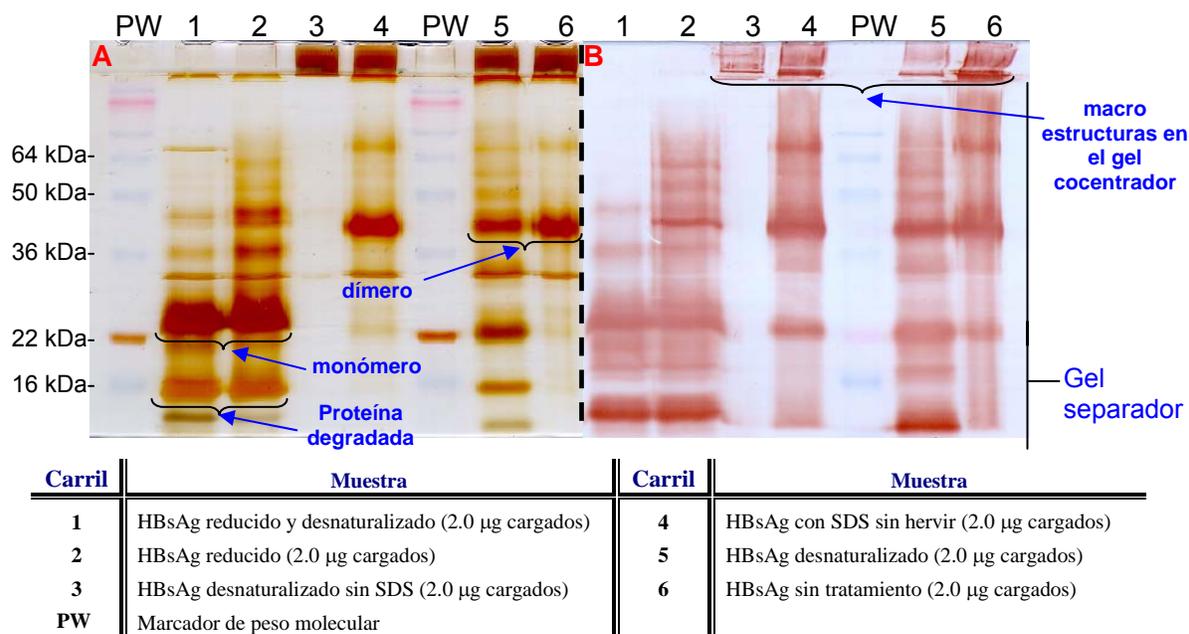
Por lo tanto, es posible concluir que el HBsAg presenta una gran heterogeneidad en términos de tamaños de partículas ensambladas (polidispersión). Reportes anteriores

han demostrado que tal polidispersión depende en muchos casos del organismo recombinante en el que es expresada la proteína, el tipo de fermentación y del proceso de purificación (Hardy et al., 2000; Tleugabulova et al., 1998b, 1999a; Zhou et al., en prensa). Todos estos factores influyen en el número de monómeros que constituyen a la partícula y por lo tanto en su tamaño.

A pesar de que las partículas de HBsAg están compuestas por el mismo monómero (en este caso proteína S), la heterogeneidad de su tamaño se ve reflejada en su tiempo de elución de la cromatografía de exclusión molecular. Y como se vera más adelante, cambios en el tiempo de elución son acompañados por cambios en la capacidad de hemaglutinación específica, expresada por la relación $[\text{HBsAg}]_{\text{PHA}}/[\text{HBsAg}]_{\text{Bradford}}$, donde $[\text{HBsAg}]_{\text{PHA}}$ es el título obtenido en la prueba de hemaglutinación pasiva y $[\text{HBsAg}]_{\text{Bradford}}$ es la concentración de proteína total contenida en cada fracción.

Con la finalidad de verificar la pureza, peso molecular e identidad del HBsAg se tomaron alícuotas de HBsAg purificado. De estas: una parte fue tratada con buffer de carga no reductor (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol) y calentada a temperatura de ebullición por 10 minutos, otra parte fue tratada con el mismo buffer pero no se calentó y otra parte fue tratada con buffer de carga reductor (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercapto-etanol). Todas las alícuotas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y Western Blot (**Figura 17A y B**). En todos los casos se observa claramente una banda alrededor de los 30 kDa no reconocida por el Western Blot (**Figura 17B**), la cual fue separada para su identificación de proteínas por espectrometría de masas Sin embargo, los resultados no permitieron o fueron suficientes para su identificación. Es posible que dicha banda contenga varias proteínas de mismo peso molecular, las cuales dificulten su identificación, por lo que se recomienda un gel en dos dimensiones para confirmar esta hipótesis.

Al someter al HBsAg a condiciones reductoras y desnaturalizantes (carril 1 y 2 de la **Figura 17A**) se detectó una proteína de peso molecular similar a la reportada para el monómero (banda con mayor intensidad a los 22 kDa) y otra con un peso que correspondería al dímero (40 kDa, carril 2, 4, 5 y 6) cuyas identidades fueron confirmadas por Western Blot (**Figura 17B**). La misma muestra al tratarla en condiciones desnaturalizantes (detergente SDS y calentada por 10 minutos) presentó una considerable disminución en la intensidad de la banda correspondiente al monómero, un aumento en la correspondiente al dímero y se detectó proteína retenida en el gel concentrador (carril 5), mientras que la muestra que solo fue expuesta al detergente SDS sin hervir, presenta una intensa banda alrededor de los 40 kDa, y más proteína retenida en el gel concentrador (carril 4). En todos los casos en que las muestras no fueron reducidas con 2-mercapto-etanol (carriles 3, 4, 5 y 6), una buena parte de la proteína fue retenida en el gel concentrador, señal de que la o las proteínas se encuentran en un estado en el que su tamaño es demasiado grande para que estas puedan penetrar en el gel separador. Además, se observan estructuras que corresponderían al HBsAg en la forma de tetrámero, dímero y monómero reconocidos por el Western Blot, los cuales posiblemente al estar en un medio o solvente polar se asocian por medio de interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas, creando estructuras o agregados. Estas estructuras con tamaños diversos ocasionan el ensanchamiento de los picos cromatográficos y gran variedad de tamaños que se observan en el análisis de “DLS”.

Figura 17. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida del HBsAg (biofármaco) con diferentes

tratamientos. Condiciones reductoras: 10% 2-mercapto-etanol, 4% SDS. Condiciones desnaturalizantes: 4% SDS, hervido por 10 min. (B) Confirmación de la identidad de las bandas por medio de su Western blot.

Se procedió a la inyección repetida de una muestra de HBsAg tratada en condiciones desnaturalizantes al HPLC-GP con base en que en el carril 5 de la **Figura 17** es el que mejor y más definidas bandas presentó, por lo que esperábamos observar y caracterizar diferentes formas del HBsAg (monómero, dímero, trímero). De estas corridas se recolectaron por separado los picos denominados I, II, III y IV (**Figura 18**) para su reanálisis en HPLC-GP, SDS-PAGE y así determinar la posición de las diferentes formas del HBsAg (monomero, dímero, trímero, etc.). Con base en su tiempo de elución, el pico III y IV corresponderían a estructuras de muy bajo peso molecular (≤ 15 kDa) con un R_H menor a los 3 nm. El pico II presenta un R_H de aproximadamente 15 nm. Lamentablemente los resultados obtenidos al someter estos picos a SDS -PAGE en condiciones desnaturalizantes (**Figura 19**) no confirman ni permiten determinar si dichos picos corresponden a las diferentes formas del HBsAg al no presentar bandas a los 22 nm 40 kDa. Es posible que algunas formas sean muy

inestables o poco solubles, por lo que tiendan a agregarse de forma espontánea al poco tiempo después de ser colectadas, tal y como se observa en la **Figura 20** la cual corresponde al perfil cromatográfico del pico II de la **Figura 18** a las 24 horas de haber sido colectado. En dicho perfil se observa claramente la presencia de un pico a los 6.1 minutos el cual está fuera del límite de exclusión de la columna y correspondería a una estructura de mas de 100 nm de diámetro.

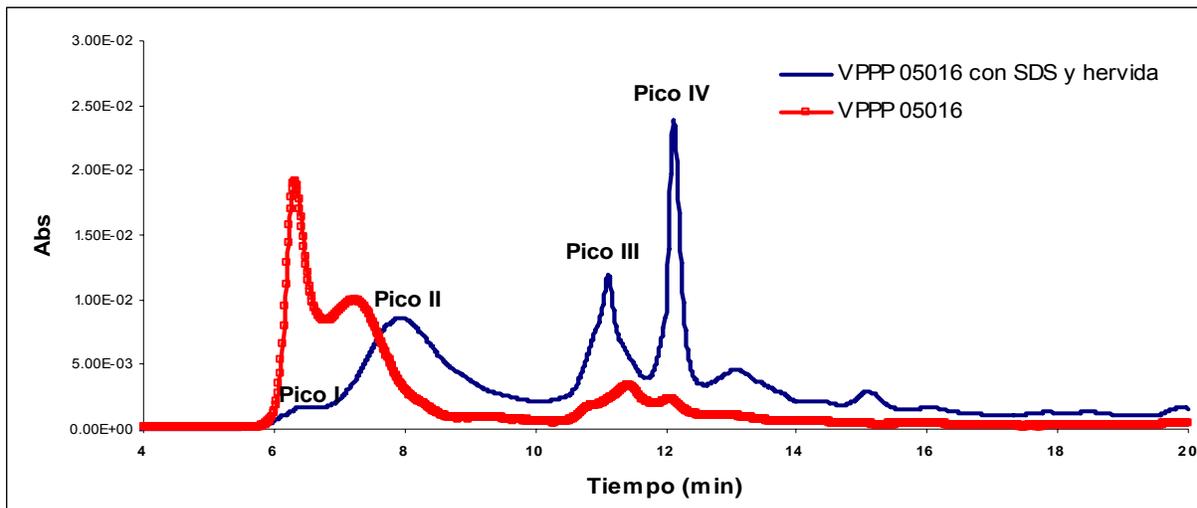


Figura 18. Perfil cromatográfico del HBsAg lote VPPP 05016, tratado con SDS y hervido por diez minutos (línea azul fuerte) y misma muestra sin tratar utilizada como control (línea azul claro). Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7.8 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm, fosfato dibásico 10 mM como eluyente con un flujo de 0.9 mL/min; 50 μ L de volumen de inyección.

Carril	Muestra
1	Marcador de peso molecular
2	VPPP05016 estándar reducido
3	Albúmina
4	-----
5	VPPP05016 Pico I
6	-----
7	VPPP05016 Pico II
8	VPPP05016 Pico III
9	VPPP05016 Pico IV
10	Marcador de peso molecular

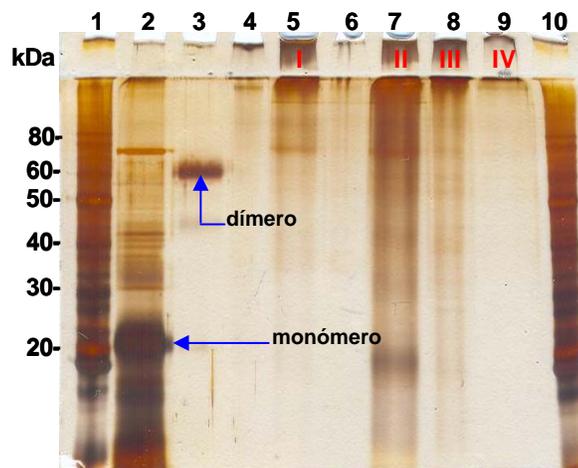


Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los diferentes picos I, II, III y IV, obtenidos de la muestra de HBsAg lote VPPP 05016 tratada con SDS y hervida por 10 minutos. Condiciones descritas arriba.

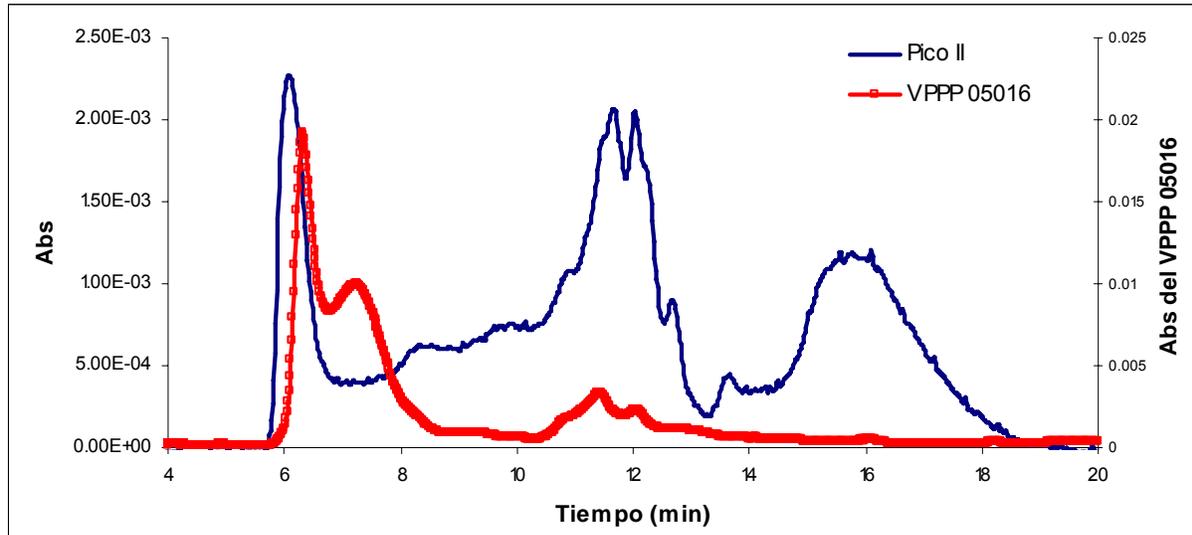


Figura 20. Perfil cromatográfico del pico II después de 24 horas de ser colectado, correspondiente a la muestra de HBsAg tratada con SDS y hervida por 10 minutos (línea naranja). Muestra del HBsAg lote VPPP05016 utilizada como control (línea azul).

6.4. Caracterización del HBsAg durante el proceso de purificación.

Observando el perfil cromatográfico de cada una de las etapas que conllevan a la purificación industrial a partir de la etapa de ruptura celular (RC), se puede determinar el cambio en la proporción del HBsAg con respecto a los demás contaminantes en cada etapa de purificación: precipitación ácida (PA), intercambio iónico (II), ultracentrifugación (UC) y cromatografía de filtración en gel (SEC) y de esta forma estimar a *grosso modo* la cantidad de HBsAg en cada etapa de purificación. En la **Figura 21A**, la línea punteada en azul, representa a grandes rasgos el proceso de purificación del HBsAg. En la misma figura pero en línea punteada naranja se ilustra la

inyección por separado de una muestra representativa de cada una de las etapas de purificación al sistema HPLC-GP para la cuantificación de HBsAg. En la **Figura 22** se muestran los perfiles cromatográficos típicos de cada etapa de purificación (rompimiento celular, precipitación ácida, intercambio iónico, ultracentrifugación y exclusión molecular). Con esta información, además de los resultados de contenido de lípidos y carbohidratos, podemos evaluar el actual proceso de purificación. Para realizar esto se analizaron tres lotes de producción. En todos los casos se inyectaron 50 μL de muestra a la columna Ultrahydrogel 500 en las condiciones ya mencionadas. Se identificaron e integraron por separado los diferentes picos (en este caso se consideró la suma de los picos 1 y 2 como el contenido total de HBsAg en la etapa) y proteína no ensamblada. Además, se analizó la distribución de tamaños del HBsAg en la última etapa de purificación por medio de la inyección de diferentes fracciones producidas durante la etapa de exclusión en gel (fracciones 10, 24, 35 y un “pool” de las fracciones 4 a la 35). Finalmente y solo con fines comparativos se inyectó el HBsAg purificado (biofármaco), correspondiente al lote de producción anterior (VPPP 05003), en el que se aprecia claramente el perfil de un lote típico de producción.

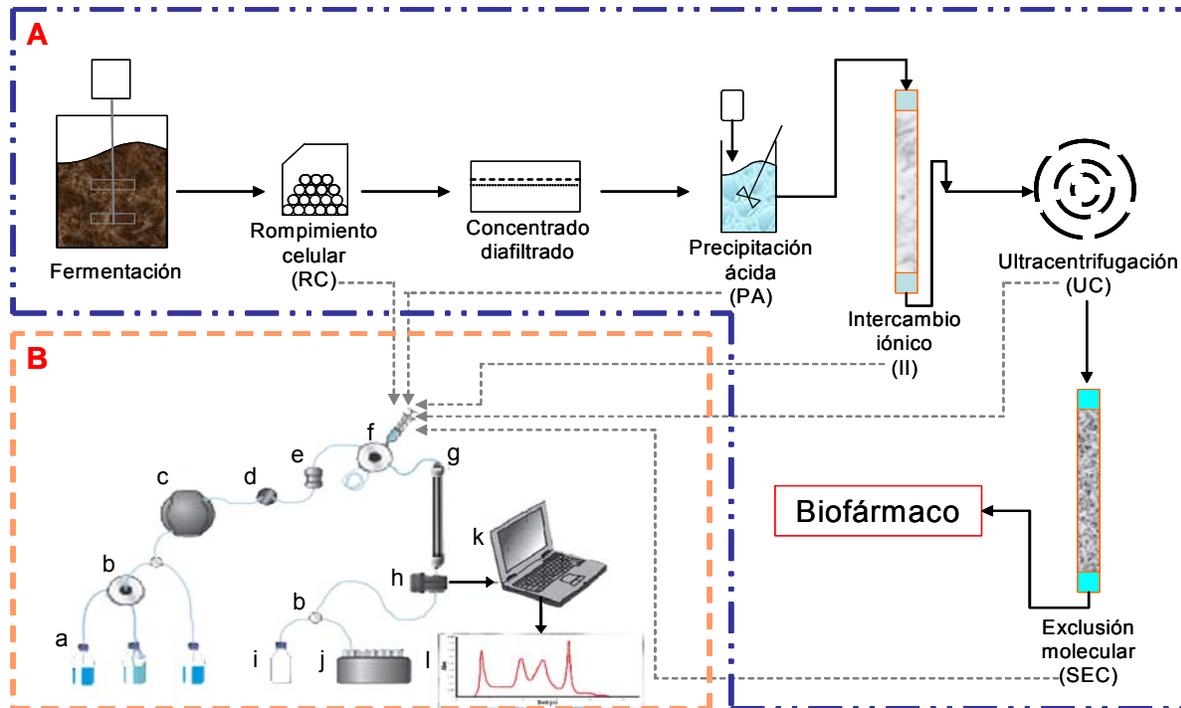


Figura 21. Diagrama de proceso para la purificación del HBsAg (A). Esquema general del sistema HPLC-GP: a) reservorio para buffer, b) válvulas, c) sistema de bombeo, d) sensor de presión, e) mezclador, f) sistema de inyección, g) columna Ultrahydrogel 500, h) detector de UV, i) vertedero, j) colector de fracciones, k) unidad de procesamiento de datos y l) cromatograma (B). En cada etapa de purificación se inyectó una muestra a la columna Ultrahydrogel 500 para la cuantificación del HBsAg con base en su tiempo de elución.

