ARTICULOS SOBRE TECNICAS/ PAPERS ON TECHNIQUES

PURIFICACIÓN DEL AGSHB-R POR CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD. ESTUDIO DE LOS ACMS CB-HEP.1 Y CB-HEP.3

Isary Almagro, Alberto Agraz, María E. Fernández de Cossio, Victoria Lugo y Carlos A. Duarte*

Departamento de Desarrollo de Biofarmacéuticos y División de Inmunotecnología y Diagnóstico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en septiembre de 1993. Aprobado en mayo de 1994.

Key words: Immunoaffinity, chromatography, antibodies, purification, HBsAg.

RESUMEN

El antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B recombinante (AgsHB-r) producido en *Pichia pastoris*, Se purificó mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando los anticuerpos monoclonales (AcMs) CB-HEP.1 yCB-HEP.3 acoplados a CL-Sepharose 4B. La capacidad de adsorción dinámica de antígeno para ambos inmunogeles fue de 1.02 mg de AgsHB/mL de gel para el AcM CB-HEP.1 y de 2.20 mg de AgsHB/mL de gel para el AcM CB-HEP.3. La elusión del AgsHB-r se logró utilizando tanto urea 8 M como KSCN 3 M + NaCl 1 M para el inmunogel CB-HEP.1. Para el CB-Hep.3 la elusión se logró con $MgCl_2$ 4.5 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0, y con el tampón glicina-HCl 20 mM, 3 M KSCN a pH ácidos; el tiocianato de potasio demostró ser un estabilizador del AgsHB-r cuando la elusión se realizó a estos valores de pH; sin embargo, el inmunogel CB-HEP.3 se inactivó rápidamente al realizarse múltiples corridas con elusión ácida. Finalmente, utilizando el $MgCl_2$ 4.5 M en Tris-HCl 20 mM a pH 7.0, la columna CB-HEP.3 mostró ser estable al menos en 30 corridas. El antígeno purificado por estos inmunogeles mostró más de un 90% de pureza en gel de poliacrilamida con SDS, formando partículas de 20 nm.

SUMMARY

Recombinant Hepatitis B surface antigen (r-HBsAg) from *Pichia pastoris*, was purified by immunoaffinity chromatography using the monoclonal antibodies (Mabs) CB-HEP.1 and CB-HEP.3 coupled to CL-Sepharose 4B. The adsorption capacity of immunogels was 1.02 mg of HBsAg/mL of gel, for CB-HEP.1 and 2.2 mg of HBsAg/mL of gel for CB-HEP.3. Elution was accomplished using either 8 M urea or 3 M KSCN + 1 M NaCl, for CB-HEP.1. For CB-HEP.3, the antigen was eluted with 4.5 M $MgCl_2$ and with 20 mM glycine-HCl, 3 M KSCN, at low pH; and it was demonstrated that potassium thiocyanate confers stability to the antigen when the column was eluted using acid buffers. By contrast, coupled Mab (CB-HEP.3) was rapidly inactivated when was eluted with low pH buffer during sequential runs. Finally, the CB-HEP.3 column showed to be stable for at least thirty runs, using 4.5 M $MgCl_2$ for elution. The purified antigen with both immunogels was more than 90% pure as judged by SDS-PAGE, and also correctly aggregated into 20 nm particles

INTRODUCCION

Entre las enfermedades infecciosas de mayor incidencia en el mundo se encuentra la hepatitis viral del tipo B. La infección causada por este virus puede conducir a diferentes cuadros clínicos: hepatitis fulminante, aguda o crónica; carcinoma hepatocelular; y cirrosis hepática. Por tal razón, resulta de interés obtener el antígeno de superficie del virus (AgsHB) en su forma pura, para fines de diagnóstico y terapéuticos (por ej. confección de un preparado vacunal).

El AgsHB es una proteína bien caracterizada, componente de la superficie del virus, que es capaz de formar partículas de aproximadamente 100 subunidades de un monómero de 24 kD de peso molecular. La partícula es estabilizada por enlaces disulfuro (Wampler *et al.*, 1985), y además contiene carbohidratos y lípidos (Gavilanes *et al.*, 1990). El gen que codifica para esta proteína ha sido aislado y clonado en bacteria (Edman *et al.*,1981) y levadura (Hilleman *et al.*, 1985; Emini *et al.*, 1986; Harford *et al.*, 1987) y se han descrito algunos procedimientos para su purificación (Hilleman, 1987; Stephen, 1990; Wijnendaele y Simonet, 1987; Hamada *et al.*, 1988; Craig y Siegel, 1989; Pentón *et al.*, 1992.

