

**CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**



TESIS EN OPCION AL GRADO CIENTIFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Título:

**IMPLEMENTACION DE UN METODO DE PURIFICACION CONSISTENTE Y
VIROLOGICAMENTE SEGURO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL CB.Hep-1
EMPLEADO EN LA PURIFICACION EL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE
LA HEPATITIS B**

Autor:

Lic. Rodolfo Valdés Véliz

Tutores:

**Dr. Carlos Duarte Cano
Dr. Alejandro Beldarraín Iznaga**

Consultante:

Dr. Joaquín Díaz Brito

CIUDAD DE LA HABANA, CUBA

2007

Dedicatorias

A mis padres:

Por la educación y confianza depositada en todo momento y sobre todo por el ejemplo dado.

A Beatriz:

Por transmitirme la enseñanza de que la vida hay que enfrentarla con un amplio sentido del esfuerzo correcto, con claridad y firmeza para que nos ayude a evolucionar.

A mis compañeros de trabajo:

Es necesario que colaboremos unos con otros a lo largo de la vida que no es fácil, donde no hay nada tan hermoso, ni emocionalmente tan intergrador, como cooperar con los demás.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi gratitud al Dr. Carlos Duarte Cano quien contribuyó sustancialmente a mi formación en este campo en los primeros años de trabajo en esta institución y por guiar el desarrollo de esta Tesis. Al Dr Alejandro Beldarraín por su papel como tutor de la tesis. Al colectivo de profesores de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana por el papel jugado en mi formación inicial como Biólogo. A Beatriz Gago por su sincero, incondicional e importante apoyo. A todos los miembros de la División de Producción de Anticuerpos Monoclonales del CIGB por su trabajo, resultados, apoyo y sugerencias durante 13 años. A los miembros del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio involucrados en la producción de ascitis. Al colectivo de trabajadores del Centro de Referencia para SIDA y en especial al Dr. Ignacio Ruibal por compartir conmigo todo el trabajo validación viral. A la Dr. Pilar Rodríguez Moltó por su revisión crítica del trabajo de validación viral. A los compañeros de la Dirección de Control de Calidad del CIGB, a los compañeros del Departamento de Control de Proceso del CIGB. A los compañeros del Departamento de Validación y Evaluación de Procesos del CIGB. Al colectivo de dirección de la Dirección de Producción del CIGB.

A todos, muchas gracias

Síntesis

Esta Tesis aborda la implementación de un método eficiente y consistente para la purificación del anticuerpo monoclonal (AcM) CB.Hep-1 empleado en la purificación del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (AgsVHBr), así como la demostración de su capacidad de eliminación de virus. También se exploró la potencialidad del tratamiento térmico del AgsVHBr en presencia de KSCN para inactivar virus. El empleo de este AcM brinda una alta selectividad y originalidad al método de obtención del AgsVHBr, pero aporta inconvenientes desde el punto de vista regulatorio por el uso de fuentes biológicas que pueden introducir virus patógenos al hombre.

El diseño del método de purificación del CB.Hep-1 se basa en la combinación de precipitación salina, cromatografías de afinidad y de exclusión molecular y un paso de ultrafiltración, lo cual permite obtener esta molécula con alta pureza (>95%) y recobrado (>40%). Una vez implementado este método y demostrada su consistencia, se procedió a la caracterización de las fuentes biológicas para la presencia de virus y se validó el desescalado de la cromatografía de afinidad empleada en la purificación del AcM CB.Hep-1. Finalmente, se calculó la capacidad de eliminación de virus mediante el desafío con virus de la cromatografía de afinidad, los procedimientos de higienización y almacenamiento de la matriz de afinidad en etanol, la incubación del AcM en tampón ácido y el tratamiento térmico del AgsVHBr. Los virus modelos empleados en los experimentos de desafío fueron el virus sendai, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus herpes simple humano 1, el poliovirus humano 2 y el parvovirus canino. Los resultados demuestran que este método de purificación del AgsVHBr, no sólo permite su obtención con alta pureza y recobrado sino que también posee una capacidad de eliminación de virus superior a 14 Logs por encima de la contaminación viral de la fuente biológica.

Entre los elementos novedosos está en la implementación de un método eficiente y consistente para la purificación del AcM CB.Hep-1, lo cual permite su utilización en la cromatografía de inmunoafinidad para purificar el AgsVHBr. Por otra parte, esta es la única vacuna contra la Hepatitis B obtenida a través de esta metodología que usa un AcM como ligando para purificar el AgsVHBr. Otro aspecto novedoso es que se demuestra la seguridad virológica del método de purificación del AgsVHBr. Esto constituye el primer estudio de validación viral realizado al método de obtención de un antígeno vacunal que emplea en su purificación una proteína proveniente de fuentes biológicas que pueden introducir virus patógenos al hombre. Este trabajo informa además, las bondades del uso de la cromatografía de inmunoafinidad para purificar el AgsVHBr y por primera vez, la alta capacidad de inactivación de virus de la combinación del KSCN con elevadas temperaturas, lo cual justifica su empleo en la obtención de biológicos. Informa también por primera vez el alto grado de inactivación del etanol 70% sobre el parvovirus canino, modelo para el parvovirus de ratón, con elevada resistencia a los agentes físico-químicos y la baja capacidad del etanol al 20% para inactivar virus desnudos.

En conclusión, el aporte práctico principal es que la implementación de un método de purificación del AcM CB.Hep-1 y la demostración de su capacidad de eliminación de virus en combinación con el tratamiento térmico del AgsVHBr en presencia de KSCN ha permitido llevar a cabo un extenso programa de vacunación a escala nacional y de exportación de más de 100 millones de dosis de la vacuna cubana contra la Hepatitis B.

Tabla de Contenido

1	INTRODUCCION.....	1-5
1.1	Hipótesis.....	4
1.2	Objetivos.....	4
1.3	Tareas.....	4
1.4	Aportes.....	5
2	REVISION BIBLIOGRAFICA.....	6-25
2.1	Hepatitis B.....	6
2.2	Clasificación y estructura del virus de la Hepatitis B.....	6
2.3	Antígeno de superficie S del virus de la Hepatitis B.....	6
2.4	Antígeno de superficie M del virus de la Hepatitis B.....	7
2.5	Antígeno de superficie L del virus de la Hepatitis B.....	7
2.6	Vacunas anti Hepatitis B.....	7
2.6.1	Vacunas plasmáticas.....	7
2.6.2	Vacunas obtenidas por atenuación de cepas virulentas.....	8
2.6.3	Vacunas obtenidas por síntesis química.....	8
2.6.4	Vacunas antiidiotípicas.....	8
2.6.5	Vacunas obtenidas por la vía recombinantes.....	8
2.7	Métodos de purificación del AgsVHBr.....	9
2.8	Anticuerpos monoclonales.....	11
2.8.1	Métodos de producción de anticuerpos monoclonales.....	11
2.9	Errores en la industria médico-farmacéutica y en el manejo de animales contaminados con virus patógenos al hombre.....	12
2.10	Patógenos virales de ratas y ratones.....	14
2.10.1	Virus de la neumonía de ratón.....	15
2.10.2	Virus sendai.....	15
2.10.3	Citomegalovirus.....	15
2.10.4	Parvovirus de ratón tipo 1.....	15
2.10.5	Rotavirus de ratón.....	16
2.10.6	Virus tímico de ratón.....	16
2.10.7	Reovirus tipo 3.....	16
2.10.8	Virus de tumores de mama de ratón.....	17
2.10.9	Virus de la coriomeningitis linfocítica.....	17
2.10.10	Virus elevador de la enzima Lactato deshidrogenasa.....	17
2.10.11	Virus de la leucemia murina.....	18
2.10.12	Virus de la encefalomiелitis murina de Theiler.....	18
2.10.13	Virus hantaan.....	18
2.10.14	Poliomavirus.....	19
2.10.15	Adenovirus.....	19
2.10.16	Virus ectromelia.....	19
2.10.17	Virus diminuto de ratón.....	19
2.10.18	Virus de la hepatitis murina.....	20
2.11	Validación virológica de los métodos de purificación de biológico.....	20
2.12	Clasificación de los virus para los estudios de validación.....	21
2.13	Características de los virus modelos empleados.....	22
2.14	Procedimientos de validación virológica.....	23
2.14.1	Desescalado del método de purificación para los experimentos de remoción viral.....	24
2.14.2	Aspectos a considerar en los métodos de inactivación viral.....	25
3	MATERIALES Y METODOS.....	26-37

3.1	Aspectos generales	26
3.1.1	Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B.....	26
3.1.2	Anticuerpo monoclonal CB.Hep-1.....	26
3.1.3	Medios de cultivo para las líneas celulares e inóculos virales.....	26
3.1.3.1	Cultivo del hibridoma CB.Hep-1.....	26
3.1.3.2	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.....	26
3.1.3.3	Virus herpes simple tipo 1 y poliovirus humano tipo 2.....	26
3.1.3.4	Parvovirus canino.....	26
3.1.3.5	Virus sendai.....	26
3.1.4	Titulación de los inóculos virales.....	26
3.2	Producción de líquido ascítico rico en el AcM CB.Hep-1.....	27
3.3	Determinación de contaminación viral en la fuente biológica.....	27
3.3.1	Hibridoma	27
3.3.1.1	Detección de partículas retrovirales mediante Microscopía Electrónica de Transmisión....	27
3.3.1.2	Ensayo S+L- para caracterizar Retrovirus xenotrópicos.....	28
3.3.1.3	Ensayo XC para caracterizar Retrovirus ecotrópicos.....	28
3.3.1.4	Prueba de MAP para determinar virus murinos en el hibridoma CB.Hep-1.....	28
3.3.1.5	Ensayo in vitro para determinar virus.....	29
3.3.1.6	Ensayo in vivo para determinar virus en huevos embrionados de pollos.....	29
3.3.1.7	Ensayo in vivo para determinar virus en ratones adultos, lactantes y coballos.....	30
3.3.2	Ensayo de serología para determinar virus en la colonia de ratones BALB/c.....	30
3.3.3	Ensayo in vivo (MAP) e in vitro para la detección de virus en la ascitis.....	30
3.3.3.1	MAP.....	30
3.3.3.2	Detección de virus adventicios en células de primates.....	30
3.4	Purificación e inmovilización del AcM CB.Hep-1.....	31
3.4.1	Purificación del AcM CB.Hep-1.....	31
3.4.2	Activación de la Sefarosa CL-4B por el método del bromuro de cianógeno.....	31
3.4.3	Inmovilización del AcM CB.Hep-1.....	31
3.5	Caracterización del AcM CB.Hep-1.....	31
3.5.1	Cuantificación del AcM CB.Hep-1 por ELISA.....	31
3.5.2	Cuantificación de proteínas totales.....	32
3.5.3	Determinación de pureza del AcM CB.Hep-1 por electroforesis	32
3.5.4	Determinación de pureza del AcM CB.Hep-1 por HPLC-exclusión molecular	32
3.5.5	Determinación del punto isoeléctrico del AcM CB.Hep-1.....	32
3.5.6	Determinación de la subclases y subtipos del AcM CB.Hep-1.....	32
3.5.7	Verificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del AcM CB.Hep-1.....	33
3.5.8	Mapeo triptico del AcM CB.Hep-1.....	33
3.5.9	Confirmación de la especificidad del AcM CB.Hep-1.....	33
3.5.10	Determinación de la constante de afinidad del AcM CB.Hep-1.....	34
3.5.11	Determinación de ADN de ratón en muestras del AcM CB.Hep-1.....	34
3.5.12	Cuantificación de Proteína A por ELISA.....	34
3.6	Estudio estabilidad del AcM CB.Hep-1.....	35
3.7	Estudio estabilidad del inmuoadsorbente CB.Hep-1.....	35
3.8	Estudio de validación virológica.....	35
3.8.1	Virus modelos empleados y cálculo de la capacidad de remoción e inactivación viral.....	35
3.8.2	Desescalado del proceso de purificación del AcM CB.Hep-1.....	36
3.8.3	Experimento de remoción de virus modelos en la cromatografía de afinidad.....	36
3.8.4	Inactivación viral en etanol al 70% y al 20% a 4°C.....	36
3.8.5	Experimento de estabilidad del AcM CB.Hep-1 en ácido cítrico 100 mM pH 3 a 4°C.....	37
3.8.6	Inactivación de virus modelos en ácido cítrico 100 mM pH 3, 4°C.....	37
3.8.7	Inactivación viral en Tris 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M/KSCN 3M, 60°C...	37

4	RESULTADOS	38-69
4.1	Análisis de consistencia en la producción de líquido ascítico en el AcM CB.Hep-1.....	38
4.2	Análisis de recobrado y rendimiento del método de purificación del AcM CB.Hep-1.....	38
4.3	Caracterización del AcM CB.Hep-1 purificado.....	39
4.3.1	Resultados de la determinación de pureza del AcM CB.Hep-1.....	39
4.3.2	Resultados de la determinación de la subclase e isotipo.....	40
4.4.3	Resultados del mapeo peptídico de la cadena ligera y pesada del AcM CB.Hep-1.....	41
4.4.4	Resultados de la confirmación de la especificidad del AcM CB.Hep-1.....	41
4.4.5	Resultados de la secuencia de aminoácido de la cadena ligera del AcM CB.Hep-1.....	42
4.3.6	Resultados de la determinación del punto isoeléctrico de AcM CB.Hep-1.....	42
4.4.7	Resultados de la determinación de la constante de afinidad del AcM CB.Hep-1.....	43
4.4	Caracterización de los contaminantes críticos en las preparaciones del AcM CB.Hep-1...	43
4.4.1	Resultados de la determinación de ADN de ratón.....	43
4.4.2	Resultados de la determinación de Proteína A.....	43
4.5	Estabilidad del AcM CB.Hep-1 en tampón Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6.....	45
4.6	Inmovilización y caracterización cromatográfica de los inmunogeles del AcM CB.Hep-1.	46
4.7	Estabilidad de los inmunogeles del AcM CB.Hep-1.....	47
4.8	Caracterización de los contaminantes virales en las fuentes biológicas.....	48
4.8.1	Resultados de la determinación de Retrovirus en el hibridoma CB.Hep-1.....	48
4.8.2	Resultados de la tipificación de Retrovirus mediante los ensayos S+L- y XC.....	48
4.8.3	Resultados de la determinación de virus en el hibridoma CB.Hep-1 mediante el ensayo de MAP.....	49
4.8.4	Resultados de la determinación de virus adventicios en el hibridoma CB.Hep-1 mediante el ensayo en líneas celular sensibles a replicación viral.....	50
4.8.5	Resultados de la determinación de virus adventicios en el hibridoma CB.Hep-1 mediante al inoculación en huevos embrionados, ratones adultos, lactantes y cobayos.....	50
4.8.6	Resultados de los análisis serológicos a los animales.....	51
4.8.7	Resultados de la determinación de virus endógenos en la ascitis mediante el ensayo de MAP.....	51
4.8.8	Resultados de la determinación de virus adventicios en la ascitis mediante el ensayo en de inoculación en líneas celular.....	52
4.9	Desescalado del método de purificación del AcM CB.Hep-1.....	52
4.10	Resultados de la determinación de la capacidad de remoción de virus modelos.....	54
4.10.1	Virus envueltos (virus sendai, VIH-1, VHS-1).....	54
4.10.2	Virus desnudos (PVH-2, PVC).....	56
4.11	Resultados de la determinación de la capacidad de inactivación de virus modelos por el etanol al 70% y al 20%.....	58
4.11.1	Virus envueltos (VIH-1, VHS-1).....	58
4.11.2	Virus desnudos (PVH-2, PVC).....	59
4.12	Resultados de la determinación de la capacidad de inactivación de virus modelos en ácido cítrico 100 mM, pH 3 a 4°C.....	61
4.12.1	Estabilidad del AcM CB.Hep-1 en ácido cítrico 100 mM pH 3.....	61
4.12.2	Virus envueltos (virus sendai, VIH-1, VHS-1).....	62
4.12.3	Virus desnudos (PVH-2, PVC).....	63
4.13	Resultados de la determinación de la capacidad de inactivación viral en Tris 20 mM/ EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M/KSCN 3M, 60°C.....	65
4.13.1	Resultados de la recuperación del AgsVHBr durante el tratamiento térmico.....	65
4.13.2	Virus envueltos (virus sendai, VIH-1, VHS-1).....	65
4.13.3	Virus desnudos (PVH-2, PVC).....	67
4.14	Capacidad de eliminación de virus modelos del método de purificación del AgsVHB a partir de <i>Pichia pastoris</i>	68

5	DISCUSION	70-92
5.1	Implementación de un método consistente del AcM CB.Hep-1 empleado en la purificación del AgsVHBr.....	71
5.2	Demostración de la capacidad de remoción e inactivación de virus modelos del método de purificación del AcM CB.Hep-1 y del tratamiento térmico del AgsVHBr	80
6	CONCLUSIONES	93
7	RECOMENDACIONES	94
8	AUTOBIBLIOGRAFIA	95-98
9	REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA	99-114
-	ANEXOS	-

1. INTRODUCCION

Trescientos cincuenta millones de personas son portadores del virus de la Hepatitis B (VHB) en el mundo, de los cuales entre 500 000 y 750 000 mueren anualmente debido a las enfermedades hepáticas y al carcinoma hepatocelular que aparecen como secuela de esta infección (C. D. C., 2002). La infección con el VHB en adultos es inaparente clínicamente y la mayoría de los casos se recuperan completamente eliminando el virus. Sin embargo, entre el 5 y el 10% se convierten en infectados crónicos (Mitchel, 2000).

El VHB pertenece a la familia *Hepadnaviridae*; su genoma codifica las proteínas de la envoltura, la nucleocápsida, la polimerasa y la proteína X. La envoltura viral es de naturaleza lipoproteica y tiene como componente principal una proteína de 24 kDa denominada antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (AgsVHB) la cual está asociada a lípidos derivados de las células hospederas y se ha demostrado también que contiene las regiones inmunodominantes y protectoras para el humano (Gerlich, 1991; Fatlovich, 2003).

A pesar del elevado número de casos de infección con el VHB hay una importante disminución en la población menor de 19 años, debido a los extensos programas de vacunación. Una de las primeras vacunas contra la Hepatitis B (“Heptavax-B” de Merck, Sharp and Dohme) fue licenciada en Francia y en los Estados Unidos en 1981, (Zuckerman, 1985; Zuckerman, 1987). Esta demostró ser muy eficaz y evidenció que la inmunización es una estrategia efectiva en la prevención de esta patología (Szmunn y cols., 1980; Yré y Safari, 1987).

En 1985, comenzaron los trabajos de obtención del AgsVHB para ser usado como ingrediente activo de la vacuna contra la Hepatitis B en el CIGB. Poco años después, se logró su expresión en la levadura *Pichia pastoris* (Muzio y cols., 1989). El método de purificación de este antígeno se basó en la cromatografía de inmunoafinidad (Pentón, 1992; Agraz y cols., 1993; Páez y cols., 1993; Agraz y cols., 1994; Pérez y cols., 1994). Esta técnica permitió su aislamiento con una alta pureza y recobrado, así como su obtención a escala industrial, aceptabilidad del producto y originalidad, ya que existen otros métodos de aislamiento del AgsVHB que no emplean la cromatografía de inmunoafinidad como técnica de purificación (Hitzeman y cols., 1983; Gavilanes y cols., 1990; Jun Chai y cols., 1992; Zhou y cols., 2005).

El anticuerpo monoclonal (AcM) de ratón CB.Hep-1 (Fontirrochi y cols., 1993) es empleado como ligando en esta cromatografía de inmunoafinidad. Este AcM se generó a partir de la fusión del mieloma Sp2/0-Ag14 con linfocitos de ratones inmunizados con el AgsVHB obtenido a partir de un individuo crónicamente infectado con el VHB. Su producción basa en la inducción de tumores ascíticos en ratones BALB/c. Dicho método es muy productivo (Kozbor y cols., 1985; De Geus y Hendriksen, 1998; McArdle, 1999; McArdle, 2000) pero posee varios inconvenientes desde el punto de vista regulatorio, ya que el hibridoma, el suero fetal, los animales y la ascitis pueden contaminar el producto de interés con

virus patógenos al hombre y priones (Caethew, 1986; White y cols., 1991; Hart, 1995; Baker, 1998). Por lo que, si bien el empleo del AcM CB.Hep-1 en la cromatografía de inmunoafinidad para purificar el AgsVHBr de forma consistente ha contribuido al extenso programa de vacunación contra la Hepatitis B, su implementación no hubiese sido posible sin una demostración de la capacidad de remoción e inactivación de virus del método de obtención del AcM CB.Hep-1 y del AgsVHBr.

Esto es un serio inconveniente que ha sido señalados por varias entidades regulatorias, las cuales han emitido guías hacer para los estudios que demuestren de la capacidad de remoción e inactivación de virus y otros agentes patógenos de los métodos de purificación de AcMs de uso terapéutico o empleados en la purificación de biológicos (F. D. A., 1987; O. M. S., 1992; I. C. H., 1997; C. P. M. P., 1998; F. D. A., 2001).

El problema viral es complejo, ya que son varios los virus que pueden estar presentes en estas fuentes biológicas. Existen al menos 5 virus de ratón, como el hantaan y el virus de la coriomeningitis linfocítica, que pueden ocasionar la muerte en humanos, y otro grupo de virus conformado por 11 ó 13 virus para los cuales no se ha demostrado aún su capacidad de infectar humanos, pero sí líneas celulares humanas (O. M. S., 1992; Baker, 1998). Adicionalmente, se ha demostrado la contaminación de muchos hibridomas con virus que poseen actividad reverso transcriptasa y propiedades oncogénicas (Herr y Spell, 1985). Otros autores encontraron partículas retrovirales tipo A en células NS-1, células de mieloma derivadas de ratón BALB/c, mientras que 12 de 17 hibridomas estudiados (71%), liberaron grandes cantidades de partículas retrovirales tipo C (Weiss, 1982; Levy, 1983; Bartal y Hirshaut, 1987).

Otra fuente de contaminación viral relacionada con las células, es el suero fetal bovino (SFB). Su empleo adiciona el riesgo de contaminación con los virus de la diarrea bovina, la rinotraqueitis bovina, la enfermedad hemorrágica epizoótica y el parvovirus bovino, entre otros (Adamson, 1998). El descubrimiento de la encefalomielitis espongiiforme (Powell y cols., 1985; O. M. S., 1992; Foster, 1994; Honstead, 1996; O. M. S., 1996; Epstein y Brown, 1997; I. C. H., 1997), incrementó la presión sobre el desarrollo de medios de cultivo libres de suero. No obstante, ellos también incorporan productos de origen animal como la insulina, la transferrina y la albúmina, por lo cual no pueden ser considerados tampoco como exentos de riesgo (Lubiniecki, 1999).

La forma de resolver este problema es mediante la demostración de la capacidad de remoción e inactivación de virus del método de purificación del biológico de interés (Cameron y cols., 1997). Esto se logra mediante la adición de determinadas cantidades de virus modelos o relevantes a los diversos pasos del método de purificación para medir su capacidad de separar o inactivar los virus adicionados de la molécula que se desea purificar. Por consiguiente, la capacidad de remoción e inactivación total es calculada como la suma de las capacidades de remoción e inactivación de virus de cada unos de los pasos del método de purificación de la molécula de interés. En tal sentido, hay varios criterios para diseñar un método robusto de purificación de proteínas para uso farmacéutico. El más aceptado es que un método de

purificación se considera “robusto” si su nivel de eliminación de virus es superior a 4 Logs (virus envueltos) y 6 Logs (virus no envueltos) de la cantidad de virus detectada en la fuente biológica empleada en la obtención del biológico (Darling y Spaltro, 1996; Brian y cols., 1997; Lugo, 1998).

Para llevar a cabo este tipo de demostración científica, la selección de los virus constituye el elemento de mayor importancia. Los virus modelos son aquellos que reúnen propiedades físico-químicas parecidas a los que pueden estar en la fuente biológica y por lo tanto los resultados pueden ser extrapolados a los virus endógenos y adventicios (Darling y Spaltro, 1996).

El otro elemento crítico es el desescalado del método de purificación de la molécula de interés. La validez del mismo debe ser demostrada antes de comenzar los experimentos de desafío con los virus modelos. Para que este procedimiento sea válido, el nivel de purificación de la versión desescalada del método en cuestión debe ser lo más cercano posible al de la escala real de purificación. Los parámetros usualmente considerados en los sistemas cromatográficos son: altura del lecho, diámetro de la columna, sistema de distribución de la columna, flujo lineal, tiempo de residencia (T_r), concentración de proteínas, temperatura de los tampones, pH de los tampones y contenido de sales. En ocasiones surgen desviaciones de los parámetros que no pueden ser resueltas, pero estas pueden ser discutidas científicamente si la calidad del producto y la interpretación de los resultados no se afecta (Sofer, 1996).

La eliminación completa de las partículas virales sólo se puede lograr con un método de purificación robusto. En general, los sistemas de purificación de AcM se componen de una combinación de varias técnicas de purificación: precipitación para concentrar el producto, filtración por membrana de un determinado tamaño de poro (Nanofiltración) y las técnicas cromatográficas basadas en las propiedades físicas y químicas de las moléculas que componen la fuente a partir de la cual se desea extraer el AcM tales como: cromatografía de afinidad en cama empacada o expandida, cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de exclusión molecular (Gagnon, 1996; Fahrner y cols., 1999; Camperi y cols., 2003; Takashi y Shuichi, 2005). Sin embargo, ninguno de estos pasos por sí sólo constituye un método robusto de eliminación de virus, aunque sí para alcanzar la pureza proteica deseada (Darling y Spaltro, 1996; E. M. E. A., 1996).

Los diseños de validación viral deben incluir también pasos ortogonales de inactivación viral. Estos son pasos que no impliquen el mismo principio de remoción e inactivación. Esto significa también establecer las cinéticas de inactivación y el balance de pérdida de la capacidad de inducir efecto citopatogénico (Sofer, 1996; Schlegel y cols., 2001). Los métodos de inactivación son más fáciles de modelar que los de remoción física de las partículas virales, pues no conllevan la demostración de un desescalado. No obstante se debe considerar que cuando la cinética de inactivación es muy rápida, se deben realizar estudios más profundos para determinar exactamente la capacidad de inactivación viral del método estudiado.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se propuso entonces la siguiente hipótesis.

Hipótesis

El método de purificación del CB.Hep-1, AcM empleado en la purificación del AgsVHBr, es efectivo, consistente y combinado con el tratamiento térmico del AgsVHBr en presencia de KSCN es capaz de eliminar más de 6 Logs de virus por encima del nivel de contaminación detectado en las fuentes biológicas.

A partir de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. Demostrar la eficiencia y consistencia desde el punto de vista bioquímico del método de purificación del AcM CB.Hep-1 y de la cromatografía de inmunoafinidad del AgsVHBr obtenido a partir de *Pichia pastoris*.
2. Demostrar la capacidad de remoción e inactivación de virus modelos del método de purificación del AcM CB.Hep-1 y del tratamiento térmico del AgsVHBr en presencia de KSCN.

