INFLUENCIA DEL USO DE ADITIVOS EN LA LIOFILIZACIÓN DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

✉Vivían Pujol, Jorge Sotolongo, Maribel Vega, Judith Pineda y Lourdes Costa

Departamento de Desarrollo Biofarmacéutico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba.

ABSTRACT

Yeast derived recombinant HBsAg is lyophilized as a preservation method for long term storage. Three different lyophilization cycles were assayed. The freezing temperature was -50 °C, the rate of ice sublimation was 10 °C/h and also sublimation at 10 °C and 20 °C was tested with temperature for desorption of residual water of 25 °C and 30 °C respectively. Additives like dextran, maltose, sucrose, magnesium chloride and trehalose were studied in the lyophilization and for all of them, the HBsAg activity recovery after lyophilization was about 100 %. Residual humidity of lyophilized samples was of 2 % in all the cases. The structure of assembled particles of HBsAg was not affected by lyophilization process using sucrose and maltose as additives.

Key words: recombinant HBsAg, preservation method, lyophilization, aditives

Biotecnología Aplicada 1996;13:12-15

RESUMEN

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B es liofilizado como método de conservación. Se estudiaron tres ciclos de liofilización, la temperatura de congelación fue -50 °C en todos los casos; se estudió un esquema lento de sublimación del hielo a razón de 10 °C/h, se ensayó la sublimación a -10 °C y 20 °C; las temperaturas de desorción del agua residual fueron 25 °C y 30 °C respectivamente. Se realizó un estudio de liofilización empleando aditivos como dextrana, maltosa, sacarosa, cloruro de magnesio y trehalosa; los valores de actividad del liofilizado no mostraron diferencias respecto a los valores iniciales; el porcentaje de humedad residual de los liofilizados fue menor del 2 %; se obtuvo una correcta particulación del antígeno determinado por cromatografía de esclusión molecular por HPLC al emplear bajas concentraciones de sacarosa y maltosa.

Palabras claves: AgsHB recombinante, métodos de preservación, liofilización, aditivos

Introducción

La hepatitis viral del tipo B presenta actualmente uno de los mayores índices de incidencia mundial dentro de las enfermedades infecciosas, de ahí la importancia de obtener el antígeno de superficie del virus (AgsHB-r) puro para ser empleado con fines terapéuticos.

El AgsHB es una proteína perfectamente caracterizada que se encuentra en la superficie del virus formando partículas de aproximadamente 100 subunidades de monómero de peso molecular de 24 KDa por lo que queda estabilizada la estructura por enlaces disulfuro (1). El AgsHB-r se obtiene mediante técnicas del ADN recombinante de un cultivo de levaduras.

La liofilización es muy usada en la producción de proteínas que son inestables para su distribución y uso en soluciones acuosas. La solución acuosa con la proteína se congela, el agua congelada se extrae por sublimación a baja presión durante el secado primario, y la no congelada contenida en la sustancia intersticial se elimina durante el secado secundario (2).

Algunos componentes químicos o excipientes son adicionados a la formulación con un propósito definido: como lioprotectores para aumentar la estabilidad durante el proceso de liofilización, como excipiente para aumentar la estabilidad del producto seco o como sustancia de carga para darle mejor presentación (elegancia) al producto (3, 4).

Una amplia variedad de aditivos, incluyendo azúcares, polioles, metilaminas y algunas sales son efectivas para minimizar la desnaturalización de las proteínas en las fases de estrés (altas y bajas temperaturas) (5, 6, 7).

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la formulación y el comportamiento de la partícula AgsHB-r en el proceso de liofilización para un posterior estudio de estabilidad del antígeno liofilizado.

Materiales y Métodos

Procedencia del antígeno (AgsHB-r)

Se utilizó AgsHB-r obtenido mediante clonaje y expresión del gen en *Pichia pastoris* (8); la muestra procedente de la fermentación de la cepa productora se extrajo mediante ruptura celular y fue purificada hasta los niveles requeridos para ser adyuvada como preparado vacunal.