La cromatografía de inmunoafinidad, basada en la especificidad y reversibilidad de la interacción antígeno-anticuerpo, es un método ideal para la purificación selectiva de proteínas recombinantes.

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

(Ladisch, 1989). A partir del advenimiento de la tecnología de generación de anticuerpos monoclonales, se ha universalizado la aplicación de éstos, en diferentes campos de la investigación y el diagnóstico. En el área industrial los AcMs han contribuido a darle una nueva calidad a la cromatografía de inmunoafinidad para la purificación de biomoléculas de uso terapéutico, no sólo por las indiscutibles ventajas cualitativas con relación al empleo de anticuerpos policlonales, sino también por constituir una fuente escalable y reproducible de productos.

El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados del uso de la cromatografía de inmunoafinidad con AcMs para la purificación de AgsHB-r. En él se describe un estudio comparativo entre los inmunogeles CB-HEP.1 y CB-HEP.3.

MATERIALES Y METODOS

Procedencia del antígeno (AgsHB-r).

Se empleó AgsHB-r obtenido mediante clonaje y expresión del gen en *Pichia pastoris*. El AgsHB-r fue extraído mediante ruptura celular y sometido a un paso de precipitación ácida, y adsorción en una matriz no específica, obteniéndose un producto semipurificado de AgsHB-r, que fue utilizado para los experimentos de afinidad. (Pentón *et al*, 1992).

Anticuerpos monoclonales.

El AcM CB-HEP.1 es secretado por el clon 48/1/5/4, y su principal componente es una IgG 2b. (Fontirrochi *et al*, 1993). El AcM CB-HEP.3 es un anticuerpo de subclase IgG1 y es secretado por el clon 12/3/7. Ambos AcMs fueron generados a partir de la fusión de linfocitos esplénicos de un ratón BALb/c inmunizado con AgsHB-r (para el AcM CB-HEP.1) y AgsHB-n (para el AcM CB-HEP.3), y el mieloma P3/X-63-Ag-653, según lo descrito previamente por Gavilondo *et al.* (1987).

Preparación de la matriz de inmunoafinidad.

Los geles de inmunoafinidad se prepararon utilizando Sepharose CL-4B (Pharmacia-LKB, Suecia), y fueron activados por el método de bromuro de cianógeno y suministrada por el Dr. L. Rodés, (Dpto. Química de Superficies Sólidas, CIGB). Los AcMs CB-HEP.1 y CB-HEP.3 se acoplaron en una relación de 5 mg/mL de gel según el procedimiento sugerido por el fabricante, con una eficiencia de acople mayor del 95% para ambos AcMs.

Determinación de la capacidad de adsorción dinámica de los inmunogeles CB-HEP.1 y CB-HEP.3.

La columna se equilibró previamente en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, EDTA 3 mM, pH 7.0. La muestra se aplicó en el mismo tampón y en condiciones de saturación de AgsHB-r (4 mg de antígeno/mL de gel). La adsorción de AgsHB-r a cada uno de los inmunogeles se determinó mediante la medición de la concentración de AgsHB-r en la fracción no-adsorbida en el efluente.

Las corridas se realizaron en columnas de 0.7x5 cm (volumen de columna: 2 mL) con un flujo de 5 mL/h y fueron registradas mediante medición continua de absorbancia a 280 nm.

Experimentos de desorción.

Después de la aplicación, la columna se lavó con 5 volúmenes de ésta utilizando el tampón inicial. Después del paso de lavado se probaron los siguientes agentes de elusión en ambos inmunogeles, empleando 3 volúmenes de columna: urea 8 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0; dioxano 10% en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0; KSCN 3 M/NaCl 1 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0; glicina 20 mM, pH 2.5, 3.0, y 3.5; KSCN 3 M en glicina a pH 2.5, 3.0, y 3.5; $MgCl_2$ 1, 2, 3, 4, y 4.5 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0; y $MgCl_2$ 1, 2, 3, y 4.5 M en glicina-HCl 20 mM, pH 7.0. Para cada agente de elusión estudiado se realizaron 3 corridas independientes.

