DETERMINACIÓN DE LA PUREZA Y HOMOGENEIDAD MOLECULAR DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B (AGSHBR) POR HPLC POR FILTRACIÓN EN GEL.

Lourdes Costa[1]; Galina Moya[1]; Ernesto M. González[1]; Abel Caballero[2]; Viviana Falcón [2] y Maribel Vega[1]

[1]*Subdirección de Calidad, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba* [2]*División de Química-Física, CIGB*

Recibido en noviembre de 1993. Aprobado en febrero de 1994

Key wordss: HPLC, gel filtration, quality control, HBsAg

SUMMARY

A precise and rugged high performance size exclusion chromatography method for the control of purity and molecular homogeneity of recombinant Hepatitis B surface antigen was developed and validated on TSK G5000PW (7.5 x 600 mm). The chromatographic method showed a good resolution for the separation of the antigen particle (22-27 nm) from antigen particles with smaller size. The precision between runs and interlaboratories was under 1%. A linear behavior in the range of 20 and up to 120 μg of protein was obtained. This method was suitable for the quality control of recombinant Hepatitis B surface antigen used as active ingredient in the manufacturing of recombinant anti Hepattis B vaccine and was successfully applied to the stability study of this active raw material.

RESUMEN

Se describe un método de cromatografía líquida de alta eficacia en filtración en gel para la determinación de pureza y homogeneidad molecular de la materia prima activa del antígeno de superficie recombinante del virus de la Hepatitis B recombinante (AgsHBr), así como una metodología de validación del procedimiento analítico. Se logra separar con buena resolución la partícula de antígeno (22-27 nm) de otras posibles especies con mayor o menor estado de agregación mediante una columna TSK G5000PW. Los resultados de la validación mostraron que el método es confiable y reproducible, con coeficientes de variación menores del 1% en estudios intra- e interlaboratorios. Se evidenció un comportamiento lineal entre 20 y 120 μg de proteína. El método resulta apropiado para el control de calidad y los estudios de estabilidad de la materia prima activa del antígeno de superficie recombinante del virus de la Hepatitis B utilizado en la preparación de la vacuna recombinante contra la Hepatitis B.

INTRODUCCION

La hepatitis B es una de las enfermedades virales que afecta a una gran parte de la población mundial. El antígeno de superficie resulta ser la proteína estructural más importante del virus (AgsHB) que se agrega formando partículas de 22 nm de diámetro (3). Se ha reportado la producción del AgsHB en microrganismos utilizando la tecnología del ADN recombinante (10). El material obtenido por esta vía y extensivamente purificado puede ser usado en la formulación de una vacuna muy efectiva contra la enfermedad.

Los métodos de control analítico que se aplican al preparado vacunal deben evaluar su identidad, pureza y actividad. La cromatografía deHPLC en gel filtración es ampliamente utilizada en el estudio, desarrollo y control de biomoléculas. Se caracteriza por ser un método rápido, sencillo, confiable, fácil de reproducir, requiere de un equipamiento sencillo, las separaciones cromatográficas muestran buena resolución y no dependen fuertemente del pH, temperatura y concentración del analito (7).

En la actualidad no se concibe un método bioanalítico de control que no esté validado. El propósito de la validación de un procedimiento analítico es demostrar y documentar la resolución y confiabilidad del método y por tanto confirmar la certeza del resultado. Se ha establecido que todos los métodos analíticos deben ser validados si los resultados son usados como sustento para el registro de un nuevo

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

producto farmaceútico (1). La selección de los parámetros a validar dependen de cada técnica y de sus objetivos (5). En este trabajo se describe un método de HPLC-GF para el control de la homogeneidad molecular y pureza del AgsHBr así como el procedimiento de validación de la técnica cromatográfica teniendo en cuenta los parámetros de resolución, reproducibilidad y límite de detección.