La pureza del HBsAg se define como la fracción de HBsAg ensamblado en partículas de 21 a 30 nm con respecto a la cantidad de proteína total. En una etapa temprana de la purificación (ruptura celular), la preparación de HBsAg se encuentra asociada con una gran cantidad de proteína intracelular, célula completas, ácidos nucleicos y material insoluble junto con otros contaminantes tales como carbohidratos y lípidos los cuales deben ser removidos para alcanzar las especificaciones del producto final. El seguimiento del grado de remoción de estos contaminantes es de suma importancia para alcanzar los requerimientos mínimos de calidad que marca la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la producción de vacunas de hepatitis B por técnicas de ADN recombinante (OMS., 1989).

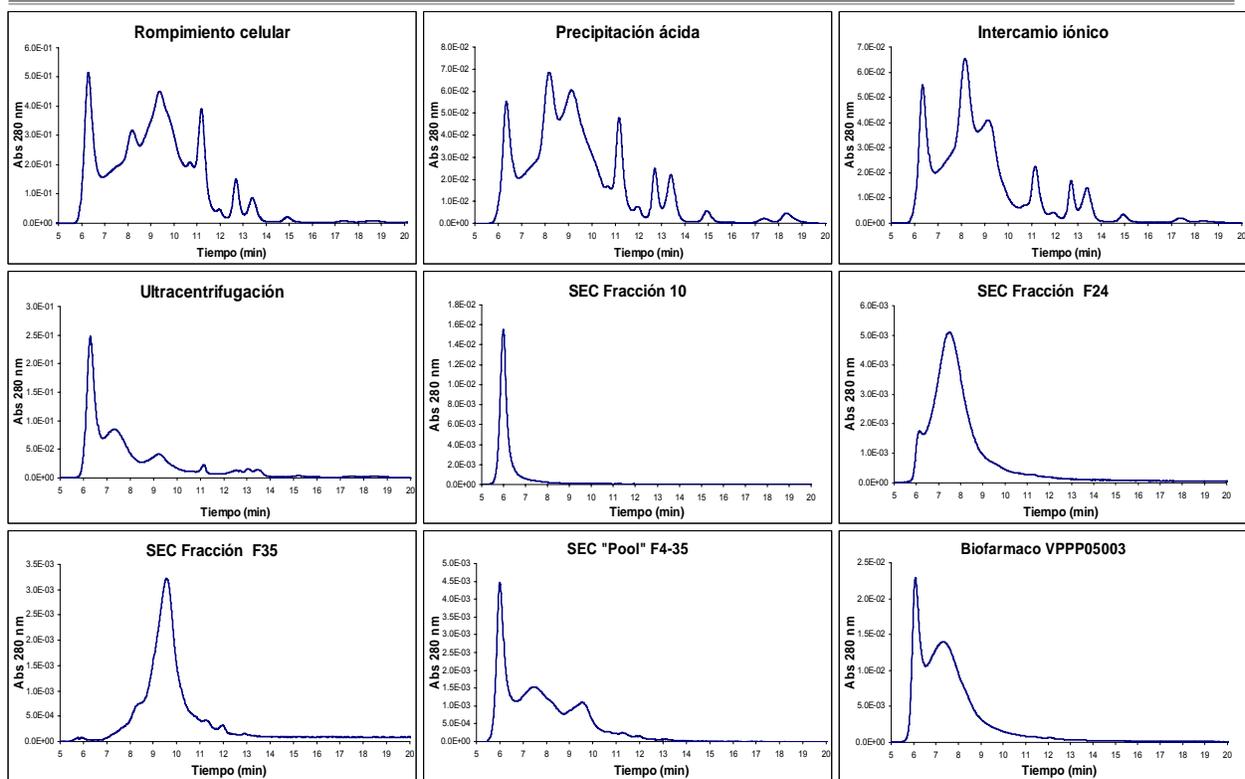


Figura 22. Perfiles cromatográficos de cada una de las etapas de purificación del HBsAg. (A) rompimiento celular. (B) precipitación ácida. (C) intercambio iónico. (D) ultracentrifugación. (E) cromatografía de exclusión en gel (SEC) correspondiente a la fracción 10. (F) SEC correspondiente a la fracción 24. (G) SEC correspondiente a la fracción 35. (H) SEC correspondiente al “pool” fracciones 4-35. (I) biofármaco de HBsAg. En todos los casos se inyectaron 50 μ L de muestra en las condiciones ya descritas.

La eliminación de estos contaminantes (proteína, carbohidratos y lípidos) empleando el proceso de purificación mostrado en la **Figura 21** es de más del 99% para el caso de proteínas y lípidos contaminantes y de 95% para los carbohidratos (**Tabla 4**). Si comparamos estos valores con los reportados por Hardy y colaboradores (2000), los cuales también emplean la precipitación ácida como primera etapa de purificación después de la ruptura celular y cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel como penúltima y última etapa en la purificación del HBsAg, encontramos un grado de remoción muy similar de proteínas y carbohidratos contaminantes de 85 y 31% respectivamente, en la etapa de PA. Sin embargo, la eliminación de lípidos es 4.5 veces menor. Esto puede deberse a variaciones en el pH alcanzado durante la precipitación el cual, como se verá más adelante es de suma importancia para la

estabilidad de nuestra partícula. En el caso de la etapa de intercambio iónico se observan mayores variaciones en el porcentaje de eliminación. Al llegar a este punto Hardy ya reporta un grado de remoción de más del 99% para los tres contaminantes. Sin embargo, hay que mencionar que ellos utilizan dos etapas intermedias de cromatografía con tierra de diatomeas y otra de afinidad, por lo que al llegar a intercambio iónico la pureza del HBsAg es sumamente alta. No obstante la cantidad total de contaminantes removidos al final de nuestro proceso alcanza los mismos niveles, con la ventaja de utilizar menos etapas las cuales tienen un gran impacto en el tiempo y costo del proceso.

Tabla 4. Cantidad y por ciento de remoción de contaminantes a través de las etapas de purificación.

Etapa	Proteína contaminante [g]	Remoción %	Carbohidratos [g]	Remoción %	Lípidos [g]	Remoción %
RC	394.9 ± 111.5	0.0	206.7 ± 120.2	0.0	4500.0 ± 1484.6	0.0
PA	84.0 ± 21.4	77.9 ± 5.9	137.0 ± 91.0	35.2 ± 13.0	724.0 ± 131.4	83.3 ± 3.1
II	58.5 ± 19.7	84.7 ± 5.1	101.9 ± 74.4	53.2 ± 6.6	451.5 ± 287.7	90.1 ± 6.4
UC	6.6 ± 2.5	98.0 ± 1.1	32.6 ± 14.1	83.3 ± 4.8	110.2 ± 40.3	97.2 ± 1.8
SEC	0.4 ± 0.1	99.9 ± 0.1	11.9 ± 11.5	95.0 ± 2.0	5.3 ± 1.2	99.9 ± 0.0

Los valores presentados en esta tabla corresponden al promedio de cuatro lotes típicos de producción, donde la cantidad de proteína contaminante se calculó por la diferencia de la proteína total en cada etapa menos la proteína correspondiente al porcentaje de área del HBsAg en el perfil cromatográfico de dicha etapa: RC, ruptura celular; PA, precipitación ácida; II, intercambio iónico; UC, ultra centrifugación; SEC, cromatografía de filtración en gel.

Finalmente el factor de purificación, el rendimiento del HBsAg después de cada etapa de purificación y global se muestra en la **Tabla 5**, en el caso de la etapa de intercambio iónico, donde el rendimiento resultó ser más del 100 %. Esto puede deberse a una alta interacción inespecífica de la resina con el HBsAg lo que podría provocar el ensamblaje de HBsAg anteriormente no ensamblado o la eliminación de algún compuesto que evitara el ensamblaje del HBsAg. Por otra parte la resina de intercambio iónico está constituida por una cierta cantidad de ligandos en la superficie del soporte (densidad del ligando), los cuales interaccionan tanto con las partículas ensambladas como con los monómeros, dímeros, oligómeros, etc. Un aumento en la

concentración de proteína durante la adsorción y posteriormente su elución puede ocasionar agregación entre los monómeros y/ o dímeros, aumentando de forma aparente la población de partículas bien ensambladas y por lo tanto, la cantidad de partículas de HBsAg es mayor que con la que se comenzó.

Ya que el rendimiento global de un proceso de purificación disminuye exponencialmente en función del número de pasos de purificación (Hearn y Anspach, 2001), se tiene que de manera general:

$$RG = \left[\left(\frac{RPP}{100} \right)^{PP} \right] * 100$$

donde: RG = Rendimiento global.
 RPP = Rendimiento promedio del proceso.
 PP = Pasos de purificación.

Si consideramos el rendimiento global de nuestro proceso actual de 2% con 4 etapas de purificación, encontramos que la etapa de intercambio iónico tendría un rendimiento de 66.9% el cual resulta adecuado para este tipo de operación unitaria.

La etapa que presenta un menor rendimiento es la precipitación ácida con solo un 13%. Este bajo rendimiento puede ser un indicativo del elevado grado de remoción de lípidos en esta etapa. Recordemos que la partícula antigénica de HBsAg esta asociada con lípidos en proporciones desde 0.5 hasta 1.8 mg de lípido por mg de proteína (Gavilanes *et al.*, 1982; Diminsky *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 2002). Una mejora en este punto de por ejemplo un 43% el cual es reportado por Hardy para esta etapa, repercutirá en un 4.6 % de recuperación global, lo cual significaría que con solo la mitad de materia prima (extracto) se podría purificar la misma cantidad de HBsAg que con el rendimiento actual.

Tabla 5. Masa, factor de pureza, rendimientos global y después de cada etapa en la recuperación y purificación del HBsAg.

Etapa	HBsAg [g]	% recuperación por etapa	% recuperación global	Factor de pureza
Extracto	234.6 ± 8.4	100	100	1
PA	30.5 ± 6.7	13.0 ± 2.8	13.0 ± 2.8	0.7 ± 0.1
II	36.9 ± 11.1	120.5 ± 21.9	15.7 ± 4.7	1.0 ± 0.2
UC	9.9 ± 2.6	25.5 ± 1.9	4.2 ± 1.2	1.5 ± 0.5
SEC	4.7 ± 0.6	50.4 ± 17.6	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.2

La cantidad de HBsAg corresponde al porcentaje de área en el perfil cromatográfico de dicha etapa multiplicado por la concentración de proteína total: RC, ruptura celular; PA, precipitación ácida; II, intercambio iónico; UC, ultracentrifugación; SEC, cromatografía de filtración en gel.

Las **Figuras 23** y **24** muestran el grado de remoción de carbohidratos y lípidos, en donde para el caso de los lípidos la etapa más importante para su eliminación (hasta un 86 %) es la de precipitación ácida, aumentando en un 13% en la última etapa (SEC). Para el caso de los carbohidratos, estos se van eliminando aproximadamente en un 25 % en cada etapa del proceso.

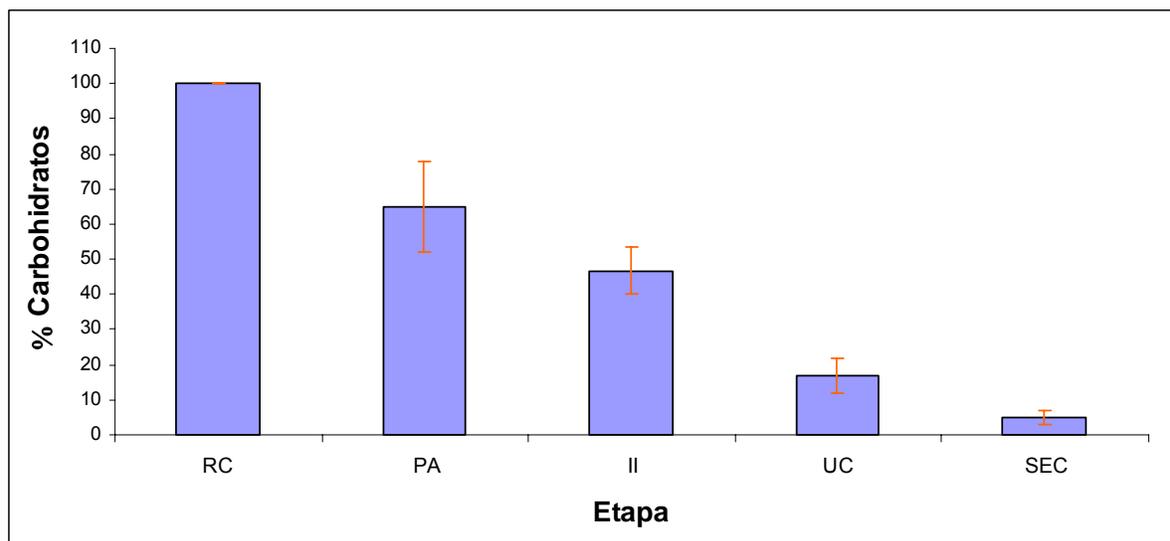


Figura 23. Remoción de carbohidratos a través de cada etapa en el proceso de purificación. RC, ruptura celular; PA, precipitación ácida; II, intercambio iónico; UC, ultracentrifugación; SEC, cromatografía de filtración en gel.

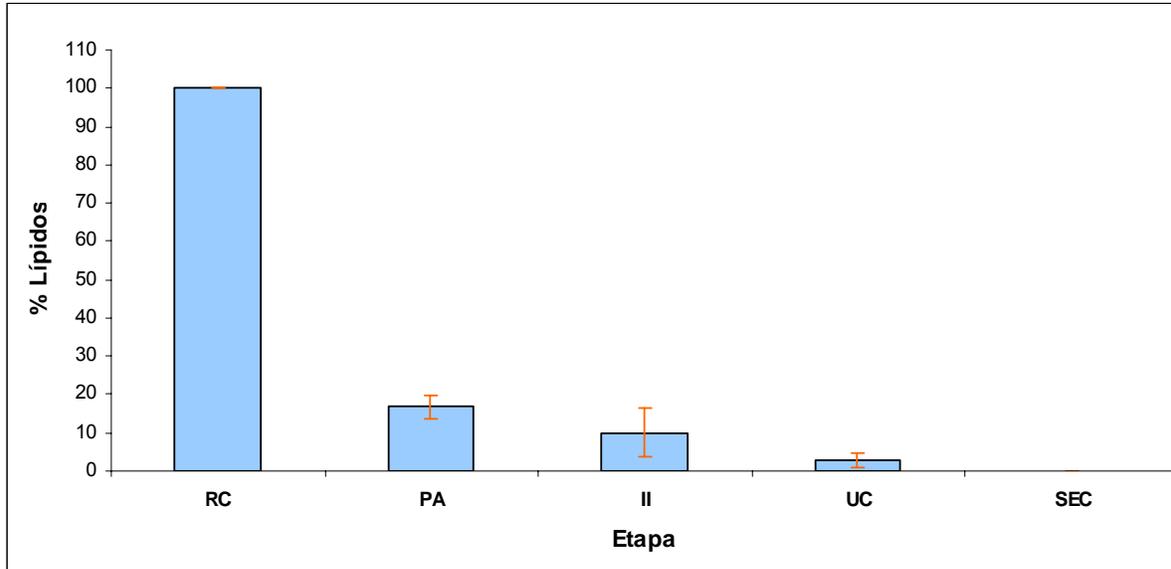


Figura 24. Remoción de lípidos a través de cada etapa en el proceso de purificación. RC, ruptura celular; PA, precipitación ácida; II, intercambio iónico; UC, ultra centrifugación; SEC, cromatografía de filtración en gel fracción.

6.5. Purificación del HBsAg sin el empleo de la ultracentrifugación.

6.5.1. Cromatografía preparativa de filtración en gel.

La purificación de virus o de seudopartículas virales ha sido en el pasado casi exclusivamente dependiente de la ultracentrifugación en gradientes de densidad. Similarmente, preparaciones a partir de estos virus (componentes subvirales) han dependido en gran medida de esta técnica. Además, la cromatografía de afinidad y la cromatografía de intercambio iónico han sido también empleadas para la purificación de partículas virales (Crooks et al., 1986; Huang et al., en prensa). Sin embargo, y a pesar de que estas técnicas han sido empleadas con éxito en el pasado, se sabe que estas tienen varias desventajas que imposibilitan su uso en muchas ocasiones. La centrifugación con gradientes de densidad frecuentemente produce partículas deformadas y agregadas, posiblemente debido a la sobre concentración, deshidratación y exposición a altas fuerzas iónicas a las que son sometidas las

partículas virales. Esta técnica también requiere del uso de máquinas capaces de generar altos valores de g (fuerza de gravedad relativa), además de que la contención de virus patógenos en estos sistemas con poca instrumentación es difícil y costosa (Rolland et al., 2001). Por otra parte se ha reportado que el uso de esta técnica produce preparaciones con una considerable cantidad de contaminantes de tipo protéico las cuales pueden agregarse durante el proceso de ultracentrifugación causando una sobre estimación en la cantidad de partículas bien ensambladas. Este factor puede también variar de lote en lote y complicar la comparación de resultados (Gao *et al* 2000; 2001; Mena *et al.*, 2005).

