



Biotecnología Aplicada a las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
EVALUACION DE ESCALAS ANALITICA-PRODUCTIVA EN LA PURIFICACION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B (AgsVHBr)

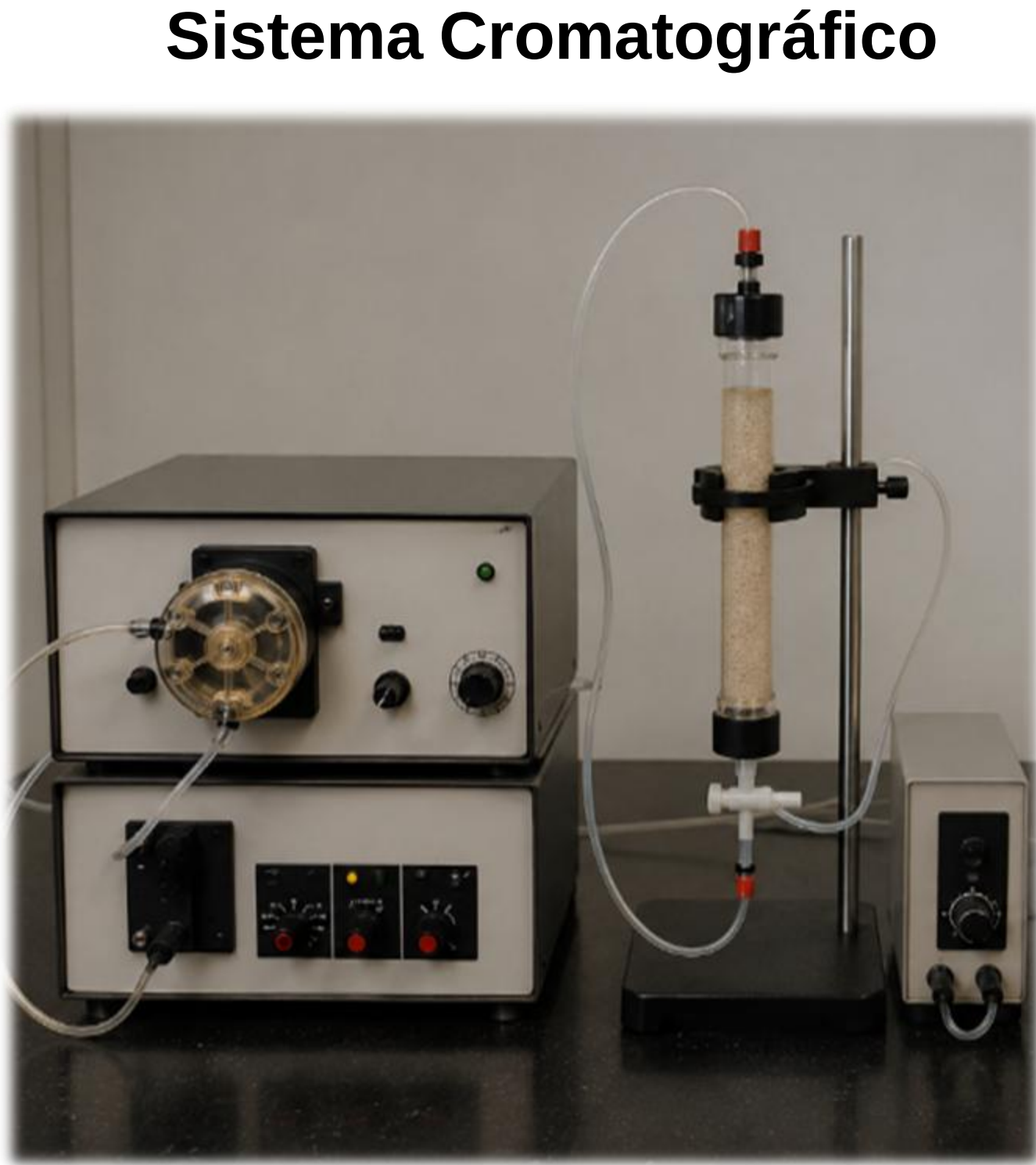
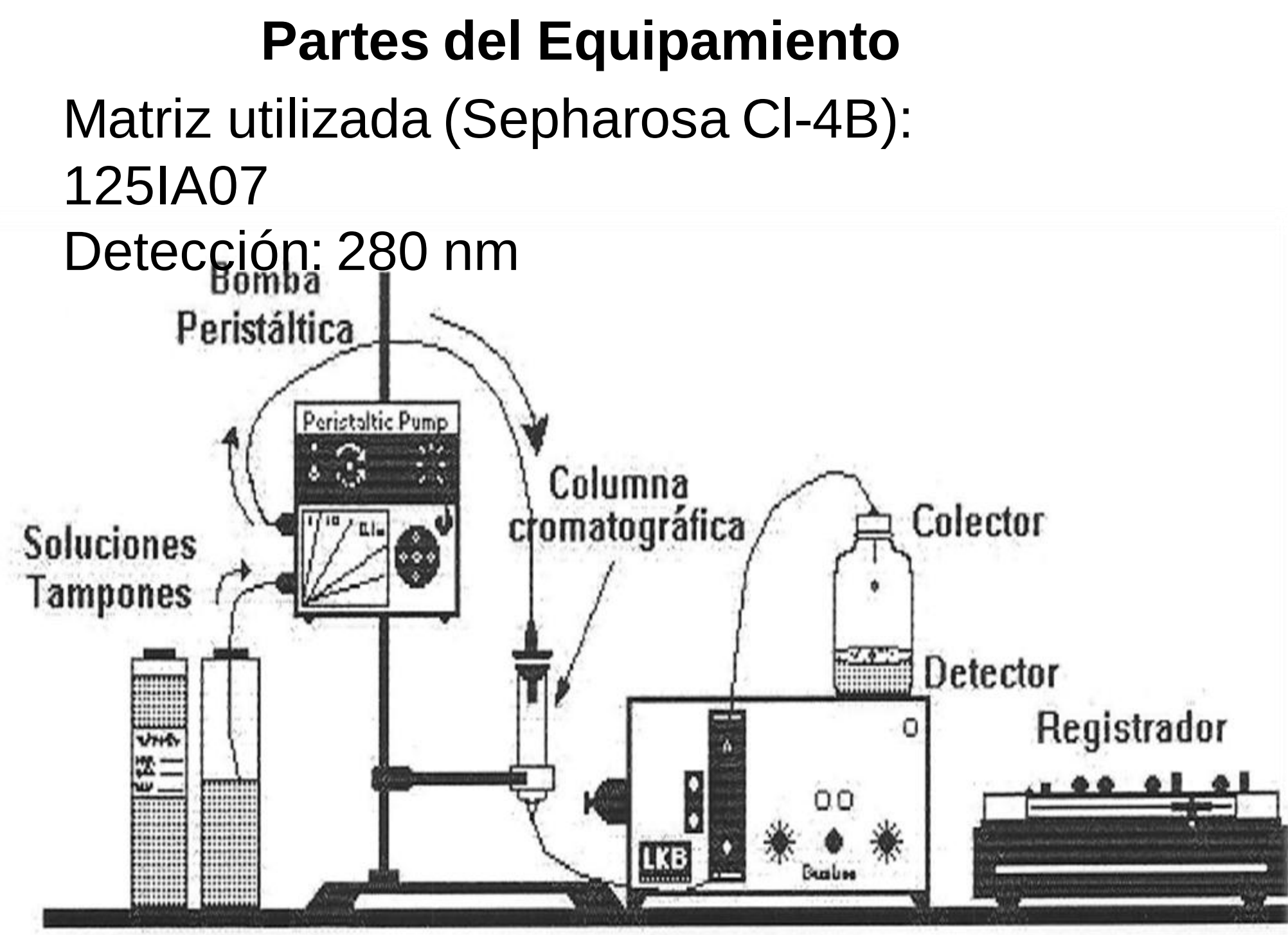
Autores: Ramcy Regalado Hernández¹, Galina Moya Fajardo¹, Miguel Castillo Ferrer¹