MATERIALES Y METODOS

Equipo Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución equipado con una bomba modelo 2150 (LKB, Suecia), un monitor de longitud de onda variable (KNAUER, Alemania) acoplado a una computadora IBM compatible a través de una tarjeta de interfase BioCROM (CIGB, Cuba), un desgasificador modelo ERC-3120 (ERMA, Japón). Las corridas cromatográficas se realizaron en una columna TSK G5000PW (Ultropac, LKB), 7.5 x 600 mm de diámetro interno.

Reactivos

Juego de proteínas patrones para la calibración cromatográfica en el rango de 12500-45000 Da (Boehringer Mannheim), preparados en el tampón de corrida a una concentración de 2 mg/mL. Marcador de peso molecular azul dextrana (Pharmacia).

Condiciones cromatográficas

El tampón de corrida consistió en tampón fosfato salino a pH 7 conteniendo KH_2PO_4 1.7 mM, Na_2HPO_4 7.9 mM, KCl 2.7 mM, y NaCl 0.25 M. Los análisis se realizaron a un flujo de 0.2 mL/min y la detección se efectuó a 280 nmde longitud de onda.

Patrón de laboratorio

Como patrón de laboratorio se utilizó una preparación de MPA de AgsHBr cuya pureza y composición fueron determinadas por:

- determinación de proteína por Lowry (4)
- determinación de proteína por medición de la absorbancia a 280 nm
- determinación de la concentración de antígeno por ELISA (6)
- determinación del tamaño de partícula por microscopía electrónica (figura 1)
- control de pureza por HPLC-GF (TSK G3000PW)
- control de pureza por SDS-PAGE (figura 2)

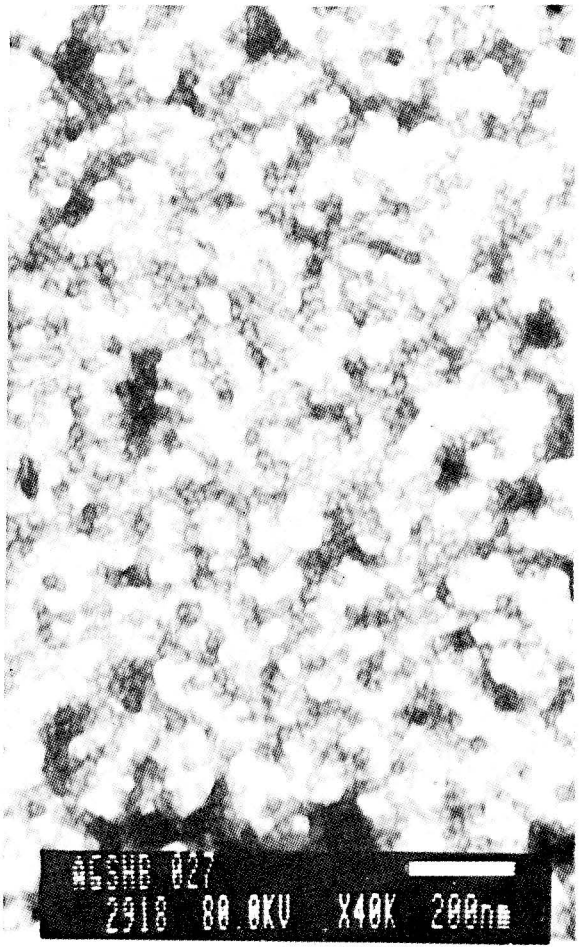

Fig 1. Microscopía electrónica del patrón de AgsHB. Se observa el carácter particulado, partículas entre 22 y 27 nm.

