

- The unitary cost for production in the SACCEL bioreactor was 15 % less than in the ACUSYST-R bioreactor.
- Considering mass production, the cost in the SACCEL bioreactor is 15 % less than in the ACUSYST-R.

Conclusions

The achievement of a considerable reduction of the medium consumption without affecting yield was obtained in this study. It was demonstrated that even a 50 % reduction of the culture medium consumption does not affect the specific antibody production, at least in the cell line described.

This result represents a 13 % reduction of the total production cost per unit for both bioreactors in

relation to previous runs using the ACUSYST-R bioreactor. Besides, the use of hollow fiber bioreactors simplify the validation studies of the production process and support the reduction of production cost.

The production of 6.00 g of CB IFN 2.4 MAbs was achieved, including 3.3 g manipulating a new, nationally produced device (SACCEL) designed for this purpose.

The MAbs produced in both bioreactors did not have significant quality differences when they were compared with the MAbs produced in mice using the same cell line. The main difference was in the productivity of both systems (Table 1) but the importance of the production in hollow fiber bioreactors refers to the cost, considering the regulations for the use of laboratory animals.

Table 1. Characterization of monoclonal antibody CB IFN 2.4 produced *in vivo* and *in vitro* using hollow fiber bioreactors.

Characteristic	ACUSYST-R	SACCEL	Reference data*
mg MAb/mL harvest	0.84	0.64	4-5
Purity of MAb	92.4 %	96.7 %	> 90
Mouse DNA	< 4	< 4	< 10
pg DNA/mg MAb			
Specific Activity	75	80	> 70
MAb Immobilized	99 %	99 %	> 95
µg Ag eluted/mg MAb immobilized	91.5	93	80

**In vivo* production at the Division of MAbs Production, Genetic Engineering and Biotechnology Center (unpublished data).

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA ADSORBIDA EN GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO

José Luis Marcelo, Alfonso Acosta, Lourdes Costa, Jorge L López, Makis Torres, Asterio Cruz, Maribel Vega y Dayamí Amador

Subdirección de Calidad, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, Ciudad de La Habana 10600, Cuba.

Introducción

La producción de la vacuna antihepatitis B por vía recombinante cuenta con un sistema de controles analíticos, tanto a la materia prima como al producto final, que garantiza que la misma sea liberada manteniendo sus tres principales características: eficacia, seguridad e inocuidad. A la par del desarrollo de nuevos productos, las regulaciones en materia de productos biológicos son cada día más estrictas, lo que ha traído consigo la búsqueda de nuevos y más sensibles métodos y procedimientos para dar cumplimiento a las mismas, siendo una de las principales, la determinación de la concentración de la proteína de interés en el preparado final (1).

Debido a la complejidad de la determinación de la proteína unida al gel, pocos son los trabajos que se reportan en la literatura sobre este tema. Golovina (2) emplea polietilenglicol para determinar proteínas adsorbidas sobre Sepharosa, con lectura a 280 nanómetros, pero la sensibilidad es limitada. Koelsch (3) ha desarrollado la determinación por medio de la reacción de iones cobre con dietilditiocarbamato, en proteínas inmovilizadas en geles de agarosa, con la desventaja de no poder ser usado con matrices que formen complejos con iones cobre. El ensayo de ninhidrina, es otro de los más recientes métodos empleados para péptidos o proteínas asociadas al adyuvante, con muy buenos resultados, excepto en presencia de liposomas (4). El ensayo de Kjeldahl, en su variante de micrométodo (1), es otra de las vías utilizadas, con las desventajas de las interferencias causadas por la presencia de nitrógeno en muchas de las soluciones tampón que se emplean, así como de la disponibilidad del equipamiento.

El objetivo del presente trabajo consistió en establecer un procedimiento analítico que permita determinar la cantidad de proteína contenida en la vacuna cubana antihepatitis B, y que permita el empleo de procedimientos ampliamente reconocidos y validados, como son la desorción del antígeno (5) y la cuantificación de proteínas por Lowry (6), de forma tal que garantice su sencillez y reproducibilidad, parámetros indispensables a tener en cuenta para el establecimiento del método en el control del producto final.

Materiales y Métodos

Se utilizó como control un lote de vacuna, previamente analizado y liberado, con una concentración de 20 µg de antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) por cada mililitro de gel de hidróxido de aluminio.