Preparación de las muestras

Las muestras que contenían AgsHB-r se filtraron de manera estéril a través de filtros 0,2 µm (Millipore) y se dispensaron en bulbos 2R norma DIN en un volumen de 1 mL. Para el llenado de los bulbos se empleó una máquina llenadora semiautomática (Paxall, USA).

1. Wampler. Multiple chemicals forms of hepatitis B surfacen antigen produced in Yeast. Proc Natl Acad Sci USA 1985;8: 6830-6834, October.

2. Carpenter JF, Arakawa T and Crowe JH. Interactions of Stabilizing Aditives with Proteins During Freeze-Thawing and Freeze-Drying , Develop Biol Standard 1991;74: 225-239.

3. Franks F, Ross H, Hatley M and Mathias SF. Materials Science and the Production of Shelf- Stable Biologicals, Biopharm 1991; 123-128.

4. Marcel PW. Evaluation of the Physical Stability of Freeze-Dried Sucrose-Containing Formulations by Differential Scanning Calorimetry, Pharmaceutical Research 1992; 9:224-226.

5. Levine H and Slade L. Another view of Trehalose for drying and Stabilizing Biological Materials, Biopharm 1992;May.

6. Pikal MJ. Freeze-Drying of Proteins: Formulation Selection, Biopharm 1991;321-326.

7. Arakawa T, Kita Y and Carpenter JF Protein-Solvent Interaction in Pharmaceuticals Formulations, Pharmaceutical Research 1991;8:222-231

✉Autor de correspondencia

Cuando la liofilización se realizó con aditivos, se añadió en todos los bulbos 300 µg/mL de antígeno.

Las muestras empleadas se conservaron antes y después de la liofilización a una temperatura de 4 °C.

Reactivos empleados

Los reactivos empleados fueron: sucrosa, maltosa, cloruro de magnesio, trehalosa y dextrana (Merck, Alemania).

Liofilización

Se empleó una liofilizadora (Edward Kniese, Inglaterra) modelo S-08 con una capacidad de evacuación de hielo de 20 kg. La cámara se llenó con aproximadamente 800 bulbos, de estos solo 60-70 contenían AgsHB-r, el resto contenía agua en un volumen de 1 mL.

Se registró de forma continua la temperatura de los productos y la conductancia de la solución; todos los ciclos experimentales se dieron por concluidos cuando las temperaturas de los productos y de las platinas se igualaron por espacio de al menos 4 h; se realizó la prueba de control de vacío en la cámara (variación menor de 0,5 µbar cada 1 h) hasta finalizar el proceso. La presión en la cámara se mantuvo en la fase de sublimación entre 90-110 µbar y durante la desorción en 10 µbar. La temperatura del condensador fue de -70 °C

Humedad residual

En cada experimento 12 bulbos de diferentes localizaciones de la cámara fueron seleccionados para determinar el contenido de agua residual. El porcentaje de humedad residual se determinó por el método de Karl Fisher (9), empleándose un sistema de titulación DTS-830 (Radiometer, Dinamarca).

Determinación de AgsHB-r

Se determinó el contenido de AgsHB-r de las muestras antes y después de liofilizadas empleando un sistema ELISA con anticuerpos policlonales (10). Los valores de concentración reportados son el promedio de tres determinaciones realizadas a cada muestra. La variabilidad del método fue en todos los casos menor del 5 %.

Particulación del antígeno. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La talla molecular del antígeno antes y después de liofilizado se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando una columna TSK-5 000 de gel filtración (11).

Apariencia y reconstitución

La apariencia del producto liofilizado y el tiempo de reconstitución fueron rigurosamente observados en cada ensayo, teniendo en consideración el aditivo empleado. Los bulbos liofilizados se reconstituyen con 1 mL de agua para inyección; la reconstitución se realizó a temperatura ambiente y con una ligera agitación manual.