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se acometieron las siguientes tareas experimentales:

1. Implementación y determinación de la eficiencia y consistencia del método de purificación del AcM CB.Hep-1 en base a las siguientes propiedades bioquímicas de la preparación final de este AcM: pureza evaluada por electroforesis y cromatografía líquida de alta resolución, actividad específica, pH isoelectrico, isotipo, reconocimiento de su epítipo, constante de afinidad, secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, mapeo peptídico, contenido de ADN de ratón y contenido de Proteína A.
2. Determinación de la consistencia del método de inmovilización del AcM CB.Hep-1 a la Sepharose CL-4B y de la cromatografía de inmunoafinidad empleada en la purificación del AgsVHBr evaluando la pureza del AgsVHBr purificado, la capacidad de elución de los inmunogeles y el nivel de desprendimiento de IgG de ratón.
3. Determinación de la estabilidad del AcM CB.Hep-1 en el tampón Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6 y del inmunogel del AcM CB.Hep-1 en tampón fosfato salino 150 mM; pH 7.2.
4. Caracterización de los contaminantes virales aportados por el hibridoma CB.Hep-1, el ratón BALB/c y el fluido ascítico, empleados en la producción del AcM CB.Hep-1.
5. Establecimiento del desescalado del método de purificación del AcM CB.Hep-1 utilizando como criterio principal el tiempo de residencia constante en la cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose.
6. Determinación de la capacidad de remoción e inactivación de virus modelos de los siguientes aspectos: cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose, procedimiento de higienización de la matriz Protein A-Sepharose con etanol al 70%, procedimiento de la matriz Protein A-Sepharose conservación en etanol al 20%, incubación del AcM CB.Hep-1 en ácido cítrico 100 mM; pH 3 y el tratamiento térmico del AgsVHBr en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1 M/KSCN 3 M, pH 7.2.

La novedad científica de esta Tesis radica en la implementación de un método eficiente y consistente para la purificación del AcM CB.Hep-1, lo cual permite su utilización en la cromatografía de inmunoafinidad del AgsVHB obtenido a partir de *Pichia pastoris*. Por otra parte, esta es la única vacuna contra la Hepatitis B obtenida a través de esta metodología que usa un AcM como ligando para purificar el AgsVHB. Otro aspecto novedoso es que se demuestra la seguridad virológica del método de purificación del AgsVHBr. Esto constituye el primer estudio de validación viral realizado al método de obtención de un antígeno vacunal que emplea en su purificación una proteína proveniente de fuentes biológicas que pueden introducir virus patógenos al hombre. Por estas razones los resultados que se derivan de este estudio también constituyen un aporte al conocimiento de los métodos biotecnológicos diseñados para purificar proteínas de uso en humanos.

Este trabajo informa además, la consistencia del método de inmovilización del AcM CB.Hep-1, las bondades del uso de la cromatografía de inmunoafinidad para purificar el AgsVHBr y por primera vez, la alta capacidad de inactivación de virus de la combinación del KSCN con elevadas temperaturas, lo cual justifica su empleo en la obtención de biológicos. Informa también por primera vez el alto grado de inactivación del etanol 70% sobre el parvovirus canino, modelo para el parvovirus de ratón, con elevada resistencia a los agentes físico-químicos y la baja capacidad del etanol al 20% para inactivar virus desnudos.

El aporte práctico de esta Tesis es que la implementación del método eficiente y consistente de purificación del AcM CB.Hep-1 y la demostración de su capacidad de eliminación de virus en combinación con el tratamiento térmico del AgsVHBr en presencia de KSCN ha permitido llevar a cabo un extenso programa de vacunación a escala nacional y de exportación de más de 100 millones de dosis de la vacuna cubana contra la Hepatitis B.

Estos resultados han sido presentados en varios eventos y 9 publicaciones internacionales. Ha sido premiado por la Academia de Ciencias de Cuba y el CITMA y fue reconocido también como relevante en el XI FORUM Nacional de Ciencia y Técnica.

Este trabajo de Tesis consta de las siguientes partes: Síntesis, Tabla de Contenido, Abreviaturas, Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Autobiografía, Bibliografía y Anexos.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Hepatitis B.

El término Hepatitis B fue introducido por MacCallun en 1947 para denominar a la enfermedad causada por el virus del mismo nombre (VHB). Este virus ha infectado a más de 2 billones de personas en el mundo, de los cuales más de 400 millones son portadores crónicos, por lo cual es uno de los patógenos más difundidos del hombre (Mosley, 1975; Chisari y Ferrari, 1995). La infección crónica del VHB puede causar la aparición de uno de los carcinomas más comunes en el hombre: el hepatocarcinoma (Beasley y cols., 1984). En el año 1970, Dane encontró partículas parecidas a virus en pacientes con Hepatitis B, las cuales fueron designadas también como VHB (Dane y cols., 1970).

2.2. Clasificación y estructura del virus de la Hepatitis B.

El VHB pertenece a la familia *Hepadnaviridae*. Su forma de transmisión es a través de la sangre y el contacto sexual (Barker, 1970; Davis, 1989). El genoma viral es de ADN de doble cadena y contiene cerca de 3200 pares de bases (Howard, 1986; Ganem y Varmus, 1987). El ADN posee dos asimetrías importantes, la primera está dada por la diferencia en la longitud de las cadenas de ADN y la segunda por la unión covalente de una proteína en el extremo 5' de la cadena L-. Este genoma codifica varias proteínas entre las que podemos citar el AgsVHB. Dentro de la región del genoma que codifica las proteínas de superficie hay tres sitios de comienzo de lectura y sólo un codón de terminación, en virtud de lo cual las proteínas de superficie (AgsSVHB, AgsMVHB y AgsLVHB) comparten regiones comunes. La región que comparten las tres proteínas se conoce como dominio S (Brancoft y cols., 1972).

2.3. Antígeno de superficie S del virus de la Hepatitis B (AgsSVHB).

En la década de 1960-1970, Blumberg descubrió una proteína en la sangre de un aborigen australiano (Blumberg, 1967), por lo cual se denominó antígeno Australia (Au). Posterior a este informe, otros investigadores establecieron el Au como el AgsVHB (Okochi, 1968; Prince, 1968). El AgsSVHB es el más pequeño de los tres antígenos, contiene solamente el dominio S. Es altamente hidrofóbico y contiene 4 regiones transmembránicas con 14 cisteínas. También aparece en forma glicosidada la Asp 146 (Heerman y Gerlich, 1991; Melegari y cols., 1997). Los estudios de modelación en computadora muestran de 3 a 4 hélices en la región transmembránica insertadas postraduccionalmente dentro de la membrana del retículo endoplasmático. Dos de estas hélices son consideradas como los sitios de multimerización. En esta proteína reside el determinante "a", el cual resulta de gran importancia, ya que la respuesta protectora anti VHB está dirigida fundamentalmente contra esta región. Este determinante es conformacional y su estructura forma dos lazos. El primero, en la posición 122-137 y el otro en 139-149, en el cual se localiza la secuencia fundamental para la inmunogenicidad del determinante común "a" del AgsVHB (Eble y cols., 1986; Heermann y Gerlich, 1991). Los serotipos del AgsSVHB fueron originalmente definidos por el reconocimiento de anticuerpos. El dominio antigénico presente en todos los aislamientos virales fue

denominado como determinante “a”, aunque posteriormente se encontraron otros determinantes con dominios antigénicos irreconocibles por anticuerpos específicos para los subtipos clásicos de este virus (Norder y cols., 1992).

2.4. Antígeno de superficie M del virus de la Hepatitis B (AgsMVHB).

Esta proteína contiene 55 aminoácidos adicionales al AgsSVHB cuyo dominio es conocido como Pre-S2. Este dominio es hidrofílico y está ubicado extracelularmente. La Asp 4 aparece siempre glicosidada mientras que la glicosidación en el dominio S puede no ocurrir. Se ha propuesto que esta proteína está involucrada en el anclaje y entrada al hígado. Sin embargo, en un análisis genético del VHB en pacientes con Hepatitis B, el codón de iniciación de la región Pre-S2 contenía dos mutaciones que impedían su expresión. Se plantea también que está involucrada en un segundo mecanismo de anclaje (Gerlich, 1991).

2.5. Antígeno de superficie L del virus de la Hepatitis B (AgsLVHB).

La proteína L es la mayor de las proteínas de superficie del VHB. Está compuesta por los dominios Pre-S1, Pre-S2 y S. La región Pre-S1 es muy variable entre individuos infectados sugiriendo que esta proteína puede ser la máxima responsable de la unión del VHB al hígado. No contiene sitios adicionales de glicosidación, sólo de miristilación en la región N terminal. Una alta expresión de ella resulta en la retención en el retículo endoplasmático debido a la presencia de un factor de unión citoplasmático a la proteína L. Otras evidencias demostraron la formación de partículas intracelulares en el lumen del retículo endoplasmático, lo cual se debe a la unión de L con calexinas (Heerman y cols., 1984; Budkowska, 1995; Bruss y Vieluf, 1995).

2.6. Vacunas anti Hepatitis B.

Existen varias vacunas comerciales contra el VHB (Zanetti y cols., 1982; Carman y cols., 1990; Harrison y cols., 1992; Carman y cols., 1993). La tecnología de producción va desde vacunas producidas a partir de plasma de portadores crónicos del VHB hasta vacunas obtenidas por vía recombinante, pero todas tienen en común el principio farmacéutico activo: el AgsSVHB. La estrategia de vacunación contra esta patología tiene la meta general de eliminar la transmisión del VHB. Debido a que muchas de las secuelas ocurren en personas con infección crónica, el objetivo primario de esta estrategia es eliminar la infección y como segundo objetivo prevenir las enfermedades asintomáticas asociadas con esta infección (Barker, 1970; Davis, 1989).

2.6.1. Vacunas obtenidas a partir del plasma de portadores del VHB.

Las primeras experiencias de inmunización contra el VHB fueron realizadas con preparaciones de sueros inactivados (Krugman y Giles, 1970). A partir de esta experiencia empezó la carrera por la generación de vacunas contra este virus. En 1981 se licenció en los Estados Unidos la primera vacuna, obtenida a partir del plasma de portadores crónicos del VHB, el cual se sometió a un largo proceso de purificación e inactivación (Zuckerman, 1985). Las desventajas principales de este tipo de vacunas son la preocupación

sobre la transmisión del VIH y otros virus, las reacciones autoinmunes y la limitada disponibilidad (Grein y Purcel, 1983).

2.6.2. Vacunas obtenidas por atenuación de cepas virulentas.

Estas vacunas se obtienen por atenuación de cepas virulentas incapaces de producir la enfermedad. El sistema de expresión del virus vaccinia ha sido usado para expresar el AgsSVHB (Smith y cols., 1983; Perkus y cols., 1985). Sin embargo, existen una serie de desventajas por las cuales esta vía no ha sido utilizada para vacunaciones masivas. La ausencia de marcadores de atenuación de la virulencia induce el temor de que aparezcan revertantes virulentos o que la virulencia se modifique por la introducción de genes foráneos. La diseminación a contactos y la asociación de la inmunización primaria con la aparición de complicaciones severas como la encefalitis e infección progresiva de individuos inmunodeficientes, constituyen también otro grupo de preocupaciones al respecto (Perkus y cols., 1985). Otras entidades han sido también utilizadas para inmunizar contra el VHB, pero la respuesta obtenida es pobre (Lubeck y cols., 1989).

2.6.3. Vacunas obtenidas por síntesis química.

Estas vacunas ofrecen como ventaja que los péptidos son productos químicos definidos, estables y no implican ningún riesgo de infección. Además su pequeño tamaño facilita su producción a gran escala por lo que no se necesitan grandes plantas para el escalado de la producción (Tam, 1992; Lerner y cols., 1994). Se han realizado estudios para definir los péptidos más inmunogénicos (Tam, 1992). Pero esta propuesta ha estado limitada por varias razones. Los péptidos representan sólo una pequeña fracción de la secuencia antigénica nativa, por consiguiente sólo contienen un repertorio limitado de epítomos T y los epítomos que se representan en la estructura nativa de la proteína son con frecuencia conformacionales (Manivel y cols., 1992; Kumar y cols., 1992).

2.6.4. Vacunas “antiidiotípicas”.

Estas vacunas constituyen otra vía para la obtención de vacunas contra el VHB. Estudios en animales han demostrado que este tipo de vacunas poseen suficiente eficacia para proteger los animales de la infección. Sin embargo, su interés parece ser solamente académico si se analizan las ventajas de las otras vacunas y el temor de inducir reacciones anafilácticas por múltiples inyecciones con anticuerpos heterólogos (Kennedy y cols., 1986).

2.6.5. Vacunas obtenidas por la vía recombinante.

Se han utilizado diferentes sistemas hospederos para obtener el AgsVHBr. Los primeros trabajos se realizaron en *E. coli* pero los niveles de expresión fueron bajos y no ocurría el ensamblaje de las partículas inmunogénicas (Pasek y cols., 1979). La expresión del AgsVHBr en células eucariotas ha permitido su obtención de forma glicosidada y secreción al medio en forma de partículas similares a las encontradas en el plasma de individuos infectados (Nozaki y cols., 1985; Sell y cols., 1987). Sin embargo, esta vía no ha sido muy utilizada para vacunaciones masivas debido al potencial tumorigénico asociado a

la presencia de oncogenes, *Retrovirus*, y al costo de producción (Papaevangelou, 1987). Este antígeno ha sido también expresado en células de insectos en forma glicosidada y como partículas lipoproteicas, pero este sistema ha sido sólo de interés académico (Shishido y cols., 2006).

La posibilidad potencial de producir grandes cantidades del AgsVHBr se hizo entonces evidente en 1986-1987 por lo cual la vacuna contra la Hepatitis B constituyó, la primera vacuna recombinante aprobada para uso en humanos (Marquardt y cols., 1987). Las levaduras son uno de los sistemas más empleado en la expresión del AgsVHB. Estas son de rápido crecimiento y fácil manipulación genética, además poseen capacidad de procesamiento postraduccionales tales como: formación de puentes disulfuros, cortes endoproteolíticos, glicosidación y ensamblaje multimérico (Hitzman y cols., 1983; van Wijnendaele y cols., 1987; Hamada y cols., 1988; Buckholz y Gleeson, 1991; Romanos y cols., 1992; Romanos, 1995).

En 1986 se aprobó la primera vacuna recombinante por subunidades en *Saccharomyces cerevisiae*. El antígeno producido en esta levadura posee las mismas características del derivado del plasma humano (André y cols., 1987; Cadranel y cols., 1987; Petre y cols., 1987; Schellenkes y cols., 1987; Bitter, 1988; Ichida y cols., 1988; André, 1990). El AgsVHBr ha sido obtenido además en *Pichia pastoris* siendo esta la primera y única vacuna disponible en el mercado elaborada también a partir de un antígeno expresado en este tipo de levadura (Muzio y cols., 1989; Pentón y cols., 1994).

La vía de la expresión en plantas es relativamente novedosa y está dirigida fundamentalmente a reducir costos de producción y a la producción de antígenos que pueden ser administrados por vía oral. Entre las desventajas están que es una tecnología poco conocida y se reporta la posibilidad de algún carácter alergénico e inmunogénico de los productos debido a la presencia de xilosa y fucosa (Fischer, 2000; Langridge, 2000; Walmsley, 2000).

2.7. Métodos de purificación del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B.

El AgsVHBr ha sido purificado mediante varias técnicas de purificación de proteínas, cuya aplicación está determinada en parte por la célula hospedadora donde se expresa esta proteína. Entre las más empleadas está la diafiltración del AgsVHBr con membranas de ultrafiltración de 100 KDa de tamaño de poro. Para lograr un alto recobrado y rapidez en este paso, el AgsVHBr fue previamente tratado con enzimas proteolíticas para eliminar varias de las proteínas contaminantes (Jun Chai y cols., 1992).

Alrededor del 10% de la población en China es portadora crónica del VHB, por lo tanto contar con un procedimiento de purificación del AgsVBr es muy importante para el programa de salud de este país. Para lograr este propósito, actualmente se produce este antígeno en células CHO y se purifica por un procedimiento que utiliza la cromatografía de intercambio iónico en presencia de 1% de polietilenglicol (10000) como paso principal de purificación. De acuerdo a la información publicada por Zhou y colaboradores (2005), la adición de polietilenglicol en la fase móvil permite incrementar el recobrado de esta cromatografía desde 55 hasta 80%, obtener una alta pureza y favorecer la agregación de esta

glicoproteína en la misma forma que ocurre con el VHB, lo cual es un requisito importante para la inmunogenicidad de la proteína.

Otro grupo de procedimientos involucran el prensado de las células con la adición eventual de detergentes no iónicos como el Triton X-100 (van Wejnemdale y Simonet, 1987), Tween 20 ó 80 seguido de un tratamiento con una solución de aldehído para obtener partículas menores de 20 y 5 nm respectivamente (Wei Kuang y cols., 1994). También se utiliza el tratamiento de las partículas del AgsVHBr con alquilfenol polietileno con 10 cadenas de oxietileno, un agente desnaturizante (urea o guanidino) o un agente reductor (Hubert y cols., 1982). El producto obtenido por este procedimiento de extracción posee un tamaño de 10-20 nm. Otra información relaciona el tratamiento del AgsVHBr con detergentes con propiedades deslipidantes o con solución de cloruro de sodio isotónica a pH neutro (Newurath y cols., 1980, Gavilanes y cols., 1990; Desombere y cols., 2006). Sin embargo, algunos investigadores plantean que el uso de detergentes rompe las partículas formadas por agregados de proteínas (Hitzeman y cols., 1983). Partiendo de estos postulados, estos investigadores no utilizan detergentes no iónicos para formar mezclas de polipéptidos libres de detergente en la fase acuosa de un gradiente de sucrosa con alta inmunogenicidad (Einarsson y cols., 1981; Dejean y cols., 2004).

En general, todos estos procedimientos incluyen después de los pasos de extracción las técnicas clásicas de purificación como la cromatografía de interacciones hidrofóbicas, exclusión molecular y la cromatografía de afinidad basada en Concanavalin A-Sepharose (Neurath y cols., 1976; Skelly y cols., 1979).

Como se mencionó anteriormente, la vacuna cubana contra la Hepatitis B es el único ejemplo de producción de vacuna anti Hepatitis B en la levadura *Picchia pastoris*. Pero la purificación del AgsVHBr empleado como componente activo de esta vacuna, resulta también un ejemplo único entre los productores de estas vacunas, ya que utiliza como paso principal la cromatografía de inmunoafinidad que tiene como base la interacción del AgsVHBr con el AcM CB.Hep-1. Esto le aporta ventajas en términos de selectividad, recobrado, pureza, poder de concentración, no utilización de solventes orgánicos o detergentes y simplificación del método productivo, pero le agrega inconvenientes desde el punto de vista regulatorio, obligando a la demostración de la capacidad de remoción e inactivación de virus adventicios.

La cromatografía de afinidad es una cromatografía de adsorción en la cual la molécula a purificar es específica y reversiblemente adsorbida por una sustancia complementaria denominada ligando, inmovilizado de forma covalente a una matriz insoluble. La muestra que contiene la sustancia de interés es aplicada bajo condiciones que favorezcan la interacción con el ligando, mientras que las sustancias no adsorbidas son eliminadas y la de interés recuperada bajo condiciones que desfavorezcan su interacción con el ligando (Nishikawa, 1983). Este procedimiento ha sido muy empleado como herramienta fundamental en la investigación para purificar proteínas como la fosfodiesterasa PDE-4D4 (Sheperd y cols., 2004) y a medida que se ha logrado el avance tecnológico en la producción de AcM con los

requerimientos regulatorios necesarios (O. M. S., 1992), también se ha extendido a la purificación de biomoléculas a escala industrial. Dentro de sus aplicaciones se pueden destacar la purificación del Interferón y la Urokinasa (Secher y Burke, 1980; Stump y cols., 1986; Quiñones y cols., 1989).

Existen diversas variantes de esta técnica de purificación de proteínas. Una de éstas se basa en la unión de la región Fc de las inmunoglobulinas (Ig) a la Proteína A de *Staphylococcus aureus*. Esto permite la utilización del mismo ligando para la purificación de Ig de diferentes orígenes y características. Otra variante, la inmuno-específica, explota la especificidad, la alta afinidad y la interacción reversible entre los anticuerpos y una proteína dada. Las desventajas principales de ambas variantes es que pueden requerir frecuentemente condiciones drásticas de elución, lo que puede afectar la estabilidad de la molécula de interés y del ligando (Ey y cols., 1978; Langone, 1982) y el desprendimiento del ligando, contaminando así el producto de interés con moléculas que suelen ser tóxicas e inmunogénicas. Por ejemplo, numerosas publicaciones vinculan la Proteína A con toxicidad en el hombre y en animales (Balint, 1984; Ernest-Cabrera y Wilchek, 1988; Bloom y cols., 1989; Gagnon, 1996).

Entre sus ventajas está la alta selectividad o capacidad de purificación, recobrado, poder de concentración y el tratamiento con soluciones acuosas, o sea, no involucran solventes orgánicos o detergentes que pudieran desnaturalizar, desagregar o disminuir la inmunogenicidad de la proteína de interés.

2.8. Anticuerpos monoclonales.

En 1975, George Köhler y Cesar Milstein publicaron un nuevo método de producción de AcMs (Köhler y Milstein, 1975). Esta nueva técnica conllevó una revolución asumida por todos los campos de la biomedicina y la biotecnología. Fue tan importante el aporte, que estos investigadores recibieron el premio Nobel en 1984. Las aplicaciones específicas de los AcMs abarcan el inmunodiagnóstico, la cromatografía de afinidad, la inmunoquímica y la terapia contra el cáncer, entre otras. Los AcMs son moléculas que pueden ser producidas de forma continua por hibridomas (Marx y col., 1997). Un hibridoma es un híbrido construido biológicamente entre una célula mortal productora de anticuerpos y una inmortal llamada mieloma ([Anexo 1](#)). Esta tecnología representó un significativo avance pues permitió obtener cantidades ilimitadas de AcMs.

2.8.1. Métodos de producción de AcMs.

La producción del híbrido, así como la selección de las células productoras de anticuerpos de interés ocurre *in vitro*. Desde el inicio de esta tecnología (1970-1980) los hibridomas desarrollados *in vitro* se inyectaban en el peritoneo de un animal para la producción de ascitis y de grandes cantidades del AcM de interés (Jones, 1990; Hendriksen y Leeuw, 1998; Jackson, 1999). Este procedimiento fue muy utilizado en aquel tiempo, ya que no se habían desarrollado los procedimientos *in vitro*. Posterior a los 80s comenzaron serias dudas sobre el empleo de este método, muy productivo pero doloroso para el animal ([Anexo 2](#)) además de los elementos de contaminación potencial con agentes patógenos al hombre (Halder, 1988; Stephen y cols., 1990; Balls, 1995; Zutpen y Balss, 1996), que impulsaron la segunda

revolución de los métodos alternativos y la necesidad de profundizar en los trabajos de validación de la capacidad de remoción y de inactivación de virus.

Debido a que los anticuerpos murinos son inmunogénicos en humanos, los investigadores han tratado de limitar la respuesta inmune anti Ig de ratón. Una de las estrategias empleadas fue transferir la tecnología de generación de hibridomas murinos hacia la tecnología de células humanas (Kurz, 2007). Sin embargo, aspectos éticos asociados con la inmunización de humanos, conjuntamente con la carencia de mielomas humanos con alta eficiencia de fusión, rendimiento de AcM y estabilidad de la línea celular han limitado esta estrategia. No obstante, células productoras de anticuerpos humanos pueden ser immortalizadas con el herpesvirus de Epstein-Barr, aunque la transferencia de genes virales crea el riesgo de expresión de partículas virales infecciosas (Little y cols., 2000). Los AcMs pueden producirse también en animales transgénicos. Esta variante disminuye la inmunogenicidad de los AcM resultantes, pero su producción posee los mismos inconvenientes desde el punto de vista regulatorios del método de hibridomas murinos y suele ocurrir un alto grado de contaminación con anticuerpos propios del animal empleado (Pendly y cols., 2003; Moroney y Plüctum, 2005).

También se producen AcMs en líneas celulares de organismos superiores, mielomas murinos y células CHO, mediante la tecnología del ADN recombinante, integrando la información para los AcM humanos en vectores de expresión adecuados para estas líneas celulares (Peterson, 2005). Esta variante demuestra una expresión estable de anticuerpos pero los niveles de expresión suelen ser bajos comparados con otros sistemas de expresión de proteínas heterólogas y el costo de producción es mayor.

2.9. Errores en la industria médico-farmacéutica y en el manejo de animales contaminados con virus patógenos al hombre.

La historia de las regulaciones de la industria médico-farmacéutica está relacionada con múltiples errores que han provocado un elevado costo de vidas humanas y recursos financieros (Theiler y cols., 1937; Accomazzo y Graut, 1986; Minor, 1989; Fisher, 1999; Fradkin y cols., 1991; Brown y cols., 1992; E. M. E. A., 1996; Honstead, 1996; Parkman, 1996). A continuación se mencionan de forma cronológica algunos errores que aparecen explicados en las referencias incluidas en este acápite.

- ☑ El hospedero natural del *Herpesvirus simiae* son los monos asiáticos del género *Macaca*. El primer caso conocido de infección en humanos fue en 1932 cuando un individuo murió de encefalomiелitis tres días después de ser mordido por un mono Rhesus clínicamente normal. Un total de 28 casos se informaron desde 1932 hasta 1987, de los cuales 20 fueron fatales y 7 quedaron con severas secuelas neurológicas (Minor, 1989).
- ☑ En 1937-1940, la vacuna contra la fiebre amarilla fue contaminada con el virus de la leucosis aviar debido a que en su producción se utilizaron huevos infectados y también con el virus de la Hepatitis B aportado por el suero humano empleado como estabilizador. Esto fue un caso aceptado por la OMS

debido a la imposibilidad de obtener huevos embrionados libres de patógenos virales (Theiler y cols., 1937; O. M. S. 1983).

- ☑ La contaminación con el virus sendai de las vacunas contra el poliovirus y el adenovirus preparadas en 1950 en cultivo primario de células de riñón de mono Rhesus (Minor, 1989).
- ☑ El virus SV40 produce infección latente en los riñones de monos Rhesus y puede transformar células humanas. La prevalencia de la infección implicó que en 1954 cuando la producción de vacunas contra el poliovirus y el adenovirus comenzó, todos los lotes de vacunas producidas en células a partir de riñón de mono Rhesus fueron evaluados y cerca del 20% resultaron contaminados con el SV40. En 1955, este proceso de vacunación provocó 51 casos con parálisis y 10 fallecidos (Shah y Nathanson, 1976).
- ☑ En 1958, En los Estados Unidos se reportaron tres casos de muerte por la enfermedad de Creusfelt-Jacob en jóvenes tratados con la hormona de crecimiento obtenida por procesamiento de pituitarias de cadáveres humanos. Sólo en este país aproximadamente 10000 personas se trataron con esta hormona desde el año 1965 hasta el presente, mientras que en Inglaterra el número de tratados fue aproximadamente 1800 casos. La incidencia de esta enfermedad después de estos tratamientos ha sido sustancial. Esta enfermedad está asociada con un agente patógeno comparable con aquellos responsables del scrapie, kuru y encefalomiелitis esponjiforme (Jackson y cols., 1985).
- ☑ El virus ebola. En Agosto de 1967, trabajadores de dos centros de investigaciones en Alemania y un tercero en Yugoslavia desarrollaron severas enfermedades después de manipular tejidos de monos Vervet (*Cercopithecus aethiops*). De un total de 31 casos con enfermedad aguda, 7 murieron. Estudios posteriores con estos monos infectados demostraron una enorme acumulación de este virus en el hígado de los animales infectados lo que permitió una evidencia ultraestructural de que este agente viral era distinto al *Rhadovirus* que inicialmente se asoció con la enfermedad (Murphy y cols., 1971).
- ☑ La contaminación viral de sueros fetales bovinos es también de gran preocupación para la industria de la producción de biológicos. Históricamente, tres agentes virales han sido los más frecuentemente detectados en los sueros fetales, virus de la rinotraqueitis bovina (herpesvirus bovino), virus de la diarrea viral bovina y el parainfluenza tipo 3. Estos son patógenos para los bovinos y su transmisión es vía infección materna (Erickson y cols., 1991).
- ☑ Más recientemente, son muy conocidas además las contaminaciones de productos obtenidos a través de la sangre con el VIH, VHA, VHB y el parvovirus B19 (Azzi, 1992).
- ☑ La información científica sobre la infección con el virus hantaan en el mundo oriental fue descrita en la guerra de Korea (1951-1953), cuando más de 3000 soldados desarrollaron una enfermedad caracterizada por fiebre y fallo renal. Esta enfermedad tiene un índice mortalidad de aproximadamente un 10% y el virus fue designado con este nombre, ya que su aislamiento se produjo en las proximidades del río Hantan en Korea. Francia sufrió, en 1993, la epidemia más aguda de

fiebre hemorrágica con síndrome renal: se contaron 192 casos. Desde 1977 hasta nuestros días, se han identificado 513 casos de fiebre hemorrágica con síndrome renal. Tres pacientes habían contraído la infección fuera: Finlandia, Yugoslavia y Rusia. Entre los 510 casos autóctonos, 505 infecciones por el virus tuvieron lugar en el cuadrante nororiental del país; cinco se debían a un virus más próximo al hantaan que al puumala: probablemente, el virus Seul, un hantavirus cosmopolita transmitido por las ratas (Song y cols., 2006).