La introducción y desarrollo de matrices o geles de exclusión molecular capaces de diferenciar una gran variedad de moléculas biológicas con base en su tamaño, ha permitido la purificación de virus y partículas virales por métodos cromatográficos (Crooks et al., 1986; Rolland et al., 2001; Sato *et al.*, 1990; Tleugabulova ., 1998; Trudel et al., 1981). Esta técnica no requiere el empleo de complicados protocolos además de ser fácil de escalar. Virus y subpartículas pueden ser purificados con una reducción en el tiempo total de producción (Auricchio *et al.*,2001).

Con el fin de observar la factibilidad de utilizar la cromatografía preparativa de exclusión molecular (**Figura 25**), eliminando de esta forma la etapa de ultracentrifugación con gradientes de densidad, se utilizó primero una columna XK 16/70 de Pharmacia, empacada con la resina Sephacryl S-500 (tamaño de partícula de 50 μm , tamaño de poro de 50 nm, intervalo de exclusión 4×10^4 - 2×10^7 Da), altura de cama de 45 cm, montada en el sistema cromatográfico ÄKTA explorer (Amersham Biosciences).

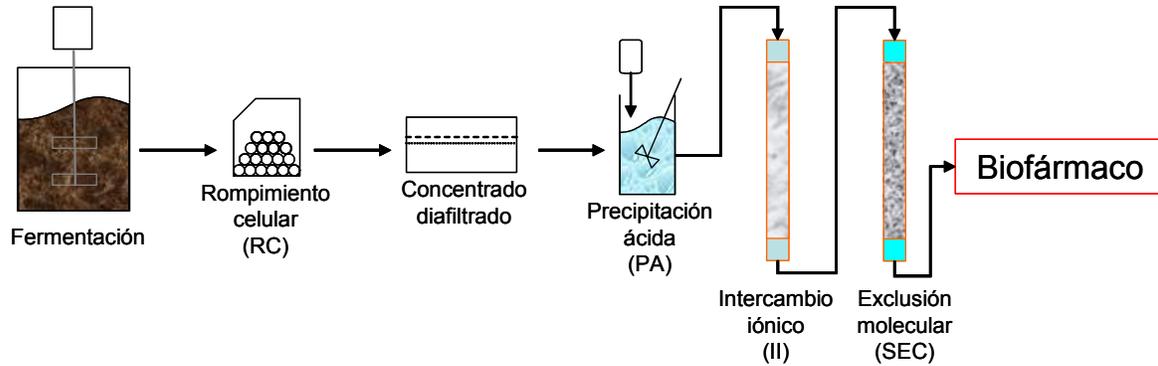


Figure 25. Diagrama de proceso para la purificación del HBsAg sin el empleo de la ultracentrifugación con gradiente de densidad.

Para comprobar la calidad del empaque y funcionamiento de la columna, la eficacia de la columna fue probada inmediatamente después del empaque, a intervalos regulares y cuando el funcionamiento de la separación se vio deteriorada. El mejor método de expresar la eficacia de una columna empacada está en términos de la altura equivalente del plato teórico (*HETP*) y por el factor máximo de asimetría (*As*). Es de suma importancia para el cálculo de *HETP* y *As* que las condiciones de corrida se mantengan constantes, de modo que los resultados sean comparables. Cambios en el soluto, solvente, eluyente, volumen de la muestra, empaque de la columna, distribución de tamaños de partículas en la columna, flujo, temperatura, etc., influyen en los resultados de *HETP* y *As*, por lo que deben por tanto ser utilizados como valores de referencia solamente (Amersham Biosciences. 71500242., 1996; Pápai *et al.*, 2002).

HETP y *As* fueron determinados por medio de las ecuaciones:

$$HETP = \frac{L}{N}$$

$$N = 5.54 \left(\frac{V_e}{W_h} \right)^2$$

$$As = \frac{b}{a}$$

Donde:

$HETP$ = altura equivalente del plato teórico por sus siglas en inglés (mm)

L = altura de la cama (mm)

N = número de platos teóricos

V_e = distancia del punto de inyección al pico máximo (mm)

W_h = ancho del pico a la mitad de su altura (mm)

a = ancho de la primera mitad del pico a un 10 % de su altura (mm)

b = ancho de la segunda mitad del pico a un 10 % de su altura (mm)

A partir de una curva de conductividad (**Figura 26**) obtenida por la inyección de una solución de NaCl 2.0 M, de un volumen de 2.5 % el volumen de columna, a un flujo lineal de 0.5 mL/cm se determinó un valor de asimetría de 1.37 y 470 platos teóricos con una altura equivalente de 0.95 mm cada uno.

El factor que describe la forma del pico cromatográfico es As . La teoría asume una forma Gaussiana y que el pico sea simétrico, por lo que As debe ser tan cercano como sea posible a 1 (los valores entre 0.8-1.5 son generalmente aceptables). Un cambio en la forma del pico es generalmente la primera indicación de un mal empaque o deterioro de la cama debido al uso (Amersham Biosciences 71500242., 1996). Valores de $As < 1$ puede deberse a la formación de canales durante el empaque o a un sobre empaque (empacado con alta presión o flujo). $As > 1$ puede indicar una perturbación de la resina en la parte superior de la cama durante la inyección de la muestra o puede deberse a un mal empackado de la columna (empacado con muy baja presión o flujo). Para ambos casos, es recomendable reempacar la columna y determinar nuevamente As . El intervalo de aceptación de As dependerá por lo tanto del método de validación utilizado para cada proceso en particular (Amersham Biosciences 18102218., 2002).

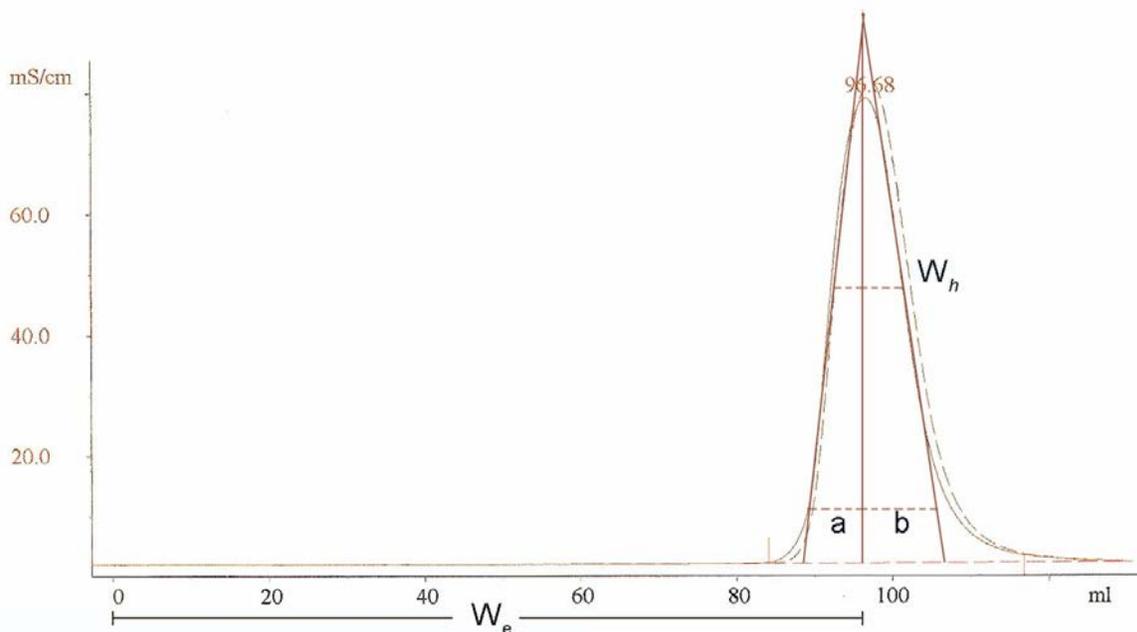


Figura 26. Trazo de la conductividad (mS/cm) para la prueba de asimetría y determinación del número de platos teóricos de la resina Sephadryl S-500.

La eficiencia de la columna es sumamente dependiente del empaque de la columna. Este parámetro puede ser medido mediante la determinación de la *HETP*, el cual es igual a la altura de la columna entre el número de platos teóricos (N).

N debe ser tan alto como sea posible. Un valor típico reportado para Sephadryl High Resolution es de 0.15 mm. Una columna mal empacada dará lugar a un flujo irregular, ensanchamiento del pico y a la pérdida de resolución⁷. Entre más ancho sea el pico del cromatograma, N será más pequeño y por lo tanto *HETP* más grande, y viceversa. Consecuentemente, la *HETP* es una medida de la amplitud de un pico cromatográfico (eficiencia de la columna). Entre menor sea la *HETP*, mayor eficiencia de la columna (Tejeda *et al.*, 1995).

La resolución de la resina es afectada por el flujo, eficiencia de la columna y altura de la cama. Flujos muy altos disminuyen la resolución. El flujo en el cual se obtiene la eficacia óptima es dependiente del peso molecular de la molécula de interés. En

⁷ Resolución: grado de separación entre dos componentes (picos) en una operación cromatográfica

general, moléculas más grandes requieren normalmente flujos más bajos, flujos más altos se pueden utilizar con moléculas más pequeñas.

Considerando lo anterior, se procedió a caracterizar la resina por medio de la inyección de una muestra de HBsAg correspondiente a la etapa de intercambio iónico, a diferentes flujos (2, 1, 0.5 y 0.2 mL/min), en todos los casos se inyectaron 5 mL de muestra (52.2 mg de proteína total) y se colectaron fracciones de 2 mL. Los resultados mostraron que sin importar el flujo, la proteína siempre eluye al mismo volumen de columna (**Figura 27**). Se decidió trabajar a un flujo de 1.0 mL/min el cual corresponde a un flujo lineal de 0.5 cm/min.

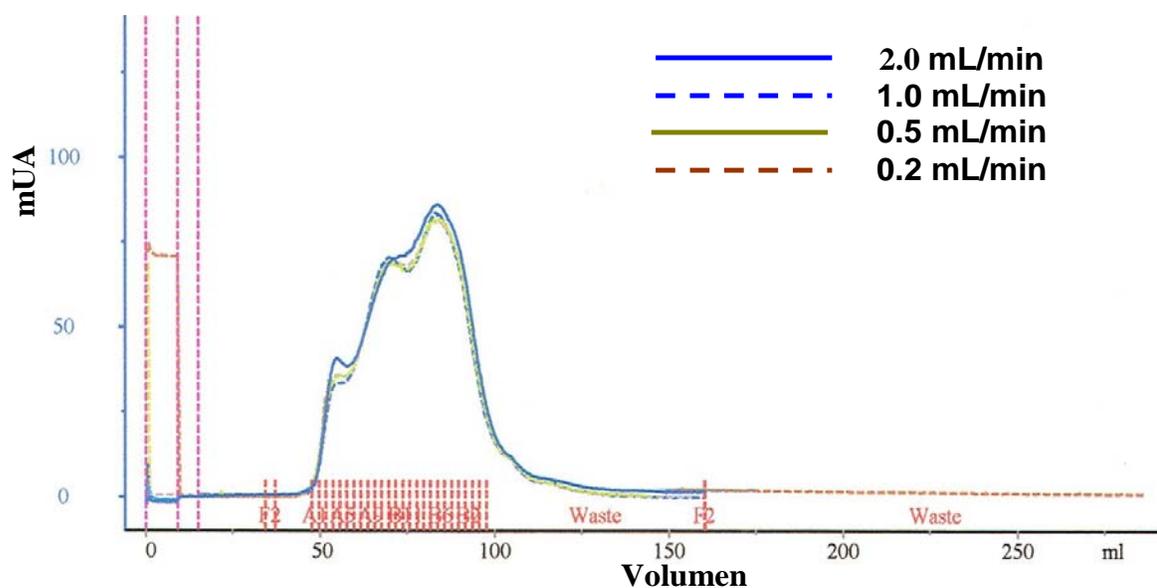


Figura 27. Análisis cromatográfico de una muestra de HBsAg correspondiente a la etapa de intercambio iónico a diferentes flujos, empleando la resina Sephacryl S-500. Como fase móvil se utilizó solución de fosfato dibásico 10 mM.

Se tomó cada una de las fracciones de la corrida a un flujo de 1 mL/min y se le determinó a cada la concentración de proteína por el método de Bradford, y su antigenicidad por el método de PHA, para determinar las fracciones en las que se

encuentra el HBsAg. Los resultados muestran que a partir de la fracción 6 hasta la 18 se tiene una buena antigenicidad, siendo la fracción 14 la que presenta el mayor título específico (**Figura 28**). Sin embargo, al analizar las fracciones por HPLC-GP, se observó la presencia de contaminantes y/o proteína mal ensamblada (el llamado pico 3) a partir de la fracción 13-14 (**Figura 29**), por lo que el número de fracciones que pueden ser seleccionadas se reducen a las fracciones 6-12, las cuales corresponden al $\approx 7\%$ de la proteína total inyectada a la columna (**Tabla 6**). Por el análisis de área en el perfil cromatográfico de la etapa de intercambio iónico se tiene que el HBsAg corresponde a un 40% de la proteína total, por lo que al emplear esta resina solo se recuperaría un $\approx 18\%$ del HBsAg inyectado.

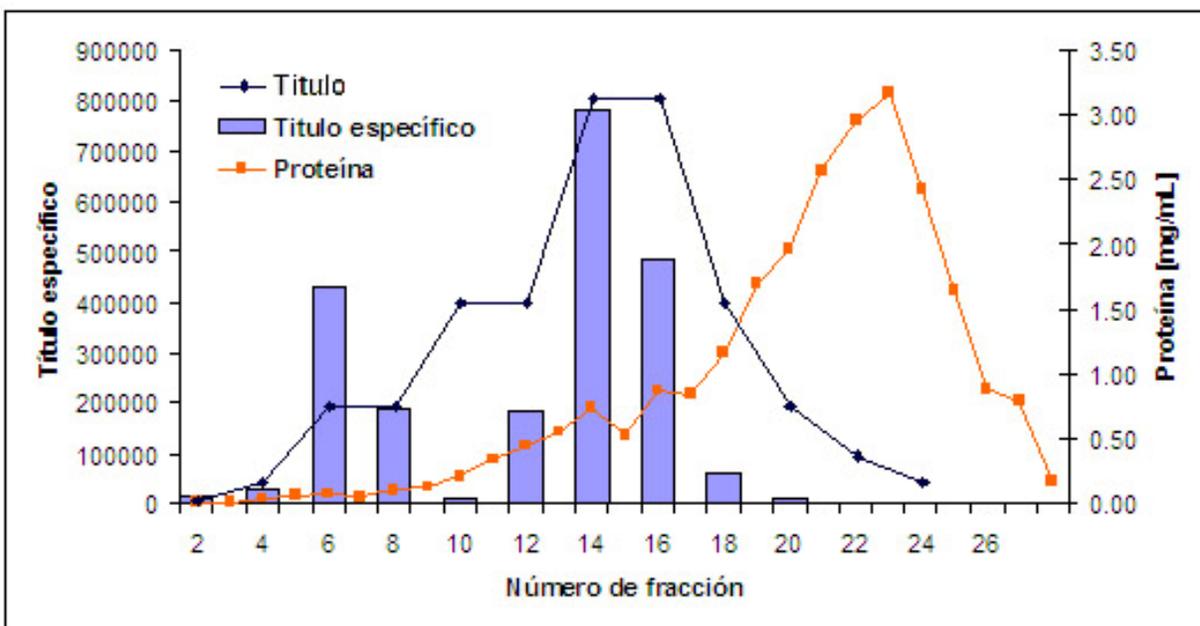


Figura 28. Perfil cromatográfico de exclusión en gel del HBsAg procedente de la etapa de intercambio iónico. Se muestra la concentración de proteína con respecto a la fracción cromatográfica y la antigenicidad por PHA y título específico. Condiciones: columna XK 16/70, resina Sephacryl S-500, fosfato dibásico 10 mM como eluyente.

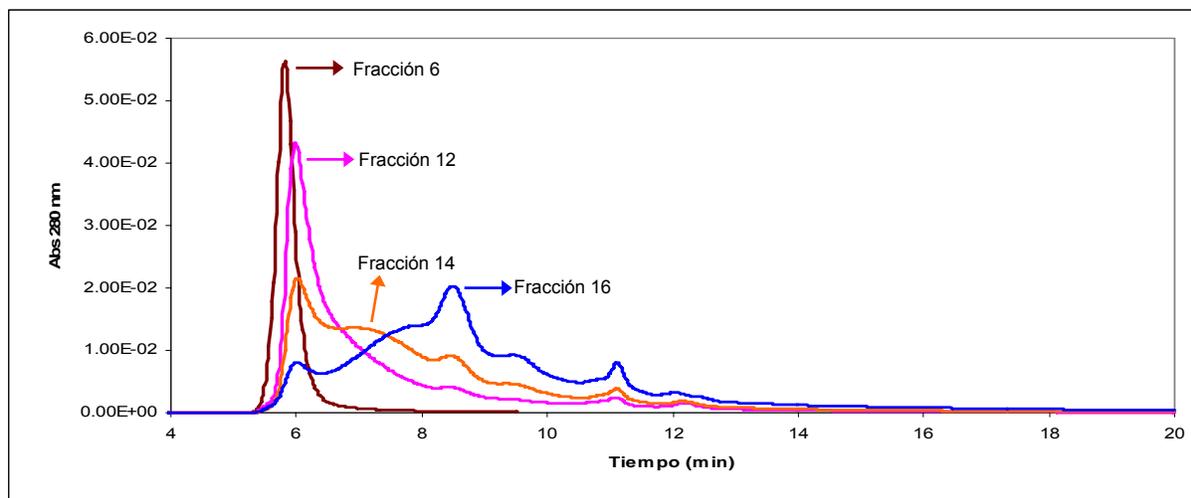


Figura 29. Perfiles cromatográficos en HPLC-GP de fracciones obtenidas en la cromatografía preparativa de exclusión en gel empleando la resina Sephacryl S-500 empacada en la columna XK-16/70, las cuales presentaron mayor antigenicidad. Condiciones descritas arriba.