Tabla 1. ***Ciclos de liofilización ensayados para el AgsHB-r (sin el empleo de aditivos).***

Parámetros	Ciclos de Liofilización		
	I	II	III
Temp. congelación (°C)	-50	-50	-50
Tiempo de congelación (h)	2	2	2
Temp. sublimación (°C)	20	20	-10
Tiempo de sublimación (h)	2	2,5	11
Temp. de desorción (°C)	30	30	25
Tiempo de desorción (h)	5	10	4,5

Las temperaturas reportadas están referidas a los valores de temperaturas de las platinas.

Resultados y Discusión

Inicialmente se exploró el efecto de 3 ciclos de liofilización con las condiciones de sublimación y desorción diferentes para el AgsHB-r sin el empleo de ningún aditivo; se ensayaron esquemas lentos y rápidos de sublimación del hielo, así como dos temperaturas de sublimación y desorción del agua residual respectivamente. En la tabla 1 se muestran las condiciones de liofilización ensayadas en los tres ciclos iniciales de liofilización estudiados sin añadir ningún aditivo al AgsHB-r.

En el tercer ciclo propuesto se empleó un esquema lento de sublimación, incrementándose la temperatura de las platinas a razón de 10 °C/hora.

Tabla 2. ***Resultados de concentración de AgsHB-r por ELISA y porcentaje de humedad residual del antígeno para los tres ciclos propuestos al liofilizar sin el empleo de aditivos.***

Concentración de AgsHB-r (µg/mL)	Ciclos de liofilización		
	I	II	III
Sin liofilizar	360,5	421,3	284,2
Liofilizado	442,8	322,9	289,0
% de humedad residual	2,21	1,8	1,5

Al liofilizar el AgsHB-r sin el empleo de ningún aditivo no se obtuvo una variación significativa de la actividad biológica de las muestras por efecto de la liofilización (variaciones menores del 5 % al emplear un sistema ELISA con anticuerpos policlonales). El porcentaje de humedad residual obtenido es el adecuado para este tipo de producto liofilizado (Tabla 2).

Al realizar una cromatografía de gel filtración por HPLC del antígeno liofilizado se observó la presencia de un pico de mayor talla molecular. Los cromatogramas correspondientes se muestran en la Figura 1 a, b, c.

De los 3 ciclos estudiados los mejores resultados de porcentaje de humedad residual y menor grado de sobreparticulación del antígeno correspondieron al ciclo III. Se decidió realizar un estudio de estas condiciones de liofilización con el empleo de diferentes aditivos para tratar de disminuir el efecto de sobreparticulación

8. Hilleman MR. Recombinant yeast human hepatitis B vaccine. J. Hong Kong Med. Assoc. 1985;37:75-85.

9. May JC, Wheeler RM, Etz N and Del Grosso A. Determination of residual moisture in freeze-dried viral vaccines: Karl Fischer, gravimetric and thermogravimetric methodologies, Journal of Biological Standardization 1982;10: 249-259.

10. González Griego A. Método de cuantificación del HBsAg, Revista Cubana de Investigación Biomédica 1991;10:156-159.

Tabla 3. ***Aditivos empleados al liofilizar el antígeno. Concentraciones ensayadas y resultados de actividad biológica para cada concentración de aditivo empleada.***

Aditivos	Concentración (mg/mL)	Concentración de AgsHB-r. (µg/mL)
Sin liofilizar	-	282,3
Sucrosa	2	315,7
	5	206,7
	10	368,6
	20	287,7
	30	210,7
	40	208,0
Maltosa	2	286,3
	5	279,4
	10	291,78
	20	212,7
	30	297,0
	40	244,0
Dextrana	10	241,2
	20	203,8
	30	202,3
	40.	196,4
Cloruro de magnesio	2	232,1
	5	217,4
	10	223,4
	20	274,6
Trehalosa	5	300,0
	10	240,0

del antígeno. Los reactivos estudiados y sus concentraciones son seleccionados de acuerdo a lo reportado (2).

Por tal razón para las experiencias de liofilización con aditivos se empleó las condiciones del ciclo III. Los resultados de actividad del antígeno antes de liofilizar y liofilizado empleando aditivos en cada concentración estudiada son reportados en la tabla 3. Es necesario señalar que en ningún caso se produce una disminución significativa de la actividad después de ser liofilizada la muestra.