- ☑ Dos casos independientes de contaminación con un parvovirus murino (virus diminuto de ratón) se describieron en la producción de un biológico a partir de cultivo de células CHO en los Estados Unidos. La fuente de contaminación sospechada, ya que no pudo ser demostrada, fue la contaminación de las materias primas del proceso productivo con heces fecales y orina de ratones (Adanson, 1998).
- ☑ Virus de la coriomeningitis linfocítica. Se reportaron 4 casos de infección con este virus en el sur de Francia en 1997 (Rosseau y cols., 1997) y más recientemente infección a partir de órganos transplantados a varias personas a partir de un donante común en los Estados Unidos (Paddock y cols., 2005).

Como se puede apreciar, la historia de las regulaciones de productos biológicos derivados de fuentes biológicas contaminadas con virus está desafortunadamente vinculada a víctimas fatales o pacientes afectados por el uso de medicamentos contaminados. Estos antecedentes históricos explican, en primera instancia, la necesidad del establecimiento de rigurosos programas de validación de la demostración de la capacidad de eliminación de estos patógenos (Fry, 1984, I. C. H., 1997).

2.10. Patógenos virales de ratas y ratones.

El tema de los patógenos de los animales de laboratorio puede ser dividido en tres períodos fundamentales (Weisbrouth, 1996).

- 1) Desde 1850 hasta 1950 el período de la domesticación, durante el cual varias especies de roedores se convirtieron en animales de laboratorio. Muchas de estas especies vivían en condiciones naturales siendo portadores de muchos patógenos. Esta situación obligó a realizar grandes esfuerzos en esta etapa por el control ambiental y la nutrición de los animales de laboratorio.
- 2) Desde 1950 hasta 1985, este período se consideró como el de la derivación gnotobiótica, ya que hubo una explotación de la cesárea aséptica permitiendo el reemplazo de los grupos de animales infectados por no infectados. Este procedimiento fue muy exitoso en la eliminación de patógenos no proveniente del útero.
- 3) A partir de 1986, el autor lo denominó como el de la erradicación de los virus murinos naturales (aparición de animales SPF). Esta reducción se logró mediante la aplicación de ensayos serológicos con la posterior eliminación y la rederivación por cesárea. No obstante, a pesar de estos esfuerzos, se han realizado varios estudios de prevalencia y aún continúan algunos de estos agentes virales

circulando entre la población de animales de laboratorio (National Research Council, 1991; Gillioli y cols., 1996;). Por lo cual el riesgo de contaminación de biológicos está aún vigente.

A continuación aparece una breve descripción de los patógenos virales más frecuentes que afectan los sistemas de órganos específicos de ratas y ratones.

Sistema Respiratorio.

2.10.1. Virus de la neumonía de ratón: Es un virus de ARN de simple cadena de la familia *Paramixoviridae*. La contaminación se produce vía aerosoles y por contacto con el tracto respiratorio (Miyata y cols., 1995). Las infecciones son cortas y generalmente asintomáticas. La susceptibilidad de los animales puede incrementarse por una variedad de factores estresantes sistémicos o locales y por la carencia de respuesta inmunológica contra determinadas cepas virales (National Research Council, 1991; Schunrman y cols., 1992).

2.10.2. Virus sendai. Es uno de los patógenos más frecuentemente encontrado en las ratas y ratones (National Research Council, 1991). Es también un virus de ARN de simple cadena y de la familia *Paramyxoviridae*. Es extremadamente contagioso y su transmisión es a través del contacto con el tracto respiratorio y aerosoles (Sakaguchi, 1994). La infección natural en ratones es epizoótica, o sea son infecciones endémicas de la colonia donde el suministro constante de animales susceptibles mantiene la infección. Los ratones son infectados en un período corto hasta que alcanzan niveles altos de anticuerpos anti sendai, incluso después de que la infección es eliminada, se mantienen altos títulos de anticuerpos por un largo período de tiempo. El virus sendai contiene la proteína HN con actividad neuroaminidasa y hemoaglutinante. También contiene la proteína F con actividad de fusión celular y hemolítica (Tanayabashi y cols., 1996). La conversión de la proteína F a su forma activa es dependiente de la actividad de proteasas de la célula hospedera, por lo cual la susceptibilidad y la patología varían severamente entre variantes de animales.

Sistema Digestivo.

2.10.3. Citomegalovirus: Es un virus de ADN de simple cadena de la familia *Herpesviridae*. Es comúnmente encontrado en las glándulas salivales submandibulares de ratones salvajes. Su prevalencia en los animales de laboratorio es muy baja, a pesar de que los resultados son afectados por el método de pesquiasaje, pues las glándulas salivales están persistentemente infectadas. La vía de transmisión principal es a través del contacto con la saliva (Tsutsui y cols., 1995). Además de las glándulas salivares, infecciones latentes pueden encontrarse en riñones, próstata, páncreas, corazón, hígado, pulmones, bazo, neuronas y células del linaje mieloide (Osborn, 1982; Collins y cols., 1993; Pollock y cols., 1995; Tsutsui y cols., 1995; Mitthel y cols., 1996).

2.10.4. Parvovirus de ratón tipo 1. Este virus ha sido recientemente reconocido como un patógeno muy común de los ratones de laboratorio. La prevalencia de la infección parece ser alta en las instalaciones para roedores (Jacoby y cols., 1996), donde tres aislamientos de un mismo serotipo han sido identificados

(1a, 1b, y 1c). Es un virus de ADN de simple cadena perteneciente a la familia *Parvoviridae*. Requiere de células en activa división o diferenciación para poder “sobrevivir”, su forma de transmisión es a través de las vías urinarias, heces fecales y tal vez por las vías respiratorias. Las infecciones naturales de ratón son generalmente asintomáticas y no patogénicas incluso en los neonatos y los ratones inmunocomprometidos (Smith y cols., 1993). Este virus tiene antígenos con reactividad cruzada con *Parvovirus* de otros roedores y con el virus diminuto de ratón debido a la presencia de proteínas no estructurales muy conservadas (Ball-Goodrich y cols., 1994; Besselsen y cols., 1996). Afecta los procesos de diferenciación celular y modula directamente de la disfunción de células T.

2.10.5. Rotavirus de ratón. La enfermedad causada por este virus se denomina diarrea epizootica de ratones infantiles. El genoma es de ARN de doble cadena y pertenece a la familia *Reoviridae*. El rotavirus de ratón es miembro del grupo A de los *Rotavirus*, los cuales son conocidos por infectar una amplia variedad de vertebrados incluyendo al hombre. Se han identificado múltiples cepas de rotavirus de ratón (Ijaz y cols., 1993; Burns y cols., 1995;). La infección es altamente contagiosa y se adquiere a través de la exposición al aire contaminado y al encamado. La protección contra este agente viral parece estar más relacionada con la replicación intestinal del virus, que con las propiedades inmunogénicas específicas de las proteínas virales (McNeal y cols., 1994). El rotavirus altera la fisiología del hospedero en muchas formas. Los animales infectados son más sensibles a los efectos de copatógenos (Newsome y cols., 1985) y las alteraciones de la fisiología intestinal (Ijaz y cols., 1987; Collins y cols., 1998).

2.10.6. Virus tímico de ratón. Es relativamente pequeño y es conocido con ese nombre debido a su incapacidad de replicarse en cultivo. El genoma es de ADN de doble cadena y pertenece a la familia *Herpesviridae*. La transmisión parece ser por vía directa (St. Pierre y cols., 1987) y vía transmamaria (Morse y cols., 1987). Las infecciones naturales son subclínicas y los cambios patológicos están limitados a la necrosis linfocítica del timo, nódulos linfáticos y del bazo en ratones neonatales, seguida por una difusa granulomatosis (Wood y cols., 1981). El virus también persiste en las glándulas salivares y se ha demostrado que afecta la respuesta de células T a la concanavalina A y a la fitohemoaglutinina (Cross y cols., 1976).

2.10.7. Reovirus tipo 3. Los *Reovirus* de mamíferos se agrupan en tres serotipos 1, 2 y 3. El reovirus 3 es el más patogénico de los virus de roedores de laboratorio (Barthold y cols., 1993). Su importancia capital se debe a que es un contaminante habitual de líneas celulares y de tumores transplantables (Nicklas y cols., 1993). Este es un virus de ARN de doble cadena y pertenece a la familia *Reoviridae*. Su transmisión es a través del contacto directo, aunque Bartold y colaboradores (1993) demostraron que la transmisión de este virus no ocurre de madres infectadas a infantiles, lo que indica su bajo nivel de contagio. La infección natural de este virus es casi asintomática. Cook, en 1993 informó los siguientes síntomas: alopecia abdominal, diarrea, aturdimiento, ictericia, necrosis hepáticas y riñones amarillos. La inmunidad contra el reovirus 3 es primeramente humoral (Cuff y cols., 1991; Tyler y cols., 1993; Barkon y cols., 1996), pero también involucra respuesta celular (Cuff y cols., 1991; Virgin y cols., 1991; Cuff y cols., 1993;). Los

efectos informados de las infecciones naturales se limitan a la lisis de tumores ascíticos transplantados pues inhibe la síntesis del ADN e induce apoptosis (Bennette, 1960; Nelson, 1960).

Sistema Dermal.

2.10.8. Virus de tumores de mama de ratón. Este es un virus de ARN de simple cadena tipo B. Pertenece a la familia *Retroviridae*. Al menos 4 variantes de este tipo de virus han sido identificadas: S, (estándar); L, (baja oncogenicidad); P, (embarazo); y O, (dominante) (Matsuzawa y cols., 1995). Con posterioridad se identificaron también otras variantes tales como SW y C4 (Shakhov y cols., 1993). El mecanismo de transmisión difiere entre las variantes, por ejemplo la variante O es endógena del genoma del ratón, la S es transmitida vía leche, la L vía células germinales y la P a través de la leche y las células germinales (National Research Council, 1991). Las variantes también difieren en su poder oncogénico, las variantes S y P son altamente oncogénicas mientras que el resto tiene menos oncogenicidad. Dependiendo de la línea de ratón, este virus puede expresarse en las mamas o en otros órganos y tejidos o puede existir como un provirus en el ADN del hospedero (van Nie y Hilgers, 1976; Wajjwalku y cols., 1991). Los síntomas clínicos están limitados a las mamas pero puede además hacer metástasis a distancia con el posterior comprometimiento de los órganos. La inmunidad involucra ambos tipos de respuestas (Bentvelzen y cols., 1980; Matsuzawa, 1995; Xu y cols., 1996). Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II interactuando con la V β del receptor de las células T, activa las células B y permite la división y diferenciación celular (Held y cols., 1994). La infección natural con este agente viral puede interferir con los estudios de carcinogénesis, ya que reduce el tiempo de vida de los animales.

Sistema Hematopoyético.

2.10.9. Virus de la coriomeningitis linfocítica. Es un virus de ARN de simple cadena no citopático de la familia *Arenaviridae*. La importancia primaria de este virus es la zoonosis pues es un contaminante potencial de tumores transplantables y de líneas celulares (Mahy y cols., 1991; Dykewicz y cols., 1992; Nicklas y cols., 1993). Las infecciones naturales de ratones con este agente viral son poco comunes y sólo el ratón y el hámster son capaces de transmitir su infección. Las vías de transmisión son: tumores transplantables, mucosas, piel, orina, saliva, leche y vía ingestión. Adicionalmente, transmisión transovárica y transuterina ha sido observada (National Research Council, 1991; Tishom y cols., 1991; Moskophidis y cols., 1995). Patrones clínicos incluyen: infecciones persistentes seguidas por infección en el útero y en el neonato e infecciones persistentes en linfocitos T CD4+, y viremia (Stellrecht-Broomhall, 1991; Colle y cols., 1993; Gold y cols., 1994; Gossman y cols., 1995; De la Torre y cols., 1996).

2.10.10. Virus elevador de la enzima Lactato deshidrogenasa. Es un virus de ARN de simple cadena de la familia *Togaviridae*. Existen múltiples cepas. Los ratones y los cultivos celulares son los únicos hospederos del virus. Es contaminante de tumores transplantables, de inóculos de otros agentes infecciosos pasados de forma seriada por ratón (Nicklas y cols., 1993; Percy y cols., 1993; Ohnishi y cols., 1995). Los síntomas clínicos están restringidos a síntomas neurológicos en animales

inmunosuprimidos. Este virus afecta varias funciones del organismo tales como: funcionamiento de los macrófagos, deprime la inmunidad celular y humoral y aumenta la síntesis de factores de crecimiento tumoral.

2.10.11. Virus de la leucemia murina. Es un virus de ARN de simple cadena de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Oncovirinae*, género tipo C (Lieber y Tobaró, 1975; Patience y cols., 1998). El genoma es un dímero de dos ARN de simple cadena de sentido positivo. Se han reconocido numerosas cepas. Las cepas son generalmente clasificadas de acuerdo al tipo del hospedero (infectividad) para tejidos o cultivos celulares. El tipo está determinado por el producto del gen de la envoltura, una glicoproteína de 70 kDa. La variante ecotrópica se replica sólo en ratones, y su replicación en diferentes líneas de ratón depende del locus Fv-1. La variante xenotrópica crece sólo en células no murinas, ejemplo conejos, humanas, etc. El hospedero natural es el *Mus musculus*. Existen dos fases en el ciclo de “vida” de los *Oncovirus* tipo C. Una fase donde el genoma está integrado en el genoma de las células hospedera, transmitiéndose así hacia las células hijas. La segunda fase es cuando el ARN generado a partir del ADN empacado en los viriones extracelulares pasa a otras células del hospedero, lugar donde se retrotranscribe y se integra en el genoma (Bishop y Varmus, 1975; Lilly y Mayer, 1980).

Sistema Nervioso Central.

2.10.12. Virus de la Encefalomiелitis murina de Theiler. Es un virus de ARN de simple cadena de la familia *Picornaviridae*. Es el modelo de poliomiелitis y esclerosis múltiple, ya que induce demielinización (Skea y cols., 1991). Existen múltiples cepas, las cuales han sido clasificadas según su virulencia. Debido a que el virus infecta la mucosa intestinal la transmisión es primariamente vía fecal-oral. Además, la transmisión transplacentaria ha sido también documentada y las líneas celulares de ratones y ratas pueden estar contaminadas con este agente viral. Generalmente, no son observados síntomas clínicos pero en estado de viremia la infección puede pasar desde los intestinos hacia otros tejidos, incluyendo el bazo, hígado y sistema nervioso central ocasionando varios síntomas como parálisis unilateral y/o bilateral, necrosis, poliomiелitis, meningitis, microgliosis, perivascularitis y neuronofagia (Percy y cols., 1993).

Sistemas Múltiples.

2.10.13. Virus hantaan. Son virus de ARN de simple cadena pertenecientes a la familia *Bunyaviridae*, género *Hantavirus*. Este nuevo género está basado en la morfología, genética, antigenicidad y similitudes físico-químicas (McCormick y cols., 1982; White y cols., 1982). Colectivamente ellos han sido agrupados como los virus causantes de la fiebre hemorrágica con síndrome renal. Se han descrito varias cepas dentro del género, todas a partir de humanos o ratas asociadas con infecciones en diferentes países. Los hospederos naturales de estos virus parecen ser pequeños mamíferos y principalmente roedores. Las ratas de laboratorio naturalmente infectadas han sido la causa de infecciones en el personal de laboratorio (Japón 1979, Bélgica 1979 y 1983, Reino Unido 1984 y Francia 1984). Los animales hospederos no

muestran síntomas de infección pero el virus aparece en sus pulmones a los 10 días después del contagio y posteriormente en la orina y la saliva. La forma principal de transmisión es vía tracto respiratorio, aerosoles, orina, heces y saliva.

2.10.14. Poliomavirus. Es un virus de poca significación como agente infeccioso natural. Su mayor importancia se debe a su amplio uso como modelo experimental para estudios de carcinogénesis *in vivo* (Dawe y cols., 1987; Freund y cols., 1992; Lukacher y cols., 1993). Es un virus de ADN de doble cadena y pertenece a la familia *Papovaviridae*. Puede ser propagado en cultivo primario de embriones o riñón de ratón, y en fibroblastos de ratones 3T3 y 3T6. El *Mus musculus* sirve como hospedero natural de este virus (Rowe, 1961). El virus es altamente contagioso y sus vías de transmisión son: la orina, las heces y la saliva, en las cuales puede permanecer por largos períodos de tiempo. También puede ser transmitido por vía nasal. El tracto respiratorio es aceptado como el tracto normal de infección e induce tumores pleomórficos en las glándulas salivares. También suelen producir sarcomas y carcinomas en riñones y en las glándulas mamarias y adrenales. El control de este virus no es un problema, sin embargo, una vez establecida la infección se deben tomar fuertes medidas de restricción porque es muy contagioso.

2.10.15. Adenovirus. Es un virus de ADN de doble cadena de la familia *Adenoviridae*. Se han informado dos tipos de cepas Mad-1 y Mad-2 (Hamelin y Lussier, 1998). La infección de ratones es poco frecuente. La transmisión de ambas cepas ocurre por contacto directo. La variante Mad-1 tiene una distribución sistémica y puede aparecer en la orina por dos años (van der Veen y Mes, 1973). En el caso de infecciones en ratones de laboratorio afecta el tropismo del sistema nervioso central y causa enfermedades fatales en adultos C57B pero no en adultos BALB/c (Guida y cols., 1995). En contraste con Mad-1, Mad-2 no tiene un patrón sistémico. Su infección se localiza en el intestino y es asintomática y los cambios patológicos están limitados a inclusiones intranucleares de células del intestino delgado.

2.10.16. Virus ectromelia. Es un virus de ADN de doble cadena de la familia *Poxviridae*. Es el agente causal de la viruela del ratón (National Research Council, 1991). Reportes de infección natural en animales de laboratorio en Europa es algo común. En los Estados Unidos se han informado varias infecciones a partir de animales importados desde Europa. La transmisión es fundamentalmente vía contacto directo. La resistencia a este agente varía entre líneas de ratones y es dependiente de múltiples genes (Brownstein y cols., 1991; O'Neill, 1991). Posterior a su entrada a través de la piel, se replica en la piel y en los linfonodos causando una viremia que se expande rápidamente al hígado y al bazo. La replicación masiva en los macrófagos de estos órganos provoca una segunda gran viremia causando necrosis del bazo, hígado, linfonodos y timo, erosión de la mucosa intestinal e inclusiones citoplasmáticas en la piel y el hígado.

2.10.17. Virus diminuto de ratón. Es un virus de ADN de simple cadena altamente contagioso y pertenece a la familia *Parvoviridae*. La forma principal de transmisión es a través de las heces y la orina pero también puede ser transmitido por exposición a las secreciones nasales. Se encuentra con frecuencia

en tumores transplantables y en reservas de virus de leucemia murina. Se han descrito múltiples cepas, las más estudiadas son la p y la I (Brownstein y cols., 1991; Brownstein y cols., 1992). Estas cepas son inmunosupresoras, ya que crecen de forma lítica en linfocitos T y causan daños multiórganos si la infección ocurre en período fetal o al nacer. Este virus puede interferir con todas las investigaciones que involucren el sistema inmune, ya que lisan las células T, altera la actividad de las células B y suprimen el crecimiento de tumores ascíticos (National Research Council, 1991).

2.10.18. Virus de la hepatitis murina. Es el patógeno más importante de los ratones de laboratorio. Es un virus de ARN de simple cadena y pertenece a la familia *Coronaviridae*. Es muy contagioso y su transmisión es vía aerosoles, contactos directos, tumores transplantables y transplacentaria (Schodel y cols., 1989; Homberger y Thomann, 1994;). Aproximadamente 25 cepas han sido aisladas. La presencia o ausencia de la proteína receptora del virus, una glicoproteína de la familia del antígeno carcinoembrionario y de la superfamilia de las Ig puede determinar la replicación del virus. Las lesiones se presentan entre los 7 y 10 días después de la infección y son cepa dependiente (Lavi y cols., 1996). Entre las más comunes tenemos: necrosis multifocal en varios órganos (hígado, pulmones, bazo, intestino y nódulos linfáticos), formación de células gigantes asociadas a la fragmentación y rearrreglo del aparato de Golgi.

2.11. Validación virológica de los métodos de obtención de biológicos a partir de fuentes biológicas.

La OMS y otras entidades regulatorias, han emitido regulaciones destinadas a homogenizar los procedimientos para los estudios de validación de los métodos de purificación de biológicos en cuanto a la remoción y/o inactivación de agentes virales. En sus guías para este tipo de producción aparece la siguiente clasificación (O. M. S., 1992; E. M. E. A, 1996; I. C. H., 1997).

Virus del Grupo I. Son aquellos virus murinos que han demostrado capacidad de infectar primates, incluyendo el hombre (virus hantaan, virus de la coriomeningitis linfocítica, reovirus 3, rotavirus de rata, virus sendai). La presencia de los mismos invalida tanto a los animales como a las líneas celulares hospederas para la producción de AcMs o cualquier producto para uso humano.

Virus del Grupo II. Son aquellos virus murinos que no han demostrado capacidad de infectar primates, aunque para algunos de sus representantes sí existen evidencias de infección de células humanas* o de primates (virus ectromelia*, virus elevador de la enzima lactato deshidrogenada, virus diminuto de ratón, adenovirus de ratón, citomegalovirus de ratón, virus de la encefalomiелitis murina de Theiler, virus de la hepatitis de ratón, rotavirus de ratón, virus de la neumonía murina, polyomavirus, *Retrovirus*, virus tímico de ratón).

La presencia de los mismos no invalida el uso de los animales, ni de las líneas celulares para la producción de AcM o de cualquier producto para uso humano. Sólo que en estos casos, deberá implementarse un riguroso sistema de control, así como, deberán realizarse los estudios de validación del método de purificación para medir su capacidad de remoción y/o inactivación de dichos agentes virales.

El conocimiento de la eficiencia con que los métodos de purificación de biológicos remueven virus modelos es fundamental para decidir el método de purificación a utilizar (White y cols., 1991).

Es teórica y prácticamente imposible monitorear la presencia de los agentes biológicos desconocidos. Tales agentes inclusive pudieran tener un efecto biológico crítico para la salud del hombre. Los ensayos específicos para determinar virus no pueden ser diseñados para demostrar la presencia de estos agentes o la partición de éstos durante el método de purificación de una proteína para fines farmacéuticos, ya que en ocasiones las características de la muestra en un paso dado no permiten el crecimiento de la línea celular empleada en la titulación del efecto citopatogénico. Por estas razones se deben tomar un número de medidas preventivas adicionales al diseño de un método de purificación robusto (Berthold y cols., 1992).

- ☑ En aras de llegar a un estimado de la necesaria eficacia del método de purificación para eliminar virus, debe conocerse primeramente el origen y la cantidad de virus presente en el sistema dado.
- ☑ Los virus modelos deben ser lo más cercano posible, en características o propiedades, a los virus que se sospechan estén en el sistema de producción del biológico.
- ☑ Muchos investigadores emplean cepas de laboratorio que suelen ser producidas y ensayadas convenientemente. Sin embargo, éstas a su vez tienen propiedades diferentes a los virus naturales. El investigador debe justificar la selección de los virus en correspondencia con los objetivos del trabajo (White y cols., 1991).
- ☑ Los virus modelos deben además alcanzar altos títulos en cultivo para poder demostrar altos niveles de remoción e inactivación durante la purificación de la molécula de interés.

Los virus comúnmente usados, así como sus propiedades físico-químicas y criterios de selección, han sido descritos por varios autores (Berthold y cols., 1992; Darling y Spaltro, 1996).

2.12. Clasificación de los virus para los estudios de validación.

Ante la gran heterogeneidad viral, unos de los elementos más polémicos en este tipo de estudio es la selección de los virus a estudiar. Para facilitar el trabajo de selección así como homogenizar los criterios, los virus empleados en este tipo de estudio se clasifican en dos grandes grupos (Darling y Spaltro, 1996).

Virus relevantes.

Son los virus que han sido identificados en la fuente biológica. Ellos ofrecen la ventaja de saber exactamente cual puede ser su comportamiento dentro del sistema, pero en ocasiones reúnen características muy particulares que no permiten extrapolar sus resultados a otros virus (ejemplos, *Retrovirus* tipo A intracisternales o *Retrovirus* tipo C, virus Epstein-Barr, reovirus 3, virus diminuto de ratón y el VIH). Cuando no existen virus relevantes o cuando no alcancen los títulos necesarios en cultivo y se quiera demostrar también la robustez del método de purificación, se propone entonces utilizar virus modelos.

Virus modelos.

Son virus que comparten propiedades físico-químicas con los virus identificados o sospechados. Su selección viene dada por su resistencia ante los agentes físico-químicos. Los resultados de estos estudios aportan información sobre la capacidad del método de purificación para remover virus en general. Para resumir la información sobre que virus utilizar, se menciona a continuación los virus modelos más empleados en los diversos estudios de remoción e inactivación viral (virus de la estomatitis vesicular, virus de la parainfluenza, virus de la leucemia murina, virus de la seudorabia, poliovirus humano 1, virus de encefalomiocarditis, virus SV40, parvovirus canino, parvovirus porcino, virus de la diarrea bovina, virus de la hepatitis A, adenovirus, herpesvirus felino, herpesvirus simple, herpesvirus bovino) (Harris y cols., 1974; Berthold y cols., 1992; O'Neil y Balkovic, 1993; Cameron y cols., 1997).

2.13. Características de los virus modelos empleados.

Virus sendai. Es un virus envuelto, esférico con un diámetro de 150 a 200 nm y con una nucleocápsida helicoidal de 12 a 17 nm de diámetro. Su nucleocápsida está cubierta de una bicapa lipídica con proteínas asociadas. Cada partícula viral contiene un genoma de ARN, no segmentado y de simple cadena con las nucleoproteínas P y L. Posee poca resistencia ante los agentes físico-químicos, especialmente a la luz ultravioleta (Nolan, 1997) (Tabla 1).