Fig 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE bajo condiciones de reducción. Tinción con azul de Coomassie G-250. Líneas 1 y 2 - Patrón de laboratorio de AgsHB. Línea 3 - Patrón de Peso Molecular (A-67, B-18 y C-14 KDa)

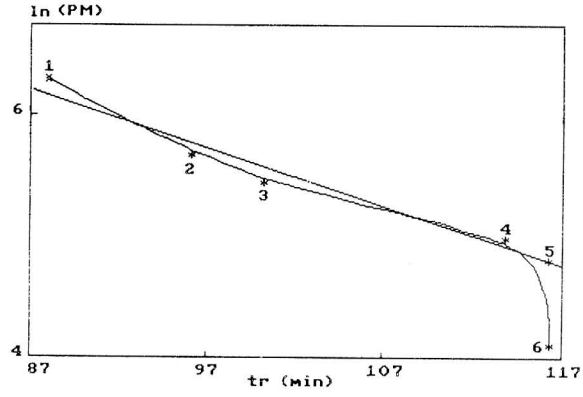

Fig 3. Curva de calibración para una mezcla de proteínas patrones, 1- azul dextran 2000 2- ferritina 3- catalasa, 4- aldolasa, 5- Albúmina de suero bovino 6- citocromo C

Cálculos

Para la adquisición y procesamiento de los datos se empleó el programa BioCROM (CIGB, Cuba). El procesamiento estadístico se realizó con ayuda del programa Statgraphics versión 2.6 (Manugistics Inc, 1992). La curva de calibración se construyó usando el método de los mínimos cuadrados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Resolución cromatográfica

La columna TSK G5000PW (7.5 x 600 mm) demostró tener un rango de permeación apropiado para el análisis del AgsHBr. Al graficar el logaritmo del peso molecular [ln (PM)] contra el tiempo de retención (tr) (figura 3) se obtuvo una curva de calibración lineal en el rango de 2000-68 kDa con un coeficiente de correlación de 0.9908.

Al analizar una alícuota de 100 mg de proteína del patrón de laboratorio se obtuvo el perfil cromatográfico que aparece en la figura 4a. El pico principal, con tiempo de retención de 75.6 min eluye primero que el azul dextrana, indicativo de una talla molecular en el entorno de 2000 kDa, como era de esperar según la talla molecular del AgsHBr particulado.

Selectividad

La selectividad es un parámetro que se emplea para medir el grado de interferencias en una técnica analítica dada (2). Un cromatograma de un blanco (proceso de producción a partir de una fermentación que contenía el plásmido sin inserto) aparece en la figura 4b; no se observan interferencias en el tiempo de retención del antígeno. El perfil cromatográfico no muestra ninguna señal. El cromatograma de una muestra atípica de AgsHBr aparece en la figura 5, se obtienen 2 señales una a los 77 min (pico 1) y otra a los 116 min (pico 2). Cada fracción fue colectada y analizada por ELISA y microscopía electrónica. El pico 1 correspondió con el antígeno particulado mostrando una respuesta positiva en el ELISA y un diámetro promedio de partículas en el intervalo de 22-26 nm. El material colectado en la segunda fracción mostró una señal a nivel del fondo cuando fue analizado por ELISA y un diámetro promedio de partículas menor de 15 nm. El pico 1 fue retenido y el pico 2 pasó a través de una membrana YM30 (tamaño de poro 30000) lo que sugiere que el pico 2 se corresponde con antígeno de menor grado de particulación. Las condiciones cromatográficas escogidas garantizan una buena resolución entre la partícula de antígeno y otras posibles especies de menor o mayor estado de agregación.

Precisión

Para conocer la variabilidad del método, 3 analistas independientes efectuaron un análisis diario durante 12 días,

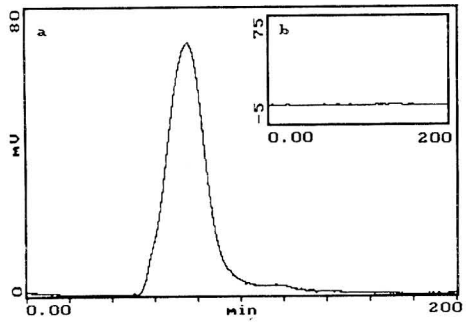

Fig 4. Cromatograma típico de una muestra de AgsHB, a- Cromatograma del patrón de AgsHB en gel filtración HPLC, b- Cromatograma de un blanco

