

## NUEVA VARIANTE DE PURIFICACIÓN A ESCALA PRODUCTIVA DE LA MATERIA PRIMA ACTIVA DE LA VACUNA CONTRA LA GARRAPATA *Boophilus microplus* GAVAC®

Oscar Boué Gutiérrez,<sup>1</sup> Karina Sánchez Manzano,<sup>1</sup> Grisel Tamayo Rodríguez,<sup>2</sup> Laura Hernández Baquero<sup>2</sup> y Antonio Enríquez Mouriz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo Desarrollo Tecnológico. <sup>2</sup>División Gavac. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162. Ciudad de La Habana 10600, Cuba. E-mail: gavac@cigb.edu.cu

### Introducción

La proteína recombinante Bm86, expresada en la levadura *Pichia pastoris*, constituye la materia prima activa (MPA) de la vacuna Gavac® (Heber Biotec, S.A., La Habana, Cuba) contra la garrapata *Boophilus microplus*, que ha resultado eficaz en el control de las poblaciones de esta especie de garrapatas en Cuba (1) y en varios países de América Latina (2, 3).

La purificación de la MPA en el proceso productivo se realiza en un solo paso, mediante una precipitación salina de los contaminantes con sulfato de amonio al 25 % de saturación (4). Debido a las ventajas que tiene este procedimiento, se seleccionó como primera opción para la purificación de rBm86. No obstante, su aplicación en 69 lotes a escala productiva representó pérdidas irreversibles por baja pureza del orden del 19 % y de un 20 % por precipitación de la proteína de interés.

Otra variante de purificación, basada en la coprecipitación isoelectrónica de las proteínas contaminantes, fue estudiada y aplicada a escala productiva. En 42 lotes desarrollados no hubo pérdidas por baja pureza, la cual aumentó en un 15 % con un recobrado del 98 %. Esto representó un ahorro de un 20 % del costo de producción de la vacuna.

### Materiales y Métodos

La mezcla de proteínas que se utilizó para purificar la rBm86 fue obtenida como describen Canales *et al.* (4). Todos los reactivos utilizados fueron de calidad para análisis (Merck). La proteína recombinante Bm86 fue cuantificada utilizando un ensayo ELISA tipo sandwich (5). La determinación de pureza fue realizada mediante densitometría láser a geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), teñidas con azul de Coomassie, según el método de Laemmli (6). El tamaño de partícula fue determinado mediante microscopía electrónica (4).

### Resultados y Discusión

#### Características de rBm86

El punto isoelectrónico de la partícula de rBm86 fue hallado utilizando una curva de valoración. Los

métodos tradicionales, como el isoelectroenfoque o el cromatofoco, son imposibles de utilizar debido a la alta agregación de la rBm86. El valor calculado por la curva de valoración ( $4,5 \pm 0,07$ ) difiere del punto isoelectrónico teórico (5,47). Esto es lógico, ya que este último solo tiene en cuenta la secuencia de aminoácidos y no la distribución de las cargas sobre la superficie de la partícula de rBm86.

Durante la valoración de rBm86 otra característica importante fue observada. La proteína no precipitó en todo el rango de pH estudiado, incluso en su punto isoelectrónico. Sin embargo, al valorar una solución que contenía a rBm86 impura, se observó un precipitado reversible. Este hecho indica que los contaminantes pueden ser precipitados solamente variando el pH del solvente, dejando soluble a la proteína de interés.

#### Alternativas de purificación. Precipitación ácida vs salina

La estrategia para purificar rBm86 está basada en la precipitación de los contaminantes (mayoritariamente hidrofóbicos) en la menor cantidad de pasos posibles y dejar soluble a la proteína de interés (hidrofílica), tomando siempre en cuenta el aspecto económico.

Una gran ventaja de la precipitación salina con sulfato de amonio es que, por lo general, las proteínas se estabilizan en esa solución. La alta concentración salina evita la proteólisis, la acción bacteriana, además de las ventajas que ofrece tener un paso en que el producto se pueda dejar toda la noche. Sin embargo, cuando se purifica rBm86 por precipitación salina con sulfato de amonio hay que tener en cuenta que la salinidad solo reduce la solubilidad por lo que nunca precipitan todas las proteínas. La pureza de rBm86 aumenta a medida que aumenta la concentración salina, pero disminuye el recobrado (Figura 1). Esto trae como consecuencia que hay que llegar a un compromiso entre el grado de pureza obtenido y el recobrado de rBm86. Alrededor del 25 % saturación con sulfato de amonio se encuentra el punto crítico para el caso de rBm86.