Tabla 6. Cuantificación de proteína durante el fraccionamiento del HBsAg proveniente de la etapa de intercambio iónico a través de cromatografía en la resina Sephacryl S-500 empacada en la columna XK-16/70. Se resaltan las fracciones que fueron seleccionadas como HBsAg purificado.

No. Fracción	Concentración ^a [mg/mL]	Proteína ^b [mg]	Proteína acumulada [mg]	% Rendimiento acumulado
1	0.01	0.02	0.02	0.04
2	0.01	0.02	0.04	0.07
3	0.04	0.07	0.11	0.20
4	0.06	0.12	0.23	0.43
5	0.08	0.16	0.39	0.72
6	0.06	0.12	0.50	0.94
7	0.11	0.21	0.72	1.34
8	0.14	0.27	0.99	1.85
9	0.21	0.42	1.41	2.64
10	0.35	0.70	2.11	3.96
11	0.46	0.91	3.03	5.67
12	0.56	1.12	4.14	7.76
13	0.75	1.50	5.64	10.56
14	0.53	1.05	6.69	12.53
15	0.87	1.74	8.43	15.78
16	0.85	1.69	10.12	18.95
17-20	1.85	14.80	24.92	46.67
21-24	2.54	20.39	45.31	84.86
25-27	0.25	8.09	53.40	100.00

^aConcentración de proteína medida por Bradford

^bCantidad de proteína al multiplicar la concentración por el volumen de la fracción de 2 mL), excento l la fracción 27 cuyo volumen es de 26 mL.

Con base en la revisión bibliográfica se encontró que las resinas de Tosoh Bioscience son muy empleadas para la purificación de este tipo de partículas, por lo que se decidió probar la resina HW-65F con tamaño de partícula de 45 μm , 100 nm tamaño de poro y límite de exclusión de 1×10^6 Da, montada en el sistema cromatográfico de baja presión ÄKTA prime (Amersham Biosciences) en las mismas condiciones y altura de cama. De igual manera se verificó la eficiencia del empaque por medio del factor de asimetría y número de platos teóricos (**Figura 30**), encontrando un factor de asimetría de **1.0** y **908** platos teóricos con una altura equivalente de **0.5** mm cada uno. Con los valores de A_s y $HETP$ determinados se decidió que la resina HW-65F presenta una mejor eficiencia y resolución que la Sephacryl S-500 al compararlas en las mismas condiciones (buffer, altura de columna, empackado, flujo, temperatura y volumen de muestra).

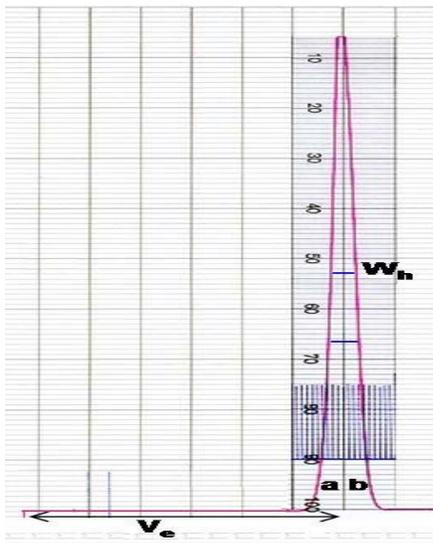


Figura 30. Trazo de la conductividad (mS/cm) para la prueba de asimetría y determinación del número de platos teóricos para la resina HW-65F.

Determinada la eficiencia de la columna, se inyectó una muestra de HBsAg correspondiente a la etapa de intercambio iónico en las mismas condiciones que con la resina Sephacryl S-500. Las fracciones resultantes fueron analizadas por HPLC-GP. Los resultados muestran un comportamiento muy similar que con la resina anterior (la aparición de los llamados tres picos conforme prosigue el fraccionamiento), pero con

la clara diferencia de que el número de fracciones que se tienen antes de que aparezca el “pico 3” es mayor (**Figura 31**). Al realizar el balance de materia para esta etapa, encontramos que la cantidad de proteína recuperada como HBsAg purificado es de 7.7%, siendo un rendimiento un poco mayor que el obtenido con la resina Sephacryl S-500. Sin embargo, se trató de mejorar el rendimiento y resolución de esta columna. Como ya se menciona, la resolución de la resina es afectada por el flujo, eficiencia de la columna y altura de la cama. A mayor altura de la cama mejor es la resolución (Amersham Biosciences 71500242., 1996).

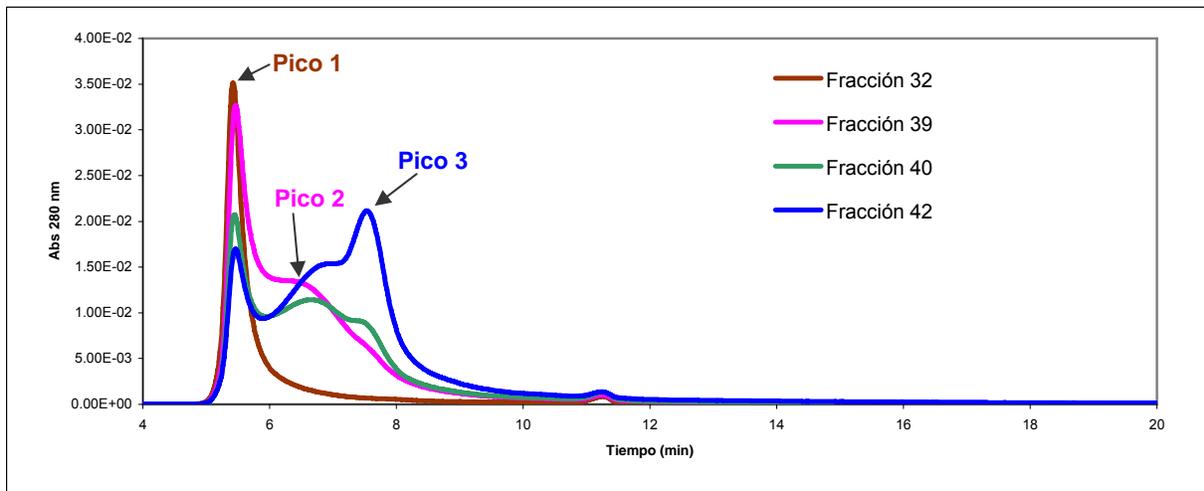


Figura 31. Perfiles cromatográficos en HPLC-GP de fracciones obtenidas en la cromatografía preparativa de exclusión molecular empleando la resina HW-65F empacada en la columna XK-16/70. Se observa la aparición del HBsAg (pico 1 y 2) y de la proteína mal ensamblada o contaminante (pico 3) conforme el número de fracción incrementa.

Determinado el flujo de operación y verificada la mejor eficiencia de la resina HW-65F, se aumentó la altura de la cama utilizando una columna XK 26/100, la cual se empacó con la resina HW-65F a una altura de 73 cm. Se determinó de igual manera la eficiencia del empaque por medio de la determinación de A_s , N y $HETP$ (**Figura 32**). Se encontró un factor de asimetría de 1.16 y 1288 platos teóricos con una separación de 0.56 mm por lo que la eficiencia se mantiene, pero al aumentar 23 cm la altura de

la columna se da más tiempo para que se lleve a cabo la separación de los diferentes componentes que comprenden la muestra que es inyectada.

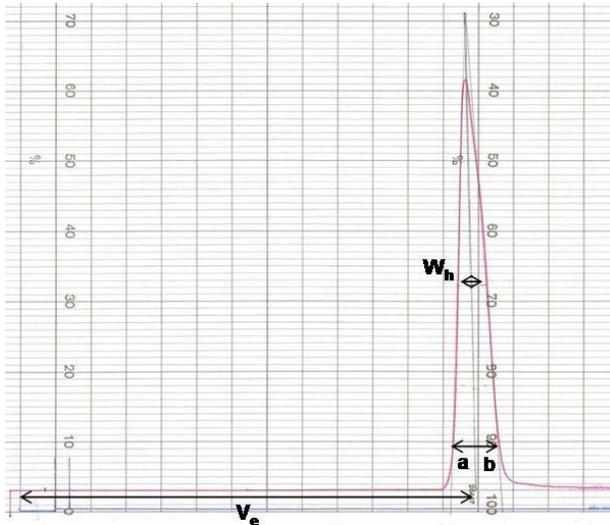


Figura 32. Trazo de la conductividad (mS/cm) para la prueba de A_s y determinación del HEPT para la resina HW-65F, empacada en la columna XK-26/100.

En la **Figura 33** se presenta el perfil cromatográfico y la curva de concentración de proteína contra el número de fracción de la misma muestra de HBsAg procedente de la etapa de intercambio iónico cargada a la columna XK-26/100, empacada con la resina HW-65F. En la misma curva se sobreponen los resultados de antigenicidad específica (PHA/[Proteína]) correspondientes a las fracciones 140 a la 213. Con el aumento en la altura de la cama se observó una mejor resolución al poder identificarse más claramente la formación de los llamados picos 1, 2 y 3 conforme transcurre el fraccionamiento (**Figura 34**). Finalmente, al realizar el balance de materia de la proteína que es cargada a la columna, considerando solo las fracciones que exhiben antigenicidad y no contienen proteína no ensamblada (fracciones 172-199), se tiene un rendimiento del 10 % con respecto a la proteína total que fue inyectada a la columna, el cual es mayor en comparación con la Sephacryl S-500 (**Tabla 7**), además de lograr procesar hasta 4 veces más volumen al incrementar de 5 a 20 mL el volumen de inyección.

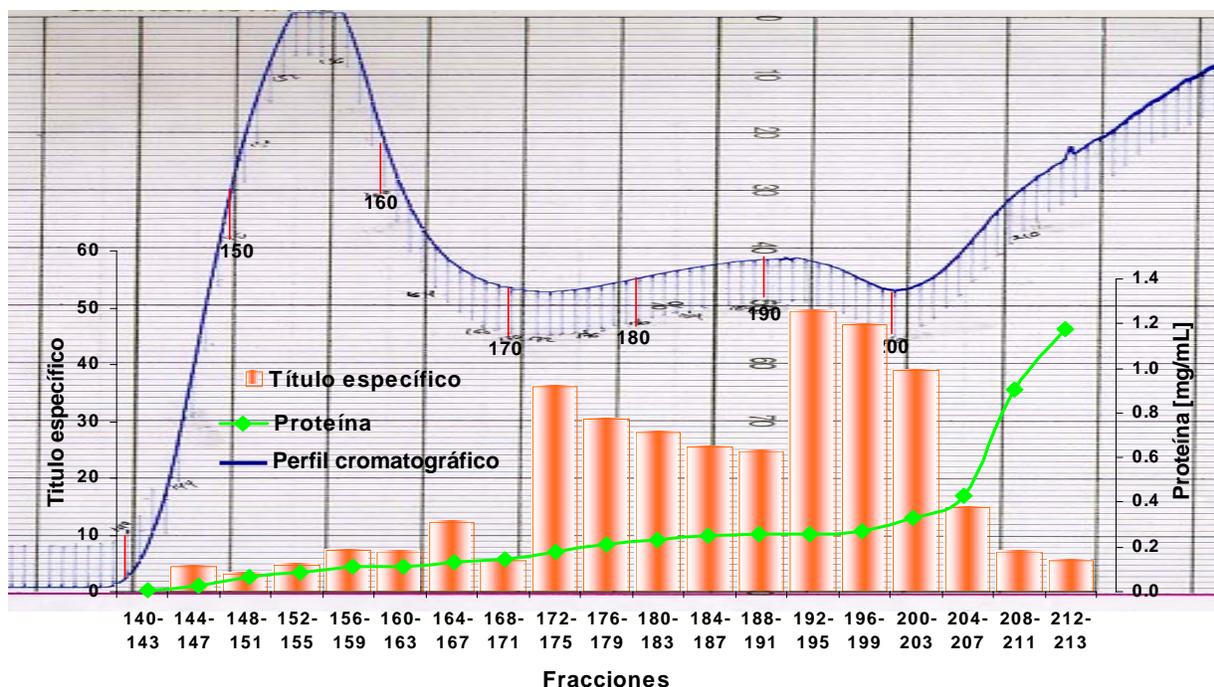


Figura 33. Representación gráfica de la concentración de proteína y título específico contra el volumen de elución de la muestra de HBsAg procedente de la etapa de II. Condiciones: columna XK 26/100, resina HW-65F, altura de cama de 73 cm. Solución de fosfato dibásico 10 mM como fase móvil, flujo de 3 mL/min, 2 mL volumen de fracción.

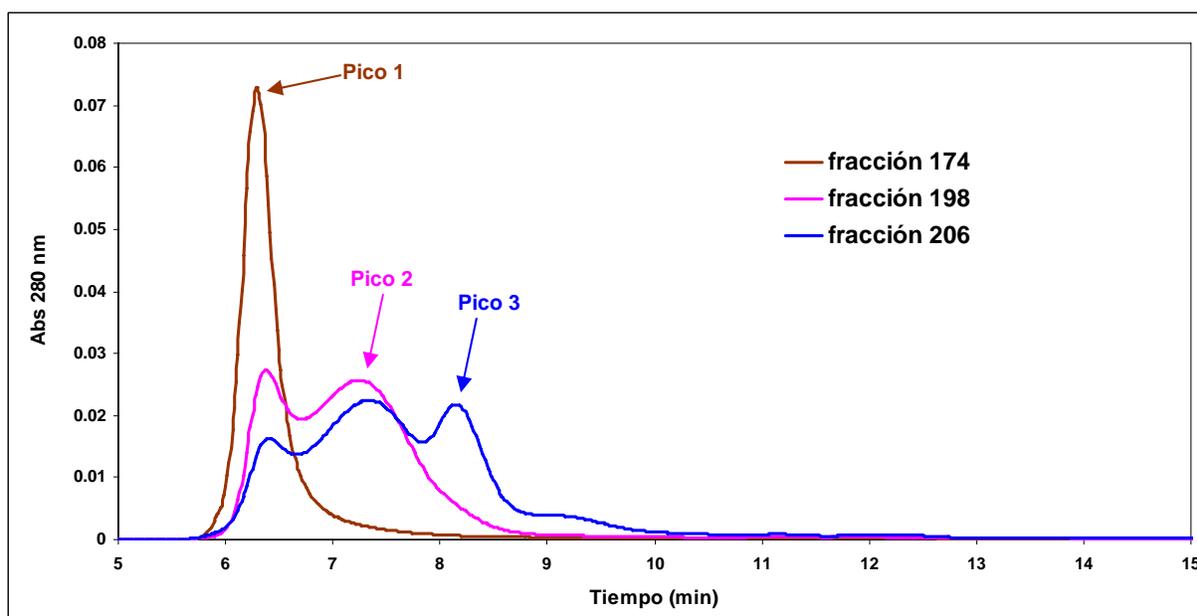


Figura 34. Perfiles cromatográficos en HPLC-GP de fracciones obtenidas en la cromatografía preparativa de exclusión molecular empleando la resina HW-65F empacada en la columna XK-26/100.

Tabla 7. Rendimientos obtenidos con las diferentes resinas y modalidades en la purificación del HBsAg a partir de la etapa de intercambio iónico.

Muestra ^a	Resina	Columna	Vol. iny	% Rendimiento ^b
II HBsAg	Sephacryl S-500	XK-16/70	5 mL	7.1
II HBsAg	HW-65F	XK-16/70	5 mL	7.7
II HBsAg	HW-65F	XK-26/100	20 mL	10.0

^a II HBsAg: muestra proveniente de la etapa de intercambio iónico.

^b Rendimiento de proteína recuperada como HBsAg purificado, antes y después de la cromatografía de exclusión en gel.

6.5.2. Purificación del antígeno de superficie de hepatitis B por cromatografía de exclusión en gel.

Se inyectaron 18.5 mL (a una concentración de 10-13 mg/mL de proteína total) previamente filtrados por 0.22 μ m de muestra procedente de la etapa de intercambio iónico a la columna XK-26 empacada con la resina HW-65F (Tosohaas), la cual fue previamente equilibrada con fosfato dibásico 10 mM. A partir del aumento de 5 mUA (mili unidades de absorbancia) en la línea base, se tomaron fracciones de 8 mL cada una. Estas fracciones se analizaron por HPLC-GP, SDS-PAGE y PHA para su selección y se cuantificó proteína total por Bradford.

En la **Figura 35A** se presenta el perfil de la SEC de la muestra de HBsAg proveniente de la etapa de intercambio iónico y el título normalizado de hemaglutinación de las diferentes fracciones obtenidas. Para la selección de las fracciones que conformaran a la mezcla final de antígeno puro se siguieron tres criterios: 1) la fracción deberá presentar antigenicidad, 2) su perfil cromatográfico en HPLC-GP no deberá contener proteínas no ensambladas (pico 3) u otros contaminantes y 3) su análisis por SDS-PAGE no deberá mostrar bandas contaminantes (**Figura 35B**).