VIH-1. Son partículas infecciosas de 100-200 nm constituidas por un genoma de ARN empacado en una cápsida proteica rodeada por una bicapa lipídica. La envoltura lipídica contiene cadenas polipeptídicas que actúan como proteínas que permiten la unión con receptores de membrana de las células hospederas. Adicionalmente el VIH-1 contiene la enzima transcriptasa inversa, encargada de la síntesis de la molécula de ADN complementaria usando como molde el ARN viral. Posee poca resistencia ante los agentes físico-químicos (Sekura, 1990) (Tabla 1).

VHS-1. Es un virus envuelto de ADN de doble cadena, con un tamaño que oscila entre los 100-200 nm, pertenece a la familia *Herpesviridae*, género *Alfaherpesvirinae* y manifiesta una resistencia baja ante los solventes orgánicos y agentes químico-físicos (Nolan, 1997). Este virus posee 4 componentes: un núcleo denso en electrones que contiene el ADN viral; una cápsida icosaédrica; una capa de proteínas designada como tegumento que rodea la cápsida de 162 cápsomeros y la envoltura viral. La envoltura a su vez la componen 10 proteínas glicosidadas y varias no glicosidadas, lípidos y poliaminas. El ADN contiene al menos 152 kpb y la variabilidad en el tamaño se debe a las reiteraciones en las secuencias internas y terminales. Estudios actuales indican que el ADN de este virus codifica 84 polipéptidos diferentes (Field, 2001) (Tabla 1).

PVH-2. Es un virus de ARN de simple cadena y polaridad positiva, no envueltos y de resistencia media-alta ante los agentes físico-químicos. Pertenece a la familia *Picornaviridae* y posee un tamaño entre 20 y 30 nm, lo cual lo hace un virus de mucho interés para los estudios de validación, ya que puede tener una interacción con las matrices cromatográficas completamente diferente al resto de los virus de gran tamaño

y envueltos. Como su género es *Enterovirinae* se replica en el tracto digestivo, por lo cual puede esperarse que posea una alta resistencia a valores muy bajos de pH (Field, 2001; Blomqvist y cols., 2003) (Tabla 1).

PVC. Representa un modelo viral de mucho interés por su alta resistencia a los agentes físico-químicos y por sus características estructurales. Son partículas icosaédricas de 18-26 nm de diámetro compuestas por un 50% de proteínas y el otro 50% el ADN. Posee tres proteínas en la cápsida donde VP-1 y VP-3 se derivan de la acción de la proteasa viral sobre VP-2. Este tipo de parvovirus en particular posee 60 subunidades proteicas en las que predomina VP-1. La cápsida y la carencia de envoltura viral son las responsables de la elevada resistencia ante los agentes físicos y químicos (Nolan, 1997). Es capaz de sobrevivir en suelos contaminados con materia fecal por más de 6 meses. La mayoría de los detergentes y desinfectantes no pueden eliminarlo, sólo el cloro y 0.1 M NaOH a 60°C han demostrado ser eficaces contra este virus (Cameron y cols., 1997) (Tabla 1).

Tabla 1. Virus murinos representados por cada uno de los modelos virales empleados.

Virus Modelos	Propiedades	Virus murinos
VHS-1	ADN, desnudo	virus tímico, virus ectromelia
PVC	ADN, envuelto	parvovirus tipo 1, virus diminuto de ratón, adenovirus, poliomavirus
sendai y VIH-1	ARN, envuelto	virus neumonía de ratón, virus sendai, virus de tumores de mama de ratón, virus de leucemia murina, virus hantaan, virus de la coriomeningitis linfocítica
PVH-2	ARN, desnudo	rotavirus de ratón, reovirus tipo 3, virus elevador de la Lactato deshidrogenasa, virus de la encefalo-mielitis murina de Theiler

2.14. Procedimiento de validación virológica.

El otro aspecto muy importante es el procedimiento de validación viral. Este consiste en adicionar cantidades deliberadas de virus al material de entrada de los diversos pasos del método de purificación para medir la capacidad de remoción (CR) y de inactivación viral de dichos pasos de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$10^{CR} = \frac{(\text{Virus aplicado} \times \text{Volumen})}{(\text{Virus detectado} \times \text{Volumen})}$$

Ejemplo,

$$10^{CR} = \frac{(10^7 \text{ Unidades infecciosas/mL} \times 10 \text{ mL})}{(10^2 \text{ Unidades infecciosas/mL} \times 20 \text{ mL})}$$

$$10^{CR} = 10^{4.7}, \text{ Capacidad de Remoción} = 4.7 \text{ Logs}$$

La capacidad de eliminación total es calculada como la suma de las capacidades individuales de remoción e inactivación viral. Debe tenerse cuidado de no sobrestimar el factor de eliminación total de los pasos que utilicen el mismo principio de remoción o de inactivación (White y cols., 1991). Es también muy

importante para la determinación de la capacidad de remoción o inactivación, asegurarse de la no ocurrencia de interferencia o citotoxicidad en los ensayos de determinación de virus, ya que puede afectarse la interpretación de los mismos. En tal sentido, puede ocurrir que la muestra interfiera con la capacidad del virus de infectar la línea celular empleada para medir su efecto citopático (interferencia) o que las condiciones de las muestras pueden impedir el crecimiento celular aún en ausencia del virus en estudio (citotoxicidad). Ambos aspectos conllevan a una estimación errónea de los resultados de los experimentos de remoción o de inactivación viral. Por tal razón, un buen diseño debe contemplar una evaluación profunda de cada situación del método de purificación para despejar cualquier elemento de toxicidad o interferencia previamente.

2.14.1. Desescalado del método de purificación para los experimentos de remoción viral.

Otro aspecto crítico en estos experimentos es el desescalado del método de purificación. La validez de este debe ser demostrada antes de comenzar los experimentos de desafío con virus. Para lo cual el nivel de purificación de la versión desescalada del método de purificación debe ser lo más cercano posible a la escala de manufactura. En ocasiones surgen desviaciones de los parámetros que no pueden ser resueltas, pero estas pueden discutirse si no afectan la calidad del producto y la interpretación de los resultados.

Los parámetros usualmente considerados en el desescalado son: tipos de equipos cromatográficos, la altura y diámetro de la columna, el flujo lineal, el T_r , la concentración de proteínas, el pH y el contenido de sales entre otros. Cuando se está diseñando un método cromatográfico para que refleje lo que ocurre en la escala real, debe tenerse en cuenta que el método incluye, la columna cromatográfica, sistemas auxiliares y detectores. Pequeños cambios en el diámetro y el largo de las mangueras pueden ocasionar grandes pérdidas o ganancias de la resolución del sistema. Las distancias de los sistemas de transporte (mangueras) deben ser las mismas entre ambas escalas. Otro elemento relevante es el material con que están construidas, ya que el grado de hidratación de las mismas puede favorecer interacciones diferentes entre ambas escalas de trabajo (Berglöf, 1993; Seely, 1994; Sofer, 1996).

El virus debe adicionarse en una cantidad que no afecte la composición del material de partida, típicamente el volumen máximo aceptado es el 10% del volumen de la muestra. Volúmenes mayores pueden cambiar de forma importante la concentración de proteínas y las interacciones entre ellas.

Una remoción completa de las partículas virales sólo se logra con el diseño de un método de purificación robusto. Básicamente los sistemas de purificación de proteínas se componen de una combinación de dos técnicas de purificación de proteínas: pasos de filtración por membrana basados en la selección del tamaño del poro de las mismas y las técnicas cromatográficas basadas en propiedades físicas y químicas (Darling y Spaltro, 1996; E. M. E. A., 1996). Por ejemplo: para purificar los AcMs, las técnicas más usadas son la cromatografía de afinidad en cama empacada o expandida, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y filtración por membrana (Nanofiltración) o cápsula entre otras (Jiskoot y cols., 1989; Gagnon, 1996; Lem y cols., 1998; Wilchek y Miron, 1999). Es también muy habitual el uso de métodos de precipitación para concentrar el producto antes de comenzar la purificación

cromatográfica, aunque este procedimiento tiende a desaparecer con la introducción de la cromatografía de cama expandida, diseñada para asimilar todo el volumen de ascitis o sobrenadante de cultivo celular (Batt y cols., 1995; Fahrner y cols., 1999).

En general ninguno de estos pasos por sí sólo constituye un proceso robusto de remoción de virus aunque sí para alcanzar la pureza proteica deseada. Es por esto que los métodos se basan en la combinación de varios pasos de purificación. El número de pasos a retar depende del grado de contaminación de la fuente biológica inicial (hibridoma, suero fetal, ratones, fluido ascítico) y del tipo de producto. Por ejemplo, para métodos de purificación donde no se demuestre presencia de virus en el material inicial, debe demostrarse al menos 4 Logs (virus envueltos) y 6 Logs (virus no envueltos) de eliminación (Darling y Spaltro, 1996; Brian y cols., 1997; Lugo, 1998) mientras que para moléculas obtenidas a partir de fuentes biológicas derivadas de humanos (sangre, órganos), independientemente del nivel de contaminación inicial debe diseñarse un método de purificación que contenga al menos dos pasos robustos 4 Logs para virus envueltos (incluyendo VIH y VHB) y una eliminación de 6 Logs de virus desnudos, pero que al menos uno de los pasos sea robusto (≥ 4 Logs) (Darling y Spaltro, 1996). Otros autores plantean que el nivel de remoción de virus de un método de purificación debe ser sólo entre 3-5 Logs superior al nivel de contaminación detectado en la fuente biológica con independencia del tipo de virus (Sekura, 1991).

2.14.2. Aspectos a considerar en los métodos de inactivación.

Siempre que sea posible debe demostrarse si la eliminación de los virus ocurre por remoción o inactivación. Esto se hace estableciendo las cinéticas de pérdida de infectividad. Es más fácil estudiar los procesos de inactivación que los de remoción, pues no conllevan el proceso de desescalado. Sin embargo, hay que tener en cuenta otros factores para demostrar con certeza la inactivación viral. Es muy importante el uso de controles de virus que demuestren la pérdida de la infectividad del virus y la no existencia de interferencia del entorno en el cual se encuentra el virus estudiado. Los procesos de inactivación se caracterizan por una rápida inactivación, seguida de una fase de inactivación lenta, por lo cual es posible, que los virus que escapan de la inactivación rápida sean los más resistentes a los pasos posteriores y por lo tanto el factor de inactivación puede no ser necesariamente la suma de las capacidades individuales de inactivación. En la literatura aparecen varias formas de inactivar virus. Entre las más empleadas están: calentamiento a 56°C durante 30 min (Erickson y cols., 1991), incubación en NaOH desde 0.1 hasta 1 M (Cameron y cols., 1997), incubación con beta-propiolactona y formalina (Jiang y cols., 1986), calentamiento a 80°C de productos previamente congelados (Helderbrandt y cols., 1985), mezcla de detergentes y radiaciones ultravioleta (Mannuci y Colombo, 1988) y pasteurización (incubación a 60°C durante 10 hrs). A favor de ellos está el potente efecto inactivador de virus, pero también de la proteína de interés por lo que estudios previos de demostración de la estabilidad de la molécula deseada se imponen antes de evaluar la capacidad de inactivación viral de estos agentes en el sistema estudiado.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Aspectos Generales.

3.1.1. Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B.

El AgsVHBr fue expresado en *Pichia pastoris* (Pentón y cols., 1994) y suministrado por el departamento de producción de la vacuna contra la Hepatitis B del CIGB.

3.1.2. Anticuerpo monoclonal CB.Hep-1.

El AcM CB.Hep-1 es una IgG-2b de ratón de cadena ligera tipo Kappa secretada por el hibridoma CB.Hep-1 (48/1/5/4) específico para el determinante “a” del AgsVHB (Fontirrochi y cols., 1993).

3.1.3. Medios de cultivo para cada línea celular e inóculo viral.

3.1.3.1. El hibridoma CB.Hep-1 se cultivó en frascos agitados de 1L partiendo de una concentración celular de 3×10^5 células/mL. El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 (Invitrogen, USA)/8% de SFB (Hyclone, USA) ([Anexo 3](#))/L-glutamina 2 mM/piruvato de sodio 1 mM/bicarbonato de sodio 17 mM y 10 µg/mL de gentamicina. Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂, el medio de cultivo se renovó cada 48 hrs y la viabilidad celular se determinó con tripán azul (Patterson y cols., 1973).

3.1.3.2. La cepa del VIH-1 IIIB ([Anexo 4](#)) se propagó en la línea celular MT4 ([Anexo 5](#)), cultivada en medio RPMI 1640 (Invitrogen, USA) suplementado con 2% de SFB (Hyclone, USA)/L-glutamina 2 mM y 40 µg/mL de gentamicina e incubadas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

3.1.3.3. La cepas del VHS-1 ([Anexo 6](#)) y del PVH-2 ([Anexo 7](#)) se propagaron en la línea celular Vero ([Anexo 5](#)), cultivada en medio MEM (Invitrogen, USA) suplementado con 2% de SFB (Hyclone, USA)/L-glutamina 2 mM y 40 µg/mL de gentamicina e incubadas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

3.1.3.4. La cepa del PVC ([Anexo 8](#)) se propagó en la línea celular LFBC ([Anexo 5](#)), cultivada en medio MEM (Invitrogen, USA) suplementado con 2% de SFB (Hyclone, USA)/L-glutamina 2 mM y 40 µg/mL gentamicina e incubadas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

3.1.3.5. La cepa del virus sendai se tituló en huevos embrionados de pollos SPF y se entregó lista para su uso por el Centro Nacional de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

3.1.4. Titulación de los inóculos virales

Las cepas virales (VIH-1, VHS-1, PVH-2 y PVC) se inocularon en sus respectivas líneas celulares y se cosecharon el día del máximo efecto citopático mediante tres ciclos de congelación-descongelación y centrifugación, para proceder a la filtración del sobrenadante de cada cultivo a través de membranas de acetatos de celulosa de 0.45 µm. Los inóculos virales se titularon por el método de microtitulación en placas de 96 pozos. Se inocularon 10×10^3 células/pozo con 4 réplicas de diluciones seriadas de base 2 y resuspendidas en los medios de cultivo descritos en el [acápite 3.1.3](#). Las lecturas se efectuaron por visualización de efecto citopático y las dosis infecciosas para cada cultivo (DICC₅₀/mL) se calcularon por

el método descrito por (Reed y Muench, 1938; Johnson y Byngton, 1979). Los inóculos virales se almacenaron a -85°C hasta el desarrollo de los experimentos de validación.

Las muestras de los experimentos de validación se titularon por el método descrito anteriormente, la infectividad se midió también por efecto citopático y los cálculos se realizaron también por el método de Reed y Muench (1938). Este ensayo de infectividad presenta un límite de sensibilidad de $10^{1.3}$ DICC₅₀/mL. Cada réplica de los experimentos de validación se tituló con 4 determinaciones y en diluciones seriadas de base 2. El inóculo del virus sendai se tituló en huevos embrionados de pollos. Para el cálculo de la DIE₅₀/mL también se realizaron diluciones seriadas de las muestras de base 2 y tres réplicas por muestra. El cálculo de la DICC₅₀/mL y la DIE₅₀/mL se realizó a partir de los valores acumulados, asumiendo que la proporción de los pozos o embriones con efecto citopático varió linealmente con el Log₁₀ de la dilución. Los valores interpolados se determinaron según la fórmula.

$$D_p = \frac{(A > 50\%) - 50\%}{(A > 50\% - B < 50\%)}$$

(A). Porcentaje de pozos con efecto citopático en la dilución más cercana pero superior al 50% y (B) es el porcentaje de pozos con efecto citopático en la dilución más cercana pero inferior al 50%.

3.2. Producción de líquido ascítico rico en el AcM CB.Hep-1.

Para la generación de ascitis se utilizaron 2000 ratones BALB/c (SPF) de 22-24 g de peso por inóculo (Anexo 9). Los animales se mantuvieron en áreas controladas a 22°C , 50% de humedad y bajos niveles de amoníaco. Se trataron 7 días antes del inóculo con 0.5 mL/animal de petrolato líquido por vía intraperitoneal. En todos los casos la cantidad de células inoculadas fue 1 millón/animal en medio RPMI 1640. La ascitis se obtuvo por punción abdominal, se centrifugó a $7000\times g$ durante 5 min y se filtró por membranas de $0.22\ \mu\text{m}$.

3.3. Determinación de contaminación viral en las fuentes biológicas.

3.3.1. Hibridoma.

3.3.1.1. Detección de partículas retrovirales por Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las células se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en solución de cacodilato 100 mM durante 1 h a 4°C , y se fijaron nuevamente en tetróxido de osmio al 1%, por 1h a 4°C . Se lavaron otra vez con cacodilato 100 mM y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70% y 100%) durante 10 min a 4°C cada vez, para incluirlas en la resina Spurr según el procedimiento descrito por Spurr, 1969. Las secciones ultrafinas ($400\text{-}500\text{\AA}$) se realizaron con un ultramicrotomo (NOVA, LKB), se colocaron sobre rejillas de cobre y níquel (400 mesh) y se contrastaron con acetato de uranil sobresaturado en metanol y citrato de plomo. Posteriormente se examinaron con un microscopio JEOL JEM 2000 EX (JEOL, Japón) y las microfotografías, 200 células escogidas de forma aleatoria, se analizaron por el programa DIGIPAT. La magnificación empleada fue 15000.

3.3.1.2. Ensayo de foco ampliado S+L- para caracterización Retrovirus xenotrópicos.

En este ensayo 0.5 mL del sobrenadante del hibridoma CB.Hep-1 diluido en 0.5 mL del medio de cultivo, RPMI 1640 (Invitrogen, USA)/10% de SFB (Hyclone, USA)/10 µg/mL de polibreno, se incubaron por duplicado en 1 mL de este medio de cultivo que contiene las células MiCl₁ (ATCC CRL 64.1) en discos de 5 cm² por 2 hrs a 37°C. Después de este tiempo se aplicaron 5 mL de medio de cultivo a cada disco y se dejaron 10 días a 37°C. Posteriormente se realizó la observación a en un microcopio óptico para ver la formación de focos, células redondeada agrupadas, por encima del nivel de la monocapa celular. El virus control positivo (virus de la leucemia felina donado por la Universidad de Glasgow) se diluyó en forma seriada para estimar el título viral con respecto al valor de referencia. El ensayo se consideró válido cuando el número de focos del control positivo no difirió en 0.5 Log₁₀ del título viral especificado como referencia. La sensibilidad teórica del ensayo se basó en la distribución de Poisson para un 98% de confianza, lo que significa 4 UFF/mL (Fischinger y cols., 1974; Q-One Biotech Protocol 37014).

3.3.1.3. Ensayo XC para caracterización Retrovirus ecotrópicos.

En este ensayo, 0.5 mL del sobrenadante del hibridoma CB.Hep-1 diluido en 0.5 mL del medio de cultivo, MEM (Invitrogen, USA)/1.5 g/L de bicarbonato de sodio/ mezcla de aminoácidos no esenciales 0.1 mM/piruvato de sodio 1 mM/10% FCS (Hyclone, USA), que contiene 10 µg/mL de polibreno se incubaron por duplicado en 1 mL de medio de cultivo que contiene las células SC-1 (ATCC CRL 1404) en discos de 5 cm² por 2 hrs a 37°C. A continuación se aplicaron 5 mL del medio de cultivo a cada disco y se dejaron 7 días a 37°C. Estas células SC-1 se irradiaron por 60 segundos con luz UV y se le adicionaron las células XC (ATCC CRL 165) permitiendo también la renovación del medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron a 37°C hasta la formación de placas en el control positivo (4-5 días). Luego se tiñeron con violeta cristal para la observación de espacios en el cultivo de las células XC por la formación de “células” multinucleadas. El virus E-MLV (cepa mov-3) y el medio de cultivo se emplearon como controles positivos y negativos respectivamente. El ensayo fue considerado válido cuando el título del control positivo no difirió en 0.5Log₁₀ del título viral especificado como referencia. La sensibilidad del ensayo se basó en la distribución de Poisson para un 98% de confianza, lo que significa 4 UFP/mL (Fischinger y cols., 1974; Rowe y cols., 1970; Q-One Biotech Protocol 37015).

3.3.1.4. Prueba del MAP para determinar virus murinos en el hibridoma CB.Hep-1.

Ratones NMRI (SPF) se inocularon con el sobrenadante del hibridoma CB.Hep-1 por vía intraperitoneal, subcutánea, endovenosa, intracraneal e intranasal. Las técnicas serológicas empleadas en la detección de virus fueron ELISA, Inmunofluorescencia e inhibición de la hemoaglutinación. El sobrenadante se diluyó 1:10 en medio MEM (Invitrogen, USA) y cada animal se inyectó con 0.05 mL (intranasal), 0.1 mL (intracraneal) y 0.5 mL para el resto de las vías de inoculación. Los controles negativos fueron el medio de cultivo MEM (I) y el medio MEM ajustado a 3 mL con la solución salina de Hank (II). Cinco ratones recibieron el control negativo I, mientras que otros 5 ratones recibieron el control negativo II. El ensayo

se rechazó cuando al menos 1 animal del grupo I murió en el plazo de 14 días o cuando al menos 1 animal del grupo II fue eliminado del ensayo por alguna causa desconocida. Se emplearon como control negativo también, el suero de 3 ratones no inoculados con las muestras y el suero de tres ratones extraído antes de comenzar la inoculación de las muestras en estudio. Los controles positivos fueron sueros hiperinmunes contra cada virus murino. Entre 3 y 14 días posteriores a la inoculación se tomaron muestras de los ratones para la determinación de la enzima Lactato deshidrogenasa, utilizando como control positivo una mezcla de sueros de ratón positivos a este virus. El resto de las muestras se analizaron 28 días después de la inoculación mediante las técnicas serológicas mencionados. Se consideró la muestra contaminada con virus cuando se detectaron anticuerpos contra los virus evaluados a diferencia de los ratones no inoculados o los inoculados con medio de cultivo ([Anexo 10](#)).

3.3.1.5. Ensayo *in vitro* para la determinación de virus en el hibridoma CB.Hep-1.

El sobrenadante inoculado en las monocapas celulares fue una mezcla (v/v) del sobrenadante de la lisis del hibridoma CB.Hep-1, obtenido mediante 3 ciclos congelación-descongelación y centrifugación, y del sobrenadante de cultivo del hibridoma. Los cultivos de las líneas celulares se prepararon por duplicado en frascos de 80 cm², se inocularon con 3 mL de la mezcla del sobrenadante y se mantuvieron a 36°C por 14 días. Las líneas celulares estudiadas fueron (células embrionarias humanas (HEL), células de riñón de monos verdes africanos (TAGMK), células de rhabdomyosarcoma humano (RD), células de pulmón de Visión (MVLu), células de tumor cervical de humanos (Hela Ohio), células de hígados de ratón (NCTC 1469), células de tejidos conectivos de ratón (L929) y células de embriones de ratón (ME)). Debido a que la infección *in vitro* de células no induce necesariamente cambios morfológicos, se realizó un ensayo de hemoadsorción de eritrocitos de cobayos a 4°C al final del período de incubación. También, se realizó un pase a ciegas por 14 días en las mismas líneas celulares. El medio RPMI 1640 (Invitrogen, USA) se utilizó como control negativo, mientras que el poliovirus humano tipo 1, el citomegalovirus, el VHS-1 y el virus de la influenza tipo A se emplearon como controles positivos ([Anexo 11](#)).

3.3.1.6. Ensayos *in vivo* en huevos embrionados de pollos para la detección de virus en el hibridoma CB.Hep-1.

Esta determinación se realizó mediante la inoculación de 200 µL de sobrenadante del hibridoma CB.Hep-1 en el fluido alantoideo y el vitelo de 10 huevos embrionados. La viabilidad de los embriones se chequeó los primeros 3 días post-inoculación. Diez días después, el fluido alantoideo se colectó para analizar la presencia de virus adventicios mediante los ensayos de hemoaglutinación de eritrocitos humanos, de pollo y de coballos. El ensayo se consideró válido si 7/10 embriones llegaron a los 10 días sin síntomas de infección viral y cuando 4/5 embriones del control positivo demostraron capacidad de hemoaglutinación y/o lesiones en la membrana corioalantoidea. La muestra se consideró positiva si el número de embriones muertos fue superior al del control negativo y además se evidenció actividad hemoaglutinante o lesiones en la membrana corioalantoidea. A todas las muestras con resultados negativos se le realizó un pase

adicional en embriones para comprobar la ausencia de virus. El virus de la influenza tipo A (cepa PR8) se empleó como control positivo, mientras que el RPMI 1640 se utilizó como control negativo ([Anexo 12](#)).

3.3.1.7. Ensayos *in vivo* en ratones y cobayos para la detección de virus en el hibridoma CB.Hep-1.

Los ratones adultos y los cobayos inoculados por vía intracerebral, intramuscular e intraperitoneal con el sobrenadante del hibridoma CB.Hep-1 se observaron durante 40 días. Durante este tiempo, se observó la evolución clínica de los animales y al final del mismo se practicó la eutanasia mediante dislocación cervical para el análisis patológico. Además, tres grupos de ratones lactantes se inocularon con este sobrenadante para monitorear el crecimiento y la aparición de patologías durante 45 días ([Anexo 13](#)).

3.3.2. Ensayo de serología para determinar virus en la colonia de ratones BALB/c.

Muestras de sangre extraídas a los ratones provenientes de cada unidad de cría se incubaron 1 h a 37°C y subsiguientemente 1 h a 4°C. Luego se centrifugaron a 2000xg durante 5 min y se diluyeron 1:5 en PBS 150 mM; pH 7.2. A continuación se inactivaron a 56°C por 30 min y se procedió a la detección de anticuerpos contra cada virus murino empleando las mismas técnica serológicas del [acápito 3.3.1.4](#). El número de ratones evaluados se determinó según Nicklas y colaboradores, (2002) ([Anexo 14](#)).

$$S = (\text{Log } 0.05) / (\text{Log } P) \times N$$

S: tamaño de la muestra; N: número de animales sanos; P: porciento de prevalencia de la enfermedad; Log 0.05: 95% de confianza.

3.3.3. Ensayos *in vivo* (MAP) e *in vitro* (células sensibles a replicación viral) para la detección de virus en el fluido ascítico.

3.3.3.1. MAP.

Este ensayo se realizó utilizando el mismo procedimiento empleado en el [acápito 3.3.1.4](#). La diferencia radicó en que en este ensayo se inoculó la ascitis generada con el hibridoma CB.Hep-1 ([Anexo 15](#)).

3.3.3.2. Determinación de virus adventicios en células sensibles a replicación viral.

Las suspensiones celulares ([Tabla 2](#)) se mantuvieron en 5 mL de medio de cultivo en frascos de 25 cm² por 24 hrs a 37°C. Posterior a este tiempo el medio de cultivo se renovó con 5 mL, a los cuales se le añadieron 5 mL de la ascitis (por triplicado). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y se observaron durante 14 días con el microscopio óptico para monitorear el desarrollo de efectos citopáticos. Al final del ensayo se realizó un ensayo de hemoaglutinación de eritrocitos de cobayos, monos Rhesus y pollos para comprobar también la presencia de virus (P. N.O-5090).