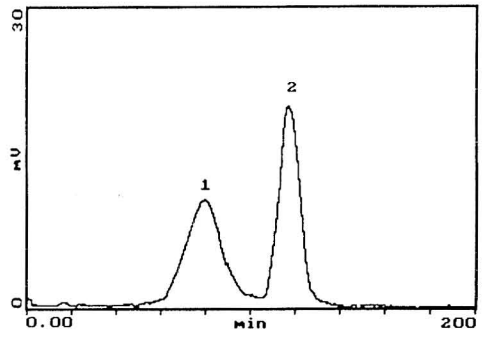

Fig 5. Perfil cromatográfico de una muestra de MPA atípica, pico 1: AgsHB particulado, pico 2: AgsHB con menor grado de particulación

Tabla 1
Datos de tiempo de retención en función del día y el analista

DIA	TIEMPO DE RETENCION(min)		
	A1	A2	A3
1	79.6	77.9	79.3
2	77.9	78.7	78.2
3	78.9	78.3	77.8
4	78.4	78.7	78.2
5	78.4	78.6	78.4
6	79.3	78.6	77.9
7	78.2	78.7	78.9
8	78.4	77.9	77.6
9	77.5	78.1	78.2
10	78.1	78.6	78.3
11	78.2	78.3	78.4
12	77.5	77.4	77.8

A: Analista

inyectando 200 μL del patrón de laboratorio de AgsHBr. Los datos obtenidos (tabla 1) se sometieron a un análisis de varianza con bloqueo simple (tabla 2). El método resultó ser reproducible, no existiendo diferencias significativas debidas a los analistas y al día.

El coeficiente de variación del método es menor del 1%, comparable con lo reportado en la literatura (9) para la variabilidad de métodos cromatográficos analíticos.

Tabla 2
Análisis de varianza para determinar la reproducibilidad del método

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.L	MEDIA DE CUADRADOS	F. EXP.	F. TAB.
TOTAL	9.19	35	-	-	-
ANALISTA	0.101	2	0.051	0.231	2.56
DIA	4.251	11	0.386	1.757	1.90
ERROR	4.838	22	0.220	-	-

Tabla 3
Resultados de precisión del laboratorio 2

DIA	n	tr(min)	media	DS	CV(%)
1	3	67.58	67.58	0.23	0.34
		67.63			
		67.78			
2	3	67.82	67.78	0.07	0.10
		67.70			
		67.81			
3	4	67.60	67.54	0.14	0.21
		67.67			
		67.72			
		67.38			

Reproducibilidad interlaboratorio:

Para determinar la variabilidad interlaboratorio del método se aplicaron a la columna 100 μg de proteína en dos laboratorios independiente durante 3 días. El coeficiente de variación para el tiempo de retención fue menor del 1% (tabla 3) confirmándose la buena precisión del método.

Linealidad

En el intervalo de 20 a 120 μg de proteína, el sistema mostró un comportamiento lineal al graficar el área bajo la curva contra cantidad de proteína aplicada. La curva de calibración (n-4 para cada punto de la curva) mostró un coeficiene de correlación de 0.991.

Aplicación

El método puede ser utilizado como una herramienta muy útil en los estudios de estabilidad y conservación del AgsHB. Los cromatogramas de muestras de AgsHB almacenadas a 3 temperaturas: 4°C, 45°C y 55°C durante 15 días se muestran en la figura 6. Se observan ligeros cambios en los perfiles cromatográficos en dependencia de la temperatura de exposición; cuando la muestra es almacenada a 55°C durante 15 días aparece un pico a los 117 min correspondiente con antígeno de menor estado de agregación. El hombro al inicio del pico principal aumenta con la temperatura. Mediante el empleo del HPLC-GF pueden detectarse variaciones en la partícula de antígeno en función del tiempo y la temperatura de conservación. Una carta de control que refleja los resultados de los tiempos de retención de diferentes lotes de MPA empleados como