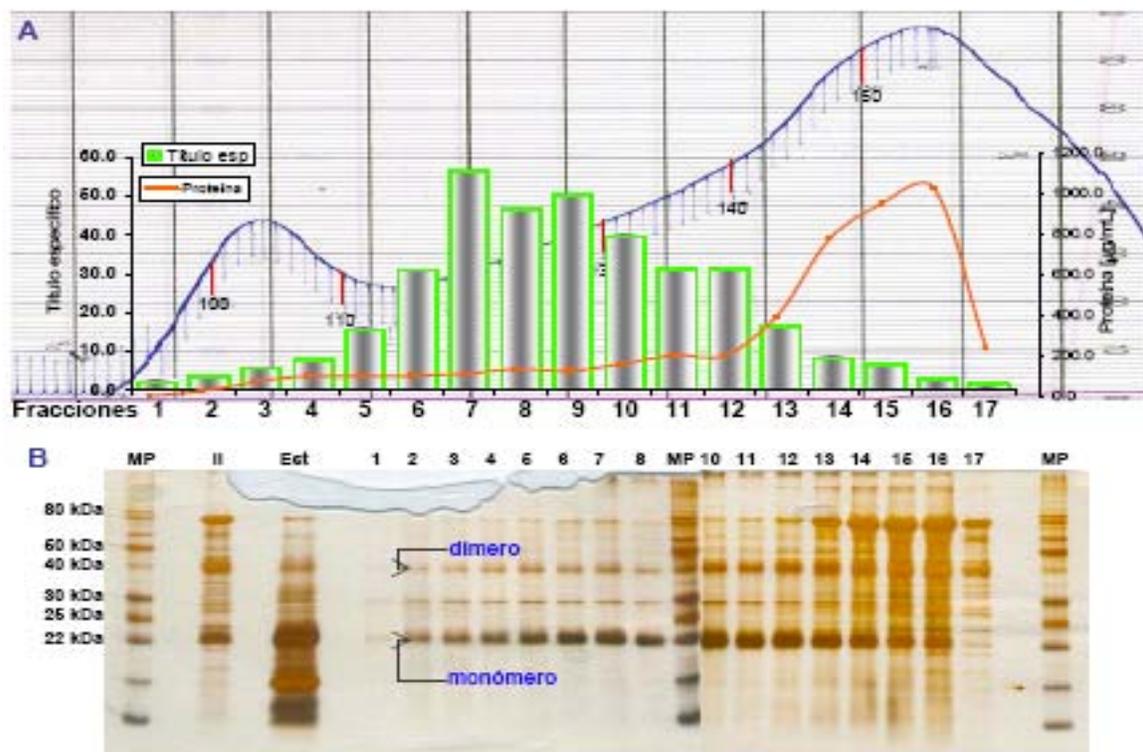


Figura 35. A) Perfil cromatográfico de la muestra de HBsAg proveniente de la etapa de intercambio iónico en donde se muestra la relación $[\text{HBsAg}]_{\text{PHA}}/[\text{HBsAg}]_{\text{Bradford}}$. B) SDS-PAGE de las diferentes fracciones obtenidas de la SEC-preparativa. Los números bajo el cromatograma y encima del SDS-PAGE indican el número de fracción.

Obsérvese que existe presencia del HBsAg en prácticamente todo el fraccionamiento, sin embargo la relación $[\text{HBsAg}]_{\text{PHA}}/[\text{HBsAg}]_{\text{Bradford}}$ es más alta en las fracciones que corresponden a las subpartículas de 19 a 26 nm de diámetro (fracciones 5-12) según determinaciones por HPLC-GP, favoreciendo esto la idea de que existe una gran variedad de poblaciones de tamaño del HBsAg en la muestra.

6.5.3. Determinación de la pureza y composición de la partícula de HBsAg purificada por SEC.

Con base en los tres criterios arriba mencionados, fueron seleccionadas las fracciones 4 a la 11 para conformar el “pool”, el cual fue sometido análisis de pureza por densitometría, SDS-PAGE, Western Blot y HPLC-GP. Al someter el “pool” al análisis por HPLC-GP (**Figura 36**), se observó el típico perfil cromatográfico para el HBsAg mostrado en la **Figura 13**, el cual presenta un pico principal cuyo tiempo de elución (6.3 min) corresponde a una partícula de 24 nm de diámetro y el de un hombro en el costado derecho, el cual corresponde a una partícula de 19 nm según nuestra curva de calibración.

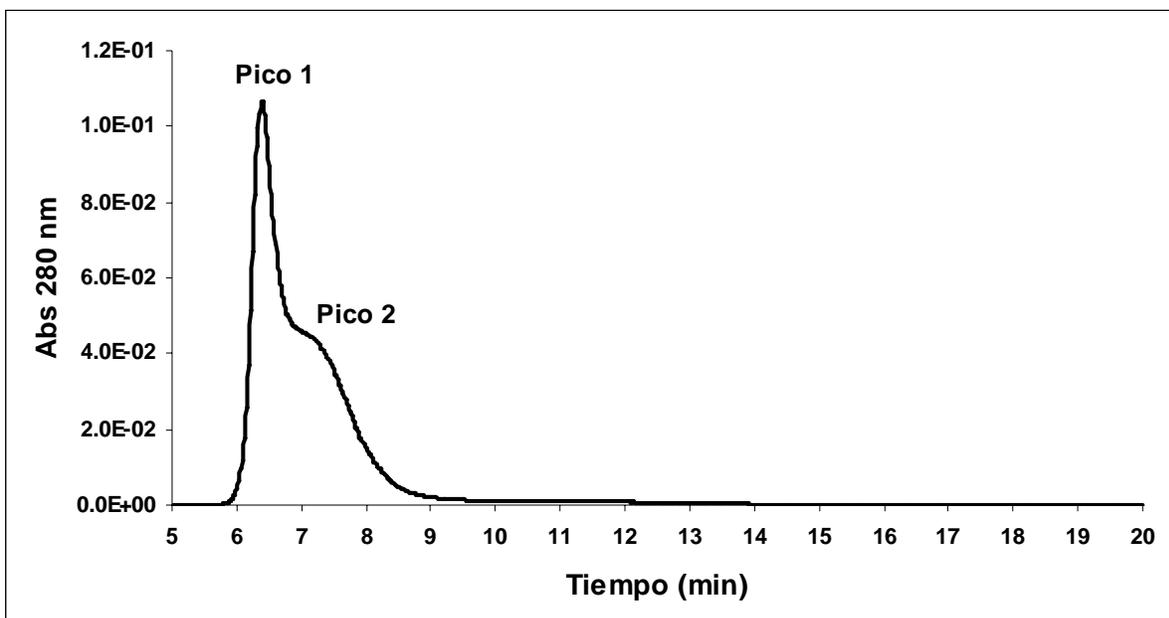


Figura 36. Análisis cromatográfico del “pool” obtenido en la purificación del HBsAg por SEC-preparativa a partir de la etapa de intercambio iónico.

Posteriormente, el “pool” fue cargado en dos geles de SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes, a una concentración de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Al finalizar la corrida un gel se tiñó con sales de plata y el otro se transfirió para análisis por Western

Blot. El gel teñido por sales de plata se cuantificó por densitometría. La pureza de la muestra se determinó restando al 100% del área por intensidad del gel, el porcentaje de área por intensidad de las bandas que no fueron reconocidas en el Western blot (**Figura 37**).

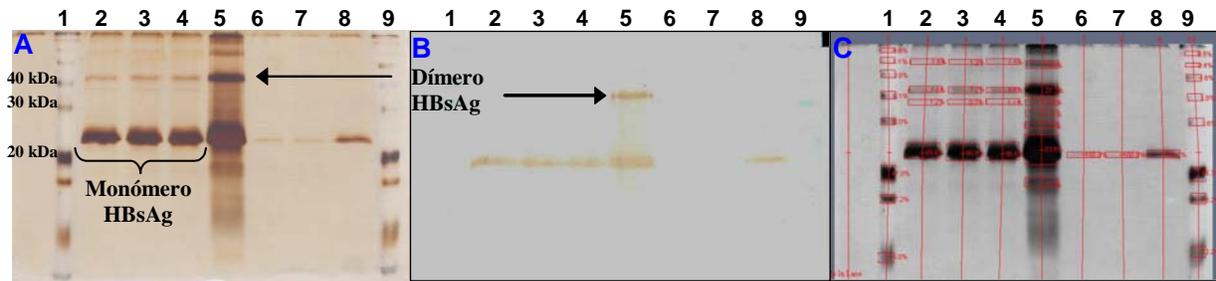


Figura 37. Determinación de la pureza de la muestra de HBsAg (“pool”) por SDS-PAGE (A), Western blot (B) y densitometría (C). Carril 1 y 9; Marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4 muestra de HBsAg a una concentración de 0.8 µg/µL. Carril 5; Control positivo de HBsAg a 0.8 µg/µL. Carril 6 y 7; muestra de HBsAg a una concentración de 0.04 µg/µL. Carril 8; Control positivo de HBsAg de Probiomed a 0.04 µg/µL.

Se verificó el contenido de lípidos y carbohidratos, encontrando que la concentración de ambas biomoléculas están dentro de las especificaciones (**Tabla 8**). formador lo tanto el HBsAg purificado con este procedimiento cumple con las especificaciones que marca la Organización Mundial de la Salud para el HBsAg en la forma de biofármaco producido en levadura, las cuales son; pureza: > 95% de acuerdo a SDS-PAGE para bandas de monómero, dímero y trímero. Identidad: reactividad con anticuerpos anti/HBsAg de acuerdo con el análisis de Western Blot. Lípidos: entre 50-180 mg de lípidos por mg de proteína de acuerdo con Merckotest (OMS., 1989; Schaefer *et al.*, 2002).

Tabla 8. Cuantificación de proteína, lípidos, carbohidratos, identidad por SDS-PAGE y pureza de dos lotes de producción purificados a partir de la etapa de intercambio iónico sin el uso de ultracentrifugación. La columna derecha muestra las especificaciones para este producto.

Muestra	Análisis	Resultado	Especificación
Lote 1	Proteína total (Lowry)	1.49 mg/mL	Entre 0.40 –0.80 mg/mL
	Identidad SDS-PAGE	Cumple	Banda principal en 23 kDa y banda superior en 46 kDa correspondiente a dímeros
	Pureza Western Blot	98.90 %	No menos de 95%
	Carbohidratos	142.45 mg/100 mg	Entre 20-200 mg/100 mg de proteína
	Lípidos	97.3 mg/100 mg	Entre 50 – 200 mg/100 mg de proteína
Lote 2	Proteína total (Lowry)	0.98 mg/mL	Entre 0.40 –0.80 mg/mL
	Identidad SDS-PAGE	Cumple	Banda principal en 23 kDa y banda superior en 46 kDa correspondiente a dímeros
	Pureza Western Blot	95.00 %	No menos de 95%
	Carbohidratos	116.11 mg/100 mg	Entre 20-200 mg/100 mg de proteína
	Lípidos	115.94 mg/100 mg	Entre 50 – 200 mg/100 mg de proteína

Resultados analíticos realizados en el departamento de control de calidad de Probiomed con base en procedimientos estandarizados y certificados.

Una alícuota de la misma muestra fue tomada para inmunomarcaje empleando un anticuerpo de ratón anti-HBsAg acoplado a un anticuerpo secundario unido a oro coloidal de 10 nm de diámetro, para facilitar su observación al microscopio electrónico (**Figura 38**).

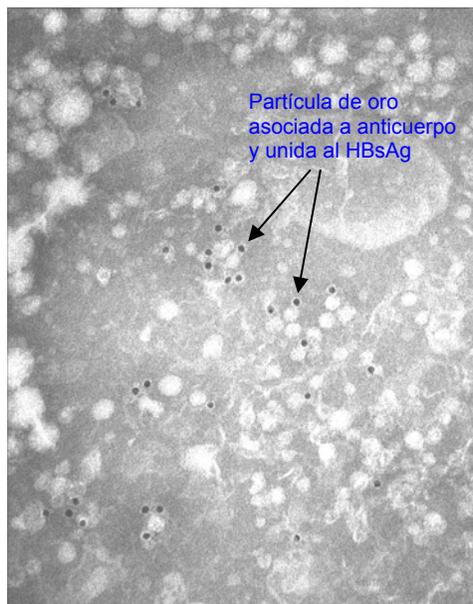


Figura 38. Microscopía electrónica de transmisión de la partícula de HBsAg con tinción negativa, purificada por cromatografía de exclusión molecular inmunomarcada con un anticuerpo de ratón anti-HBsAg ligado a oro coloidal de 10 nm de diámetro. Amplificación a 140,000x.

Al comparar los rendimientos obtenidos de 5 diferentes lotes de producción (dos del 2005 y tres del 2006) con respecto a la proteína total a partir de la etapa de intercambio iónico, utilizando SEC con la resina HW 65F, se obtuvieron valores sino mayores, por lo menos similares a los reportados por Probiomed (**Tabla 9**).

Tabla 9. Rendimientos del HBsAg de 5 diferentes lotes purificados por Probiomed empleando UC comparados con los obtenidos por SEC sin el empleo de UC.

Lote	Rendimiento obtenido empleando UC (%)	Rendimiento obtenido empleando SEC sin el uso de UC (%)
II 05016	8.8	8.8
II 05023	6.1	5.7
II 06001	7.3	6.0
II 06011	6.2	9.9
II 06012	3.2	3.5
Media	6.3	6.8
Desv. Est.	2.1	2.6

El valor reportado corresponde al porcentaje de recuperación de proteína total medida por Bradford, a partir de intercambio iónico hasta después de la cromatografía de exclusión en gel.

Finalmente, en la **Tabla 10** se comparan los resultados de HBsAg (g), rendimiento por etapa, rendimiento global y factor de pureza en la recuperación y purificación de la subpartícula de HBsAg, empleando SEC sin el uso de la ultracentrifugación (mostrado en la tabla como Px). El rendimiento por etapa después del intercambio iónico es similar en ambos casos (de 27% para UC y de 21% para Px). Sin embargo, al eliminar la etapa de ultracentrifugación en el proceso de purificación, el rendimiento global obtenido fue 1.7 veces más grande, lo cual era de esperarse al eliminar una etapa en el tren de purificación.

Tabla 10. Masa, factor de pureza, rendimientos global y después de cada etapa en la recuperación y purificación del HBsAg sin el empleo de la ultracentrifugación.

Etapa	HBsAg [g]	% recuperación por etapa	% recuperación global	Factor de pureza
Extracto	240.2 ± 8.4	100	100	1
PA	30.8 ± 6.7	12.8 ± 2.8	12.8 ± 2.8	0.7 ± 0.1
II	37.1 ± 11.1	120.5 ± 21.9	15.4 ± 4.7	1.0 ± 0.2
UC	9.9 ± 2.6	26.8 ± 1.9	4.1 ± 1.2	1.6 ± 0.5
SEC	4.7 ± 0.6	47.0 ± 17.6	1.9 ± 0.2	2.4 ± 0.2
Px	7.7 ± 3.9	20.9 ± 10.2	3.2 ± 0.7	2.5 ± 0.3

La cantidad de HBsAg corresponde al porcentaje de área en el perfil cromatográfico de dicha etapa multiplicado por la concentración de proteína total: RC, ruptur-a celular; PA, precipitación ácida; II, intercambio iónico; UC, ultracentrifugación; SEC, cromatografía de filtración en gel.

6.6. Efecto de las variables de proceso sobre el HBsAg.

6.6.1. Estudio del efecto de la temperatura.

Para realizar el estudio del efecto de la temperatura en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg, alícuotas de concentración conocida (0.3-0.5 mg/mL) fueron incubadas a diferentes temperaturas de -3, 10, 30, 50, 70 y 90 °C por periodos de 10, 20, 40, 160 y 320 minutos. Como control negativo se incubó un blanco (solución salina) y como control positivo se utilizó la misma muestra de HBsAg sin tratar. La relación $[\text{HBsAg}]_{\text{PHA}}/[\text{HBsAg}]_{\text{Bradford}}$ de la muestra sin tratar se tomó como el 100%, para efectos de normalización de los resultados. Todos los ensayos se hicieron por duplicado. En la **Figura 39** se muestran los resultados de la relación $[\text{HBsAg}]_{\text{PHA}}/[\text{HBsAg}]_{\text{Bradford}}$ normalizados. Se observa claramente que la partícula de HBsAg mantiene su capacidad de hemaglutinación intacta, tanto a temperaturas bajas (-3 °C) como a temperaturas relativamente altas (50 °C), ni se observan cambios en su tamaño al no presentarse cambios significativos tanto en la proporción como en el tiempo de elución del pico 1 y pico 2, tal y como se muestra en al **Figura 40C y D**, indicando que la partícula antígenica de hepatitis B es muy estable en estas regiones de temperatura.

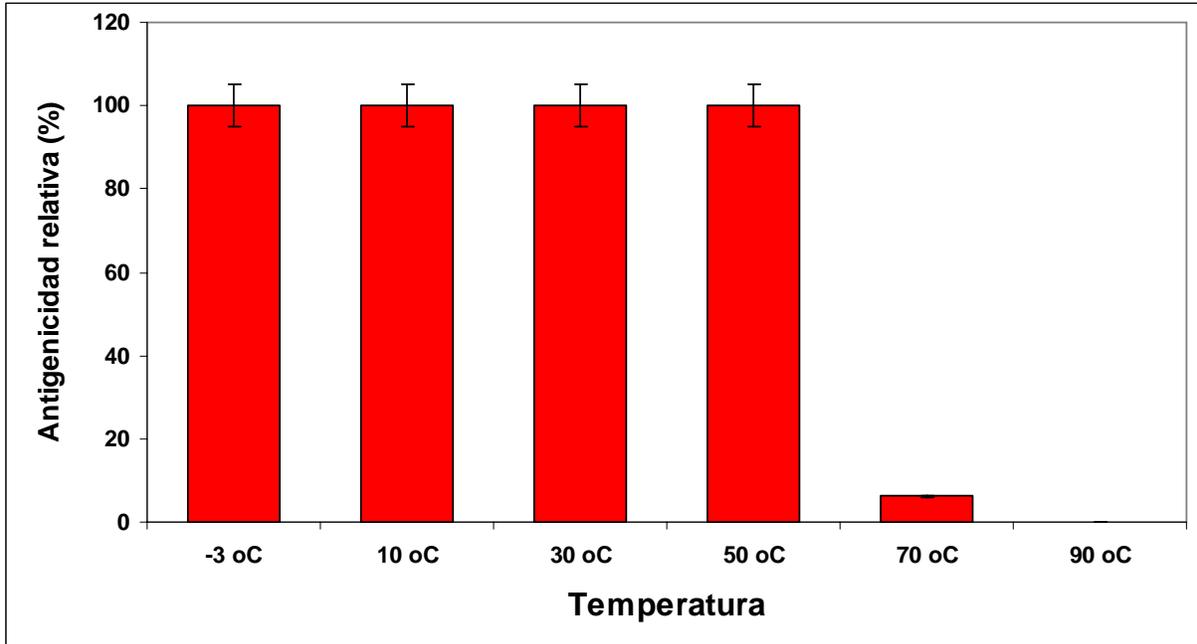


Figura 39. Pérdida de la capacidad de hemaglutinación del HBsAg con respecto a la temperatura. Cada dato representa la media (barras) y la desviación estándar (línea delgada) de por lo menos dos mediciones. Las muestras sometidas a -3, 10, 30 y 50 °C fueron incubadas hasta 320 minutos; 70 y 90 °C por 160 minutos.