Determinación de AgsHB-r y de proteína total.

La determinación de AgsHB-r se realizó mediante un inmunoensayo sobre fase sólida (ELISA) con anticuerpos policlonales. El estándar utilizado fue proporcionado por el Instituto "Paul Erlich"(Alemania). La proteína total se determinó según el método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con SDS se realizó según Laemmli (1970). Las muestras fueron calentadas a 100°C en tampón de ruptura (con ß-mercaptoetanol) durante 10 min. La tinción de los geles se realizó utilizando azul brillante de Coomassie R-250.

Microscopía electrónica del AgsHB-r.

El antígeno purificado se aplicó a una rejilla de cobre de 400 nm de malla, se tiñó con 2% de acetato de uranilo y se examinó con un microscopio electrónico de alta resolución Jeol-JEM 2000EX (Tokío, Japón).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El antígeno purificado se analizó mediante HPLC, utilizando una columna TSKG-5000 PW (Ultropac, LKB) de gel filtración.

RESULTADOS

Determinación de la capacidad de adsorción dinámica de los inmunogeles CB-HEP.1 y CB-HEP.3.

La disminución de la concentración de antígeno en la fracción no-adsorbida en relación con la de la muestra inicial demostró que ambos inmunoadsorbentes fueron capaces de adsorber el AgsHB-r.

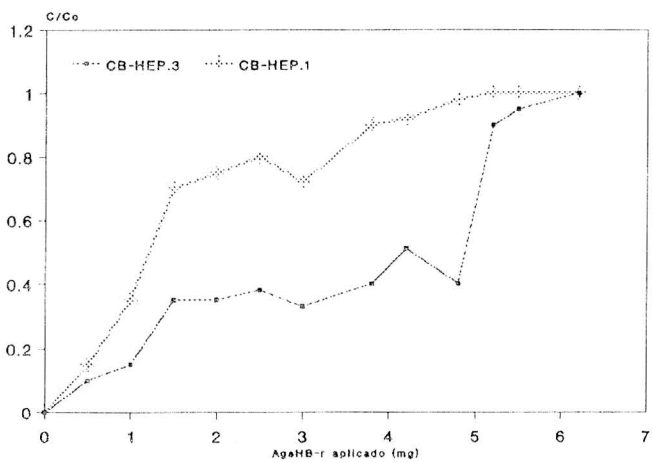

Fig 1. Curva de capacidad de adsorción dinámica de los inmunogeles CB-HEP.1 y CB-HEP.3. [C]- Concentración de antígeno en el efluente, [Co]- Concentración de antígeno en la fracción aplicada.

La figura 1 muestra la curva de capacidad de adsorción dinámica de ambos inmunogeles para un flujo de 5 mL/h. Después de aplicado 0.7 mg de AgsHB-r/mL de gel, la capacidad dinámica del inmunogel CB-HEP.3 fue 0.6 mg de AgsHB-r/mL de gel (valor que corresponde con un 15% de pérdida de AgsHB-r en el efluente), mientras que en el CB-HEP.1 fue 3 veces menor (0.2 mg de AgsHB-r/mL de gel). Comparativamente, la capacidad dinámica del CB-HEP.1 siempre fue menor que la del CB-HEP.3 en cualquier punto de la curva. En el punto de saturación de la columna la capacidad dinámica para CB-HEP.1 y CB-HEP.3 fue 1.02 y 2.20 mg de AgsHB-r/mL de gel, respectivamente.

Selección de las mejores condiciones de elusión de los inmunogeles CB-HEP.1 y CB-HEP.3.

Todos los agentes eluyeron el antígeno con más de 90% de pureza (resultados no presentados), por lo que el criterio de selección de los mejores agentes fue la eficiencia en la desorción.