En la precipitación isoelectrónica de los contaminantes de rBm86 existe un valor de pH (~5) en el que la

1. Rodríguez M, Penichet ML, Mouriz AE, Labarta V, Luaces LL, Rubiera R *et al.* Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology* 1995;57:339-349.

2. Rodríguez M, Massard CL, da Fonseca AM, Ramos NF, Machado M, Labarta V and de la Fuente J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine* 1995;13:1804-1808.

3. Lamberti J, Signorini A, Mattos C, D'Agostino B, Citroni D, Bacos E *et al.* Evaluation of the recombinant vaccine against *Boophilus microplus* in grazing cattle in Argentina. In: de la Fuente J, editor. *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*. Havana: *Elfos Scientiae* 1995:205-227.

4. Canales M, Enríquez A, Ramos E, Dandíe M, Soto A, Cabrera D *et al.* Large-scale production of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. *Vaccine* 1997;15:414-432.

5. Triguero A, Carpio E, Blanco R, Machado M, Rodríguez M, Enríquez A *et al.* Development of a sandwich ELISA with monoclonal antibodies generated against the recombinant Bm86 antigen. *Biotecnología Aplicada* (In press).

6. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 1970;227:680-685.

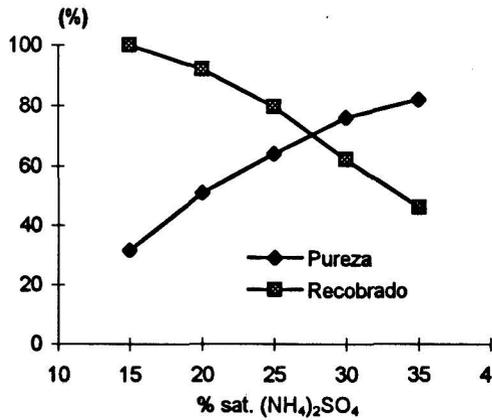


Figura 1. Pureza y recobrado obtenido para rBm86 a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

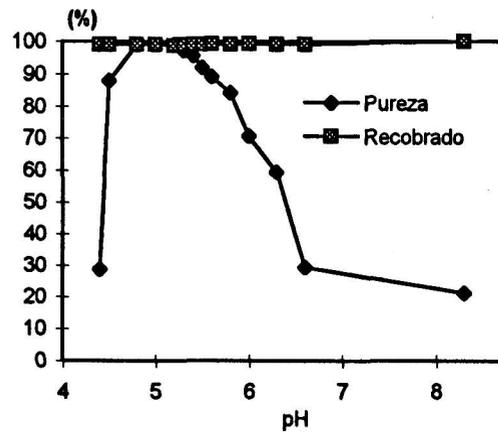


Figura 2. Pureza y recobrado para rBm86 contra la variación del pH de la solución.

pureza y el recobrado son máximos (Figura 2) evitándose las pérdidas por precipitación de la rBm86.

Los resultados a escala productiva de la precipitación isoeléctrica a pH 6,04 (punto isoeléctrico de la principal contaminante de rBm86) y a escala piloto, precipitando a pH 5, con respecto al método tradicional en cuanto a nivel de pureza y a tamaño promedio de las partículas muestran una mejoría significativa (Tabla 1). Además de reducir a cero los rechazos,

el nuevo método es operacionalmente simple, ahorra materias primas, materiales, electricidad, reduce de manera considerable la operación de los equipos, aumenta considerablemente el recobrado, obteniendo valores de pureza elevados y estables, que incrementan significativamente la calidad de la MPA de la vacuna. Solo con la aplicación de este nuevo método se ha disminuido en un 50 % los costos de producción de la MPA y un 20 % de los costos de la vacuna Gavac®.

Tabla 1. Comparación entre todos los lotes producidos de rBm86 por ambos métodos.

	Salina*	pH 6,04*	pH 5,0**
Total lotes	69	38	14
<b>Pureza</b>			
Media	61	76	97
Rechazo (%)	19	0	0
<b>Particulación</b>			
Tamaño promedio	19	21	26
Recobrado (%)	80	98	98

\*Escala productiva  
\*\*Escala piloto