Por otra parte, a 70 y 90 °C se observó la precipitación de la proteína, en aproximadamente un 50% para el pico 1 y hasta un 70% el pico 2, según el área bajo la curva de la **Figura 40A y D**. La pérdida de la capacidad de hemaglutinación es el resultado de la desestabilización de la partícula con su consecuente precipitación (esto pudo ser observado en el tubo de incubación). A 70 °C la partícula pierde un 20 y 94% de su capacidad de hemaglutinación a periodos de incubación de 80 y 160 minutos, con una consecuente pérdida total a los 360 min. A 90 °C, la partícula perdió rápidamente (a 10 minutos de incubación) un 50% de su capacidad de hemaglutinación, con una pérdida total a los 160 min. La exposición del HBsAg a estas temperaturas no ocasionó apreciables cambios en la proporción del pico 1 con respecto al pico 2 (**Figura 40A y B**), ni tampoco fue capaz de disociar a la partícula en su forma de dímeros o monómeros puesto que no se observó la formación de otro pico con un tiempo de elución mayor a los 8 min. Los perfiles cromatográficos a 10 y

30 °C no se muestran por exhibir el mismo comportamiento que a -3 y 50 °C y al mantener el 100 % de su capacidad de hemaglutinación.

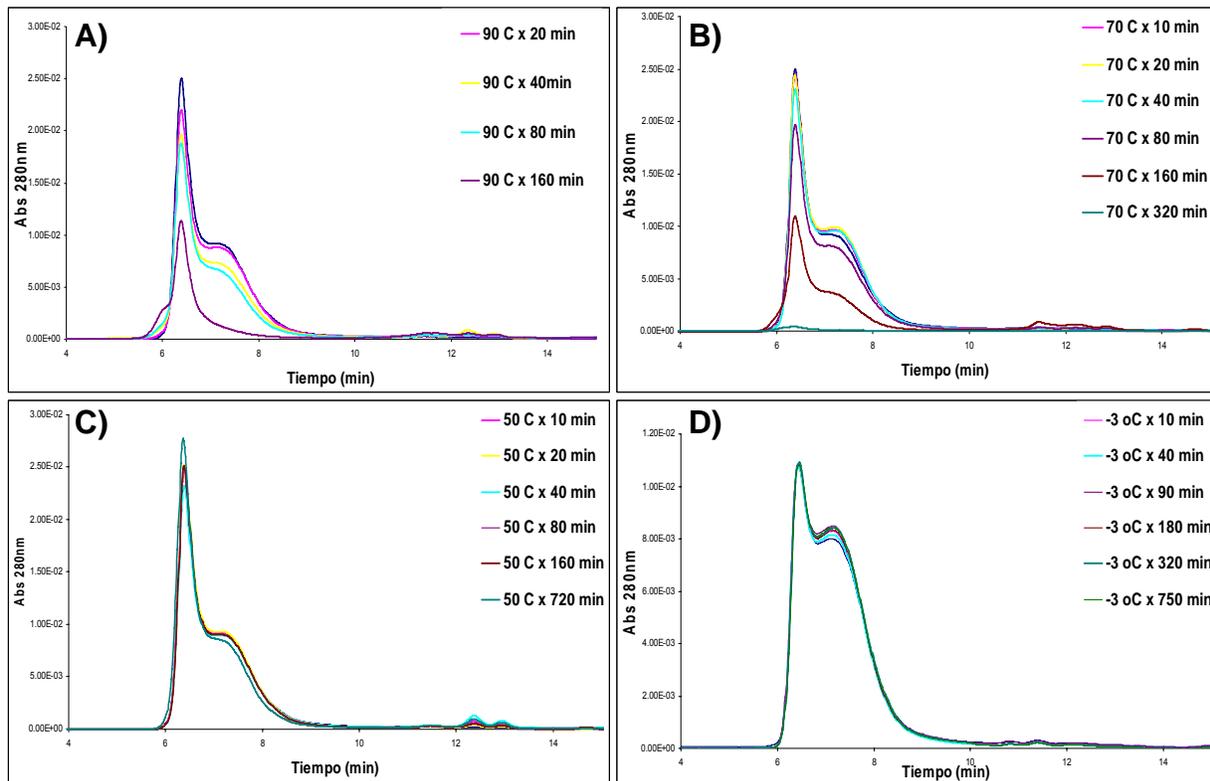


Figura 40. Análisis cromatográfico del HBsAg en HPLC-GP del efecto a la temperatura. HBsAg incubado a 90 °C (A). HBsAg incubado a 70 °C (B). HBsAg incubado a 50 °C (C). HBsAg incubado a -3 °C (D). Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm, fosfato dibásico 10 mM como fase móvil a un flujo de 0.9 mL/min; 30 μ L volumen de inyección.

6.6.2. Estudio del efecto del pH.

Para realizar el estudio del efecto del pH en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg, alícuotas de concentración conocida (0.5-0.6 mg/mL) fueron incubadas a diferentes valores de pH desde 3.5 a 11 con intervalos de 0.5 unidades de pH, usando soluciones reguladoras 0.05 M a temperatura ambiente por 10, 20, 40, 80, 160 y 320 minutos. Como control negativo se incubó un blanco (solución salina) y

como control positivo se utilizó la muestra de HBsAg en solución de fosfatos dibásico 0.05 M pH 8.5. La relación $[\text{HBsAg}]_{\text{PHA}}/[\text{HBsAg}]_{\text{Bradford}}$ de esta muestra se tomó como el 100% para efectos de normalización de los resultados. Todos los ensayos se hicieron por duplicado. En la **Figura 41**, se presentan los resultados del efecto del pH en la capacidad de hemaglutinación del HBsAg. A diferencia de la temperatura, el efecto del pH fue más drástico al disminuir inmediatamente un 50 % la capacidad de hemaglutinación al estar expuesto a $\text{pH} \leq 5.5$, disminuyendo hasta un 25% y 6% a periodos de incubación de 360 min a $\text{pH} \geq 3$ y ≤ 5.5 . Este cambio no fue reversible, ya que el ensayo de hemaglutinación se hace a pH de ≈ 6 .

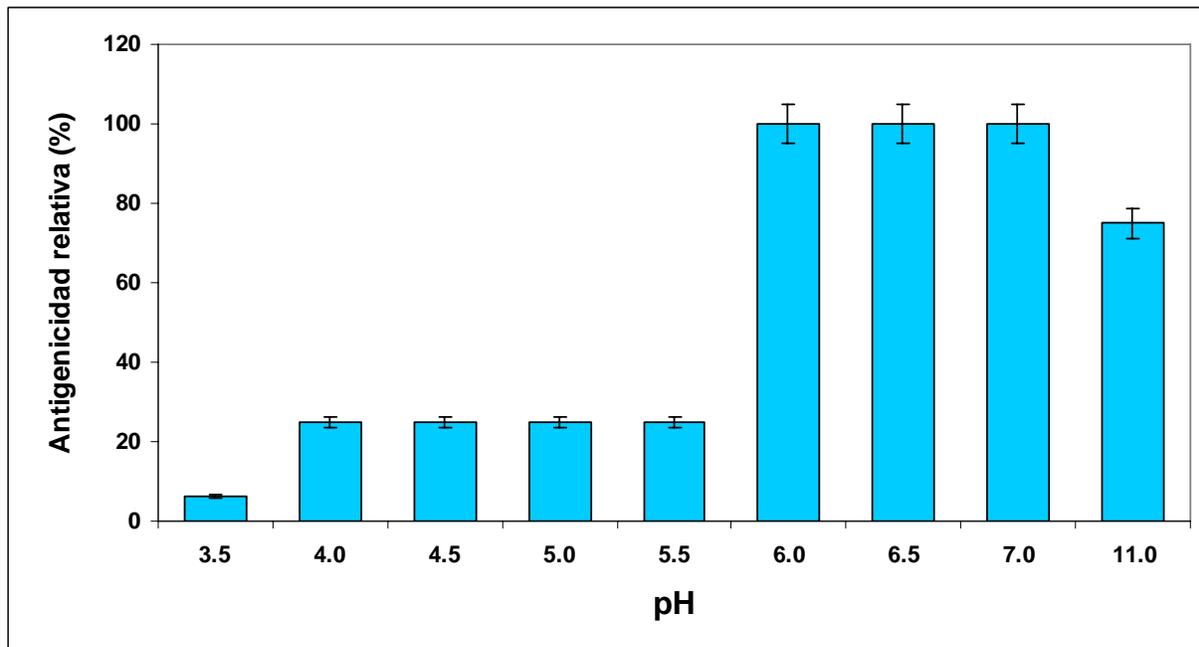


Figura 41. Pérdida de la capacidad de hemaglutinación del HBsAg con respecto al pH, normalizada con respecto a una muestra no tratada. Cada dato representa la media (barras) y la desviación estándar (línea delgada) de por lo menos dos mediciones. Las muestras fueron sometidas a diferentes pHs por un periodo de 360 minutos.

El análisis del HBsAg por HPLC-GP presenta un perfil muy característico, un hombro con un tiempo de elución de 7.3 min y un pico principal el cual eluye a los 6.3 min. de esta forma. Por lo tanto, la aparición de un pico a un tiempo menor a los 6.3 min en el cromatograma del HBsAg sometido a diferentes pHs, puede indicar la formación de agregados.

En la **Figura 42** se resumen los perfiles cromatográficos a los diferentes tiempos y pHs. La exposición del HBsAg a pHs ≤ 5.5 ocasionó la disminución del área bajo la curva de la fracción correspondiente al pico 2 y la formación de un pico agudo con un tiempo de elución de 6.1 min, lo que corresponde a estructuras de más de 100 nm de diámetro, sugiriendo la formación de agregados. No se observó disociación alguna de la partícula ni algún tipo de hidrólisis del monómero al no presentarse otros picos con tiempos de elución mayores a los 9 min en el cromatograma. Sin embargo, a pH de 3.5 se formó un precipitado en el fondo del tubo de reacción.

A pHs mayores de 6.0 la partícula no se vio afectada, ni tampoco las proporciones agregadas y no agregadas. Solo hasta un pH de 11 durante 150 minutos de exposición el antígeno perdió un 25 % de su capacidad de hemaglutinación.

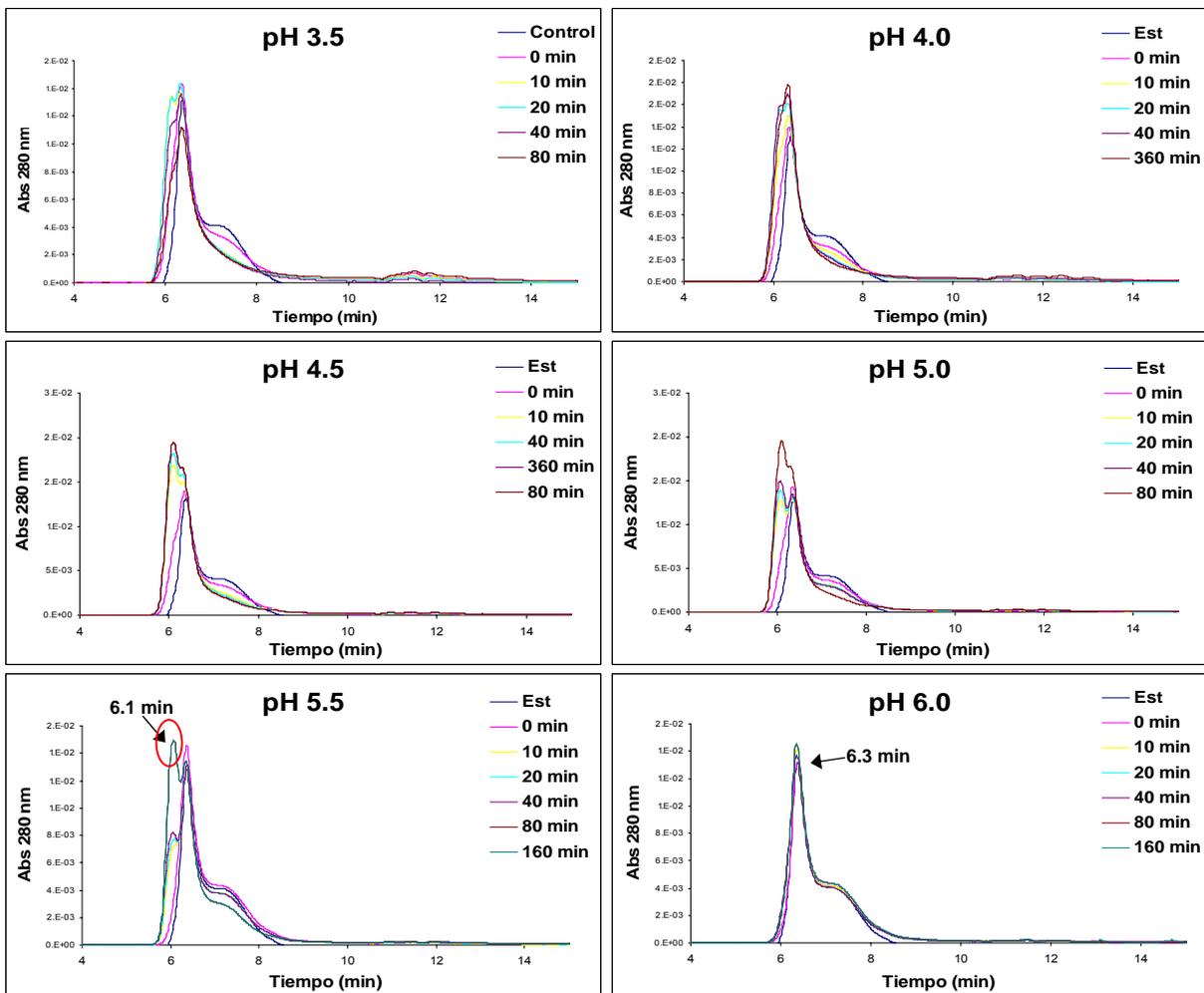


Figura 42. Perfiles cromatográficos del HBsAg en HPLC-GP en donde se observa el efecto del pH sobre el HBsAg. En círculo rojo se muestra que apareció un pico a los 6.1 min. Condiciones: Ultrahydrogel 500 (300 x 7 mm), guarda-columna Ultrahydrogel, detección UV a 280 nm, fosfato dibásico 10 mM como fase móvil a un flujo de 0,9 mL/min; 30 μ L volumen de inyección.

6.6.3. Estudio del efecto del tiempo de almacenaje.

Para estudiar el efecto del tiempo de almacenaje en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg, alícuotas de concentración conocida (0.3-0.5 mg/mL) fueron incubadas a 4 °C por periodos de 1, 4, 8, 10, 13, 15 y 19 semanas. Los resultados mostraron que a tiempos de almacenaje de 1 a 4 semanas el HBsAg no

muestró cambios significativos en el perfil cromatográfico. Por otra parte, puede observarse en la **Figura 43** que a partir de la semana 8 empezó a ocurrir degradación al disminuir el área total de integración de la muestra y presentarse cambios en las proporciones del pico 1, pico 2 y pico 3 (**Tabla 10**). El área del pico 1 disminuyó de un 60 hasta un 40 %, la del pico 2 permaneció relativamente constante, mientras que la del pico 3 aumentó de un 4.4 hasta un 20 %. El hecho de que el pico 2 no cambie en su proporción puede deberse a que la degradación de la partícula de HBsAg implique diferentes etapas que afectan su forma y tamaño por lo que las partículas del pico 1 tendrán que pasar forzosamente a una forma similar a la del pico 2, manteniendo constante su proporción.

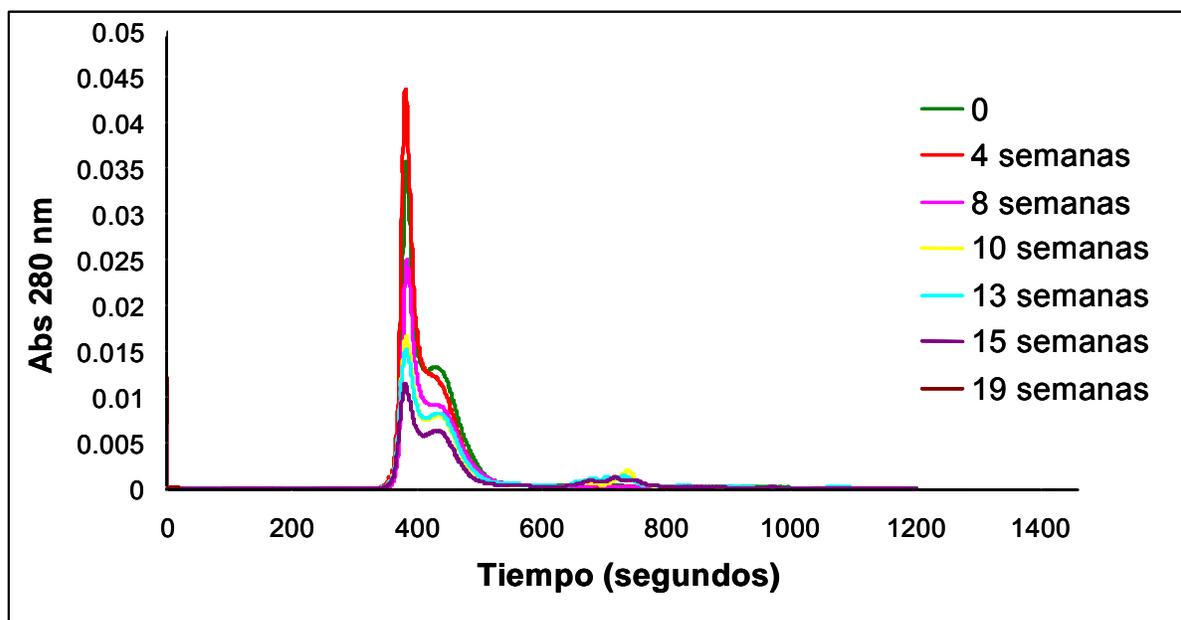


Figura 43. Perfiles cromatográficos del HBsAg en HPLC-GP en donde se observa el efecto del tiempo de almacenaje a -4°C sobre el HBsAg por periodos de 4, 8, 10, 13, 15 y 19 semanas. Mismas condiciones que en Figura 42.

