REPORTES ESPECIALES/ SPECIAL REPORTS

ESTABILIDAD DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B RECOMBINANTE EN DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.

Maribel Vega, Daisy Barbería, Lourdes Costa, Tania Currás, Judith Pineda, Alberto Agraz, Ernesto González, Vivian Pujol, Mabel Izquierdo, Gerardo García, Viviana Falcón

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Apartado Postal 6162. La Habana 6, C.P. 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en noviembre de 1993. Aprobado en noviembre de 1994.

Key words: Recombinant hepatitis B, surface antigen, stability, storage, freezing, freeze drying.

SUMMARY

We studied the stability of recombinant hepatitis B surface antigen (HBsAg) in phosphate saline buffer when stored frozen (-20°C and -70°C), refrigerated (4°C), closed to room temperature (28°C) and freeze dried. AgsHB is produced at the CIGB, Cuba, by recombinant DNA techniques from *Pichia pastoris* yeast. After a purification process, an antigen more than 95% pure is obtained. AgsHB is used in the Cuban anti-hepatitis B recombinant vaccine Heberbiovac HB.

Just after the production of HBsAg, we tested its antigenic identity by immunoenzimatic assay (ELISA), the purity and degradation level by electrophoresis and the particle size by gel filtration in high performance chromatographic system. These tests were assumed as zero or initial time. After that, we evaluated the samples stored at different conditions at each subsequent test interval, comparing the results with those at the initial time.

The time of the study was prolonged up to 16 months at 4°C and up to 10 months at 28°C, frozen for 3,5 months and freeze dried for one month.

At the studied conditions HBsAg maintained its antigenic identity and there were not noticeable changes in its organoleptic characteristics. Regularly it preserved its physico-chemical characteristics, but we observed some structural changes when the HBsAg was frozen or freeze dried. We consider that the HBsAg preserved invariably its characteristic at 4°C in the evaluated period.

RESUMEN

Se estudió la estabilidad del antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B (AgsHB) en tampón fosfato, en condiciones de congelación (-20°C y -70°C), refrigeración (4°C), temperatura cercana a la ambiente (28°C) y en forma liofilizada. El AgsHB fue producido en el CIGB por vía recombinante a partir de levadura *Pichia pastoris*. Luego de un proceso de purificación,

dicho antígeno se obtiene con más del 95% de pureza. El AgsHB se emplea en la formulación de la vacuna cubana antihepatitis B recombinante Heberbiovac HB.

El material se analizó inmediatamente después de su producción evaluando la identidad antigénica del AgsHB mediante ensayo inmunoenzimático tipo ELISA, su pureza y degradación por electroforesis y el grado de particulación por gel filtración (cromatografía de alta resolución) y microscopia electrónica. Estos análisis se tomaron como tiempo cero o inicial. Posteriormente se realizaron los análisis en diferentes intervalos de tiempo a las muestras almacenadas en las distintas condiciones y se compararon con los resultados obtenidos en el tiempo inicial.

El tiempo de estudio se extendió hasta 16 meses a temperatura de 4°C y hasta 10 meses a 28°C; en condiciones de congelación hasta 3,5 meses y en forma liofilizada hasta un mes.

El AgsHB mantuvo su identidad antigénica y no se observaron cambios en sus características organolépticas en las diferentes condiciones de estudio y en general conservó sus características físico-químicas y solo se observaron algunos cambios estructurales cuando el antígeno se congeló o se liofilizó.

A 4°C, el AgsHB se mantuvo estable durante todo el estudio.

INTRODUCCION

El propósito de los estudios de estabilidad es determinar como la calidad de un producto varía con el tiempo bajo la influencia de una variedad de factores experimentales. La calidad de un producto se determina por su contenido de sustancia activa, por su pureza (que los productos de degradación y contaminantes se encuentren dentro de los límites especificados), y por sus propiedades organolépticas, físico-químicas y microbiológicas (The Rules governing Medicinal Products in the European Community, 1987).