La tabla 4 muestra que al liofilizar empleando los parámetros de la variante experimental sin aditivos, se obtiene un 95,8 % de antígeno presente en forma de partícula, reportándose mayores porcentajes de antígeno sobreparticulado (pico mayor de 22 nm) al liofilizar con las variantes I y II. Además al emplear la variante I se obtiene un 11,5 % de antígeno desparticulado. En la Figura 2 se exponen los parámetros fundamentales del ciclo de liofilización empleados en la variante experimental III.

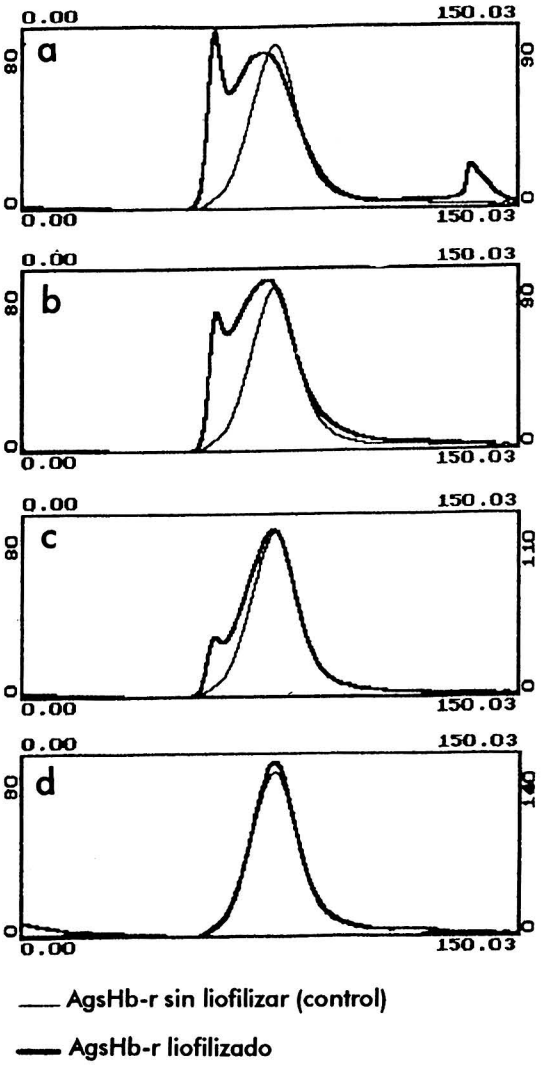

Figura 1. ***Cromatogramas de HPLC correspondientes al antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B (AgsHb-r) liofilizado empleando las tres variantes experimentales.***
a) Ciclo de liofilización I.
b) Ciclo de liofilización II.
c) Ciclo de liofilización III.
d) Ciclo de liofilización III empleando sucrosa al 2 % como aditivo.

Al analizar el grado de sobreparticulación del antígeno se observó que al adicionar dextrana y cloruro de magnesio se obtenían altos porcentajes de antígeno sobreparticulado (Tabla 4).

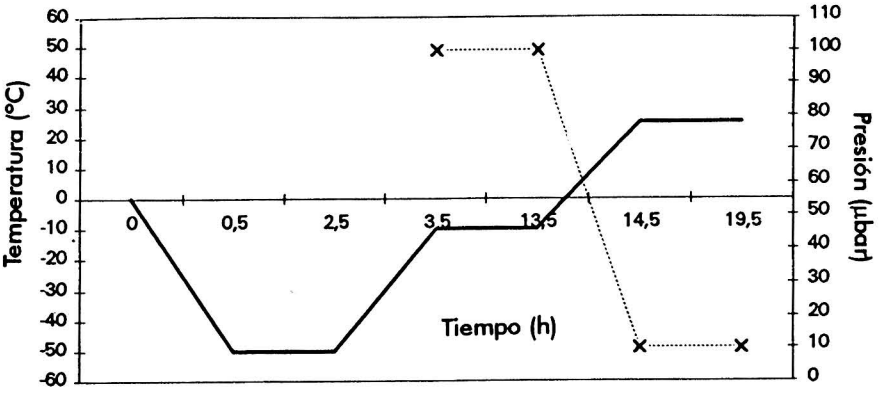

Figura 2. ***Parámetros fundamentales de la variante experimental III.***

De todos los aditivos empleados, los mejores resultados de particulación del antígeno se obtuvieron al utilizar sucrosa en cualquiera de las concentraciones añadidas. También se obtuvieron resultados satisfactorios al adicionar maltosa en la concentración más