1. INTRODUCCION (OBJETIVOS)

1. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

En 1989 se logró la expresión exitosa del AgsVHBr en levadura Pichia pastoris en el CIGB. Este antígeno con fines vacunales se purifica mediante el empleo de la cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo monoclonal (AcM) de ratón CB.Hep-1 inmovilizado a la matriz por el método de Bromuro de cianógeno. Actualmente se requiere optimizar el proceso productivo del antígeno y para ello se verifica la calidad de las matrices de afinidad de acuerdo a su recobrado y capacidad para eluir la proteína de interés. Es por ello que en este estudio planteamos como objetivos: evaluar las escalas analítica y productiva de purificación, identificar factores que afectan su equivalencia y optimizar parámetros a pequeña escala que contribuyan a mejorar el proceso de producción en términos de % de recobrado y capacidad de elución .

2. METODOLOGIA



Parámetros establecidos en los ensayos comparativos		
Columna de proceso BPG-300		CC PD-10
altura de gel empacado (h) cm	22.6	5.66
diámetro (cm)	30	1.5
Flujo lineal durante la aplicación (cm/h)	19.1	19.10
Flujo volumétrico durante la aplicación (L/h)	13.5	33.74
Tiempo de residencia aplicación. Tr (h)	1.2	0.3
Flujo lineal durante la elución (cm/h)	31.8	31.8
Flujo volumétrico durante la elución (L/h)	22.5	56.2
Tiempo de residencia elución tr (h)	0.7	0.2
Volumen de gel empacado (L)	16	10.0
Volumen de Pass IIN a aplicar (L)	126	79
Relación Volumen de Pass/Volumen de gel empacado	7.86	7.86

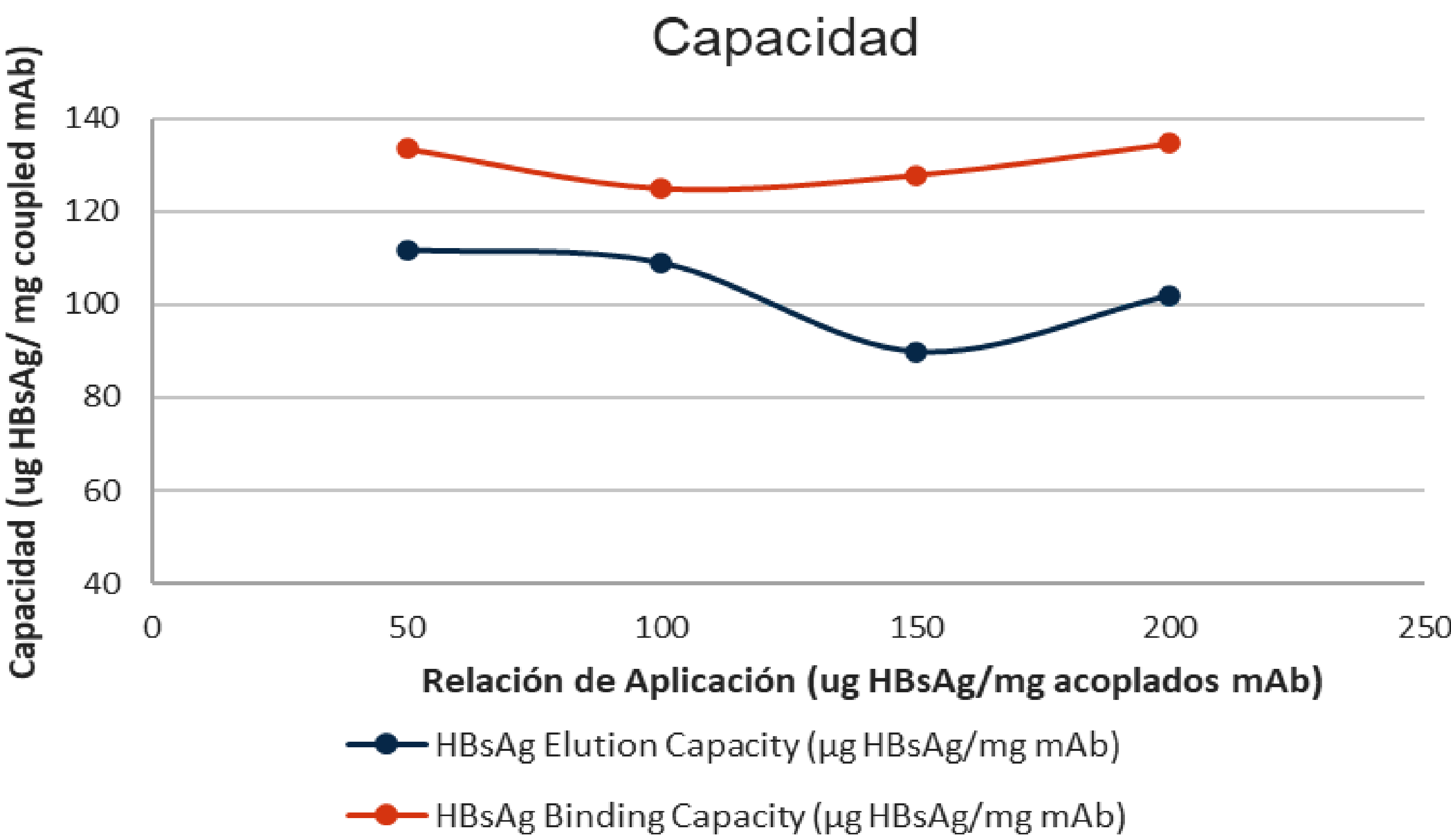
Prueba T Student		
μ_1 : media de población de Productiva (% Recobrado)		
μ_2 : media de población de Laboratorio (% Recobrado)		
Hipótesis nula (No existen diferencias)	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$	
Hipótesis alternativa (Diferencias significativas)	$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$	
Valor T	GL	Valor p
-443,98	7	0,023