Tabla 11. Efecto del tiempo de almacenaje a 4 °C en la formación de agregados o cambios estructurales.

Muestra	% Proteína “Pico 1”	% Proteína “Pico 2”	% Proteína “Pico 3”
	Intervalo 5.9 a 6.7 min	Intervalo 6.7 a 8.0 min	Intervalo 8.0 a 20 min
Semana 0	60.22	35.31	4.47
Semana 8	46.24	38.67	15.09
Semana 10	45.15	39.01	15.83
Semana 13	43.38	40.54	16.08
Semana 15	39.80	39.80	20.39
Semana 19	41.14	38.76	20.10

6.6.4. Estudio del efecto de la fuerza iónica.

El efecto de la fuerza iónica en la formación de agregados y cambios en la estructura del HBsAg se realizó incubando a temperatura ambiente el antígeno (biofármaco) a concentraciones de NaCl de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.2 y 1.5 M por diferentes periodos de tiempo desde 1, 2, 5, 7, 24 y 72 horas. Se determinaron cambios estructurales o agregación por HPLC-GP y PHA. Los resultados muestran que el HBsAg fue inmediatamente afectado por un aumento en la concentración de sal (mismo comportamiento a tiempo cero que a 72 horas). Un aumento en la concentración de NaCl estuvo acompañado con una inmediata disminución en el área bajo la curva del perfil cromatográfico del HBsAg, llegando hasta solo una décima parte del área (línea verde **Figura 44**) a una concentración de NaCl de 1.5 M, con respecto a una muestra sin sal (línea roja **Figura 44**). En la **Figura 45** se muestra el efecto de la concentración de NaCl en función del área normalizada, presentando un comportamiento sigmoidal que sugiere el desensamblaje de la partícula. Sin embargo, a pesar de esta disminución del área, la capacidad de hemaglutinación del antígeno permaneció constante hasta las 7 horas y a concentraciones de NaCl de 1.2 y 1.5 M donde su capacidad de hemaglutinación disminuyó hasta un 50 %. Solo cuando el HBsAg fue incubado por 72 horas, su capacidad de hemaglutinación se vio afectada un 50 % a cualquier concentración de NaCl.

La desaparición de los picos sin la aparición de otros a un tiempo mayor a los 8 minutos, los que corresponderían al desensamblaje de la partícula (formación de subestructuras monómeros, dímeros, trímeros, etc.), no explica la disminución del área total. Para determinar si la adición de sal ocasionó la precipitación del HBsAg, nos dimos a la tarea de incubar las muestras a concentraciones de NaCl de 0.0, 1.2 y 1.5 M por 7 horas. Posteriormente las muestras se centrifugaron y filtraron por 0.22 μm para su lectura en un espectrofotómetro (Beckman DU 650. USA) a 280 nm, empleando una celda de cuarzo de 1 cm de espesor. Además, las muestras incubadas hasta 72 h fueron inyectadas al HPLC-GP, pero ahora la fase móvil no contenía NaCl.

Los resultados mostraron que la partícula de HBsAg no fue precipitada al no existir una diferencia significativa en la absorbancia de las muestras, y en la **Figura 46** se muestran los resultados de la inyección del HBsAg sin NaCl en la fase móvil, donde se ve que al eliminar el NaCl del eluyente, el área de los picos se normalizó con respecto a la muestra sin NaCl. Esto sin embargo, no explica el porque de dicho fenómeno pero demuestra que es totalmente reversible.

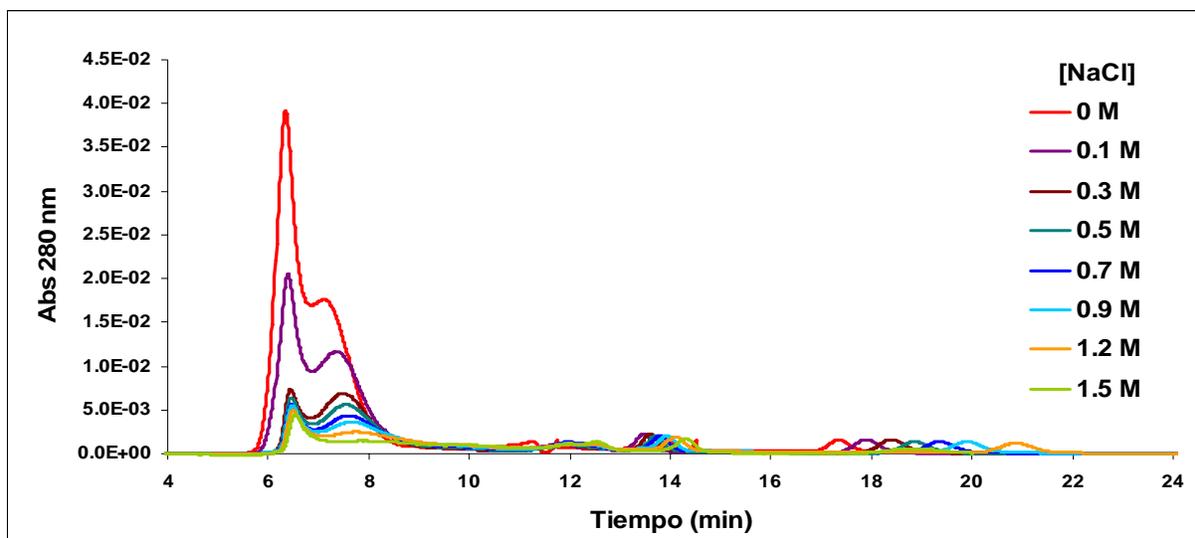


Figura 44. Perfiles cromatográficos del HBsAg en HPLC-GP en donde se observa el efecto de la fuerza iónica. Mismas condiciones que en Figura 42. Para cada concentración de NaCl a la que fue sometida la proteína se utilizó la misma concentración salina en la fase móvil.

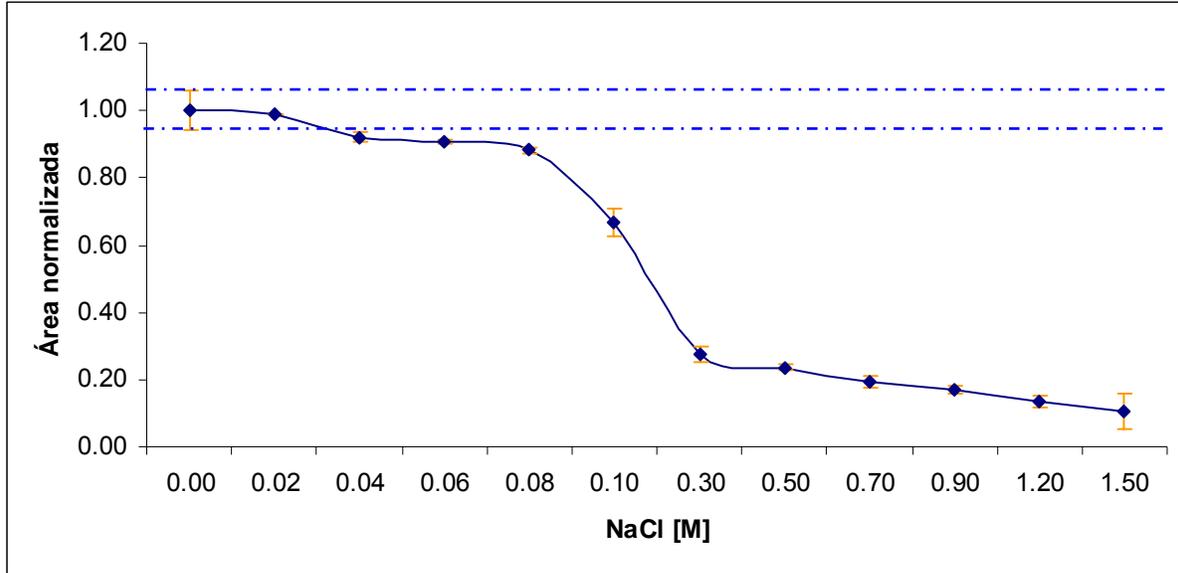


Figura 45. Efecto de la concentración de NaCl sobre el área bajo la curva del perfil cromatográfico del HBsAg, donde el 100 % es el área obtenida del cromatograma del HBsAg sin la presencia de NaCl. Las condiciones cromatográficas son las mismas que en la figura 44.

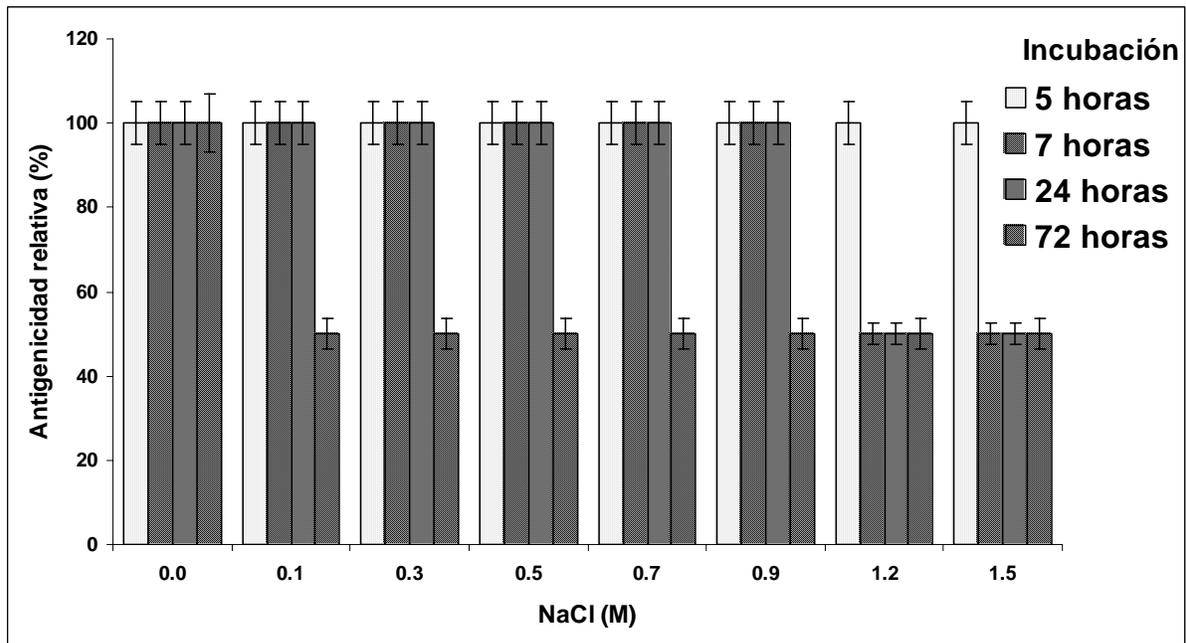


Figura 46. Pérdida de hemaglutinación del HBsAg con respecto al tiempo de incubación a diferentes concentraciones de NaCl.

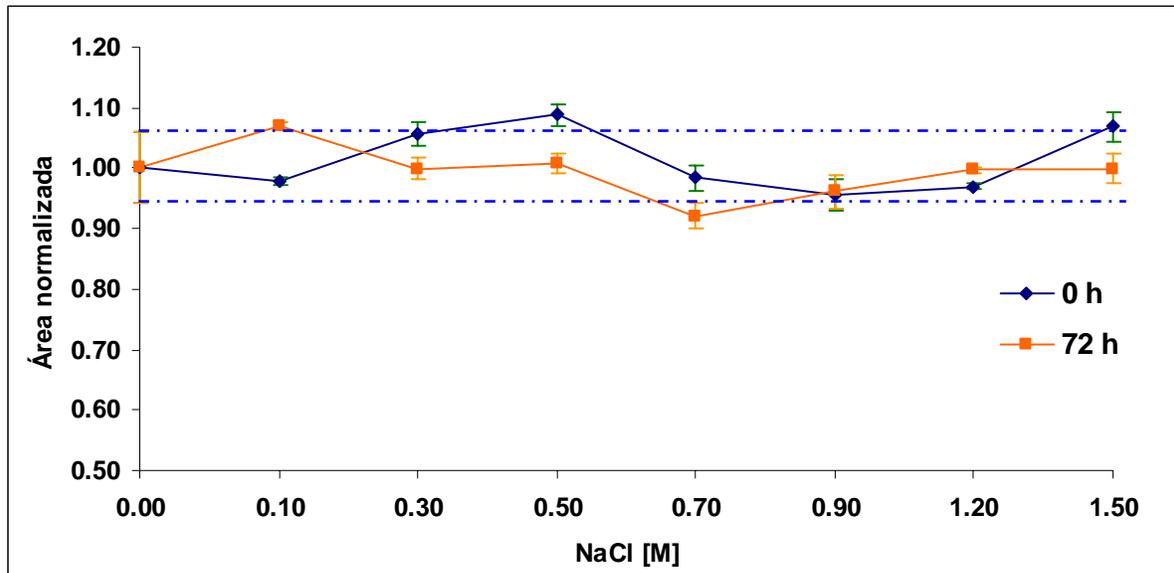


Figura 47. Efecto de la concentración de NaCl sobre el área bajo la curva del perfil cromatográfico del HBsAg, donde el 100 % es el área obtenida del cromatograma del HBsAg sin la presencia de NaCl. Fosfato dibásico 10 mM como eluyente sin NaCl.

6.6.5. Estudio del efecto a la concentración de proteína.

El ensayo comenzó con una muestra de HBsAg a una concentración de 0.2 mg/mL, la cual fue concentrada sucesivamente a 4, 8, 1.5, 3 y 11 mg/mL por medio de una celda de ultrafiltración (Amicon-Millipore. USA), utilizando una membrana de celulosa regenerada con un corte molecular de 30 kDa. Se verificó la integridad de la membrana por medio del monitoreo de la absorbancia del permeado a 280 nm.

Una vez alcanzadas las concentraciones arriba mencionadas se tomaron muestras para su análisis en HPLC-GP y PHA. Los resultados muestran que el HBsAg no tuvo problemas de solubilidad ni agregación al aumentar la concentración de proteína, hasta ≈ 11.5 mg/mL, al no cambiar la proporción de los picos 1 y 2 (**Figura 48**). Este aumento de concentración, tampoco afectó la capacidad de hemaglutinación inherente del HBsAg al no haber un cambio significativo en el porcentaje de actividad relativa (**Figura 49**).

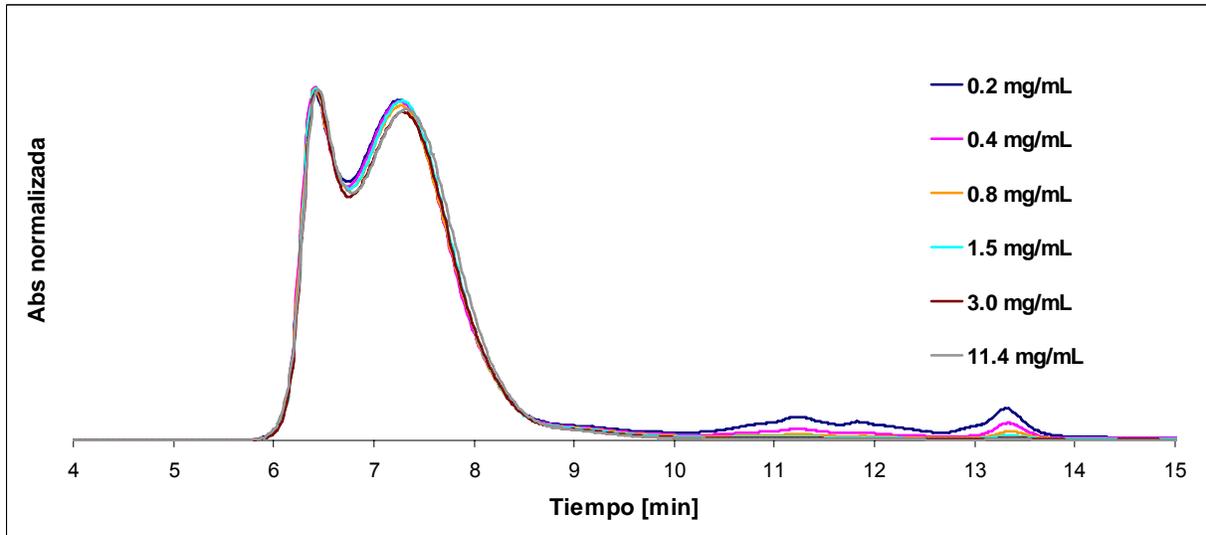


Figura 48. Análisis por HPLC-GP del HBsAg a diferentes concentraciones. Todos los cromatogramas fueron normalizados con respecto a la concentración inicial. Mismas condiciones que en la Figura 42.

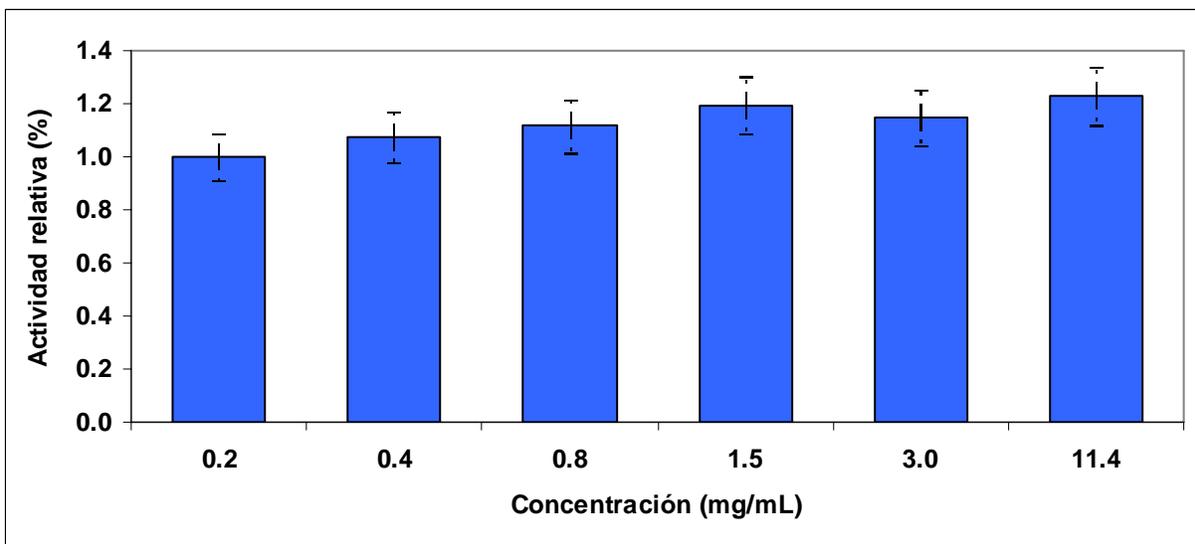


Figura 49. Efecto de la capacidad de hemaglutinación del HBsAg a diferentes concentraciones de proteína.