Tabla 2. Líneas celulares y cepas virales empleadas en la determinación de virus

Líneas Celulares	Medio de Cultivo	Cepas Virales
Vero (ATCC 81) células de riñón (mono Rhesus)	MEM/2% FCS	virus de la parainfluenza bovina tipo 3, cepa SF-4 (ATCC VR 281)
A9 (ATCC 1.4) células derivadas de la línea NCTC (L929) (ratón)	DMEM/2% FCS	sarampión, cepa Edmonton (ATCC VR 24)
MRC-5 (ATCC CCL 171) células diploides de pulmón (hombre)	MEM/2% FCS	virus diminuto de ratón (ATCC VR 1346)

3.4. Purificación en inmovilización del AcM CB.Hep-1.

3.4.1. Purificación del AcM CB.Hep-1.

La ascitis se filtró por membranas de 0.45 μm para eliminar proteínas coaguladas. Posteriormente se le añadió el mismo volumen de una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 100% de saturación y se incubó durante 3 hrs. Después se centrifugó a 4800xg durante 20 min a 4°C. El precipitado se lavó en una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% de saturación de un volumen equivalente al 30% del inicial. Este material se centrifugó bajo las mismas condiciones y el precipitado se resuspendió en PBS 150 mM; pH 8. Luego, se desalinizó empleando una columna BPG 200/750 empacada con 21 L de Sephadex G-25c (Amersham-Pharmacia, Suecia) equilibrada con PBS 150 mM; pH 8. La fracción colectada, se aplicó en una columna BPG 100/500 empacada con Protein A-Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia, Suecia) equilibrada con PBS 150 mM; pH 8 a un flujo lineal de 100 cm/h. La elución de contaminantes se realizó con ácido cítrico 100 mM; pH 5 y la elución del AcM CB.Hep-1 con ácido cítrico 100 mM; pH 3. Subsiguientemente, se realizó un cambio de tampón a Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6 en una columna BPG 200/75 empacada con 20 L de Sephadex G-25c (Amersham-Pharmacia, Suecia). El material obtenido se concentró por ultrafiltración (modelo DC-10, Amicon, USA) y se filtró por membranas de 0.22 μm .

3.4.2. Activación de la Sepharose CL-4B por el método del Bromuro de Cianógeno.

La activación de la Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia, Suecia) se realizó según el procedimiento modificado de Axen, Porath y Ernback (Hernández y cols., 2005).

3.4.3. Inmovilización del AcM CB.Hep-1.

El cambio de tampón de la preparación del AcM CB.Hep-1 se realizó en una columna empacada con 21 L de Sephadex G-25c (Amersham-Pharmacia, Suecia) a $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 mM/NaCl 500 mM; pH 8.3. La matriz activada se hidrató con HCl 1 mM en una relación de 5 L/L de gel y se lavó con $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 mM/NaCl 500 mM; pH 8.3 en una proporción de 1.5 L/L de gel. A continuación se añadió la solución de AcM y se mantuvo la agitación por 2 hrs a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Los grupos activos libres se neutralizaron con glicina 200 mM; pH 8, en una relación de 2 L/L de gel. Finalmente, se realizaron dos lavados alternos con acetato de sodio 100 mM/NaCl 500 mM; pH 4 y $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ 500 mM; pH 8.3 (1 L/L de gel) y el almacenamiento del inmunogel con PBS 150 mM; pH 7.2/timerosal 0.01%.

3.5. Caracterización del AcM CB.Hep-1.

3.5.1. Cuantificación del AcM CB.Hep-1 por ELISA.

Placas de Poliestireno (COSTAR, USA) se recubrieron durante 20 min a 50°C con 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgsVHBr diluidos $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 mM; pH 9.6. A continuación, se aplicaron 100 μL de las muestras en cada pozo incluyendo la curva patrón (1.25-50 ng/mL) y los controles. Las placas se incubaron 45 min a 37°C y se lavaron 4 veces con PBS 150 mM/Tween 20 al 0.1%. Luego se incubaron por 30 min a 37°C con

anticuerpos de carnero anti-IgG de ratón conjugado con PRP (Sigma, USA). Pasado este tiempo se lavaron 5 veces y la reacción se desarrolló con 100 μ L/pozo de tampón sustrato (5 mg de ortofenilendiamina/5 μ L de peróxido de hidrógeno/10 mL de $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 90 mM/ Na_2HPO_4 200 mM; pH 5.5). La reacción se detuvo a los 20 min con 50 μ L/pozo de H_2SO_4 2.5 M. La absorbancia a 492 nm se determinó en un lector de microplacas (TiTertek. Multiskan MC340) y el material de referencia empleado fue una preparación de CB.Hep-1 caracterizada por la dirección de calidad del CIGB.

3.5.2. Cuantificación de proteínas totales.

La concentración de proteínas se determinó siguiendo el protocolo descrito por Lowry y cols., (1951). Se utilizó la proteína albúmina sérica bovina como curva patrón de 10 a 500 μ g/mL.

3.5.3. Determinación de pureza del AcM CB.Hep-1 y del AgsVHBr por electroforesis.

La pureza en SDS-PAGE, 12.5%, bajo condiciones reductoras y no reductoras se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Laemmli y cols., (1970). La tinción empleada fue Azul de Coomassie y se aplicó siempre 25 μ g de cada muestra. La pureza se midió por densitometría (Molecular AnalystTM, versión 1.4.1 Bio-RAD Laboratorios).

3.5.4. Determinación de distribución molecular del AcM CB.Hep-1 por HPLC-exclusión molecular.

La pureza y la distribución molecular se determinaron sobre la base de la interrelación entre el peso molecular y el Tr. El sistema utilizado incluyó: bomba (2150, LKB, Suecia), monitor de longitud de onda a 226 nm (Knauer, Alemania), columna TSK G3000 PW (7.5x600 mm; diámetro de partícula: 10 μ m), precolumna TSK PWH (7.5x75 mm; diámetro de partícula: 12 μ m) y el programa de procesamiento de datos BioCrom (CIGB, Habana, Cuba). Se empleó como fase móvil PBS 150 mM; pH 7.2 y como material de referencia, IgG2b _{κ} anti-AgsVHB. El Tr esperado para esta referencia fue 37 min, el flujo volumétrico 0.2 mL/min y volumen de muestra aplicado 100 μ L.

3.5.5. Determinación del punto isoeléctrico del AcM CB.Hep-1.

Para determinar el punto isoeléctrico del AcM CB.Hep-1 se empleó una técnica de electroforesis de alta resolución. Se aplicaron 5 μ g de proteína diluida en agua destilada. Las condiciones generales fueron: gradiente de pH lineal entre 5 y 7 y un gel de poliacrilamida de 5% T/3% C (PHASTGEL IEF, Amersham-Pharmacia, Suecia). Como material de referencia se empleó una preparación de IgG CB.Hep-1 caracterizada por la dirección de calidad del CIGB (PPO, 4.09.098.99).

3.5.6. Determinación de la subclase y subtipo del AcM CB.Hep-1.

El isotipaje se realizó mediante un ensayo cualitativo comercialmente disponible (HL2010, Holland Biotechnology, Netherlands). Este ensayo se basó en la captura de Ig de ratón por AcMs de rata. El AcM CB.Hep-1 purificado se aplicó una dilución 1:10 000 en PBS 150 mM; pH 7.6 (Boot y cols., 1988; Esser y Radbruch, 1990).

3.5.7. Verificación de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del AcM CB.Hep-1.

Para la reducción y carboximetilación del AcM CB.Hep-1 se tomaron 500 µg del AcM y se le adicionaron 1 mL de tampón 1.12 mL de urea 9M, 125 µL de Tris 5M-glicina 1M; pH 8.5 y 3.85 mg de DTT. Esta mezcla se burbujeó con nitrógeno gaseoso y se incubó 4 hrs a 37°C. Después se le adicionaron 200 µL de yodo acetamida 200 mM y se burbujeó con nitrógeno gaseoso por 20 min en la oscuridad. Las cadenas ligeras y pesadas del AcM se separaron mediante HPLC de fase reversa en una columna C4 de 4.6 mm x 25 cm (J.T. Baker, USA). El flujo fue 0.8 mL/min y el gradiente fue de 15 a 35% de acetonitrilo en agua purificada/ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% durante 20 min y de 35 a 50% de acetonitrilo en agua purificada/ácido TFA 0.05% en acetonitrilo en 30 min. La detección se realizó a 226 nm. La cadena ligera se resuspendió en 20 µL en Urea 9 M/270 µL de (NH₄)₂CO₃ al 1% y 1.5 µg de Tripsina (Promega, USA) en una relación enzima-sustrato 1:100 por 5 hrs a 37°C. Para separar los péptidos se utilizó el equipo HPLC AKTA 100 Basic (Amersham-Biotech, Suecia) acoplado al espectrómetro de masas híbrido Q-Tof 2 con fuente de ionización ESI (Micromass, Inglaterra) con una columna de fase reversa ODS-UG5 1 mm x 15 cm (Develosil Nomura Chemical, Japón). El flujo fue 50 µL/min y el gradiente fue de 0 a 60% de acetonitrilo en agua purificada/ácido fórmico 0.1% en 40 min y de 60 a 80% de acetonitrilo en agua purificada/ácido fórmico 0.1% en 10 min.

3.5.8. Mapeo triptico del AcM CB.Hep-1.

Las cadenas ligeras y pesadas del AcM purificadas por una columna HPLC-fase reversa según el procedimiento anterior y secada al vacío se resuspendieron en 20 µL de Urea 9M. Luego se le adicionaron 270 µL de NH₄HCO₃ al 1% y 1.5 µg de Tripsina (Promega, USA), en una relación enzima: sustrato 1:100 por 5 hrs a 37°C. Para separar los péptidos se utilizó el equipo HPLC AKTA 100 Basic (Amersham-Biotech, Suecia) con una columna de fase reversa ODS-UG5 1 mm x 15 cm (Develosil Nomura Chemical, Japón). Se empleó un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo en agua purificada/TFA 0.1% durante 40 min a un flujo fue 50 µL/min y de 60 a 80% de acetonitrilo en agua purificada/TFA 0.05% en 10 min.

3.5.9. Confirmación de la especificidad del AcM CB.Hep-1.

Se utilizó una membrana de celulosa recubierta con péptidos del AgsVHB alineados y solapados en 12 y 6 aminoácidos respectivamente ([Anexo 16](#)). La membrana se lavó con dimetil formamida, etanol y agua purificada durante 2 min. Luego, se lavó con TBS (4 gr NaCl/0.1 gr KCl/3.05 gr Tris para 500 mL; pH 7) tres veces por 10 min y se bloqueó 8 hrs con leche descremada 5% en TBS a temperatura ambiente. Se aplicó el AcM CB.Hep-1 diluido en 5 mL de TBS/250 mg de leche descremada/25 µL de Tween 20 por 3 hrs a temperatura ambiente. La membrana se lavó 4 veces con TBS y se incubó durante 90 min con el conjugado anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina diluido en leche descremada al 5%/Twen 20 al 0.5%/TBS. Luego se aplicó el sustrato de la enzima (2.4 gr Tris/1.2 gr NaCl/1 gr MgCl₂/50 mL 5-bromo-4 ciano-3 indofosfato para 200 mL). Como control negativo se empleó el AcM CB.Ifñ-2,4 (Cruz y cols., 1990).

3.5.10. Determinación de la constante de afinidad del AcM CB.Hep-1.

Se recubrieron placas de poliestireno 3590 (Costar, USA) con el AgsVHBr en diluciones seriadas desde 5 hasta 0.6 $\mu\text{g/mL}$ durante toda la noche a 4°C. Seguidamente se aplicaron e incubaron las muestras de AcM durante 40 min a 37°C en diluciones seriadas desde 5 hasta 0.002 $\mu\text{g/mL}$. Las placas se lavaron con PBS 150 mM/Tween 20 al 0.01%; pH 7.6 y se aplicó la mezcla de anticuerpos de carnero anti IgG de ratón conjugada con PRP durante 40 min a 37°C. Las placas se lavaron de forma similar e inmediatamente se adicionó la solución sustrato. La reacción se detuvo con 50 μL /pozo de H_2SO_4 2.5 M y la absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan MC340). Para calcular la constante de afinidad se empleó la fórmula: $K_{af} = (n-1)/2(n(Ab')-(Ab))$ (Betty y cols., 1987).

3.5.11. Determinación de ADN de ratón en la preparación del AcM CB.Hep-1 mediante la técnica de dot-blot.

Al volumen que contiene 1 mg del AcM, se le añadió 1 mL de fenol y se centrifugó a 1300xg por 15 min. La fase superior se mezcló con igual volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó a 1300xg por 15 min. El sobrenadante se mezcló con 1 volumen de 2-butanol, se centrifugó nuevamente y se desechó la fase superior. En paralelo, se prepararon diluciones sucesivas de base 2 del ADN cromosomal de ratón desde 1 ng hasta 3.9 pg en agua calidad reactivo tipo II. Como control negativo se empleó 100 μg de albúmina sérica bovina libre de DNA_{asa} . Los detalles de esta técnica de cuantificación de ADN aparecen descritos en (Kafatos y cols., 1979; Sambrock y cols., 1989; P. P. O.4.09.082-92). Las secuencias de las sondas homólogas de ADN de ratón marcadas radiactivamente con 50 μCi alpha dATP³² fueron:

5' GAAAAACGTG 3' y 5' GATCCTCATTTCACGTTTTT 3'

3.5.12. Cuantificación de Proteína A de *S. aureus*.

Placas de poliestireno (COSTAR, USA) se recubrieron con anticuerpos de carnero contra la Proteína A utilizando $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 mM; pH 9.6 durante 3 hrs a 37°C. A continuación se lavaron 3 veces con PBS 150 mM/Tween 20 al 0.1%; pH 7.6, se bloquearon con 100 μL /pozo de PBS 150 mM; pH 7.6/leche descremada al 1% por 1 h a 37°C y se lavaron 4 veces con la misma solución de lavado. Las muestras diluidas en PBS 150 mM; pH 7.6/leche descremada al 0.5%, se calentaron durante 3 min a 100°C y se centrifugaron a 2000xg durante 1 min. Se aplicaron 200 μL de las muestras en dos pozos consecutivos para realizar diluciones seriadas de base 2 y se incubaron por 2 hrs a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente 5 veces y se aplicaron 100 μL del conjugado/pozo, fPac1-PRP (fragmentos de anticuerpos de carnero contra Proteína A conjugados con PRP) por 1 h a 37°C. Después de este tiempo, se lavaron las placas 5 veces y se aplicaron 100 μL de solución de sustrato por pozo durante 20 min. La reacción se detuvo con 50 μL /pozo de H_2SO_4 2.5 M y la absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek. Multiskan MC340). El control negativo utilizado fue el AcM CB.Hep-1 purificado por DEAE-Sephrose (Amersham-Pharmacia, Suecia) y el intervalo de la curva patrón fue desde 3.12 hasta 0.19 ng/mL.

Para demostrar la linealidad de las curvas se realizó un ANOVA para el modelo lineal donde se comparó la varianza del modelo con la varianza de los residuos para un nivel de significación de 95%. Además, se hizo un análisis de regresión lineal simple donde se comparó el coeficiente de correlación de Pearson (R) con respecto a un R crítico de 0.441 para 13 grados de libertad (n-1), n es el número de puntos experimentales, en una prueba de una sola cola ($R > 0$). Para verificar la igualdad estadística entre las dos rectas se determinaron los intervalos de confianza de la pendiente y el intercepto de ambas curvas para un 95% de confianza. La exactitud del ensayo se evaluó con tres concentraciones de Proteína A y tres réplicas por cada una de ellas; empleando la prueba de Cochran para demostrar homogeneidad de varianza en los tres niveles de medición estudiados y una prueba de hipótesis basada en la t-Student para comparar el recobrado promedio en las tres concentraciones de Proteína A evaluadas contra un recobrado esperado de 100% para un nivel de significación de 95% (Shesking, 2000).

3.6. Estudio de estabilidad del AcM CB.Hep-1

Para este estudio se tomaron tres muestras del AcM CB.Hep-1 purificadas por el procedimiento descrito en el [acápito 3.4.1](#). Las muestras se envasaron en bulbos de 1 mL y almacenaron a 4°C y -20°C respectivamente. Estas muestras fueron distribuidas de forma tal que en cada tiempo experimental (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 19, 22 y 25 meses) se evaluarán dos muestras por cada temperatura en estudio. El tampón de almacenamiento fue Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6 y la temperatura de almacenamiento fue chequeada cada vez que se tomó una muestra para su evaluación. Las características evaluadas fueron: actividad específica ($\geq 70\%$) y pureza por SDS-PAGE ($\geq 90\%$) ([acápito 3.5.3](#)). La comparación estadística entre ambas temperaturas se realizó mediante una prueba de significación de la pendiente (m) basada en la distribución t-Student para un 95% de confianza. La hipótesis nula para ambos parámetros (actividad específica y pureza) fue $m=0$ (Shesking, 2000).

3.7. Estudio de estabilidad del inmuoadsorbente CB.Hep-1.

Se inmovilizaron tres muestras del AcM CB.Hep-1 independientes. Las muestras se envasaron en bulbos de 10 mL cada una con un volumen de 6 mL y se almacenaron a 4°C. Se distribuyeron de forma tal que en cada tiempo experimental (0, 3, 8, 9, 12, 16 y 20 meses) se tomaron 2 bulbos por cada inmunogel. Se determinó la cantidad del AgsVHBr purificado y el contenido de IgG desprendida. Para cada tiempo experimental se promedió el valor de todas las determinaciones y el procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante la prueba t-Student para un nivel de significación de 95%.

3.8. Estudios de validación virológica.

3.8.1. Virus modelos empleados y cálculo del factor de remoción e inactivación viral.

Los virus modelos (virus sendai, VIH-1, VHS-1, PVH-2 y PVC) empleados son virus que comparten propiedades físico-químicas con los virus que pueden contaminar la fuente biológica. La capacidad de remoción e inactivación se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (White y cols., 1991).

$$R = \log(V_1 \times T_1) / (V_2 \times T_2)$$

R= capacidad de remoción; V1, volumen inicial; T1, concentración inicial de virus, V2, volumen final y T2, concentración final de virus.

3.8.2. Desescalado del método de purificación del AcM CB.Hep-1.

El método de purificación del AcM CB.Hep-1 se desescaló hasta 50 mL de ascitis (1% de la escala). Los criterios más importantes para desescalar fueron: concentración de proteínas, temperatura, tiempos de precipitación y centrifugación, capacidad de adsorción de IgG de la matriz de afinidad, Tr, flujo lineal, relación geométrica de las columnas cromatográficas, pH y conductividad de los tampones. El procedimiento de desescalado y los criterios aparecen descritos más detalladamente en (F. D .A., 1987; O. M .S., 1992; Darling y Spaltro, 1996). Se trabajó manteniendo constante el Tr durante la cromatografía de afinidad, ya que se considera que este es el parámetro más importante en los procesos de afinidad. Este desescalado se evaluó en tres ocasiones con ascitis rica en el AcM CB.Hep-1 sin virus modelos. Los criterios de calidad evaluados fueron: pureza del AcM, actividad específica y rendimiento. La columna de afinidad empleada en el desescalado fue: columna XK 16 mm x 30 cm, empacada con Protein A-Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia, Suecia), equilibrada con PBS 150 mM; pH 8 a un flujo lineal de 100 cm/h. Después de lavada la columna con este tampón, se realizó una elución previa de contaminantes con ácido cítrico 100 mM; pH 5 y del AcM CB.Hep-1 con ácido cítrico 100 mM; pH 3.

En el análisis estadístico de los parámetros evaluados en el desescalado se utilizó una prueba de comparación de medias para dos muestras independientes basada en la prueba t-Student. Para la evaluación de la pureza, actividad específica y rendimiento en presencia de virus modelos se empleó un ANOVA de clasificación simple para un nivel de significación de 95% y para evidenciar entre qué variantes experimentales existen diferencias significativas se utilizó la prueba de Duncan también para un nivel de significación de 95% (Shesking, 2000).

3.8.3. Experimento de remoción de virus modelos en la cromatografía de afinidad.

El virus sendai se adicionó en una dilución 1:10 de la ascitis ([Anexo 17](#)) y su título viral se midió en cada uno de los pasos del método de purificación ([acápite 3.4.1](#)). Para el resto de los experimentos, la adición de cada virus modelo (VIH-1, VHS-1, PVH-2, PVC) se realizó sólo en la cromatografía de afinidad, también en una dilución 1:10. En todos los casos se evaluaron tres réplicas por cada modelo viral y los tampones empleados en la purificación se titularon para descartar interferencia o toxicidad en las líneas celulares utilizadas para evaluar el efecto citopático de cada virus modelo ([Anexos 4-8](#)).

3.8.4. Experimento de inactivación viral en etanol al 70 y al 20% a 4°C.

Se tomaron 5 mL de Protein A-Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia, Suecia) en presencia de etanol al 70%. A este volumen de matriz se le añadió una dilución 1:10 de cada virus modelos por separado. Después de cada tiempo experimental (10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 hrs, 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs) las muestras se dializaron contra PBS 150 mM; pH 7.2 para hacer los análisis de titulación viral. El control positivo de cada virus se mantuvo a 4°C durante todo el experimento en ausencia de etanol y se dializó también para la medición del título viral siguiendo el protocolo descrito en ([acápite 3.1.3.6](#)). Este protocolo se empleó también en los experimentos de inactivación viral en etanol al 20% ([Anexo 18](#)). Los

tiempos evaluados fueron (10 min, 15 min, 30 min, 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs) y tres réplicas por cada porcentaje de etanol y virus modelo.

3.8.5. Experimento de estabilidad del AcM CB.Hep-1 en ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C.

El AcM CB.Hep-1 purificado se sometió a un cambio de tampón hacia ácido cítrico 100 mM; pH 6 empleando una columna XK16/30 empacada con 60 mL de Sephadex G-25m (Amersham-Pharmacia, Suecia). A continuación se dispensaron 2 mL de esta solución en bulbos de 5 mL y el pH se redujo a 3 con ácido clorhídrico. Cada 1 h se tomó una muestra de cada bulbo, se neutralizó con Tris 2 M y se procedió al cálculo de la concentración del AcM ([acápite 3.5.1](#)).

3.8.6. Inactivación de virus modelos en ácido cítrico 100 mM; pH 3, 4°C.

Las muestras del AcM CB.Hep-1 purificado se sometieron a un cambio de tampón hacia ácido cítrico 100 mM; pH 6 en una columna XK16/30 empacada con 60 mL Sephadex G-25m (Amersham-Pharmacia, Suecia). A continuación se dispensaron 2 mL de esta solución en bulbos de 5 mL y el pH se redujo hasta 3 con ácido clorhídrico. Inmediatamente después se inocularon con una dilución 1:10 de cada virus modelo por separado. En este momento se tomó la muestra considerada como tiempo inicial y el resto permaneció 10 horas a 4°C. Al final de cada tiempo experimental, se neutralizaron las muestras con Tris 2M y se almacenaron a -85°C hasta el final del experimento para iniciar los ensayos de titulación. También se evaluó el ácido cítrico 100 mM para descartar toxicidad en las líneas celulares ([Anexo 19](#)).

La demostración de diferencias significativas entre la actividad específica del AcM CB.Hep-1 incubado en ácido cítrico 100 mM; pH 3 en presencia de virus modelos se realizó mediante un ANOVA de clasificación simple para un nivel de significación de 95% (Shesking, 2000).

3.8.7. Inactivación de virus modelos en Tris 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3 M; pH 7.2 a 60°C.

Se tomaron 35 mL de un eluato de inmunoafinidad y se le ajustó la concentración de AgsVHBr a 0.35 mg/mL con Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2. El inóculo viral se añadió en una dilución 1:10, siempre después que el eluato alcanzó 60°C ([Anexo 20](#)). El material que contenía el virus se incubó en un baño termostataado M20 (Lauda MS, Alemania) a 60°C a 0, 10, 30, 60, 90, 120 y 180 min. El tampón se cambió en todos los casos hacia Tris 20 mM, EDTA 3 mM; pH 7.2 en columnas PD-10 empacadas con 12 mL de Sephadex G-25m (Amersham-Pharmacia, Suecia), para realizar la titulación viral sin interferencia. Además, se tomaron 0.2 mL del inóculo de cada virus modelo (control positivo), 0.2 mL del inóculo viral diluido en el tampón Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1 M; pH 7.2, 0.5 mL del tampón Tris 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M; pH 7.2 (control negativo) y 0.5 mL del eluato de inmunoafinidad ajustado a 0.35 mg/mL sin inocular (control negativo).

Para demostrar diferencias significativas en el recobrado del AgsVHBr durante el calentamiento a 60°C en presencia de virus modelos se realizó un ANOVA de clasificación simple para un nivel de significación de 95% (Shesking, 2000).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de la consistencia de la producción de líquido ascítico rico en el AcM CB.Hep-1.

La ascitis es un trasudado seroso producido en este caso por la inoculación del hibridoma CB.Hep-1 en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c. La consistencia de la producción de ascitis se analizó a través del parámetro concentración del AcM CB.Hep-1 en 20 inoculaciones consecutivas del hibridoma CB.Hep-1 en grupos de 2000 animales. Los resultados indicaron un promedio de 3.13 mg/mL con una desviación estándar de 0.70. Dado que no hay más de 9 muestras por encima o por debajo del valor promedio, ni tampoco fuera de los límites $\pm 2DS$, se puede concluir que la producción de ascitis vista a través de este parámetro es estadísticamente consistente (Fig. 1) (Gershon, 1991; PPO 4.10.08.94, 2007).

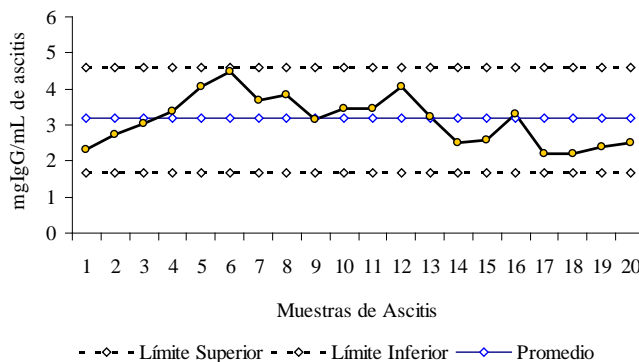


Figura 1. Gráfico de control de la concentración del AcM CB.Hep-1 en ascitis. Los límites se establecieron como el promedio ± 2 veces la desviación estándar.

4.2. Análisis del recobrado y rendimiento del método de purificación del AcM CB.Hep-1.

El recobrado promedio fue $44.33 \pm 10.93\%$ en 20 purificaciones consecutivas (Fig. 2). En la mayoría de los pasos de purificación el recobrado obtenido estuvo dentro del intervalo esperado (Gagnon, 1996) para una productividad de 38-40 g del AcM CB.Hep-1 cada 30 hrs de proceso (Tabla 3). El cálculo del recobrado se basó en la cuantificación del AcM mediante la técnica de ELISA. Esta técnica posee un coeficiente de variación interensayo entre 10-20%, pero esta variación no es la única causa de la variabilidad del recobrado. La variabilidad en el recobrado se afectó también por la composición de la ascitis y por el número de ciclos de purificación de la matriz de la cromatografía de afinidad. Experimentos posteriores demostraron la presencia de AcM en el sobrenadante de las precipitación salina, por lo cual recomendamos estudiar el efecto de la aplicación directa de la ascitis en el rendimiento y la estabilidad de la matriz de afinidad, así como otros tampones que aumenten la capacidad de adsorción de esta matriz de afinidad como la glicina 0.2 M (Gagnon, 1996).

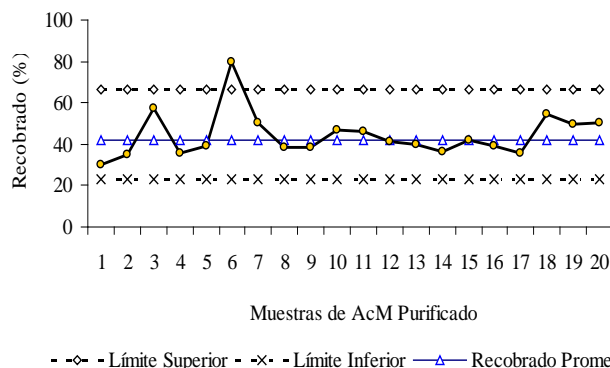


Figura 2. Recobrado del método de purificación del AcM CB.Hep-1. La curva representa el recobrado de cada purificación y los límites corresponden con el valor promedio de recobrado ± 2 veces la desviación estándar.