Los experimentos de estudio de los agentes de elusión indicaron resultados sensiblemente diferentes para ambos inmunoadsorbentes (figura 2). El antígeno se eluyó del AcM CB-HEP.1 con mayor eficiencia empleando urea 8 M y KSCN 3 M/NaCl 1 M, ambos en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.0, con 81 y 80% de recuperación respectivamente. En el caso del inmunogel CB-HEP.3 el antígeno se logró eluir con mayor eficiencia, utilizando $MgCl_2$ 4.5 M en Tris-HCl 20 mM pH 7.0, con 90% de recuperación.

Como se conoce, los valores extremos de pH pueden inactivar a las proteínas en solución. La tabla I muestra

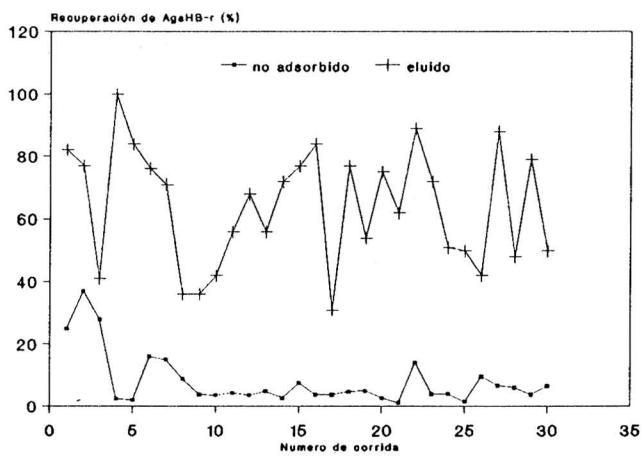

Fig 2. Elusión del AgsHB-r de los inmunogeles CB-HEP.1 y CB-HEP.3 utilizando diferentes agentes: A) Urea 8 M, B) Dioxano 10 %, C) KSCN 3 M, NaCl 1 M, D) Glicina-HCl 20 mM pH 3.5, E) $MgCl_2$ 4.5 M. A, B, C y E, contienen Tris-HCl 20 mM, pH 7.0.

Tabla I.
Influencia de la presencia de KSCN en el tampón de elusión a pH ácido en la recuperación de AgsHB-r del inmunogel CB-HEP.3.

AGENTE DE DESORCION	RECUPERACION
Glicina-HCL 20 mM, ph 2.5	< 1
Glicina-HCL 20 mM, ph 3.0	< 1
Glicina-HCL 20 mM, ph 3.5	< 1
Glicina-HCL 20 mM, KSCN 3 M, ph 2.5	82
Glicina-HCL 20 mM, KSCN 3 M, ph 3.0	67
Glicina-HCL 20 mM, KSCN 3 M, ph 3.5	87

los resultados de elusión del gel AcM CB-HEP.3 a valores de pH 2.5, 3.3, y 3.5 con adición de KSCN o sin él como agente estabilizante en el tampón de elusión. Anteriormente, se demostró que el KSCN no eluye el antígeno del CB-HEP.3 (figura 2), sin embargo a pH ácido, en presencia de KSCN , se detectó hasta más del 80% del antígeno adsorbido en la fracción eluída. Este resultado sugiere que el antígeno es eluído con eficiencia por el pH ácido pero con inactivación por efecto de pH extremo.

Debido a la alta concentración de $MgCl_2$ que se requiere para recuperar el antígeno del inmunogel CB-HEP.3, se realizó un estudio, eluyendo con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ a pH 3.5 y 7.0. La tabla II muestra que solamente a elevadas concentraciones de $MgCl_2$ se logra eluir el AgsHB-r. En este estudio la mayor recuperación se logró a pH 7.0 con 4.5 M $MgCl_2$.

Estabilidad de la columna de inmunoafinidad CB-HEP.3.

Anteriormente se demostró que con el uso de 3 M KSCN a pH ácido, se logra eluir el antígeno con un alto recobrado en una sola corrida.