El procedimiento desarrollado consta de tres pasos fundamentales:

Desorción

Con la finalidad de separar la proteína que está unida al gel para su posterior cuantificación. Se emplearon 5 mL de vacuna, de acuerdo al protocolo desarrollado por Izquierdo *et al* (5), y se tomó el sobrenadante donde se encontraba la proteína.

Desalinización

Este es un paso necesario para separar la proteína de las sustancias interferentes presentes en los tampones de desorción, las cuales afectan el ensayo de cuantificación final de la proteína por Lowry.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido en el paso anterior y se aplicó en una columna PD-10, equilibrada con el tampón de elución de fosfato a pH 6,7. Se colectó la primera fracción eluida que contenía la proteína de interés (Figura 1).

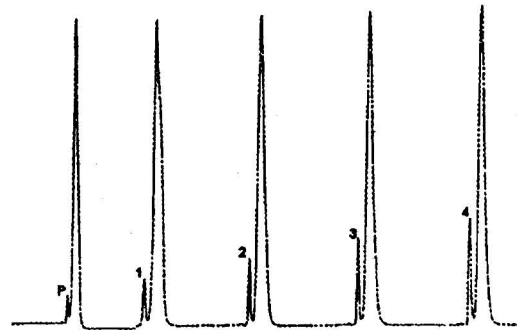


Figura 1. Perfil cromatográfico obtenido a partir de las muestras desalinizadas. P: placebo; 1, 2, 3 y 4 corresponden a las fracciones de proteína de los adyuvados de 5, 10, 15 y 20 µg/mL.

1. Technical Reports Series 1989/786. World Health Organization.
2. Golovina TO, Cherednikova T, Mevkh AT. Anal Biochem 1977;83:778-781.
3. Koelsch R, Marquardt I, Hanson H. Anal Biochem 1975;66:556-567.
4. Brewer JM, Roberts CW, Stimson WH, Alexander J. Accurate determination of adjuvant-associated protein or peptide by ninhydrin assay. Vaccine 1995;13(15):1441-1444.
5. Izquierdo M, Rodríguez O, Santiago A, Pineda J, Pozo C, Gutiérrez D *et al*. Método para la comprobación de adsorción y desorción de la vacuna contra la hepatitis B. Biotecnología Aplicada 1993;10(2):105-106.
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.

Selección de los trabajos más relevantes del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología durante 1996.

Selection of the most relevant results of the Center for Genetic Engineering and Biotecnology during 1996.

Cuantificación

Debido a que la muestra en el paso de desorción es sometida a condiciones drásticas de temperatura, que provocan cambios estructurales y conformacionales en la molécula, no fue posible realizar su cuantificación por lectura de la absorbancia a 280 nm ni por un método ELISA. Para la cuantificación del antígeno fue necesario emplear el método de Lowry.

En cada ensayo se utilizó como blanco una muestra de placebo, la cual recibió el mismo tratamiento que las restantes.

Resultados y Discusión

Estudio de identificación del antígeno

Las muestras con 22, 25 y 50 µg/mL desalinizadas se aplicaron a una columna de cromatografía líquida de alta resolución de gel filtración (HPLC-GF) TSK G 5000PW (7.5 d.i. x 600 mm) y se observó que en todos los perfiles cromatográficos se identifica la señal del HBsAg al eluir la muestra, en el tiempo de retención especificado, según Costa *et al.* (7), lo que demostró que las fracciones a las que se les determinó proteína correspondían al HBsAg recombinante.

Estudio de la reproducibilidad

Se procesaron 10 muestras de la vacuna control durante días diferentes, cada una por duplicado y se obtuvo un valor medio de 20,7 µg/mL, con una desviación estándar de 2,1 y un coeficiente de variación del 10,2 %. El valor medio coincide con lo reportado por el método microkjeldahl entre 21 y 23 µg/mL en una evaluación internacional efectuada a la vacuna, utilizando otros lotes (Laboratorios Boryung, Corea, 1994). El coeficiente de variación del método puede considerarse aceptable, si se tienen en cuenta los bajos niveles de proteína y los diferentes pasos previos a la cuantificación de la misma.

Estudio de exactitud e imprecisión del ensayo

Para estudiar la exactitud del método se realizaron 5 adyuvaciones experimentales de 5, 10, 15, 20 y 25 µg de antígeno por mL de gel codificadas y analizadas a ciegas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Como complemento de este estudio se incluyeron tres adyuvaciones experimentales de 22, 25 y 50 µg/mL respectivamente.