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud La Habana, Cuba Los análisis que se realizan tienen como objetivo obtener información que permita proponer un tiempo de vida útil para un producto medicinal y recomendar sus condiciones de almacenamiento. Como conclusiones deben recomendarse las condiciones más apropiadas de almacenamiento y el período en que se garantiza que el material cumple con las especificaciones (Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics, 1987)

Se ha reportado que el AgsHB tiene una estructura molecular compleja pues en adición a la proteína existen carbohidratos y lípidos provenientes del hospedero (Peterson et al., 1977; Steiner et al., 1974; Gavilanes et al., 1982). De los diferentes componentes del AgsHB, las proteínas son las responsables de la inducción de anticuerpos, (Dreesman et al., 1975; Shih y Gerin, 1975; Shih et al., 1978; Sanchez et al., 1981). Los lípidos, por su parte, desempeñan un importante papel pues mantienen la estructura y la actividad antigénica del antígeno (Gavilanes et al., 1990).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la estabilidad del AgsHB, que se produce en el CIGB a partir de levadura, y se emplea como principio activo en la formulación de la vacuna cubana antihepatitis B recombinante Heberbiovac HB. En este trabajo se exponen los resultados de los análisis físico-químicos realizados al AgsHB almacenado en las diferentes condiciones. Se observaron cambios estructurales cuando el antígeno se congeló o se liofilizó, pero hasta 16 meses de almacenado a 4°C y a 28°C por 10 meses, mantuvo sus especificaciones de calidad, lo cual evidencia su elevada estabilidad.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB), condiciones de estudio

Se utilizó AgsHB en solución tampón que contiene 0.85 g/L de NaH₂PO₄, 1.39 g/L de Na₂HPO₄ y 8 g/L de NaCl a pH 7.0. El material se envasó en recipientes de cristal limpios y estériles. Se controló el procedimiento para este fin según la USP XXII (USP XXII, 1990).

Las muestras utilizadas en los estudios se tomaron de lotes industriales. Su calidad, es decir concentración de AgsHB, pureza, y características físico-químicas y organolépticas fueron representativas de la producción en general. Los lotes de estudio se aprobaron por control de calidad para su uso en la formulación de la vacuna cubana antihepatitis B en el momento de su producción.

La temperatura de almacenamiento en las diferentes condiciones fue controlada y las variaciones no fueron mayores de $\pm 1^{\circ}C$. Los experimentos presentados se

realizaron con tres lotes en cada condición de almacenamiento comomínimo.

Determinaciones analíticas

Todos los análisis se realizaron en los laboratorios de control de calidad, siguiendo los mismos procedimientos utilizados en el control de calidad de los lotes de AgsHB y por el mismo personal. Las técnicas analíticas empleadas fueron validadas para identificar los cambios ocurridos y mostrar los productos de degradación. Se estudiaron las especificaciones que son susceptibles de cambiar en el tiempo.

Ensayo Inmunoenzimático tipo ELISA

Las concentraciones de AgsHB en las diferentes muestras se determinaron por ELISA usando un anticuerpo policional de carnero, obtenido contra antígeno natural. Para cada análisis se tomaron tres muestras por lote (réplicas), calculándose luego los estadígrafos: media muestral, desviación estándar y coeficiente de variación. Los puntos para los cuales el coeficiente de variación fue mayor que 20% se desecharon.

Cromatografía líquida de alta resolución en gel filtración

Entre 100 y 150 μL de muestra se aplicaron a una columna (TSK G5000PW, Japón) de 7.5 x 600 mm, con un flujo de 0.2 mL/min. La detección se realizó a 280 nm.

El análisis de la muestra por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en gel filtración verifica si el tiempo de retención del pico principal del antígeno se encuentra dentro del intervalo establecido (73-78 min), lo que indica que el tamaño de las partículas es el adecuado (20 a 27 nm). Además, permite detectar la existencia de agregación o degradación, cuyas fracciones se separarían del pico principal presentando tiempos de retención menores o mayores, respectivamente. Con este análisis se puede cuantificar, de forma relativa, la cantidad porcentual que representa el pico principal del total de especies en la muestra (pureza) y la cantidad relativa de material degradado o agregado. Esto se hace calculando el área bajo la curva para lo cual se emplea el programa BioCROM (CIGB, Cuba).

Electroforesis

Se realizó en geles de poliacrilamida al 12.5% en presencia de SDS. Las muestras se trataron con tampón de tratamiento (Laemmli, 1971), calentándose durante 10 min a 100°C. Se aplicaron 25 µg de proteínas en geles que posteriormente se tiñeron con Coomassie (Gel Electroforesis of proteins, 1981). La cantidad porcentual de cada especie en las muestras se determinó por densitometría, en un equipo Laser (LKB, Suecia, modelo ULTROSCAN 2202).

Mediante el análisis de la corrida electroforética puede observarse si existen bandas de degradación. Además puede compararse si la migración del antígeno en el gel es similar, en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos y en la muestra patrón. También se puede determinar el porcentaje relativo que representan las bandas de degradación y las especies de mayor talla molecular. La cantidad, en por ciento, que representa el AgsHB se reporta como pureza.