Tabla 3. Recobrado por etapas del método de purificación del AcM CB.Hep-1. Los valores esperados se calcularon a partir de la eficiencia informada por Gagnon (1996) para cada una de las técnicas empleadas.

Pasos del método de purificación	Recobrado Esperado	Recobrado Real±DS
Semipurificación (precipitación salina-centrifugación-exclusión molecular) (%)	60-80	75.83±13.50
Cromatografía de afinidad en Protein A-Sepharose (%)	70-90	81.50±30.40
Incubación a pH ácido durante 1 h (%)	≥98	98.50±2.10
Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25, cambio de tampón (%)	≥95	92.60±15.59
Ultrafiltración (%)	≥95	99.50±9.55
Filtración esterilizante (%)	≥95	97.30±2.41
Recobrado Total (%)	35.3-60.4	44.33±10.93
Rendimiento (mg IgG purificada/mL de ascitis)	1-2	1.23±0.34
Productividad máxima relativa del método de purificación g/30 hrs	30-60	38-40

4.3. Caracterización bioquímica del AcM CB.Hep-1 purificado.

4.3.1. Resultados de la determinación de pureza del AcM CB.Hep-1.

La pureza es uno de los aspectos de mayor relevancia en la calidad de un biológico. La pureza del AcM CB.Hep-1 evaluada por electroforesis brindó dos tipos de información: identidad referida al patrón de bandeo y el grado de pureza propiamente dicho. La [figura 3](#) muestra la pureza medida en geles de poliacrilamida al 12.5% en condiciones reductoras y al 10% para condiciones no reductoras del AcM CB.Hep-1 purificado. El porcentaje de poliacrilamida se seleccionó para visualizar contaminantes por encima de la cadena pesada, por debajo de la cadena ligera, o de la molécula completa de IgG, ya que la talla máxima de las proteínas que penetran en un gel al 12.5% y al 10% es de 100 kDa y entre 170 y 200 kDa respectivamente. En el caso de la pureza medida en condiciones reductoras ([Fig. 3A](#)) se observó un patrón de doble banda reforzado a la altura de 50-55 kDa y 25 kDa. Algunas bandas débiles aparecen por encima de la cadena pesada de la IgG, carriles 5 y 6, pero en todos los casos la pureza fue superior al 90%, mientras que en el caso de la pureza medida en condiciones no reductoras se observó una banda homogénea sobre los 150 kDa con más de 90% de pureza también ([Fig. 3B](#)), lo cual coincide con lo informado y exigido para este tipo de IgG (O. M. S. 1992; F. D. A, 2001).

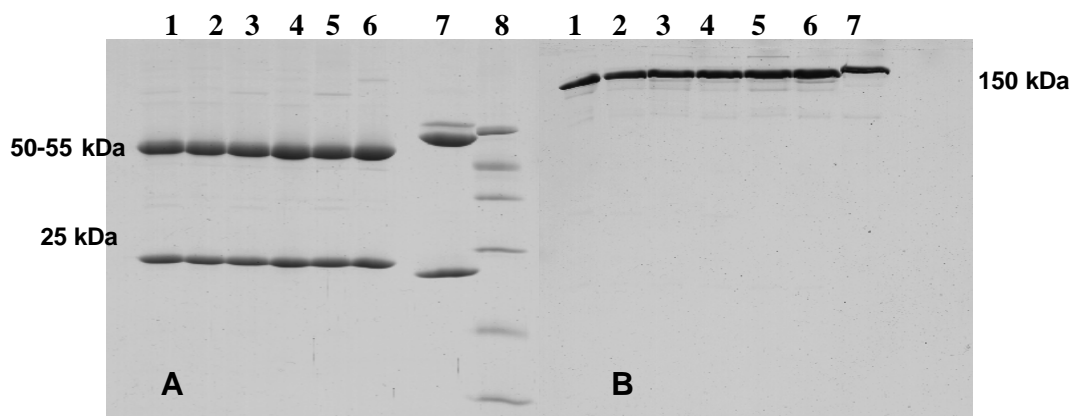


Figura 3. (A) Pureza del AcM CB.Hep-1 evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en condiciones reductoras. Línea 1-6, muestras del AcM CB.Hep-1. Línea 7, estándar de un AcM de ratón. Línea 8, marcador de peso molecular (Albumina sérica bovina 80 kDa, Ovoalbúmina 49 kDa, Anhidrasa carbónica 34.8 kDa, Inhibidor de la Tripsina de soja 28.9 kDa, Lisozima 20.6 kDa, Aprotrina 7.01 kDa). (B) Pureza evaluada en condiciones no reductoras. Línea 1-6, muestras del AcM CB.Hep-1. Línea 7, estándar de IgG de ratón.

La pureza de esta molécula se evaluó también mediante la cromatografía líquida de alta resolución. Esta técnica permite determinar la distribución molecular y la pureza sobre la base de la interrelación entre el peso molecular y el Tr. El coeficiente de variación de esta cromatografía fue $\leq 1\%$ (repetibilidad) y $\leq 2\%$ (reproducibilidad), así como el límite de detección es 20 μg por lo cual cuenta con suficiente precisión y sensibilidad para evaluar la pureza del AcM. A partir del Tr de la muestra control (37 min) se determinó la fracción de IgG-2bk anti-AgsHBr (CB.Hep-1). La [figura 4](#) presenta dos ejemplos de los resultados obtenidos en dos muestras del AcM CB.Hep-1. En ambos casos se demostró una fracción mayoritaria y una pureza superior al 95%. La identidad de la segunda fracción no está definida pero estudios realizados con este AcM obtenido a partir de otra fuente biológica indican que no es de origen proteico sino ácido cítrico empleado en la elución durante la cromatografía de afinidad. Este ácido parece interactuar con la matriz de exclusión molecular, pues su elución no corresponde con este tiempo de retención.

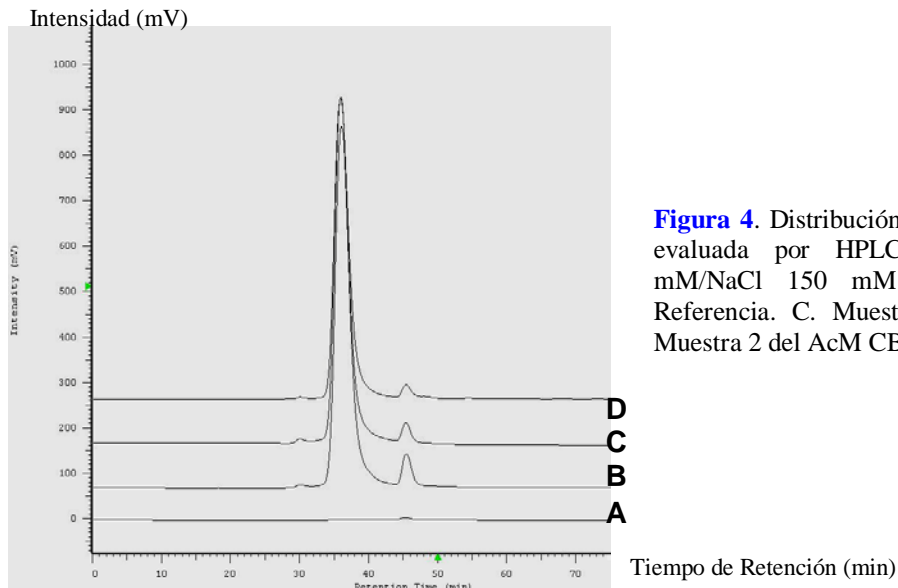


Figura 4. Distribución molecular del AcM CB.Hep-1 evaluada por HPLC-GF. A. Tampón Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6. B. Material de Referencia. C. Muestra 1 del AcM CB.Hep-1. D. Muestra 2 del AcM CB.Hep-1.

4.3.2. Resultados del Isotipaje del AcM CB.Hep-1.

Debido a la alta potencialidad de encontrar anticuerpos propios del ratón, no específicos para el AgsVHBr que pueden además ser purificados por la matriz de afinidad, Protein-Sepharose, se determinó la clase y subclase del AcM purificado como criterio adicional de pureza. La evaluación del isotipo en dos preparaciones del AcM CB.Hep-1 demostró que las moléculas purificadas corresponden con una IgG-2B cadena ligera Kappa ([Figura 5](#)). Por lo que si integramos este resultado con el de actividad específica se puede concluir que la preparación purificada corresponde mayoritariamente con el AcM CB.Hep-1.

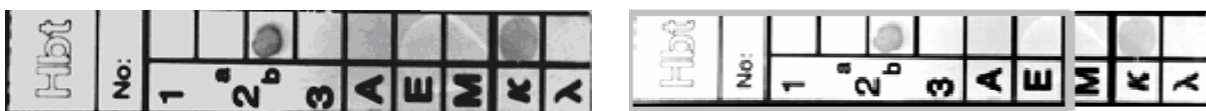


Figura 5. Isotipaje de dos preparaciones del AcM CB.Hep-1 purificado mediante Protein A-Sepharose.

4.3.3. Resultados del mapeo peptídico de la cadena pesada y ligera del AcM CB.Hep-1.

El mapeo tríptico fue otra de las técnicas empleadas para la caracterización del AcM CB.Hep-1. En este caso se mapeó la cadena ligera y la cadena pesada de tres muestras consecutivas del AcM CB.Hep-1 mediante la digestión con Tripsina. Como se observa en la [figura 6](#), los mapas trípticos de ambas cadenas son muy parecidos entre las tres muestras evaluadas, lo cual permite llegar a la conclusión de que no hay modificaciones importantes a nivel de péptidos entre las muestras. Las diferencias encontradas en una fracciones de la cadena ligera de la segunda muestra puede ser explicada por la imprecisión del método en cuanto la diluciones de la enzima y del sustrato, AcM CB.Hep-1, lo que provoca en ocasiones que la intensidad de las fracciones sea diferentes.

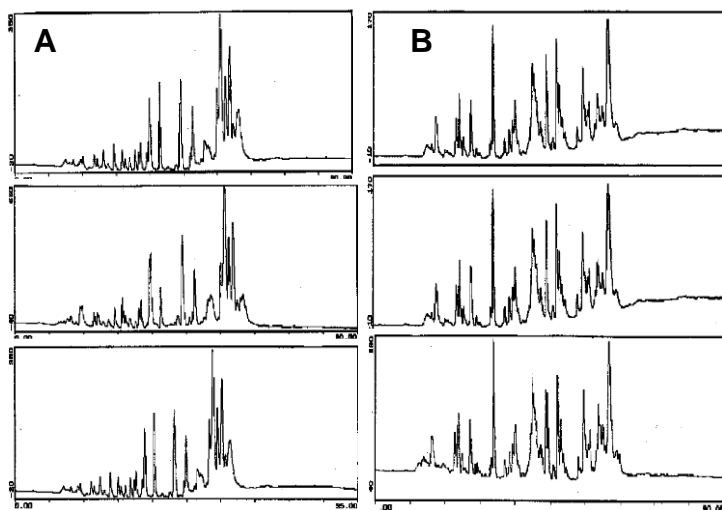


Figura 6. Mapeo peptídico de tres muestras consecutivas del AcM CB.Hep-1 tras la digestión con Tripsina. A. Mapeo peptídico de la cadena ligera. B. Mapeo peptídico de la cadena pesada. La digestión se realizó en una relación enzima: sustrato 1:100 durante 5 hrs a 37°C.

4.3.4. Confirmación del epítipo reconocido por el AcM CB.Hep-1.

Entre los ensayos más importantes de caracterización bioquímica está la determinación del epítipo reconocido por el AcM CB.Hep-1 (especificidad). Este tipo de ensayo consistió en fijar péptidos de 12 aminoácidos, solapados en 6 aminoácidos del AgsVHBr ([Anexo 17](#)) y enfrentarlo a las muestras purificadas del AcM CB.Hep-1. La [figura 7](#) presenta el reconocimiento de los péptidos 20 y 21 del AgsVHBr de una muestra del AcM CB.Hep-1 purificada, ambos péptidos comparten la secuencia de aminoácidos CKTCTT. Esta secuencia se localiza en el determinante “a” de dicho antígeno y corrobora los resultados obtenidos anteriormente en cuanto a la caracterización del epítipo reconocido por este AcM a escala analítica.

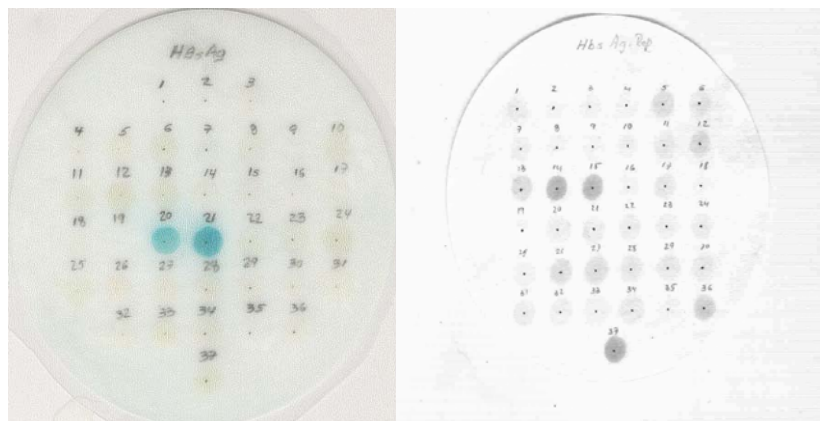


Figura 7. Reconocimiento de péptidos solapados del AgsVHBr por el AcM CB.Hep-1 (izquierda) y por el AcM CB.Ifñ-2.4 (derecha) empleado como control negativo. El color azul indica reconocimiento del AcM CB.Hep-1. Secuencia de aminoácidos de los péptidos reconocidos por el AcM CB.Hep-1. **20.** TTSTGPKCTCTTB. **21.** CKTCTTPAQNSB.

4.3.5. Resultados de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del AcM CB.Hep-1.

La espectrometría de masas es una herramienta esencial para la caracterización de la identidad de las moléculas proteicas. La alta precisión y exactitud de esta técnica permite una caracterización detallada de las proteínas (Mikkat y cols., 2004). En la [figura 8](#) se muestra un espectro de masas y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del AcM CB.Hep-1. Los resultados demostraron que esta secuencia de aminoácidos coincide con la secuencia predicha a partir de la secuencia de ADN. Los aminoácidos que aparecen reforzados corresponden con las regiones determinantes de la complementariedad del AcM. Estas regiones se determinaron a partir de la información publicada en la base de datos Kabat (1991).

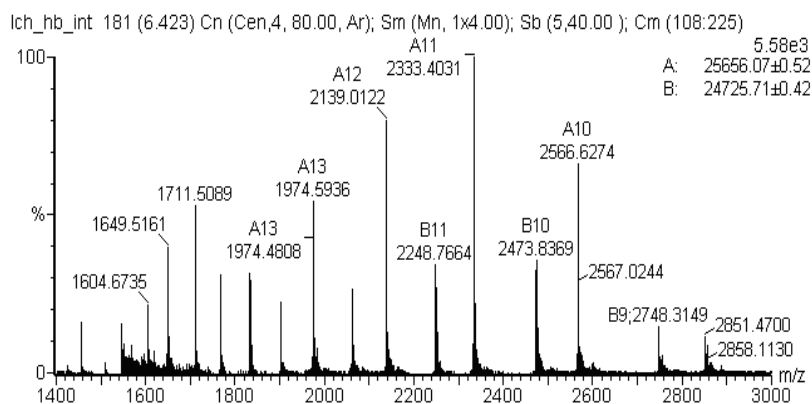


Figura 8. Espectro de masas y secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del AcM CB.Hep-1 de una muestra del AcM CB.Hep-1 obtenida a partir del hibridoma CB.Hep-1. El espectro de masas se obtuvo en un equipo que usa como principio de ionización la electro-nebulización (ESI).

DIVMSQSPSSLAIVSVGEKVALSC(**KSSQSLLYLNNHKNYLA**)WFQKPGQSPKLLIY(**WASTRDS**)GVPDRFTGSGSGTDFTLMISS
VKAEDLAVYYC(**QQYYNYPYTFG**)GGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIVVKWKIDGSRQNGVLNS
WTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

4.3.6. Resultados de la determinación del punto isoeléctrico del AcM CB.Hep-1.

La técnica de isoelectroenfoque es otro criterio de identificación molecular para las agencias regulatorias (F. D. A., 2001). Esta es una técnica de alta resolución para separar proteínas en base a sus puntos isoeléctricos donde los componentes cargados de las muestras se mueven a través del gradiente de pH y pierden su carga cuando el pH del gradiente es igual a su punto isoeléctrico. El análisis de reproducibilidad y repetibilidad realizado con el patrón de AcM indicó una variabilidad de sólo 0.5 % y 0.3 % respectivamente. La [figura 9](#) muestra los valores de pH isoeléctrico de 5 muestras consecutivas del AcM CB.Hep-1. El intervalo de pH isoeléctrico fue consistentemente de 7.1 a 6.51, lo cual coincide con lo informado por Fischer y colaboradores (1999) para este tipo de proteína y con el valor teórico determinado a partir de la secuencia de aminoácidos (pH isoeléctrico=6.9).

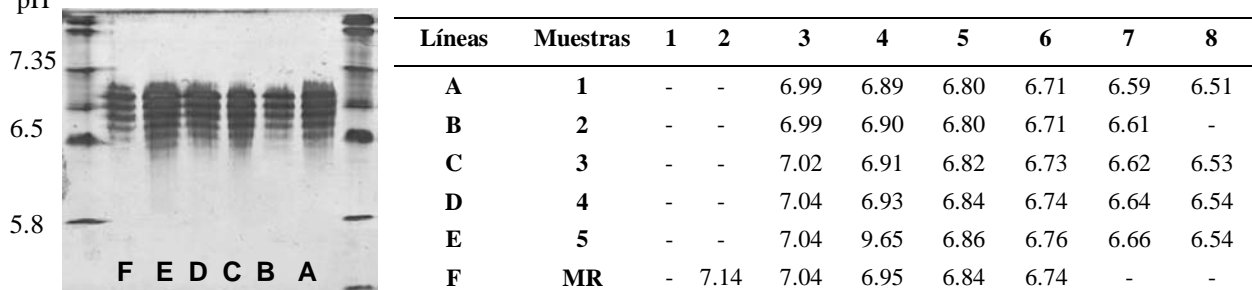


Figura 9. Isoelectroenfoque de 5 muestras consecutivas del AcM CB.Hep-1 purificado. Los valores representan el valor de pH isoeléctrico de cada banda. MR: material de referencia.

4.3.7. Resultados de la determinación de la constante de afinidad del AcM CB.Hep-1.

El método de medición de la constante de afinidad del AcM CB.Hep-1 utilizó el valor de correspondiente con el 50% de la densidad óptica total de curvas sigmoidales. Este método trabaja con la concentración total de AcM aplicada en el pozo de una placa de ELISA y el mismo se validó contra el método de radioinmunoensayo de inhibición por Beatty y colaboradores, (1987). Para el AcM CB.Hep-1, los resultados indicaron una K_{af} de $7.61 \pm 6.9 \times 10^8 M^{-1}$ (Tabla 4). La variabilidad observada coincide por la informada para este tipo de ensayo y por el uso de un antígeno, partícula, con el epítipo repetido.

Tabla 4. Resultados de constante de afinidad del AcM CB.Hep-1.

AcM CB.Hep-1	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Promedio
$K_{af} (M^{-1})$	2.1×10^7	1.1×10^7	5.0×10^7	3.4×10^8	4.6×10^8	1.6×10^8	1.1×10^8	$7.61 \pm 6.9 \times 10^8$

4.4. Caracterización de los contaminantes críticos de la preparación del AcM CB.Hep-1 purificado.

4.4.1. Resultados de la determinación de ADN de ratón.

En las muestras de los AcM, pueden aparecer dos contaminantes con gran impacto en la calidad del producto final. Estos son: el ADN de ratón y la Proteína A desprendida de la matriz de afinidad (Bloom y cols., 1989). El ADN de ratón está muy vinculado con características oncogénicas por lo cual la cantidad de esta molécula en el biológico tiene que ser muy baja ($< 10 \text{ pg ADN/mg AcM}$). En este caso la estimación de la dosis resulta difícil porque el AcM no se utiliza directamente, sino a través de un proceso de inmunopurificación. Por esta razón, decidimos evaluar el nivel de contaminación de forma similar a la que recomienda la literatura para un AcM de uso parenteral. La cantidad de ADN de ratón en estas muestras fue inferior al límite de cuantificación del ensayo ($3.9 \text{ pg ADN/mg AcM}$) (Fig. 10).

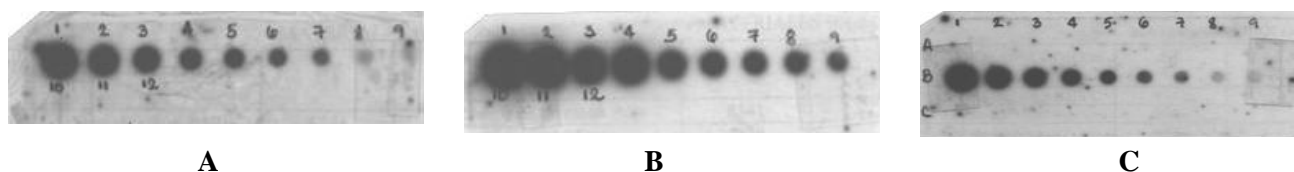


Figura 10. Contenido de ADN de ratón en preparaciones del AcM CB.Hep-1. A y B. Líneas 1-9, curva patrón de ADN de ratón ($1 \text{ ng} - 3.9 \text{ pg}$ de ADN). Línea 10, control negativo ($100 \mu\text{g}$ de albúmina sérica bovina). Línea 11, 1 mg del AcM CB.Hep-1, material de referencia. Línea 12, muestra de AcM purificado. C. La muestra de AcM CB.Hep-1 corresponde con C3.

4.4.2. Resultados de la determinación de Proteína A de *Staphylococcus aureus*.

Para esta determinación se validó un sistema de cuantificación de Proteína A en presencia de grandes cantidades de IgG. Este sistema se basó en la combinación de fragmentos de anticuerpos de carnero contra la Proteína A conjugado con PRP y anticuerpos completos de carnero con la misma especificidad. El intervalo lineal de la curva patrón (Proteína A+IgG) fue desde 0.19 hasta 3.13 ng/mL lo que se corroboró mediante un ANOVA ($p=4.360 \times 10^{-15}$). Además el análisis de regresión lineal comparando los coeficientes de correlación lineal de Pearson (R) contra el R crítico (0.441) corroboró la linealidad de las curvas en este intervalo de concentración de Proteína A (Fig 11). La comparación estadística no mostró

diferencias significativas entre ambas rectas, o sea con y sin IgG. Esto se demostró comparando el intervalo de confianza de la pendiente (m) y del intercepto de las dos rectas para un 95% de confianza. Los intervalos de confianza fueron (m de la recta de Proteína A (0.10-0.20); m de la recta de Proteína A+IgG (0.10-0.28), (intercepto de la recta de Proteína A (0.28-0.34); intercepto de la recta de Proteína A+IgG (0.29-0.34). Como se aprecia los intervalos de confianza de m y del intercepto de ambas rectas se solapan. La interferencia en el ensayo se observó para concentraciones de IgG superiores a 1 mg/mL.

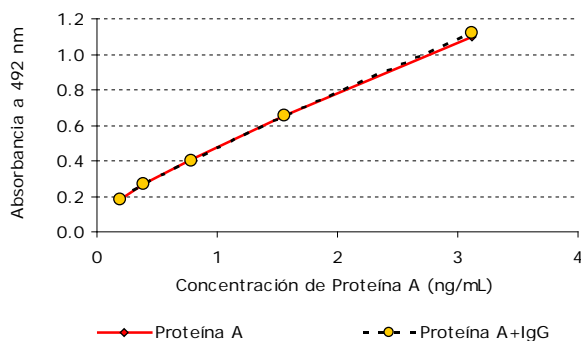


Figura 11. Cuantificación de Proteína A en presencia de 0.5 mg/mL de IgG. El coeficiente de correlación lineal de Pearson para la curva con Proteína A fue $R=0.9982$, mientras que para la curva de Proteína A+IgG fue de 0.9973.

En aras de desarrollar un ensayo riguroso, se analizó el recobrado para tres concentraciones de Proteína A diferentes (50, 100 y 150 ng/mL). En este caso el coeficiente de variación intra-ensayo fue 4.36% mientras que el coeficiente de variación inter-ensayo fue 8.63% demostrando que en ambos casos el criterio se cumplió satisfactoriamente, menos del 10 y del 20 % respectivamente. Estadísticamente, no se observó diferencias significativas en el recobrado en las tres concentraciones evaluadas mediante una prueba de hipótesis basada en la distribución t de Student para un 95% de confianza (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la prueba de Cochran (G) para demostrar homogeneidad de varianza y t -Student para comparar el recobrado promedio. En cada caso el nivel de probabilidad fue 95%.

Parámetros	50 ng/mL	100 ng/mL	150 ng/mL
Ensayo I	93.82	96.72	102.88
Ensayo II	109.80	101.72	89.29
Ensayo III	93.72	107.20	112.64
Recobrado promedio	99.14±9.23	101.88±5.24	101.60±11.23
Coefficiente de variación inter-ensayo (%)	9.31	5.14	11.54
P (Cochran)	0.609	-	-
P (t-Student)	0.887	0.598	0.833

La cuantificación de Proteína A es muy importante por los desordenes inmunológicos provocados por altos niveles de esta proteína en el plasma humano (Gagnon, 1996). Utilizando este ELISA se cuantificó el nivel de Proteína A en 20 muestras del AcM CB.Hep-1. La figura 12 muestra la cantidad de Proteína A determinada, donde el máximo valor encontrado no excedió los 2 ppm. Este valor se considera bajo para este tipo de producto, ya que posterior a este paso existen otros pasos cromatográficos con elevada capacidad de eliminación de proteínas como la cromatografía de intercambio iónico. Además este valor

de 2 ppm es muy inferior a la dosis tóxica informada para chimpancés (0.41 m/kg de peso/día, durante 15 días por vía intraperitoneal).

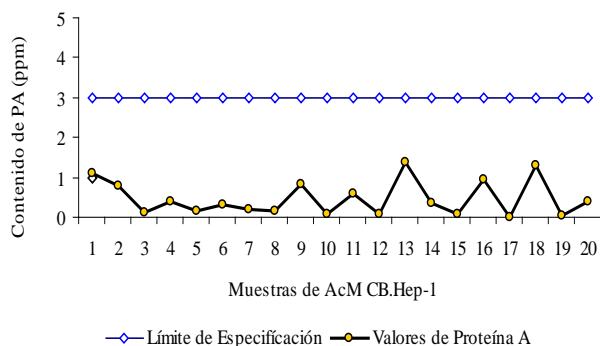


Figura 12. Contenido de Proteína A de *S. aureus* en preparaciones del AcM CB.Hep-1. El valor de 3 ppm corresponde con el valor de especificación de calidad establecido para la vacuna contra la Hepatitis B.