Tabla II□
Influencia de diferentes concentraciones de $MgCl_2$ a pH 3.5 y pH 7.0 en la recuperación de AgsHB-r del inmunogel CB-HEP.3

AGENTE DE DESORCION	RECUPERACION(%)
Glicina-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 1 M, ph 3.5	2
Glicina-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 2 M, ph 3.5	4
Glicina-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 3 M, ph 3.5	16
Glicina-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 4.5 M, ph 3.5	57
Tris-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 1 M, ph 7.0	1
Tris-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 2 M, ph 7.0	5
Tris-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 3 M, ph 7.0	35
Tris-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 4 M, ph 7.0	46
Tris-HCL 20 mM, $MgCl_2$ 4.5 M, ph 7.0	81

Para conocer la estabilidad del inmunogel CB-HEP.3 en estas condiciones, se realizaron 30 corridas secuenciales, usando 3 M KSCN en glicina-HCl 20 mM, pH 3.5. La columna perdió rápidamente la capacidad de adsorción y a la tercera corrida solamente se adsorbió un 5% del antígeno aplicado. Este efecto es debido, probablemente, a la inactivación del anticuerpo inmovilizado en la matriz, reflejando la baja estabilidad del AcM CB-HEP.3 cuando se trabaja a valores de pH ácidos.

Por otra parte, con el agente de elusión $MgCL_2$ 4.5 M se realizaron 30 corridas (figura 3), con las cuales la recuperación se mantuvo aproximadamente entre el 50 y 80%. La variabilidad en la recuperación se debe a la baja reproducibilidad del método de medición (ELISA). La estabilidad del inmunogel CB-HEP.1 Se determinó previamente en otros trabajos con resultados similares (comunicación personal).

Caracterización del AgsHB-r purificado por los inmunogeles CB-HEP.1 y CB-HEP.3.

La pureza del AgsHB-r eluído del immunogel CB-HEP.1 con Tris-HCl 20 mM, KSCN 3 M, NaCl 1 M, pH 7.8 fue 95%, determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (figura 4). El mismo resultado se obtuvo para el antígeno purificado en el inmunogel CB-HEP.3 eluído con Tris-HCl 20 mM, $MgCl_2$ 4.5 M, pH 7.0. La actividad específica aumentó de 50 a 950 mg de AgsHB/g de proteína total para el inmunogel CB-HEP.1 (factor de purificación 19 veces), y hasta 925 mg de AgsHB/g de proteína total para el CB-HEP.3 (18.5 veces).

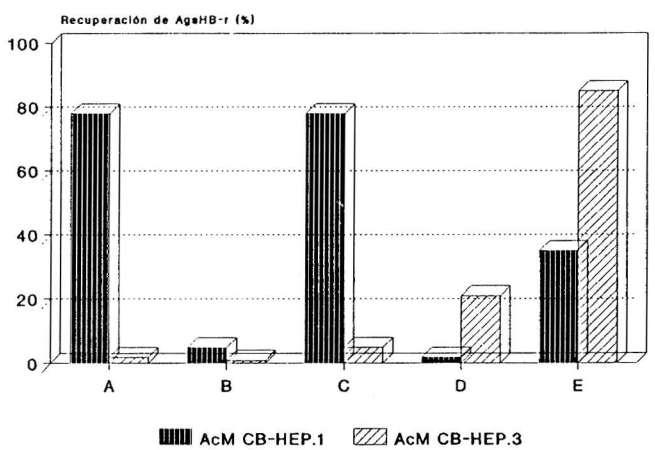

Fig 3. Estabilidad del inmunogel CB-HEP.3 utilizando como agente de elusión Tris-HCl 20 mM, $MgCl_2$ 4.5 M, pH 7.0. Los puntos representan el porciento del total de AgsHB-r aplicado, encontrado en las fracciónes no-adsorbida y eluída. La columna se equilibró en Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 7.0 y el lavado se realizó con el mismo tampón.