Observación al microscopio electrónico

Se realizó por el método de tinción negativa. Las microfotografías fueron tomadas con un aumento de X40 K.

Mediante la observación al microscopio electrónico, pueden compararse las partículas de las muestras sometidas a tratamientos, detectando la presencia de especies de morfología diferente.

Observación de las características organolépticas

Cada muestra tomada se observó para determinar si sus características de color, transparencia, y ausencia de precipitado, entre otras, se mantienen con respecto a las muestras que no han sido sometidas a ningún tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

La estabilidad a 4°C del AgsHB recombinante en solución, antes de la adsorción en gel de hidróxido de aluminio se estudió hasta 16 meses después de su producción. Los resultados de los análisis realizados inmediatamente después de producido cada lote y al final del estudio se muestran en la tabla 1.

Los resultados de los análisis en los tiempos intermedios son similares a los que se reportan en la tabla. No existió tendencia a la disminución de la concentración en el tiempo, es decir, se corroboró mediante ensayo inmunoenzimático la identidad antigénica del AgsHB. El nivel de pureza determinado por electroforesis se mantuvo hasta el final del estudio y el perfil cromatográfico en gel filtración no tuvo cambios significativos. Como se muestra en la tabla 1, el comportamiento de los parámetros estudiados fue similar para los diferentes lotes. Los resultados demostraron la estabilidad del antígeno almacenado a 4°C.

Para comprobar los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad, se preparó una vacuna con AgsHB proveniente de los lotes de producción almacenados por 16 meses.

Tanto los análisis físico-químicos como la potencia de la vacuna preparada fueron satisfactorios (tabla 2), teniendo en cuenta que las especificaciones de calidad de la potencia relativa de las vacunas se basan en límites inferiores, lo que se sustenta fundamentalmente en los resultados de los estudios clínicos realizados en humanos. Para la vacuna cubana antihepatitis B se establece que la potencia debe ser superior a 0,5. La variabilidad encontrada en los resultados es aceptable para este tipo de pruebas en las que se utilizan animales, y además, técnicas inmunoquímicas para la cuantificación de anticuerpos (Ferguson et al., 1989 y 1990; Peetermans 1987).

En ningún lote se observó degradación del AgsHB al almacenarlo a 28°C durante 10 meses. Para cada lote la variación de la pureza en el transcuso del tiempo de

Tabla 1
Estudio del AgsHB almacenado a 4°C.

Estadio del Agail Ballimateriado a 1 c.							
Lote	Tiempo de almacena miento (meses)	Concen tración (g/m L) (A)	Pureza (%) (B)	Tiempo de retención (min) (C)	Pureza (%) (D)		
9201-02	0	561	99.2	77.3	96		
	10	533	99.7	77.0	98		
9205-11R	0	439	98.4	75.3	97		
	15	693	99.1	78.0	97		
9148R	0	528	100	77.0	94		
	15	830	99.6	75.8	99		
9149	0	398	100	77.7	94		
	15	555	99.6	76.6	99		
9143-44	0	466	100	77.8	95		
	16	368	100	76.8	97		
9145-46	0	355	100	77.6	94		
	16	484	100	76.1	95		
Límites de aceptación		-	> 97%	73 - 78 min	(97 ± 3)%		

(A) Determinada por ensayo inmunoenzimático tipo ELISA. (B) Determinada por cromatografía de gel filtración de alta resolución (HPLC). (C) Se refiere al tiempo de retención de la fracción mayoritaria en la cromatografía de gel filtración de alta resolución. (D) Determinada por densitometría a partir de electroforesis en gel de poliacrilamida.

Tabla 2

Evaluación de lotes experimentales de vacuna antihepatitis B producidos a partir de AgsHB almacenado en diferentes condiciones

AgsHB		Vacuna experimental					
Lote	Condiciones de almacenamiento	Lote	Potencia Relativa (E)	Desadsorción del AgsHB del gel de Al(OH)3 (F)	Características organolépticas (G)		
9143-44	4°C por 16 meses	1/93	3.56	Satisfactorio	Satisfactorio		
9145-46	4°C por 16 meses	2/93	3.63	Satisfactorio	Satisfactorio		
9200	4°C por 3.5 meses	10/93	15.50	Satisfactorio	Satisfactorio		
9200	-70°C por 3.5 meses	8/93	12.10	Satisfactorio	Satisfactorio		
Límites de aceptación			> 0.5	Satisfactorio	Satisfactorio		

(E) Se determinó según lo reportado por Izquierdo M. et al, 1993 (11).