Resultados obtenidos a Escala Analítica luego de ajustar a 154 min el tiempo de aplicación del antígeno , aumentar la altura del gel y ajustar la relación de aplicación ug HBsAg/mg mAB

Inmunogel	Laboratorio (% Recobrado)	Laboratorio (Capacidad)
125IA07	48.54	0.119
	50.11	0.116
	49.17	0.092
	49.32	0.102
Media	49.29	0.107

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados de 5 de Recobrado y Capacidad de Elución los ensayos comparativos entre las dos escalas				
Inmunogel	Productiva (% Recobrado)	Laboratorio (% Recobrado)	Productiva (Capacidad)	Laboratorio (Capacidad)
125IA07	39,38	45,01	0,04	0,064
	39,37	44,98	0,041	0,066
	39,39	44,99	0,042	0,066
	39,35	45,02	0,043	0,065
	39,4	44,97	0,039	0,063
Media	39,38	44,99	0,041	0,065



4. CONCLUSIONES

- El estudio demuestra que bajo las condiciones evaluadas no se alcanza aun una equivalencia directa entre las escalas para la purificación del antígeno de la hepatitis B, lo cual se corrobora en las diferencias significativas encontradas en el porciento de recobrado (44,99 % en laboratorio y 39,38 % en producción con p=0,023, así como en la capacidad de elución (0,065 mg para la escala analítica y 0,041 para la escala productiva).
- Se comprueba que la optimización a pequeña escala de factores como la altura del gel empacado y la disminución del tiempo de residencia del antígeno fue efectiva y permitió obtener un mejor rendimiento del proceso con una media de recobrado de 49,29 % y una media de capacidad de elución de 0,107 ug de antígeno por miligramos de anticuerpo monoclonal inmovilizado a la matriz, lo cual establece las bases para lograr un escalado productivo mas robusto y con mejores rendimientos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-Agraz, A., Duarte, C., Costa, L., Pérez, L., Páez, R., Pujol, V., Fontirrochi, G. J. (1994). Immunoaffinity purification of recombinant hepatitis B surface antigen from yeast using a monoclonal antibody. J. Chromatography A. 672: 25–33.
-André, F. E., Safary, A. (1987). Summary of clinical finding on Engerix-B, a genetically engineered yeast hepatitis B vaccine. Postgrad Med J. 63: 169-177.
-Hernández, R., Liuba P., Gómez, L., Expósito, N., Valdés, J., Páez, R., Martínez, E., Beldarraín, A. (2005). Optimization of the coupled monoclonal antibody density for recombinant hepatitis B virus surface antigen immunopurification. Journal of Chromatography B, 816: 1–6.