4.5. Resultados de la estabilidad del AcM CB.Hep-1 en tampón Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6.

Una de las formas de medir la eficiencia de un método de purificación es comprobando si el grado de purificación que este logra, no afecta la estabilidad de la molécula de interés. Para abordar la estabilidad del AcM CB.Hep-1 se estudiaron dos temperaturas (4°C y -20°C). Los parámetros evaluados fueron la pureza y la actividad específica durante 25 meses. Los resultados confirmaron la estabilidad de esta molécula en las dos temperaturas estudiadas. La comparación estadística de ambos parámetros en ambas temperaturas no mostró diferencias significativas para un 95% de confianza según la prueba de significación de la pendiente basada la distribución t-Student para muestras independientes. Los valores de probabilidad se relacionan a continuación, para la actividad específica a 4°C (p= 0.8330), actividad específica a -20°C (p=0.9005), pureza a 4°C (p=0.9595) y pureza a -20°C (p=0.5825). Adicionalmente, en ninguno de los tiempos evaluados el valor de pureza y de actividad específica quedó por debajo de la especificación de calidad establecida (Figs. 13 y 14).

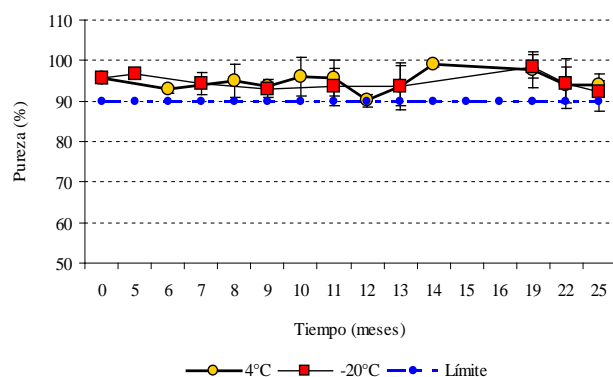


Figura 13. Resultados de la pureza del AcM CB.Hep-1 en el estudio de estabilidad en Tris 20 mM/ NaCl 150 mM; pH 7.6 a 4 y -20°C. Las curvas muestran la media y el intervalo de confianza para un 95% de significación estadística.

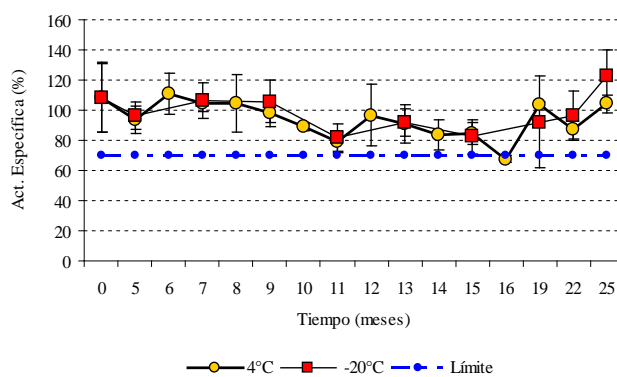


Figura 14. Resultados de la actividad específica del AcM CB.Hep-1 en el estudio de estabilidad en Tris 20 mM/ NaCl 150 mM; pH 7.6 a 4 y -20°C. Las curvas muestran la media y el intervalo de confianza para un 95% de significación estadística.

4.6. Resultados de la inmovilización del AcM CB.Hep-1 y caracterización cromatográfica de los inmunoadsorbentes del AcM CB.Hep-1.

La cromatografía de inmunafinidad es la técnica más importante en la purificación del AgsVHBr obtenido a partir de *Pichia pastoris* (Pentón y cols., 1994). Entre sus ventajas están: alto recobrado, alta pureza y alto poder de concentración del AgsVHBr, selectividad, ya que el AcM CB.Hep-1 reconoce el determinante “a” y la originalidad con respecto a otros métodos de purificación (Hitzman y cols., 1983; Murruay y cols., 1984). Entre sus limitaciones se informa el desprendimiento del ligando y la pérdida temprana de la capacidad de captura del antígeno. En esta Tesis, el método de activación con bromuro de cianógeno demostró una eficiencia de acoplamiento de IgG >97%, lo cual coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Kohn y Wilchek, 1982). La capacidad de elución fue superior a 100 µg AgsVHBr/mg AcM y la pureza del AgsVHBr purificado alcanzó valores superiores al 85%. El límite de especificación de la pureza del AgsVHBr en este paso de purificación es 80% (Fig. 15).

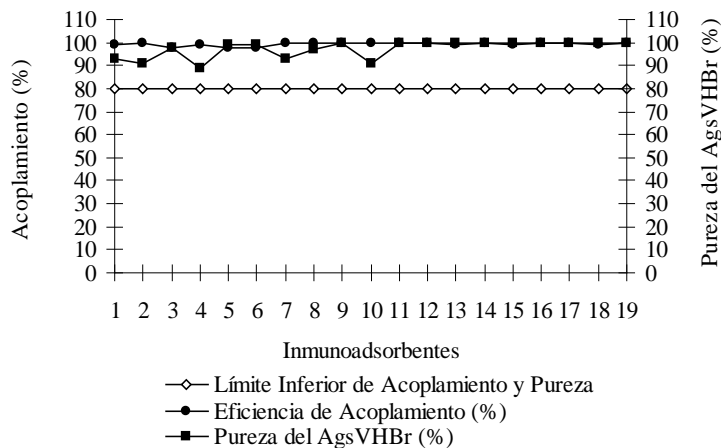


Figura 15. Gráfico de la eficiencia de acoplamiento del AcM CB.Hep-1 y pureza del AgsVHBr purificado a partir de los inmunoadsorbentes del AcM CB.Hep-1.

La especificidad de las bandas en la electroforesis del AgsVHBr se corroboró por inmunomarcaje con el AcM CB.Hep-1. Como se observa en la figura 16 no hay diferencias en el patrón de bandeo del AgsVHBr purificado con respecto al material de referencia. Este antígeno aparece en forma de monómero (24 kDa), dímero (48 kDa) y trímero (72 kDa) bajo las condiciones reductoras empleadas en este ensayo.

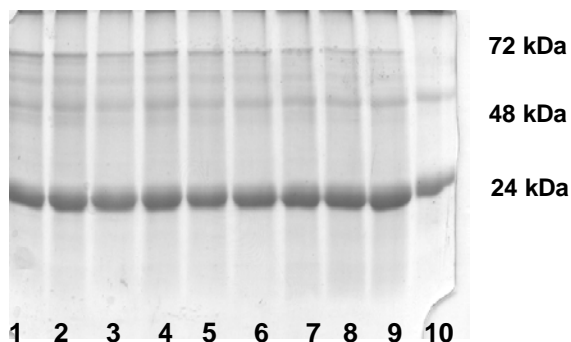


Figura 16. Líneas 1-9. Electroforesis de 9 muestras consecutivas del AgsVHBr purificado con los inmunoadsorbentes del AcM CB.Hep-1. Línea 10. Material de referencia del AgsVHBr.

El desprendimiento del ligando no superó los 3 ng IgG/µg AgsVHBr por lo cual no se afecta la pureza del antígeno purificado ni se contaminación de la vacuna con cantidades de IgG de ratón que pueden ser

inmunogénicas. De esa manera se cumple así con las especificaciones establecidas para la vacuna contra la Hepatitis B ($<3 \text{ ng IgG}/\mu\text{g AgsVHBr}$ y $>90\%$ de pureza del AgsVHBr) (Fig. 17).

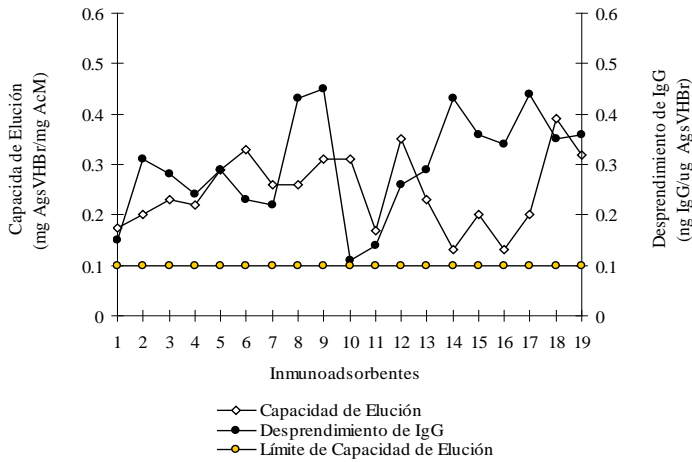


Figura 17. Capacidad de elución del AgsVHBr y desprendimiento de IgG de los inmunoadsorbentes del AcM CB.Hep-1.

4.7. Resultados de la estabilidad de los Inmunogeles del AcM CB.Hep-1.

En este estudio se evaluó la capacidad de elución y el desprendimiento del AcM CB.Hep-1 de tres inmunoadsorbentes. La capacidad de elución fue superior a los $100 \mu\text{g AgsVHBr}/\text{mg AcM}$ en dos de los inmunogeles evaluados hasta los 20 meses. En el tercer inmunogel, este parámetro cayó por debajo del límite al cabo de los 12 meses, haciendo que el promedio de los tres geles estuviera también por debajo del valor esperado (Fig. 18). El análisis del nivel de desprendimiento de ligando demostró que en ninguno de los geles evaluados el valor de IgG desprendida superó los $3 \text{ ng IgG}/\mu\text{g AgsVHBr}$ que es la especificación de calidad establecida para este producto durante 20 meses (Fig. 19).

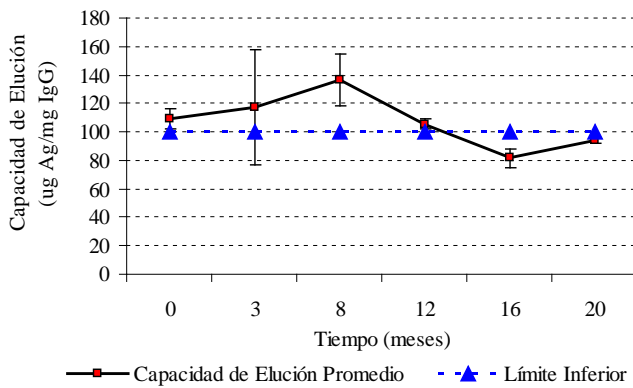


Figura 18. Capacidad de elución de los inmunogeles del AcM CB.Hep-1 durante 20 meses. La curva representa el promedio de la capacidad de elución y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad

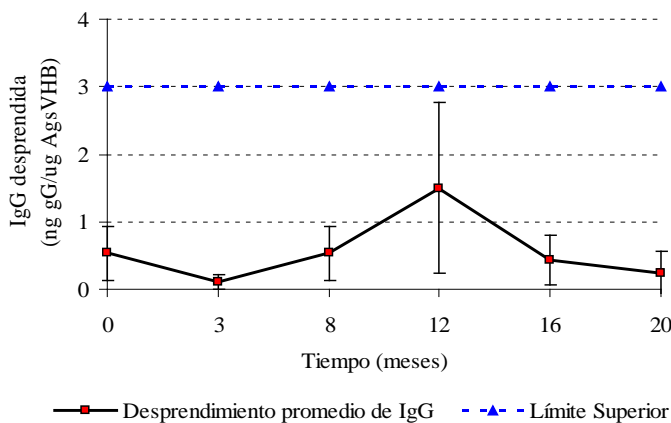


Figura 19. Desprendimiento de ligando de los inmunogeles del AcM CB.Hep-1 durante 20 meses. La curva representa el promedio del desprendimiento de IgG y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad.

4.8. Resultados de la caracterización de los contaminantes virales en las fuentes biológicas.

4.8.1. Resultados de la determinación de *Retrovirus* en el hibridoma CB.Hep-1.

La observación del hibridoma CB.Hep-1 mediante microscopía electrónica de transmisión denotó presencia de partículas parecidas a *Retrovirus* tipo C atravesando la membrana plasmática. Las partículas promediaron un tamaño entre 100-200 nm y con forma esférica. En un alto porcentaje de las células analizadas (200 células) se demostró expresión de partículas circulares que asemejan este tipo de *Retrovirus* (aparecen señaladas con flechas) (Fig. 20). Se destaca en la interpretación de esta foto que esta determinación no se considera una demostración absoluta de la presencia de este tipo de virus por lo que se requiere de ensayos más específicos de caracterización de *Retrovirus*. En ninguna de las secciones evaluadas se observaron partículas retrovirales de otro tipo.

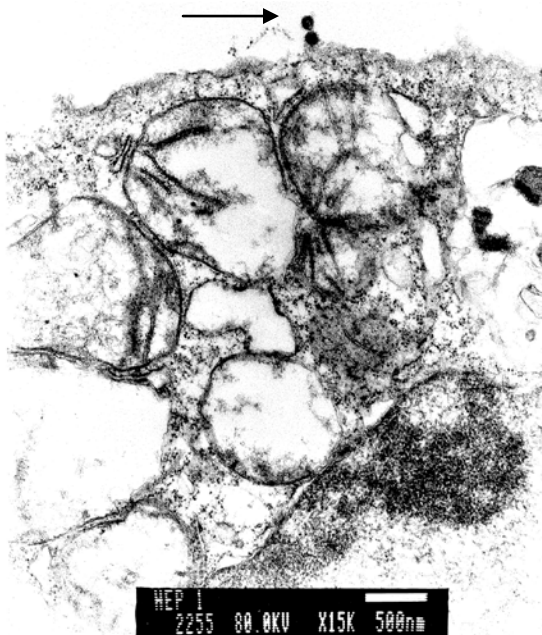


Figura 20. (A) Microscopía electrónica de transmisión del hibridoma CB.Hep-1. La flecha indica la presencia de las partículas parecidas a *Retrovirus* tipo C de 100-200 nm en el espacio exterior a las células. La magnificación empleada fue X15K.

4.8.2. Resultados de la tipificación de *Retrovirus* mediante los ensayos de foco ampliado S+L- y de placa XC.

Para determinar la presencia de *Retrovirus* murinos xenotrópicos en este hibridoma, se desarrolló la prueba directa de foco ampliado S+L-. Esta prueba está diseñada para determinar *Retrovirus* con capacidad de infección de líneas celulares de un origen diferente al ratón. Debido a que la infección *in vitro* de células con este tipo de virus de la leucemia murina no induce necesariamente cambios morfológicos en ellas, se utilizó una línea celular de visón MiCl₁ (ATCC CCL 64.1) que contiene un genoma defectivo del virus del sarcoma murino (S+), pero no contiene información para el virus de la leucemia murina (L-). Por estas razones una superinfección de esta línea celular con el virus de la leucemia murina conlleva a la expresión del virus del sarcoma y la formación de focos de infección. En el estudio del hibridoma CB.Hep-1 no se evidenció presencia de partículas de *Retrovirus* tipo C xenotrópicas, ya que no se observó el desarrollo de focos (Tabla 6, Anexo 21).

Tabla 6. Resultados de los ensayos S+L- del hibridoma CB.Hep-1 productor del AcM CB.Hep-1.

Muestras	Unidades formadoras de Focos (S+L-) detectados
Control negativo 1 (medio de cultivo)	0
Control negativo 2 (medio de cultivo)	0
Muestra 1 del hibridoma CB.Hep-1	0
Muestra 2 del hibridoma CB.Hep-1	0
Control positivo 1 (virus de la leucemia felina)	46
Control positivo 2 (virus de la leucemia felina)	57

Para la caracterización de *Retrovirus* se empleó también el ensayo de placas XC. Este es un ensayo específico para *Retrovirus* ecotrópicos, o sea con capacidad sólo para infectar células de ratones y de ratas. Se utilizó como indicador la línea celular SC-1 que carece de restricción Fv-1 y es capaz de expresar el virus ecotrópico de la leucemia murina. La línea SC-1 es altamente sensible a la presencia de este virus. Los resultados de la evaluación de nuestra línea celular tampoco evidenciaron presencia de *Retrovirus* del tipo C ecotrópicos (Tabla 7, Anexo 22).

Tabla 7. Resultados de los ensayos XC en la línea celular CB.Hep-1 productora del AcM CB.Hep-1.

Muestras	Unidades formadoras de Placas XC detectadas
Control negativo 1 (medio de cultivo)	0
Control negativo 2 (medio de cultivo)	0
Muestra 1 del hibridoma CB.Hep-1	0
Muestra 2 del hibridoma CB.Hep-1	0
Control positivo 1 (virus de la leucemia murina cepa mov-3)	18
Control positivo 2 (virus de la leucemia murina cepa mov-3)	13

4.8.3. Resultados de la determinación de virus endógenos en el hibridoma CB.Hep-1 mediante el ensayo de MAP.

De todos estos ensayos el más aceptado para la determinación de virus murinos es el MAP. Este consiste en la cuantificación de anticuerpos específicos para las entidades virales que aparecen en la Tabla 8. Se le otorga esta particular importancia porque pequeñas cantidades de virus que no pueden ser fácilmente detectadas por ensayos de cuantificación de virus *in vitro* son reconocidas por el sistema inmune de los ratones inoculados, los cuales generan una respuesta inmune fácilmente detectable por ensayos inmunoquímicos. La detección de estos anticuerpos es una medida indirecta de la presencia de virus en las muestras inoculadas. Los resultados de este ensayo tampoco evidenciaron presencia de virus en el sobrenadante del hibridoma CB.Hep-1 (Anexo 10).

Tabla 8. Resultados de la determinación de virus en el hibridoma CB.Hep-1 mediante el ensayo de MAP.

Virus Evaluados	Resultados	Virus Evaluados	Resultados
Virus hantaan	Negativo	Adenovirus	Negativo
Virus del coriomeningitis linfocítica	Negativo	Citomegalovirus	Negativo
Rotavirus de ratón	Negativo	Virus de la hepatitis murina	Negativo
Virus sendai	Negativo	Virus tímico	Negativo
Reovirus 3	Negativo	Virus de la neumonía	Negativo
Virus de la encefalomiocarditis murina	Negativo	Poliomavirus	Negativo
Virus elevador de la enzima Lactato deshidrogenasa	Negativo	Virus de la encefalomielititis murina de Theiler	Negativo
Virus diminuto de ratón	Negativo		

4.8.4. Resultados de la determinación de virus adventicios en el hibridoma CB.Hep-1 mediante la inoculación en líneas celulares sensibles a la replicación viral.

El sobrenadante del hibridoma CB.Hep-1 se sometió también a ensayos *in vitro* para la detección de virus (Tabla 9). Las líneas celulares inoculadas barrieron un amplio número de especies, desde ratón hasta primates. En ninguna de estas líneas celulares se observó el efecto citopático característico de infección viral, lo cual sugiere la ausencia de virus adventicios en este hibridoma. El pase a ciegas tampoco evidenció presencia de virus (Anexo 11).

Tabla 9. Resultados de la determinación de virus adventicios en el hibridoma CB.Hep-1.

Líneas Celulares	Nomenclatura	Efecto Citopático	Hemoadsorción de eritrocitos de cobayos
Células embrionarias humanas de pulmón	HEL	Negativo	Negativo
Cultivo terciario de células de riñón de monos verdes africanos	TAGMK	Negativo	Negativo
Células de rhabdomyosarcoma humano	RD	Negativo	Negativo
Células de pulmón de Visón	MvLu	Negativo	Negativo
Sub-línea de células de tumor cervical humano	Hela Ohio	Negativo	Negativo
Células clonadas de hígado de ratón	NCTC 1469	Negativo	Negativo
Células clonadas de tejido conectivo de ratón	L929	Negativo	Negativo
Células primarias de embriones de ratón	ME	Negativo	Negativo

4.8.5. Resultados de la determinación de virus en el hibridoma CB.Hep-1 mediante la inoculación en huevos embrionados de pollos, ratones y cobayos

Además, se realizaron varios ensayos de inoculación del sobrenadante del hibridoma CB.Hep-1 en huevos embrionados de pollos, ratones adultos, cobayos y ratones lactantes. Los huevos embrionados se inocularon en el fluido alantoideo y el saco vitelino. En este ensayo el virus de la influenza se utilizó como control positivo y el medio de cultivo como control negativo. En ninguno de los huevos embrionados se produjo la muerte del embrión y tampoco se observaron daños en la membrana corioalantoidea, ni hemoaglutinación al enfrentar el fluido alantoideo con los eritrocitos. Este efecto de hemoaglutinación se produce por interacciones entre las proteínas de la membrana citoplasmática de los eritrocitos y los virus presentes en el fluido extraído de los huevos embrionados (Anexo 12). Tampoco se observaron síntomas clínicos característicos de infección viral en los ratones adultos y los cobayos inoculados con este sobrenadante en el período desde la inoculación de la muestra hasta la eutanasia. Además, se inocularon tres grupos de 9, 12 y 16 ratones lactantes. En este ensayo se observó diversidad en el crecimiento de los ratones. Sin embargo esta diversidad no fue provocada por virus, ya que no se obtuvo evidencias de enfermedades virales. Ninguno de los ratones lactantes inoculados murió en el período de 6 semanas posterior a la inyección del inóculo (Tabla 10, Anexo 13).

Tabla 10. Resultados de la determinación de virus en el hibridoma CB.Hep-1 mediante la inoculación en animales.

Modelo Animal	Síntomas clínicos relacionados con infección viral	Análisis patológicos de cada órgano
Ratones Adultos	Negativo	Negativo
Cobayos	Negativo	Negativo
Ratones Lactantes	Negativo	Negativo

4.8.6. Resultados de los análisis serológicos a la colonia de ratones BALB/c.

Los programas de vigilancia son aquellos utilizados para monitorear el estatus de salud de los animales empleados en la producción de biológicos. Dentro de estos, los análisis serológicos juegan un papel clave. Las pruebas serológicas realizadas a los sueros de los ratones BALB/c empleados en la producción de ascitis contra las entidades virales exigidas por las agencias regulatorias no mostraron presencia de anticuerpos contra ninguna de los virus evaluados. Este ensayo consistió en la determinación directa en los sueros de los animales de anticuerpos contra los virus endógenos de ratón mediante la técnica de ELISA e inmunofluorescencia (Anexo 14). Sin embargo, debe considerarse que no todos los virus endógenos estimulan la producción de anticuerpo, pues la respuesta inmune que se produce contra estos es de origen celular y que hay períodos denominados de ventana donde no hay todavía expresión de anticuerpos contra un antígeno dado.

4.8.7. Resultados de la determinación de virus endógenos en la ascitis mediante el ensayo de MAP.

La técnica de MAP es muy empleada por su capacidad para detectar una número amplio de virus endógenos como se explica en el acápite anterior. No obstante posee las limitaciones de los ensayos serológicos. En resumen esta consiste en inocular la ascitis por varias rutas (intracraneal, intranasal, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal) en ratones con mayor sensibilidad a infecciones por virus para medir la presencia de anticuerpos contra las entidades virales endógenas. Este es por ende el punto más importante de caracterización del material de entrada al proceso de purificación de cualquier molécula que se pretenda aislar de esta fuente biológica. Los resultados tampoco demostraron presencia de anticuerpos en el suero de los ratones inoculados con la ascitis contra cada uno de los virus endógenos evaluados (Tabla 11, Anexo 15).

Tabla 11. Resultados de la determinación de virus endógenos en la ascitis mediante el ensayo de MAP.

Virus Evaluados	Resultados
Virus hantaan	Negativo
Virus del coriomeningitis linfocítica	Negativo
Rotavirus de ratón	Negativo
Virus sendai	Negativo
Reovirus 3	Negativo
Virus de la encefalomiocarditis murina	Negativo
Virus elevador de la enzima Lactato deshidrogenasa	Negativo
Virus diminuto de ratón	Negativo
Adenovirus	Negativo
Citomegalovirus	Negativo
Virus de la hepatitis murina	Negativo
Virus tímico	Negativo
Virus de la neumonía	Negativo
Poliomavirus	Negativo
Virus de la encefalomielitis murina de Theiler	Negativo

4.8.8. Resultados de la determinación de virus adventicios en la ascitis mediante el ensayo de inoculación en líneas celulares sensibles a replicación viral.

Este ensayo tiene gran importancia, pues tiene la sensibilidad suficiente para detectar virus adventicios en la fuente biológica de mayor relevancia para la demostración de la capacidad de remoción e inactivación de virus modelos, ya que es el material inicial del método de purificación. Al igual que en el ensayo de detección de virus mediante la inoculación del sobrenadante del hibridoma en células sensibles a replicación viral se utilizan células de primates para descartar la presencia de virus con poder infectivo o patogénico en el hombre. Los resultados indicaron que la muestra de ascitis evaluada no contiene virus con capacidad de producir efecto citopático o hemoaglutinación en las líneas celulares utilizadas (Tabla 12, Anexo 23).

Tabla 12. Líneas celulares, y cepas virales empleadas en la determinación de virus.

Líneas Celulares	Resultados	Cepas Virales (controles positivos)
Vero (ATCC 81) células de riñón (mono Rhesus)	Negativo	parainfluenza bovina tipo 3, cepa SF-4 (ATCC VR 281)
MRC-1 (ATCC 171) células diploides de pulmón (humanas)	Negativo	sarampión, cepa Edmonton (ATCC VR 24)
A9 (ATCC CCL 1.4) células derivadas de la línea NCTC (929) (ratón)	Negativo	virus diminuto de ratón (ATCC VR 1346)

4.9. Desescalado del método de purificación del AcM CB.Hep-1.

Para los experimentos de desafío del método de purificación del AcM CB.Hep-1 con virus modelos se realizó primeramente un desescalado 1/100 del método de purificación de este AcM. Esta escala es el 1% de la escala real de purificación. El desescalado se realizó empleando como criterio principal el Tr constante durante el paso de purificación más importante (cromatografía de afinidad en Protein A-Sepharose). La Tabla 13 muestra los criterios seguidos durante el desescalado. La pureza, la actividad específica del AcM CB.Hep-1 y el rendimiento del método de purificación fueron los parámetros empleados para demostrar similitud entre ambas escalas del método de purificación.

En resumen, el AcM CB.Hep-1 obtenido reprodujo las especificaciones de calidad del AcM purificado a la escala real. El análisis estadístico demostró diferencias no significativas en todos los parámetros evaluados entre ambas escalas según la prueba de comparación de medias basada en la distribución t-Student para un 95% de significación estadística. Los valores de probabilidad para cada parámetro fueron, pureza del AcM CB.Hep-1 ($p=1.0000$); actividad específica ($p=0.2723$) y rendimiento ($p=0.4954$).

Tabla 13. Criterios seguidos para el desescalado y resultados de las especificaciones de calidad del AcM CB.Hep-1.