(F) El método para evaluar el AgsHB desadsorbido del adyuvante (gel de Al(OH)3) fue descrito por Izquierdo M. et al, 1993 (12).

⁽G) Se evalúa por observación. Si la vacuna se presenta como una suspensión blanco grisácea que se separa en dos fases, una líquida y otra en forma de gel, después de un tiempo de sedimentación, que al agitar se resuspende fácilmente, el resultado de esta especificación se da como satisfactorio.

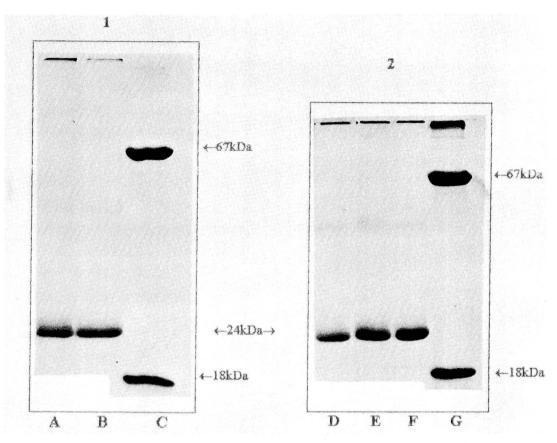


Fig. 1. Electroforesis de las muestras almacenadas a 4°C y 28°C. 1: Tiempo inicial, A: Muestra inicial, B: Patrón de antígeno; C: Patrones de pesos moleculares; 2: 10 meses, D: Patrón de antígeno: Banda mayoritaria, monómero 24 kDa, Dímero 43 kDa, E: Muestra almacenada a 4°C, F: Muestra almacenada a 28°C, G: Patrones de pesos moleculares;: Albúmina de suero bovino: 67kDa, Interferón alfa recombinante: 18 kDa..

estudio se encontró dentro de la variabilidad propia del método de determinación. En la figura 1 se muestra el análisis por electroforésis de uno de los lotes estudiados. En este caso, la pureza de la muestra inicial fue de 96±3% y después de 10 meses de almacenamiento se obtuvo 98±3% para el control a 4°C y 97±3% a 28°C, sin apreciarse bandas de degradación en ninguna de las muestras.

En todos los casos, el tamaño de las partículas, determinado por microscopia electrónica, osciló en un rango de 20 a 27 nm de diámetro, tanto en el tiempo inicial como después de almacenado el AgsHB a 4°C y a 28°C hasta 10 meses.

El perfil cromatográfico de las muestras, después del almacenamiento, corroboró los resultados obtenidos por electroforesis. El AgsHB que se mantuvo a 4°C y 28°C mostró una fracción mayoritaria de tiempo de retención 77 min como promedio en los diferentes lotes, que se corresponde con antígeno adecuadamente particulado. Esto puede afirmarse porque el tiempo de retención de esta especie en la columna se encontró dentro de los límites establecidos para este parámetro: de 73 a 78 min (figura 2).

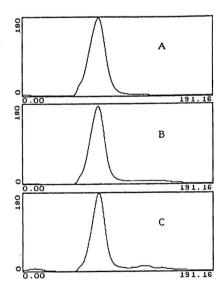


Fig. 2. Perfil cromatográfico del AgsHB almacenado a 4°C y 28°C, A: Muestra inicial, 4°C; Tiempo de retención: 77,3 min; Pureza: 99,2; B: Muestra almacenada por 10 meses a 4°C; Tiempo de retención: 77,0 min; Pureza: 99,7; C: Muestra almacenada por 10 meses a 28°C; Tiempo de retención: 76,6 min; Pureza: 99,4% Eje X: Tiempo de corrida (min); Eje Y: Absorbancia a 280 nm (mV)

El AgsHB que se congeló mostró, además, una fracción de menor tiempo de retención que la fracción principal (figura 3), que corresponde a partículas con mayor estado de agregación. La fracción de AgsHB agregado en ningún lote fue mayor del 1% después de 3,5 meses a -70°C, pero llegó a representar el 4% del total, como máximo en los lotes estudiados, para las muestras almacenadas a -20°C el mismo tiempo. A -20°C pueden quedar elementos de la solución que no se congelen completamente, a consecuencia de lo cual el pH puede variar drásticamente, por tal razón, para conservar proteínas es mejor emplear temperaturas inferiores a -25°C. La verdadera solidificación que ocurre a -70°C minimiza la desnaturalización de las proteínas (Scope, 1987; Franks, 1992).