Se encontró una buena correlación entre los valores esperados y obtenidos para este experimento, con un coeficiente de 0,998 y una respuesta lineal que corresponde a la ecuación de una recta $Y = 1,04X - 0,12$.

Empleando los resultados obtenidos se construyó un gráfico de imprecisión del ensayo (Figura 2),

cuyos resultados corroboran los obtenidos para la muestra de control (coeficiente de variación de alrededor del 10 % para una concentración de 20 µg de proteína). Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de proteína, se obtiene una mejor precisión en el ensayo y que con valores inferiores a 10 µg la imprecisión del mismo es muy alta.

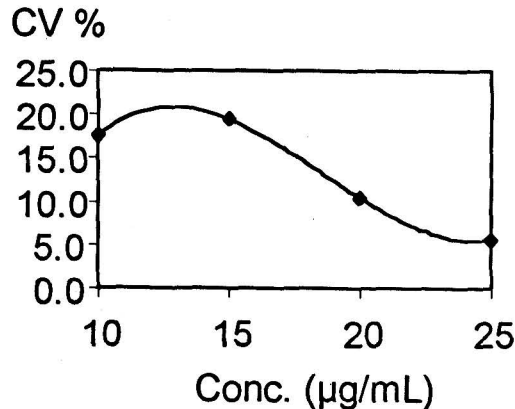


Figura 2. Gráfico de imprecisión del método

Determinación de la sensibilidad analítica

Se hizo una curva de calibración de masa contra señal, de manera que cada valor de masa equivaliera a 5 mL del adyuvado. La pendiente obtenida fue de 0,00074. Para cada punto de la curva se calculó la varianza de la señal y se comprobó homocedasticidad por medio de la prueba de Bartlett. Se promediaron las varianzas y se obtuvo la desviación estándar general (DesvStG) a través de su raíz cuadrada. La sensibilidad analítica (SA) se obtuvo por la siguiente expresión:

$$SA = \frac{DesvStG/Pendiente}{V}$$

Tabla 1. Resultados obtenidos para muestras de concentración conocidas.*

Valor esperado (µg/mL)	Valor obtenido (µg/mL)	CV (%)	% recuperación
5	4,1	51	81
10	9,0	17,6	90
15	14,6	19,4	97
20	20,2	10,4	101
25	24,6	5,5	98
22	22,5	-	102
25	23,9	-	95,6
50	58,4	-	117

*Cada uno de estos valores es el promedio de 10 determinaciones.

7. Costa L, Moya G, González EM, Caballero A, Falcón Y, Vega M. Determinación de la pureza y homogeneidad molecular del Antígeno de Superficie Recombinante de la Hepatitis B por HPLC-GF. *Biología Aplicada* 1994; 11(1):86-90.

Se determinó la sensibilidad analítica en el punto de 20 µg/mL usando la desviación estándar correspondiente al mismo y fue de 3 µg, lo que permitió un nivel de detección adecuado de la concentración a medir y por tanto, disponer de un buen nivel de sensibilidad en la determinación.

Comprobación del procedimiento en lotes de adyuvado y/o envase

Se procesaron 21 muestras que previamente habían sido liberadas y que cumplían con todos los requerimientos analíticos para el estudio y los resultados obtenidos muestran una media de 20,2 µg/mL, con valores extremos entre 17,1 y 23,3 µg/mL respectivamente.

Estos valores corresponden con lo esperado (20 µg/mL). Teniendo en cuenta que la sensibilidad analítica del método es de 3 µg, como se mostró anteriormente, la concentración de las muestras

debe oscilar alrededor de este intervalo.

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran la consistencia del proceso de adyuvación y por consiguiente, de la calidad del producto analizado.

Conclusión

Se cuenta con un método sencillo, sensible y reproducible para la determinación cuantitativa de proteína en la vacuna antihepatitis B, el cual ha sido introducido como técnica de control del contenido de la proteína al producto final, en el proceso de producción de la vacuna antihepatitis B recombinante.

El procedimiento fue aprobado por las autoridades sanitarias nacionales y permite cumplimentar con los requisitos exigidos por la Organización Mundial de la Salud en materia de producción de productos recombinantes.