7. CONCLUSIONES

Las vacunas recombinantes actualmente disponibles contra el HBV son inmunogénicas, eficientes y seguras. Sin embargo, aun se requiere de la búsqueda y mejora de los procesos de producción y purificación, en términos de su capacidad para producir un HBsAg altamente puro. La purificación debe ser capaz de eliminar la mayor cantidad de los contaminantes intrínsecos (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos) y debe requerir a la vez el menor tiempo de proceso, con bajos costos de producción. Como consecuencia disminuiría el precio en el mercado, favoreciendo los programas de inmunización.

La eliminación de la etapa de ultracentrifugación con gradientes de cloruro de cesio, la cual ha sido tradicionalmente utilizada en la purificación del HBsAg, dejando como última etapa la cromatografía de exclusión en gel, ha sido analizada aquí. Los resultados obtenidos sugieren que empleando esta tecnología se consigue estar dentro de las especificaciones en cuanto al contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas contaminantes que pueden hallarse en el biofármaco, según lo marcado por la OMS. Además de disminuir drásticamente los tiempos de proceso y costos de análisis. Sin embargo, para garantizar la inocuidad de este producto hace falta el análisis de ADN y endotoxinas los cuales también marca la OMS para la purificación segura de partículas biológicamente activas de HBsAg producidas en levadura.

Por otra parte, el conocimiento del tamaño de la partícula da una idea de la estructura y buen montaje de la partícula de HBsAg, el cual es un requisito para garantizar la alta inmunogenicidad de la vacuna. La implementación de una metodología para la caracterización del HBsAg basada en HPLC-GP mostró ser una herramienta analítica poderosa y rápida para el monitoreo de las diferentes estructuras que el HBsAg derivado de levadura puede formar. Este método puede ser aplicable también en el control de calidad durante todo el proceso de purificación de la vacuna de HBsAg, donde la estructura de la partícula pudo cambiar por la agregación o la disociación de la misma, ocasionada por su exposición a diferentes condiciones (temperatura, pH,

fuerza iónica, esfuerzos de corte, presión, etc.) que no se encuentran en la célula anfitriona.

El análisis de algunas de estas condiciones fue mostrado aquí, dando como resultado la generación de datos que pueden servir como sugerencia en el control de proceso durante la producción y purificación de la vacuna. De lo anterior, podemos concluir que:

- Se implementó una metodología para la caracterización del HBsAg.
- El producto purificado como HBsAg es una mezcla heterogénea de estructuras cuyo tamaño varía principalmente entre 19 y 34 nm de diámetro.
- El HBsAg mantiene su capacidad de hemaglutinación a temperaturas menores a los 70 °C.
- A pH menores o iguales a 5.5, la capacidad de hemaglutinación disminuye en un 50 % y hasta un 75% a pH de 3.5.
- El HBsAg fue estable por tiempos de almacenaje a 4° C no mayores a 2 meses.
- La capacidad de hemaglutinación del HBsAg se vio afectada en un 50% a concentraciones mayores a 0.9 M de NaCl a tiempos de exposición ≥ 7 horas.
- A concentraciones de proteína ≤ 11.5 mg/mL, el HBsAg no presentó problemas de solubilidad, tendencia a la agregación y su capacidad de hemaglutinación no se ve afectada.
- Se encontraron las condiciones para la implementación de la cromatografía líquida de exclusión molecular para la purificación del HBsAg sin el uso de la ultracentrifugación.
- Se logró la purificación de la subpartícula viral, la cual cumple con las especificaciones del biofármaco.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Auricchio A., Hildinger M., O'Connor E., Gao G. P., Wilson J. M. Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column. *Hum. Gene. Ther.* 12 (2001) 71-76.
- Amersham Biosciences. Sephacryl High Resolution. Instruction/Protocol. 71-5002-42. Edition AA (1996). United States.
- Amersham Biosciences. Gel filtration. Principles and methods. Handbook collection 18-1022-18 Edition AI (2002). United States.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
- Bruss V., Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 1059-1063
- Bruss V., Gerhardt E., Vieluf K., Wunderlich G. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* 39 (1996) 23-31.
- Crooks A. J., Lee J. M., Stephenson J. R. The purification of alphavirus virions and subviral particles using ultrafiltration and gel exclusion chromatography. *Anal. Biochem.* 152 (1986) 295-303.
- Donald K., Paiva A. Assay for recombinant hepatitis B surface antigen using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 230 (1995) 48-54.
- Dreesman G. R., Hollinger f. B., Suriano J. R., Fujioka R. S., Brunschwing J. P., Melnick J. L. Biophysical and biochemical heterogeneity of purified hepatitis B antigen. *J. Virol.* 10 (1972) 469-476.
- Focaccia R. "Hepatitis viral". En: Calil Farhat: fundamentos e prática das imunizações em clínica médica e pediatria. 3^{ra} edición. Livraria Atheneu Editora. Sao Paulo 1989 pp. 44-349.
- Frings C. S., Dunn R. T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am. J. Clin. Pathol.* 53 (1970) 89-91.

- Ganem D. Hepadnaviridae and their replication. En: Fields Virology, 3a edit. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. (eds) Lippincott-Raven, Filadelfia 1996, pp. 2703-2708.
- Gao G., Qu G., Burnham M., Huang J., Chirmule N., Joshi B., Yu Q., Marsh J., Conceicao C., Wilson J. Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance *in vivo*. *Hum. Gene. Ther.* 11 (2000) 2079-2091.
- Gavilanes F., Gonzalez-Ros J. M., Peterson D. L. Structure of hepatitis B surface antigen characterization of the lipid components and their association with the viral protein. *J. Biol. Chem.* 10 (1982) 7770-7777.
- Gavilanes F., Gómez G. J., Aracil M., González R. JM., Ferragut JA., Guerrero E., Peterson DL. Hepatitis B surface antigen. Role of lipids in maintaining the structural and antigenic properties of protein components. *Biochem. J.* 265 (1990) 857-864.
- Gómez G. J., Rodríguez C. I., Gonzales R. JM., Ferragut JA., Paul DA., Peterson DL., Gavilanes F. Thermal stability of hepatitis B surface antigen S proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 111 (1992) 225-231.
- Grigsby J., Blanch H., Prausnitz J. Diffusivities of lysozyme in aqueous MgCl₂ solutions from dynamic light-scattering data: effect of protein and salt concentrations. *J. Phys. Chem. B.* 104 (2000) 3645-3650
- Han J., Ching S., Kuang W., Ding Y., Ning A. Isolation of hepatitis B surface antigen from transformed yeast cells. U.S. Patent 5462863 (1995).
- Harlan J., Picot D., Loll P., Garavito M. Calibration of size-exclusion chromatography: use of a double Gaussian distribution function to describe pore sizes. *Anal. Biochem.* 224 (1995) 557-563.
- Hartmann W. K., Satharish N., Yang X. Y., Mitra G., Soman G. Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection. *Anal. Biochem.* 325 (2004) 227-239.
- Hearn M. T., y Anspach B. Chemical, physical and biochemical concepts in isolation and purification of proteins. *Sep. purif. Method.* 30 (2001) 221-263.
- Heermann K.H., Goldmann Udo., Schwartz W., Seyffarth T., Baumgarten H., Gerlich W. H. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J. Virol.* 52 (1984) 396-402.

- Hemling M. E., Carr S. A., Capiou C., Petre J. Structural characterization of recombinant hepatitis B surface antigen protein by mass spectrometry. *Biochemistry* 27 (1988) 699-705.
- Hershberg R. D. Purification process for hepatitis surface antigen and product thereof. U.S. Patent 4624918.
- Hilleman M. Critical overand outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine*. 21 (2003) 4626-4649.
- Hollinger F. B. Hepatitis B virus. En: Fields Virology, 3a edit. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. (eds) Lippincott-Raven, Filadelfia 1996, pp. 2739-2741, 2781-2783.
- Huovila A., Eder A., Fuller A. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartament. *J. Cell Biol.* 6 (1992) 1305-1320.
- Huang Y., Bi J., Zhou W., Li Y., Wang Y., Ma G., Su Z. Improving recovery of recombinant hepatitis B virus surface antigen by ion-exchange chromatographic support with low ligand density. *Proc. Biochem.* 41 (2006) 2320-2326.
- Ibarra N., Caballero A., González E., Valdés R. Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen. *J. J Chromatogr B Biomed Appl.* 735 (1999) 271-277.
- Kann M., Gerlich W. Replication of hepatitis B virus. In: The molecular medicine of viral hepatitis. T.J. Harrison and A. J. Zuckerman (Eds) John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y. (1997) pp. 63-116.
- Kobayashi M., Asano T., Utsunomiya M. Recombinant hepatitis B carrying the pre-S2 region derived from yeast: purification and characterization. *J. Biotechnol.* 8 (1988) 1-22.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 (1970) 680-685.
- Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 11 (2004) 97-107.
- Le Maire M., Aggerbeck L. P., Monteilhet C., Andersen J P., Møller J. V. The use of high-performance liquid chromatography for the determination of size and molecular

- weight of proteins: a caution and a list of membrane proteins suitable as standards. *Anal. Biochem.* 154 (1986) 525-535.
- Lerro K. L., Orlando R., Zhang H., Unsherwood P. N., Nakanishi K. Separation of the stick peptides from membrane proteins by high-performance liquid chromatography in a normal phase system. *Anal. Biochem.* 215 (1993) 38-44.
- Lewis J. D., Nail S. L. The influence of ion exchange chromatography conditions on aggregation of equine IgG. *Proc. Biochem.* 32 (1997) 279-283.
- Li S., Schoneich C., Borchardt R. T. Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnol. Bioeng.* 48 (1995) 490-500.
- Maa Y. F., Hsu C. C. Effect of high shear on proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 51 (1996) 458-465.
- Maa Y. F., Hsu C. C. Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. *Biotechnol. Bioeng.* 54 (1997) 503-512.
- Macías P. M., Rodríguez W. M., Saltigeral S. P. "Vacuna contra la Hepatitis B". En: Inmunizaciones, 1^{ra} edición. Programa de actualización continua en pediatría. Intersistemas S. A. de C. V; México D. F. 1996 pp. 33-36.
- Mahoney F. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol Rev.* 12 (1999) 351-366.
- Mahoney F., Mark K. "Hepatitis B Vaccine". Capítulo 10 en: Vaccines, 3^{ra} edición. Stanley A. Plotnick and Walter A. Orenstein (Eds). W.B. Saunders Company; Filadelfia 1999 pp. 159-82.
- Manzi A., Esko J. Preparation and analysis of glycoconjugates. In Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G. Smith J. A. Struhl K. (Eds) John Wiley & Sons, 17.9 (2000).
- Mattison K., Nobbmann U., Dolak D. The role of the hydrodynamic radius in biomolecular characterization. (2001). www.malvernstruments.com
- Mattison K., Morfesis A., Kaszuba M. A primer on particle sizing using dynamic light scattering. (2003). www.malvernstruments.com
- Mehdi H., Yang X., Peeples M., Peeples M. E. An altered form of apolipoprotein H binds hepatitis B virus surface antigen most efficiently. *Virology* 217 (1996) 58-66.

- Mena J. A., Ramírez O. T., Palomares L. A. Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *J. Chromatogr. B.* 824 (2005) 267-276.
- Moreno A, Mas O. J., Soriano G. M., Oliver S. C., Bolaños G.V. Turbidity as a useful optical parameter to predict protein crystallization by dynamic light scattering. *J. Mol. Struct.* 519 (2000) 243-256.
- Nath N., Mazzur S., Ledman R., Fang CT. Purification of hepatitis B surface antigen using polyethylene glycol, pepsin and Tween 80. *Vox Sang.* 31 (1976) 84-95.
- Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.
- Núñez E., Wei X., Delgado C., Rodríguez C. I., Yélamos B., Gómez G. J., Peterson D. L., Gavilanes F. Cloning, expression, and purification of Histidine-tagged preS domains of hepatitis B virus. *Protein Expr. Purif.* 21 (2001) 183-191.
- O'Keefe D. O., Paiva A. M. Assay for recombinant hepatitis B surface antigen using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 230 (1995) 48-54.
- OMS. Requirements for hepatitis B vaccines made by recombinant DNA techniques. Technical report series No. 186 (1989).
- Ono Y., Onda R., Igarashi K., Nishioka K. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype *adr* and *adw*. *Nucleic. Acids. Res.*, 11 (1983) 1747-1757.
- Páez R., Agraz A., Herrera L. The recovery of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) from recombinant *P. pastoris* strain, disruption and precipitation studies. *Acta Biotechnol.* 13 (1993) 117-122.
- Pápai Zs., Pap T. Analysis of peak asymmetry in chromatography. *J. Chromatogr. A.* 953 (2002) 31-38.
- Prange R., Streeck R. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.* 14 (1995) 247-256.
- Reis R., Gadam S., Frautschy L. N., Orlando S., Goodrich E. M., Saksena S., Kuriyel R., Simpson C. M., Pearl S., Zydney A. L. High performance tangential flow filtration. *Biotechnol. Bioeng.* 56 (1997) 71-82.

- Rodríguez C. I., Yélamos B. Albar J. P., Peterson D. L., Gavilanes F. Selective destabilization of acidic phospholipid bilayers performed by the hepatitis B virus fusion peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 1463 (2000) 419-428.
- Rolland D., Gauthier M., Dugua J. M., Delpech L., Watelet B., Letourneur O., Arnaud M., Jovilet M. Purification of recombinant HBc antigen expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*: comparison of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation. *J. Chromatogr. B*, 753 (2001) 51-65.
- Sato Y., Ishicawa N., Takagi T. High-performance size-exclusion chromatography and molar mass measurement of low-angle laser light scattering of recombinant yeast-derived human hepatitis B virus surface antigen vaccine particles. *J. Chromatogr. A*, 507 (1990) 25-31.
- Schaefer S., Piontek M., Ahn S., Papendieck a., Janowicz Z., Timmermans I., Gellissen G. "Recombinant hepatitis B Vaccines - Disease Characterization and Vaccine Production". Capitulo 12 en: *Hansenula polymorpha*. 1^{ra} edición. Gellissen Gerd, (Ed). Wiley-VCH 2002 pp. 175-210.
- Schirmbeck R., Melber K., Mertens T., Reimann J. Selective stimulation of murine cytotoxic T cell and antibody responses by particulate or monomeric hepatitis B virus surface (S) antigen. *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 1088-1096.
- Schirmbeck R., Melber K., Reimann J. Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I-restricted epitope presentation. *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 1063-1070.
- Tarr G., Crabb J. Reverse-phase high-performance liquid chromatography of hydrophobic proteins and fragments thereof *Anal. Biochem.* 131 (1983) 99-107.
- Tejeda A., Montesinos R., Guzmán R. Cromatografía por elución. Bioseparaciones. Editorial Unison. Hermosillo Sonora. México (1995) pp. 419-492.
- Tleugabulova D. Size-exclusion chromatographic study of the reduction of recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Chromatogr. B.* 713 (1998) 401-407.
- Tleugabulova D., Falcón V., Pentón E. Evidence for the denaturation of recombinant hepatitis B surface antigen on aluminium hydroxide gel. *J. Chromatogr. B*, 720 (1998a) 153-163.
- Tleugabulova D., Falcon V., Sewer M., Penton E. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *J. Chromatogr. B.* 716 (1998b) 209-219.

- Tleugabulova D., Falcón V., Pentón E. Physico-chemical characterization of recombinant hepatitis B surface antigen by a multidimensional approach. *J. Chromatogr. A.* 845 (1999a) 171-179.
- Tleugabulova D., Falcon V., Penton E., Sewer M. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen induced in vitro by oxidative stress. *J. Chromatogr. B.* 736 (1999b) 153-166.
- Tleugabulova D., Falcon V., Penton E., Aguilar J., Martínez E., Sewer M. Caracterización físico-química e inmunológica del antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) obtenido en forma de agregados por cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (SEC). *Biotechnol. Apl.* 18 (2001) 107-108.
- Trudel M., Marchessault F., Payment P. Purification of infectious rubella virus by gel filtration on sepharose 2B compared to gradient centrifugation in sucrose, sodium metrizoate and metrizamide. *J. Virol. Meth.* 2 (1981) 141-148.
- Weinberger K., Bauer T., Böhm S., Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J. Gen. Virol.* 81 (2000) 1165-1174.
- Yamada T., Iwabuki H., Kanno T., Tanaka H., Kawai T., Fukuda H., Kondo A. Seno M., Tanizawa K., Kuroda S. Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. *Vaccine* 19 (2001) 3154-3163.
- Zhou S., Standring D. N. Cys residues of the hepatitis B virus capsid protein are not essential for the assembly of viral core particles but can influence their stability. *J. Virol.* 66 (1992) 5393-5398.
- Zhou W., Bi J., Janson J. C., Li Y., Huang Y., Zhang Y., Su Z. Molecular characterization of recombinant Hepatitis B surface antigen from Chinese hamster ovary and *Hansenula polymorpha* cells by high-performance size exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering. *J. Chromatogr. B.* 838 (2006) 71-77.
- Zunino M. E. Epidemiología de la hepatitis B en Chile y esquemas de vacunación en Latinoamérica. *Rev. Chil. Infectol.* 19 (3); (2002) 140-155.