Tabla 4. *Grado de particulación del antígeno obtenido en los diferentes ciclos experimentados con o sin el empleo de aditivos.*

Ciclo	Aditivo	Concentración (mg/mL)	% Antígeno sobreparticulado	% Antígeno formando partículas de 22 nm	% Antígeno desparticulado
I	-	-	16,6	71,9	11,5
II	-	-	29,0	71,0	-
III	-	-	4,2	95,8	-
III	Sacarosa	2	-	100,0	-
		5	-	100,0	-
		10	2,1	97,9	-
		20	3,7	96,3	-
		30	-	100,0	-
		40	0,4	99,6	-
III	Maltosa	2	0,3	99,7	-
		40	1,3	98,7	-
III	Dextrana	10	11,8	88,2	-
		40	3,9	96,1	-
III	Cloruro de magnesio	2	7,5	92,5	-
		20	8,2	91,8	-
III	Trehalosa	5	3,0	97,0	-
		20	1,4	98,6	-

baja (2 %). La sacarosa puede ser fácilmente eliminada de la formulación por un simple proceso de diafiltración, obteniendo altos porcentajes de recobrado en este paso y es además un reactivo más barato que la maltosa. Pudiera emplearse sacarosa en cualquiera de las concentraciones estudiadas por los resultados de calidad obtenidos para la molécula, pero se propone emplear 2 % por ser la concentración más baja estudiada con resultados satisfactorios y por lo tanto más fácilmente eliminada por diafiltración.

En la Figura (1d) se muestra el cromatograma de las corridas de HPLC correspondientes al antígeno liofilizado en presencia de sacarosa, con la menor concentración estudiada. Como se observa se obtiene el AgsHB-r con su talla molecular característica, no presentándose antígeno sobreparticulado.

Apariencia del producto liofilizado y tiempo de reconstitución

Los bulbos que solo contenían antígeno, sin ningún aditivo, al ser liofilizados mostraron una pequeña pastilla sin grandes deformaciones estructurales.

Al liofilizar con sacarosa se obtuvo una pastilla consumida. Los liofilizados con maltosa y cloruro de magnesio presentaron la formación de escama superficial con hundimiento de estructura. En los bulbos que contenían dextrana como preservante se obtuvo una pastilla blanca, homogénea y sin deformaciones en su estructura.

Todos los bulbos fueron fácilmente reconstituidos en 1 mL de agua para inyección, lográndose disolver con rapidez la pastilla hasta lograr una solución totalmente transparente y homogénea.

Conclusiones

No se observan cambios significativos en la concentración por ELISA del antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B al ser liofilizada con o sin la presencia de aditivos.

Al liofilizar AgsHB-r sin el empleo de aditivos se obtiene una sobreparticulación del antígeno en las tres variantes de ciclos propuestos.

Al liofilizar con los parámetros de la variante experimental III y adicionando sacarosa como aditivo en concentraciones de 2, 5, 10, 20, 30 y 40 mg/mL se obtuvo una correcta particulación del antígeno. Se propone emplear la concentración más baja de sacarosa estudiada (2 mg/mL). Si se añade maltosa como estabilizante también se logra disminuir la sobreparticulación del antígeno.

11. Costa L, Moya G, González EM, Caballero A, Falcón V y Vega M. Determinación de la pureza y homogeneidad molecular del Antígeno de superficie de la Hepatitis B recombinante (AgsHB-r) por HPLC en gel filtración, Biotecnología Aplicada 1994.

Recibido en agosto de 1994. Aprobado en septiembre de 1995