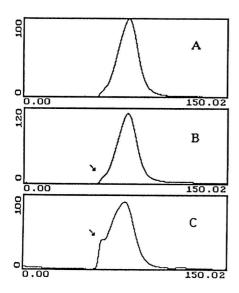
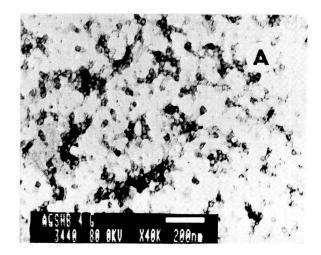
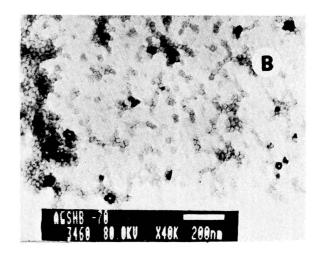


Fig. 3. Perfiles cromatográficos del AgsHB sometido a condiciones de congelación. A: Muestra control; Tiempo de almacenamiento 3,5 meses, 4°C; B:Tiempo de almacenamiento 3.5 meses, -70°C; C: Tiempo de almacenamiento 3.5 meses, -20°C.La flecha señala la fracción de mayor estado de agregación en cada caso.

Mediante microscopía electrónica no se detectaron diferencias entre las partículas que componen las muestras sometidas a diferentes condiciones de congelación (figura 4), cuyo tamaño fue similar al de las muestras de 4°C (20-27 nm).

El AgsHB fue reconocido por el anticuerpo policional en el ensayo ELISA, lo que demuestra que las partículas no perdieron su identidad antigénica a causa de ser congeladas. La potencia de la vacuna preparada a partir del AgsHB congelado a -70°C por 3,5 meses, fue satisfactoria. Los resultados se muestran en la tabla 2.





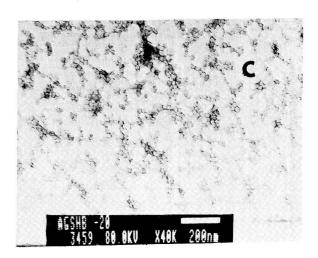


Fig. 4. Microfotografía electrónica de las muestras congeladas. A: Muestra control; Tiempo de almacenamiento 3,5 meses, 4°C; B: Tiempo de almacenamiento 3,5 meses, -70°C; C:Tiempo de almacenamiento 3,5 meses, -20°C.

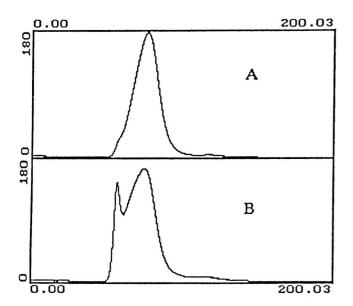


Fig. 5. Perfiles cromatográficos del HBsAg antes y después de liofilizado

(A): antes de liofilizar

(B): después de liofilizar.

Eje X: Tiempo de corrida (min)

Eje Y: Absorbancia a 280 nm (mV)

En las muestras de AgsHB que se almacenaron por un mes en forma liofilizada también se observó una fracción de menor tiempo de retención que la fracción principal, pero en mayor cantidad. Como promedio, entre los diferentes lotes liofilizados la fracción de menor tiempo de retención contiene el 18% del AgsHB total de la muestra.

En general el proceso de liofilización produjo una disminución significativa en el reconocimiento del AgsHB por el anticuerpo policional del ELISA, lo cual evidenció que este proceso le produjo cambios que afectaron su reconocimiento por los anticuerpos empleados en el ensayo inmunoenzimático.

Aunque la liofilización se prefiere cada vez más en la industria farmacéutica, a pesar del alto costo y tiempo de procesamiento que implica este método (Pikal, 1991, partes I y II), se ha reportado que la actividad de las proteínas tiende a bajar sustancialmente durante el proceso (Franks et al., 1991).

La apariencia de las muestras no cambió al ser sometidas a los distintos tratamientos; no varió su coloración ni se afectó su transparencia, no aparecieron precipitados ni evidencias de cambio de viscosidad, ni otra alteración de las características organolépticas.