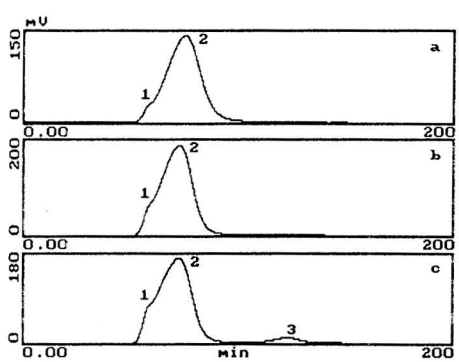

Fig 6. Cromatogramas obtenidos al someter una MPA de AgsHB a diferentes temperaturas durante 15 días, a) 4ºC b) 45ºC c) 55ºC

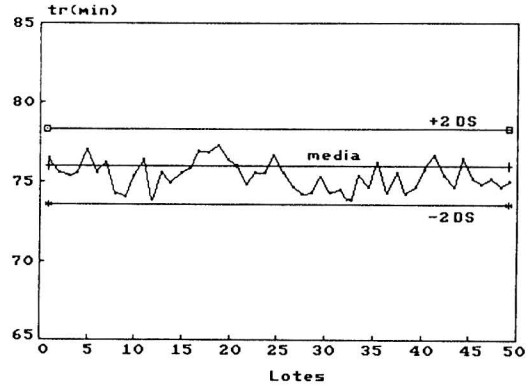

Fig 7. Carta de Control de Calidad para diferentes lotes de MPA de AgsHB

ingrediente activo en la producción de la vacuna cubana recombinante anti hepatitis B se muestra en la figura 7. Este parámetro osciló de manera estable alrededor de la media con un coeficiente de variación de lote a lote menor del 1.5% confirmándose la consistencia del proceso de producción.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método de HPLC-GF para la determinación de pureza y homogeneidad molecular de la materia prima activa del antígeno de superficie de la Hepatitis B que resultó ser selectivo y preciso lo que permite utilizarlo en estudios de estabilidad y en análisis rutinarios de control de calidad.

REFERENCIAS

1-BUICK A.R. (1990). Method validation in the bioanalytical laboratory J. of Pharmaceutical & Biomedical Analysis **8**:629-637.

2-DE SAIN C. (1992). Master Method Validation Protocols. BioPharm June: 30-34.

3-HITZEMAN R.A.; C.Y. CHEN; F.E HAGIE; E.J. PATZER; C.C LIU; D.A. ESTELL; J.V. MILLER; A. YFFE; D.G. KLEID; A.D. LEVINSON y H. OPPERRMANN (1983). Expresion of hepatitis B virus surface antigen in yeast. Nucleic Acid Research **19**:2745-63.

4-LOWRY, O.H; J. ROSEMBROUGH; A.L. FARR; R.J. RANDALL (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**:265-275.

5-RAMPAZZO P. (1990) Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry . IL FARMACO **45**:807-815.

6-RAMIREZ, V; A. ALERM; I. VEGA; A. SALGADO; M. IZQUIERDO y A. GONZALEZ-GRIEGO (1989). Cuantificación del HBsAg para la producción de vacunas y pronóstico de reservorios virales. Resúmenes del Tercer Seminario Internacional sobre Interferón y Segundo Seminario Internacional sobre Biotecnología. S05-031.

7-REGNIER F.E. (1987). HPLC of Biological Macromolecules: The First Decade. Chromatographia **24**:241-251.

8-STEPEPHENNE J. (1990). Development and production aspects of a recombinant yeast derived hepatitis B vaccine. Vaccine **8**:S69-S73

9-WIGGINGS D. E. (1989). How to set Realistic System Suitability Criteria LC-GC 7:851-854.

10-WHO (1987). Report of a WHO meeting on hepatitis B vaccines produced by recombinant DNA techniques. Technical Report Series No 760.