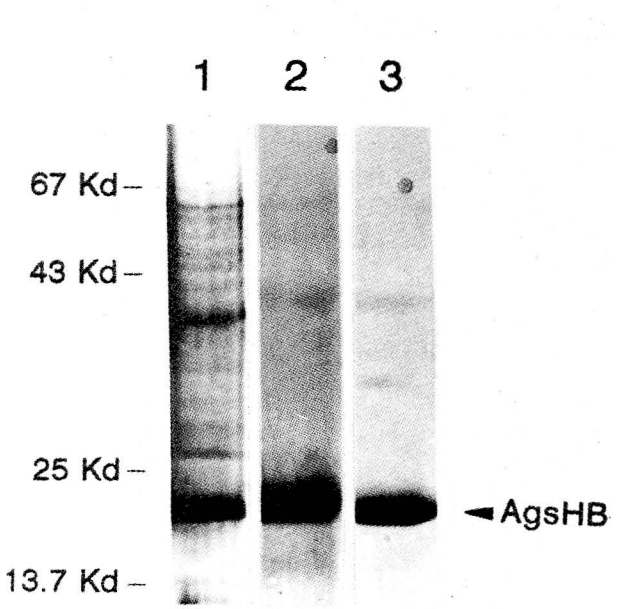

Fig. 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las diferentes fracciones obtenidas de la inmunopurificación : 1- Aplicado a inmunoafinidad, 2- Eluato del CB-HEP.1 con Tris-HCl 20 mM, KSCN 3 M, NaCl 1 M, pH 7.8, 5- Eluato del CB-HEP.3 con Tris-HCl 20 mM, $MgCl_2$ 4.5 M, pH 7.0.

La microscopía electrónica de los eluatos obtenidos de los inmunogeles CB-HEP.1 y CB-HEP.3 mostró que el antígeno purificado por ambos inmunogeles fue similar en cuanto a estado de agregación de la molécula, formando partículas de 22 nm, y con peso molecular determinado por (HPLC) de $2x10^6$ Daltons (resultado no mostrado).

DISCUSION

En los experimentos de funcionamiento de los AcMs CB-HEP.1 y CB-HEP.3 como inmunoadsorbentes, se observó que ambos son capaces de retener el AgsHB-r específicamente y purificarlo eficientemente hasta más del 90% de pureza.

Aunque ambos AcMs reconocen específicamente el antígeno, de los resultados obtenidos en la elusión con diferentes agentes se infiere que la naturaleza de la interacción es diferente para cada uno. Mientras que el antígeno es eluído de la columna CB-HEP.1 con altas concentraciones de KSCN o urea (agentes caotrópicos o desnaturalizantes), para el CB-HEP.3 la elusión se logra con la utilización de pH ácido (en presencia de KSCN como estabilizante) y altas concentraciones de $MgCl_2$. Estos resultados indican que la composición de los idiotipos de ambos anticuerpos y, por lo tanto el tipo de fuerza que prevalece en la interacción antígeno-anticuerpo es diferente, de ahí que

se requieran diferentes condiciones para provocar la elusión del antígeno. Se conoce por ensayos de competencia que ambos AcMs reconocen sitios diferentes en la molécula y que presentan diferencias en la constante de afinidad (resultados no presentados).

En este trabajo se demuestra que el tiocianato de potasio protege la partícula de AgsHB-r de la desnaturalización por pH ácido. Uno de los efectos que realiza el KSCN sobre la molécula de AgsHB-r, y que ha sido descrito previamente, es el de aumentar la rigidez de la partícula, favoreciendo la formación de enlaces disulfuros (Wampler *et al.*, 1985).

La concentración mínima de $MgCl_2$ en el tampón de elusión a pH neutro para la recuperación de más del 60% del antígeno fue 4.5 M. Adicionalmente, se encontraron resultados semejantes para esta misma sal en un tampón de elusión ácido, aunque la recuperación disminuyó con respecto al tampón de pH neutro. Probablemente el pH ácido afectó negativamente en la recuperación por inactivación del antígeno, como sucedió en los casos donde se eluyó con buffer glicina-HCl pH 3.5. Según los resultados obtenidos el $MgCl_2$ no protege al antígeno de la inactivación por pH ácido.

Debido a la capacidad de adsorción mostrada por ambos AcMs, la recuperación, pureza, características del producto final alcanzado, y estabilidad de ambos inmunogeles, éstos pueden ser empleados en procesamientos a gran escala para la obtención de AgsHB-r utilizando como agentes de desorción el KSCN 3 M+ NaCl 1 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7.8 para el CB-HEP.1 y el MgCl2 4.5 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7.0 para el CB-HEP.3. De hecho el CB-HEP.1 se utiliza en un proceso de producción de la vacuna contra la Hepatitis B (Pentón *et al.*, 1992).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la unidad productora de la vacuna contra la Hepatitis B del CIGB por suministrar el AgsHB-r semipurificado. A la Dra. Viviana Falcón de la Div. de Química-Física (CIGB) y Lic. Lourdes Costa de la Div. de Control de Calidad (CIGB) por la realización de los análisis de microscopía electrónica y HPLC.