CONCLUSIONES

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B purificado en el CIGB puede almacenarse a 4°C durante 12 meses, en condiciones estériles. En este tiempo se garantiza la estabilidad, pues los estudios se extendieron hasta 16 meses a esta temperatura, satisfactoriamente.

La cromatografía de gel filtración en sistema de alta eficacia sirve para verificar los cambios estructurales que se producen en el antígeno cuando este se congela o se liofiliza.

La temperatura de -20°C no es adecuada para el almacenamiento del AgsHB, pero a -70°C hasta 3,5 meses no se detectaron cambios significativos. La liofilización, además, afectó el reconocimiento del AgsHB por el anticuerpo policional del ensayo ELISA.

Aunque la temperatura de 28°C no es recomendable para el almacenamiento del producto, por su propia naturaleza, no se encontraron cambios estructurales cuando fue sometido a estas condiciones hasta 10 meses, lo que muestra su alta estabilidad.

REFERENCIAS

- BIOCROM (1991). Automatic Control Division. User's manual, CIGB.
- DREESMAN, G.R.; F.B. HOLLINGER y J.L. MELNICK (1975). Am. J. Med. Sci. 270:123-129.
- 3.- FERGUSON, M.; V. SEAGROATT and G.C. SCHILD (1989). Biol. Stand. 17:151-160.
- FERGUSON, M.; A. HEATH and P.D. MINOR (1990). Biologicals 18:345-350.
- 5.- FRANKS, F., H.M.R. HATLEY y S.F. MATHIAS (1991). Pharm. Techn. Int. 4:38.
- 6.- FRANKS, F. (1992). Japanese J. of Freezing and Drying. 38:5-16.
- 7.- GAVILANES, F.; J.M. GONZÁLEZ-ROS y D.L. PETERSON (1982). J. Biol. Chem. 257:7770-7777.
- 8.- GAVILANES, F., J. GÓMEZ-GUTIÉRREZ; M. ARACIL; J.M. GONZÁLEZ-ROS; J.A. FERRAGUT; E. GUERRERO y D.L. PETERSON (1990). Biochem. J. 265:857-864.
- Gel electrophoresis of proteins: A Practical Approach. (1981).
 Ed. B. D. Hames y Rickwood. I R L Press.
- 10.- Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics, February (1992). Food and Drug Administration (FDA), Center for Drugs and Biologics, Department of Health and Human Services. pp 6 y 54.
- 11.- IZQUIERDO, M.; V. RAMIREZ; M. PEÑA; A. GONZALEZ GRIEGO; V. MUZIO; E. PENTÓN; K. COSME; A. REYES y L. HERRERA (1993). Biotecnonología Aplicada 10(2):95.
- 12.- IZQUIERDO, M.; O. RODRÍGUEZ; A. SANTIAGO; J. PINEDA; C. POZO; D. GUTIÉRREZ; M.E. CISNEROS y V. RAMIREZ (1993). Biotecnología Aplicada 10(2):105-106.
- 13.- LAEMMLI, U.K. (1971) Nature. 227:680-695.
- PEETERMANS, J.H. (1987). Specifications and quality control of a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Postgraduate Medical Journal* Suppl. 2:97-100.

- PETERSON, D.L.; I.M. ROBERTS y G.N. VYAS (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:1530-1534.
- PIKAL, M.J. (1991). Freeze-Drying of Protein, Part I: Process Design. Pharm. Technol. Int. 3 (1):37-43.
- 17.- PIKAL, M.J. (1991). Freeze-Drying of Protein, Part II: Process Design. Pharm. Technol. Int. 3 (2):40-43.
- 18.- SANCHEZ, Y.; I. IONESCU-MATIU; D.R. DREESMAN; F.B. HOLLINGER y J.L. MELNICK (1981). Virology 114:71-80.
- SCOPE, R.R. (1987). Protein Purification, Principles and Practice. Second Ed. Springer-Verlag (New York, Heidelberg, Berlin, London, Paris, Tokio) p 252.

- 20.- SHIH, J.W.K.; J. L. GERIN (1975). J. Immunol. 115: 634-639.
- SHIH, J.W.K.; P.L. TAN y J.L. GERIN (1978). J. Immunol. 120:520-525.
- STEINER, S., M.T. HUEBNER y G.R. DREESMAN (1974).
 J. Virol. 14:552-557.
- 23.- The Rules governing Medicinal Products in the European Community. Volume III. Guidelines on the quality, safety and efficacy of medicinal products for human use. Revised and completed edition January 1989.
- USP XXII / NF XVII. (1990). United States Pharmacopeial Convention, Rockville, M.D.