REFERENCIAS

CRAIG, W.S.; R.S. SIEGEL (1989). Purification of hepatitis proteins. Eur. Pat. Appl. No. 89106753.0

EDMAN, J.C.; R.A. HALLEWELI; P. VALENZUELA; H.M. GOODMAN and W.J. RUTTER (1981). Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E.Coli. Nature*, **291**:503-508.

EMINI, E.A.; R.W. ELLIS; W.J. WILLER; W.J. MCALEER; E.M. SCOLNICK and R.J. GERETY (1986). Production and immunological analysis of recombinant hepatitis B vaccine. *J.Infect.*, **13** (suppl.A): 3.

FONTIRROCHI, G.; M. DUEÑAS; M.E. FERNANDEZ DE COSSIO; P. FUENTES; M. PEREZ; D. MAINET; M. AYALA; J.V. GAVILONDO and C.A. DUARTE (1993). A mouse Hybridoma Cell Line secreting IgG and IgM Antibodies with specificity for the hepatitis B Virus Surface Antigen. *Biotecnología Aplicada* **10**:24-30

GAVILONDO, J.V.; A.M. VAZQUEZ; S. FONG; E. RENGIFO; A. FERNANDEZ; C.A. GARCIA; A. VELANDIA; A PAVLENKO; S. HERNANDEZ; N. RUISANCHEZ; V. SUNDIN y M. FAXAS (1987). Anticuerpos monoclonales contra el antígeno carcinoembrionario en ensayos inmunohistoquímicos e inmunoquímicos. *Interferón y Biotecnología* **4**:143-156.

GAVILANES, F.; J. GOMEZ-GUTIERREZ; M. ARACIL; J.M. GONZALES-ROZ; J.A. FERRAGUT; E. GUERRERO and D.L. PETERSON (1990). Hepatitis B surface antigen. *Biochem. J.* **265**:857-864.

HAMADA, F.; K. SUNGAHARA; K. SHIOSAKI; S. ADACHI; H. MIZOKAMI (1988). Method for purification of HBs Antigen. US Pat. No. 4,738,926.

HARFORD, N.; T. CABEZON; B. COLAU; A.M. DELISSE; T. RUTGERS and M. DE WILDE (1987). Construction and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain (RIT4376) expressing hepatitis B surface antigen. *Postgrad Med. J.* **63** (suppl.2):65.

HILLEMAN, M.R.; R.E. WEIBEL and E.M. SCOLNICK (1985) Recombinant yeast human hepatitis B vaccine. *J.Hong Kong Med.Assoc.* **37**:75-85.

HILLEMAN, M.R. (1987). Yeast Recombinant Hepatitis B Vaccine. *European Journal for the Clinical Study and Treatment of Infections.* **15**, 1:3-7.

LADISCH, M.R. (1989). Protein Purification. In: ACS Symposium series 427. American Chem. Society, 151-155.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **22**:680-685.

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

PENTÓN, E.; L. HERRERA; V. MUZIO; V. RAMIREZ; A. GARCÍA; C. DUARTE; C. RUIZ; M. IZQUIERDO L. PEREZ; G. FONTIRROCHI; M. GONZALEZ; M. NAZABAL; A. BELDARRAIN; G. PADRÓN; J. GARCÍA; G. DE LA RIVA; A. SANTIAGO; F. AYAN; R. PÁEZ; A. AGRAZ; R. DÍAZ; and Y. QUIÑONES (1992). Method for obtaining recombinant surface antigen of hepatitis B virus (HEP B) of higher immunogenic capacity and use thereof in a vaccine preparation. Eur. Pat. Appl. No. 480 525 A2.

STEPHEN, J. (1990). Development and production aspects of recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine* **8** (Supplement):123-125.

WAMPLER, D.E.; E.D. LEHMAN; J. BOGER; W.J. MCALEER and E.M. SCOLNICK (1985). Multiple chemicals forms of hepatitis B surface antigen produced in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, **82**:6830-6834.

WIJNENDAELE, F.V.; G. SIMONET (1987). Method for the isolation and purification of Hepatitis B surface antigen using polysorbate US Pat. No. 4,649,192.