Criterios	Escala Real	Escala 1/100	Escala Real	Escala 1/100
Volumen inicial (mL)	5000	50	-	-
Condiciones de la precipitación salina 1	Sulfato de Amonio (100% de saturación)	Igual	-	-
Centrifugación 1	4800xg	Igual	-	-
Condiciones de la precipitación salina 2	Sulfato de Amonio (50 % de saturación)	Igual	-	-
Centrifugación 2	4800xg	Igual	-	-
Matriz empleada en la cromatografía de exclusión molecular	Sephadex G-25	Igual	-	-
Volumen aplicado en la cromatografía de exclusión molecular (mL)	30-40	Igual		
Matriz empleada en la cromatografía de afinidad	Protein A-Sepharose	Igual	-	-
Tiempo de residencia en la cromatografía de afinidad (h)	0.1	Igual	-	-
Altura del lecho cromatográfico (cm)	5	Igual	-	-
Diámetro de la columna de la cromatografía de afinidad (cm)	6	0.8	-	-
Temperatura (°C)	4	Igual	-	-
Razón de carga en la cromatografía de afinidad (mg/mL)	20	Igual	-	-
Pureza del AcM CB.Hep-1 (%)	≥90	Igual	98±1.0	98±1.0
Actividad Específica del AcM CB.Hep-1 (%)	≥70	Igual	131.6±8.5	123.1±8.2
Rendimiento (mg IgG/mL de ascitis)	1-2	Igual	1.59±0.2	1.70±0.2

Este desescalado fue también validado en presencia de cada virus modelo. La presencia de estos virus no afectó la capacidad del método para purificar el AcM CB.Hep-1 (Tabla 14) con alta pureza, actividad específica y rendimiento, pues todos estos parámetros estuvieron por encima del valor de corte establecido. Sin embargo, cuando se analizaron más en detalle los datos se observó que sí hay un comportamiento diferente de la cromatografía de afinidad ante la presencia de cada modelo viral. Por ejemplo el análisis de varianza (ANOVA de simple factor) aplicado a los resultados de cada parámetro en presencia de los virus modelos demostró diferencias significativas en todos los casos. Los valores de la probabilidad asociada para un nivel de confianza del 95% fueron; actividad específica ($p=0.0176$), pureza en condiciones reductoras ($p=0.0289$) y rendimiento ($p=0.0341$). La aplicación de la prueba de intervalos múltiples (DUNCAN) para encontrar entre que variables hubo diferencias significativas definió que en lo referido a la actividad específica todos los experimentos, excepto con el virus sendai, dieron diferencias significativas comparado con el control (sin virus). En el análisis de la pureza las diferencias significativas se encontraron entre los experimentos realizados con el VIH-1, virus sendai y PVC con respecto al experimento control y en el análisis del rendimiento, las diferencias significativas se encontraron entre el VHS y el PVC con respecto al experimento sin virus modelos.

Tabla 14. Resultados de la purificación del AcM CB.Hep-1 en la escala (1/100) en presencia de virus modelos.

Crterios	Pureza del AcM CB.Hep-1 (%)	Actividad Específica del AcM CB.Hep-1 (%)	Rendimiento (mg IgG/mL ascitis)
Escala 1/100 + virus sendai	93.0±2.7	119.6±25.7	1.70±0.2
Escala 1/100 + VIH-1	92.2±2.1	93.8±2.0	1.26±0.2
Escala 1/100 + VHS-1	97.4±1.5	97.3±1.5	1.06±0.1
Escala 1/100 + PVH- 2	91.7±2.0	91.8±1.9	1.20±0.1
Escala 1/100 + PVC	91.8±2.1	92.8±2.9	1.40±0.2
Valor de p (95%) de confianza	0.0289	0.0176	0.0341

4.10. Resultados de la determinación de la capacidad de remoción de virus modelos del método de purificación del AcM CB.Hep-1 (cromatografía de afinidad).

4.10.1. Virus envueltos (virus sendai, VIH-1 y VHS-1)

Virus sendai

Para demostrar la capacidad de remoción del virus sendai se realizaron dos experimentos. Un experimento inoculando la ascitis con 4.4 Logs y el otro con 8.4 Logs del virus sendai respectivamente. En ambos experimentos el virus sendai fue titulado mediante la determinación de la DIE_{50/mL} (huevos embrionados de pollos). Se demostró que este virus fue mayoritariamente removido en la cromatografía de afinidad con un máximo de remoción de 7.2 Logs (Tabla 15) por lo cual los pasos de precipitación salina y desalado en la cromatografía de exclusión molecular no aportaron niveles importantes de remoción de este modelo viral. El tampón PBS 150 mM; pH 8 no demostró efecto tóxico en los huevos embrionados, mientras que el ácido cítrico 100 mM; pH 7 y el Tris 2M si demostró toxicidad en los embriones de pollos pero sólo en la primera dilución. Las muestras con altas concentraciones de (NH₄)₂S₀₄ mostraron una subestimación del título viral de 1-2 Log. Probablemente esta diferencia esté dada por un reparto heterogéneo del virus en el material resuspendido después de la precipitación salina 2.

Tabla 15. Resultados del experimento de remoción del virus sendai. La DIE_{50/mL} fue evaluada en huevos embrionados de pollos SPF.

Muestras/Réplicas	Expto-I (Logs)	Expto-II (Logs)	Expto-III (Logs)	Expto-IV (Logs)
Ascitis precipitada sin virus (control negativo)	≤1.3	≤1.3	≤1.3	≤1.3
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (desalado)+virus	4.2	4.4	4.0	8.4
Fracción no adsorbida en la cromatografía de afinidad	4.2	4.2	3.6	7.2
Eluato de la cromatografía de afinidad	≤1.3	≤1.3	≤1.3	≤1.3
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (cambio de tampón)	≤1.3	≤1.3	≤1.3	≤1.3
Tampón PBS 150 mM; pH 8	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No tóxico
Tampón ácido cítrico 100 mM; pH 7	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)
Capacidad de Remoción	4.2	4.4	4.0	7.2

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (virus de ARN)

Debido a que los *Retrovirus* son virus obligados en las preparaciones de hibridomas murinos (Adanson, 1998), se evaluó también la capacidad de remoción del VIH-1. Este virus comparte propiedades físico-químicas con el virus sendai (genoma, envoltura, tamaño resistencia ante los agentes físico-químicos).

Teniendo en cuenta la subestimación observada en las muestras semipurificadas y que la remoción del virus sendai ocurrió en la cromatografía de afinidad, se procedió a desafiar sólo este paso cromatográfico. De esta forma se trabajó también con los restantes virus modelos (VHS-1, PVH-2 y PVC). En este experimento la ascitis desalinizada se inoculó con 5.6-5.9 Logs del VIH-1. Los resultados reprodujeron los obtenidos con el virus sendai en cuanto a que casi todo el virus, 85.9%, aparece en la fracción no adsorbida de esta cromatografía de afinidad. La capacidad de remoción observada fue de 4.30 ± 0.19 Logs (Tabla 16). No se pudo demostrar una capacidad de remoción viral mayor por el bajo título de inóculo viral. El tampón en el cual quedó el AcM al final del método de purificación Tris 20 mM/NaCl 150mM; pH 7.6 demostró toxicidad en las células MT4 en la primera dilución por lo que se decidió cambiar a PBS 150 mM; pH 8, aunque esto no afecta el cálculo del título viral, ya que se requiere de diluciones mayores para titular las fracciones con virus.

Tabla 16. Resultados de los experimentos de remoción del VIH-1 en la cromatografía de afinidad. La $DICC_{50/mL}$, fue evaluada en células MT4.

Muestras/Réplicas	Expto I (Logs)	Expto II (Logs)	Expto III (Logs)
Virus (control positivo)	7.6	7.6	7.6
Ascitis precipitada sin virus (control negativo)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (desalado)+virus	5.7	5.7	5.9
Fracción no adsorbida en la cromatografía de afinidad	5.5	5.4	4.7
Eluato de la cromatografía de afinidad	≤ 1.3	≤ 1.3	≤ 1.3
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (cambio de tampón)	≤ 1.3	≤ 1.3	≤ 1.3
Tampón PBS 150 mM; pH 8	No tóxico	No tóxico	No tóxico
Tampón Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)
Capacidad de Remoción	4.21	4.40	4.66

Virus herpes simple humano tipo 1 (virus de ADN)

El VHS-1 es un virus de ADN, envuelto con un tamaño de 100-200 nm por lo que difiere con el virus sendai y el VIH-1. En los experimentos de reto con este modelo viral se logró una capacidad de remoción de 6.03 ± 0.32 Logs (Tabla 17) y se evidenció que también fue removido casi totalmente, pues el 86.2% del virus aplicado se encontró en la fracción no adsorbida a la matriz de la cromatografía de afinidad. Los ensayos de toxicidad en las células Vero del tampón empleado (Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6) en la purificación y el material desalinizado previo a la aplicación a la cromatografía de afinidad demostraron toxicidad en la primera dilución del ensayo de microtitulación. Esto no afectó la cuantificación del efecto citopático, ya que las diluciones requeridas para medir el mismo fueron superiores. El tampón PBS 150 mM; pH 8 no demostró toxicidad en las células Vero.

Tabla 17. Resultados de los experimentos de remoción del VHS-1. La $DICC_{50/mL}$ se evaluó en células Vero.

Muestras/Réplicas	Expto-I (Logs)	Expto-II (Logs)	Expto-III (Logs)
Virus (control positivo)	8.5	8.5	8.5
Ascitis precipitada sin virus (control negativo)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (desalado)+virus	7.5	7.5	7.5
Fracción no adsorbida en la cromatografía de afinidad	7.24	7.2	7.5
Eluato de la cromatografía de afinidad	<1.3	<1.3	<1.3
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (cambio de tampón)	<1.3	<1.3	<1.3
Tampón PBS 150 mM; pH 8	No tóxico	No tóxico	No tóxico
Tampón Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)
Capacidad de Remoción	5.9	5.8	6.4

4.10.2. Virus desnudos (PVH-2 y PVC)

Poliovirus humano tipo 2 (virus de ARN)

El PVH-2 es un virus de ARN de aproximadamente 30 nm lo cual es de mucho interés para los estudios de validación, ya que su interacción con las matrices cromatográficas puede ser diferentes a los virus envueltos y de gran tamaño (Cameron y cols., 1997). Con este modelo viral se logró una capacidad de remoción de 4.87 ± 0.12 Logs (Tabla 18). Se observó también una interferencia importante en la titulación de la muestra de la fracción no adsorbida a la cromatografía de afinidad. En esta muestra se produjo una sobreestimación del título viral por lo que no pudo conocerse con certeza si el virus que no fue encontrado en el eluato de la cromatografía de afinidad está totalmente en la fracción no adsorbida o en interacción con la matriz cromatográfica debido a su pequeño tamaño. No obstante, la coincidencia entre los resultados de titulación viral del eluato de la cromatografía de afinidad y los de la cromatografía de exclusión molecular (cambio de tampón) ratifica que los resultados de los eluatos son correctos.

Tabla 18. Resultados de los experimentos de remoción del PVH- 2. La $DICC_{50/mL}$ se evaluó en células Vero.

Muestras/Réplicas	Expto-I (Logs)	Expto-II (Logs)	Expto-III (Logs)
Virus (control positivo)	9.25	9.25	9.25
Ascitis precipitada sin virus (control negativo)	Tóx. (1:4)	Tóx. (1:4)	Tóx. (1:4)
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (desalado)+virus	9.25	9.25	9.25
Fracción no adsorbida en la cromatografía de afinidad	7.6	7.7	7.5
Eluato de la cromatografía de afinidad	4.29	4.47	4.40
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (cambio de tampón)	4.80	4.80	4.05
Tampón PBS 150 mM; pH 8	No tóxico	No tóxico	No tóxico
Tampón Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)
Capacidad de Remoción	5.0	4.77	4.84

Parvovirus canino (virus de ADN)

En el desafío del método de purificación del AcM CB.Hep-1 con el PVC, se logró una capacidad de remoción de sólo 2.81 ± 0.34 Logs (Tabla 19). Al igual que en el caso del PVH-2, este resultado podría

estar relacionado con las características del virus, fundamentalmente su tamaño (18-25 nm). Este pequeño tamaño puede contribuir a una mayor retención o interacción con la matriz de afinidad, dificultando así su remoción efectiva. También se observó sobreestimación ($\approx +2.5$ Logs) en la muestra de la fracción no adsorbida en la cromatografía de afinidad. El efecto de los tampones sobre la línea celular fue similar al observado en células Vero toxicidad en la primera dilución pero sin afectar la determinación del efecto citopático de los virus que alcanzan altos títulos en cultivo.

Tabla 19. Resultados de los experimentos de remoción del PVC. La $DICC_{50/mL}$ se estimó en células LFBC.

Muestras/Réplicas	Expto I (Logs)	Expto II (Logs)	Expto III (Logs)
PVC (control positivo)	7.68	7.72	7.72
Ascitis precipitada sin PVC (control negativo)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (desalado)+virus	7.52	7.52	7.52
Fracción no adsorbida en la cromatografía de afinidad	5.51	5.82	5.52
Eluato de la cromatografía de afinidad	4.91	4.31	4.91
Eluato de la cromatografía de exclusión molecular (cambio de tampón)	4.67	4.31	4.91
Tampón PBS 150 mM; pH 8	No tóxico	No tóxico	No tóxico
Tampón Tris 20 mM/NaCl 150 mM; pH 7.6	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)	Tóx. (1:2)
Capacidad de Remoción	2.61	3.21	2.61

Resumen de los experimentos de remoción viral del método de purificación del AcM CB.Hep-1

El paso que aportó mayor nivel de remoción en los experimentos con el virus sendai fue la cromatografía de afinidad. Los virus de mayor tamaño (sendai, VHI-1 y VHS-1) experimentaron mayor nivel de remoción ($>86\%$ en la fracción no adsorbida) lo que indica una débil interacción con la matriz cromatográfica en estas condiciones experimentales. Por el contrario, los virus de menor tamaño (PVH-2 y PVC) son los que menos se remueven en esta cromatografía de afinidad, pues se encontró sólo el 57.3% solamente en los eluatos de la cromatografía de afinidad (Fig. 21). Estos resultados fueron independientes de la presencia de envoltura viral y del tipo de genoma, por lo que el elemento más importante en este tipo de experimento fue el tamaño de los virus. La cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose garantizó una alta capacidad de remoción (≥ 4 Logs) de los virus envueltos y de gran tamaño al igual que del PVC (virus desnudo), pero no para los virus con propiedades similares al PVH-2. En el caso del VIH-1 no demostró un mayor nivel de remoción (>4.3 Logs) por el bajo título de la cepa viral.

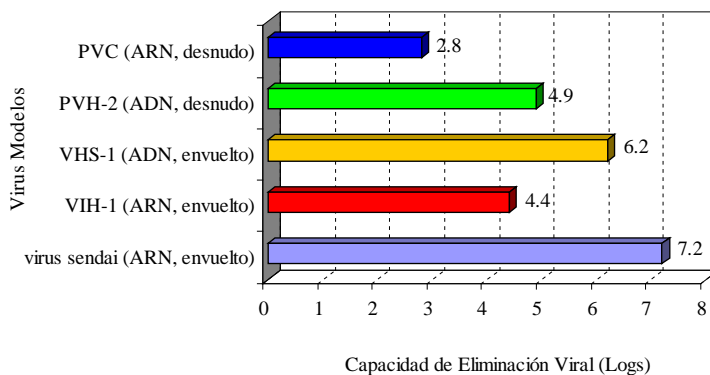


Figura 21. Resumen de la capacidad de remoción de los virus modelos del método de purificación, escala 1/100, del AcM CB.Hep-1. Estas barras representan la media de tres réplicas experimentales.

4.11. Resultados de la determinación de la capacidad de inactivación de virus modelos del etanol

4.11.1. Virus envueltos (VIH-1 y VHS-1)

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (virus de ARN)

Un aspecto de mucha importancia es la retención de los virus en las matrices cromatográficas. Esto puede conllevar a que el funcionamiento de las matrices no sea igual cuando grandes cantidades de virus se hayan acumulado tras sucesivas corridas (Wilkomen, 2006). Esta matriz de afinidad (Protein A-Sepharose) tiene estimada una estabilidad de 100-150 ciclos de purificación, por lo cual la acumulación de partículas virales puede llegar a ser significativa. En aras de demostrar la capacidad del etanol para inactivar virus, se realizaron dos cinéticas de inactivación viral en etanol al 70 y al 20% respectivamente. Los resultados con el VIH-1 indicaron una inactivación de 4.78 ± 0.22 con el etanol al 70% (Fig. 22A) y 3.7 ± 0.19 Logs con etanol al 20% (Fig. 22B). Las cinéticas de inactivación fueron similares en ambos porcentajes de etanol, demostrando la alta sensibilidad de este virus a este solvente orgánico. Después de los 15 min de inactivación no se pudo demostrar un nivel superior de inactivación por la sensibilidad de la técnica de microtitulación (1.3 Logs).

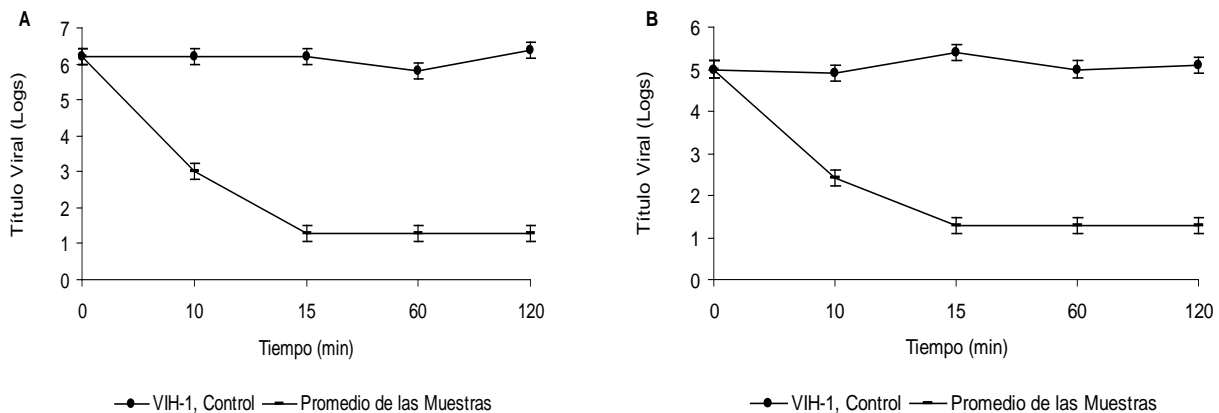


Figura 22. Inactivación del VIH-1 con etanol al 70% (A) y con etanol al 20% (B) a 4°C durante 120 min. Estos gráficos representan la media y la desviación estándar de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales sin etanol. (—) Promedio del título viral en las muestras tratadas con etanol.

Virus herpes simple humano tipo 1 (virus de ADN)

En el experimento con el VHS-1, el etanol al 70% inactivó 4.90 ± 0.22 Logs en 15 min (Fig. 23A), mientras que el etanol al 20% inactivó 4.0 ± 0.25 Logs también en 15 min (Fig. 23B). En estos experimentos no se pudo demostrar un nivel superior de inactivación por el título de la cepa viral al inicio del experimento. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores donde se demuestra una reducción de la carga infectiva de este virus de 4.91-5.72 Logs en 20 y 40% de etanol respectivamente en los primeros minutos del fraccionamiento alcohólico durante la purificación de Ig humana a partir de plasma (Ruibal, 1999).

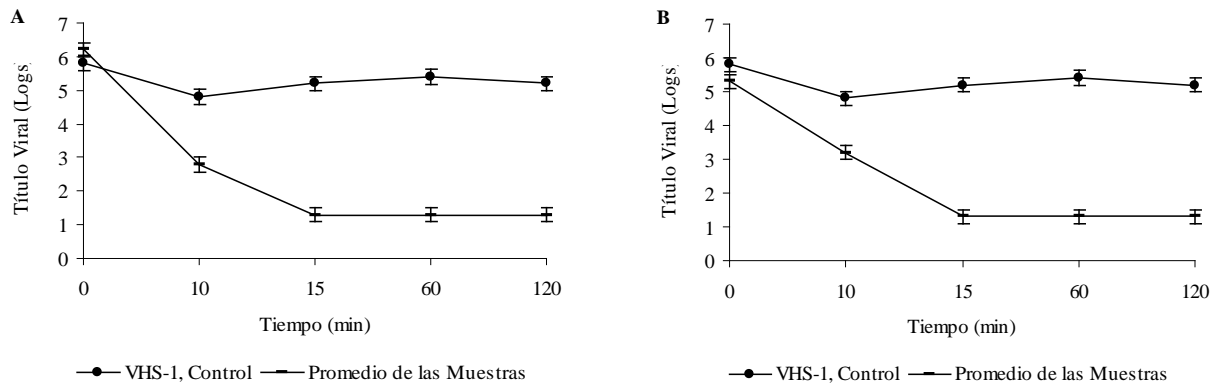


Figura 23. Inactivación del VHS-1 en etanol al 70% (A) y al 20% (B) a 4°C durante 120 min. Este gráfico representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales sin Etanol. (—) Promedio del título viral en las muestras tratadas con etanol.

4.11.2. Virus desnudos (PVH-2, PVC)

Poliovirus humano tipo 2 (virus de ARN)

La propiedad de este virus de no ser removido completamente en la cromatografía de afinidad exige la demostración de que el método de higienización de la matriz cromatográfica sea efectivo. Sin embargo, el etanol 70% logró una pobre inactivación de sólo 1.86 ± 0.87 Logs en 72 hrs de tratamiento (Fig. 24A). El etanol al 20% tampoco logró inactivar el PVH-2 en 72 hrs como se observa en la figura 24B (2.3 ± 0.34 Logs).

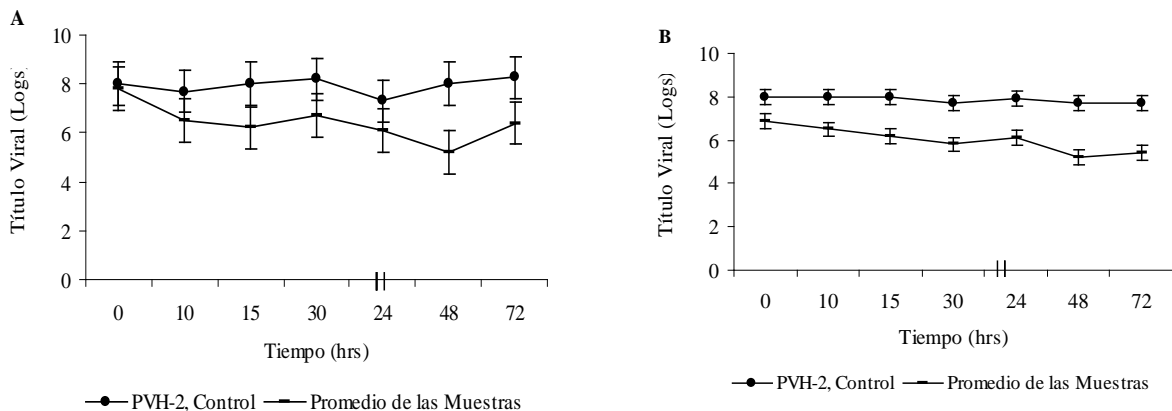


Figura 24. Inactivación del PVH-2 en etanol al 70 (A) y al 20% (B) a 4°C durante 72 hrs. Estos gráficos representan la media y la desviación estándar de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales sin etanol. (—) Promedio del título viral en las muestras tratadas con etanol. Todos los tiempos por debajo de 24 hrs están expresados en minutos.

Parvovirus canino (virus de ADN)

Los experimentos de inactivación del PVC por el etanol poseen también gran importancia debido al bajo nivel de remoción del método de purificación del AcM CB.Hep-1. En esta Tesis el etanol al 70% logró 4.90 ± 0.15 Logs de inactivación en 12 hrs de tratamiento (Fig. 25A), mientras que el etanol al 20% logró

sólo 1.2 ± 0.19 Logs de inactivación a las 72 hrs de incubación (Fig. 25B). Resulta interesante el nivel de inactivación del PVC en Etanol 70%, ya que la ausencia de envoltura viral le aporta un alto grado de resistencia ante los solventes orgánicos. Estos resultados demuestran que el procedimiento de higienización de la matriz de afinidad con etanol al 70% es muy efectivo (>4 Logs) en caso de que grandes cantidades de que virus con estas propiedades físicas y químicas se acumulen tras sucesivos ciclos de purificación del AcM CB.Hep-1. También se observó diferencia en el comportamiento del virus ante este solvente en comparación con el otro virus desnudo (PVH-2), el cual no fue inactivado por el etanol al 70%.

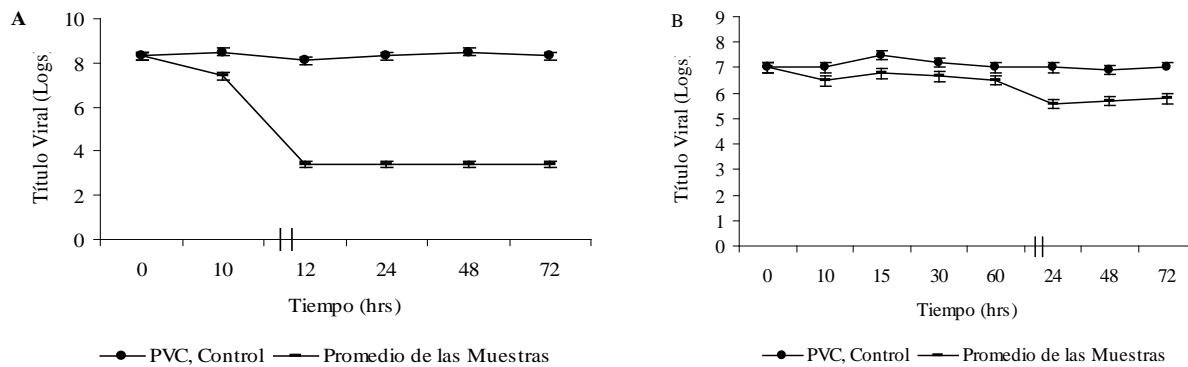


Figura 25. Inactivación del PVC en etanol al 70 (A) y al 20% a 4°C (B) durante 72 hrs. Estos gráficos representan la media y la desviación estándar de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales sin etanol. (◻) Promedio del título viral de las muestras tratadas con etanol. Todos los tiempos por debajo de 12 hrs (A) y 24 hrs (B) están expresados en minutos.

Resumen de los experimentos de inactivación de virus modelos con etanol al 70% y al 20%.

El etanol al 70% fue efectivo para los virus envueltos y el PVC (virus desnudo). El VIH-1 fue inactivado en 4.78 ± 0.20 Logs en 15 min de tratamiento y el VHS-1 en 4.90 ± 0.20 Logs en el mismo tiempo de incubación (Fig. 26). Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que el VIH-1 y el VHS-1 son los virus más sensibles a los agentes químicos producto de la presencia de la envoltura viral. Los virus desnudos resultan ser muy resistentes a estas condiciones por lo que el PVH-2 no fue inactivado (2.60 ± 0.87 Logs/72 hrs) en ambos porcentos de etanol, sin embargo el PVC demostró un elevado nivel de inactivación (4.90 ± 0.15 Logs/12 hrs) aunque en un tiempo superior a los virus envueltos. El etanol 20% no demostró capacidad de inactivación para ninguno de los dos virus desnudos (PVH-2 y el PVC) en el tiempo evaluado (72 hrs), pero sí inactivó en 3.7 ± 0.19 Logs/15 min y 4.0 ± 0.22 Logs/15 min el VIH-1 y el VHS-1 respectivamente (Fig. 27).

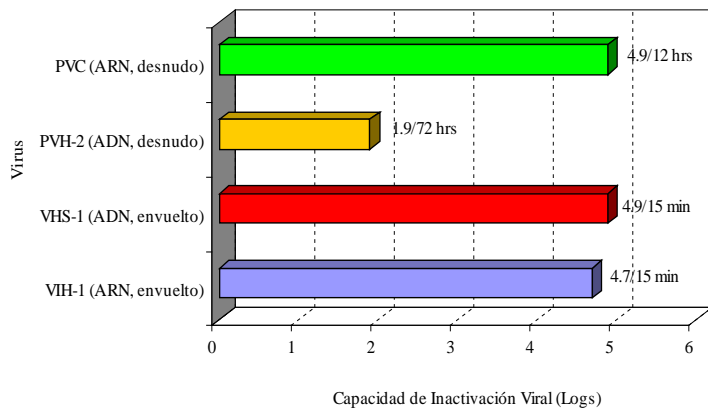


Figura 26. Resumen de la capacidad de inactivación de virus modelos por el etanol al 70%.

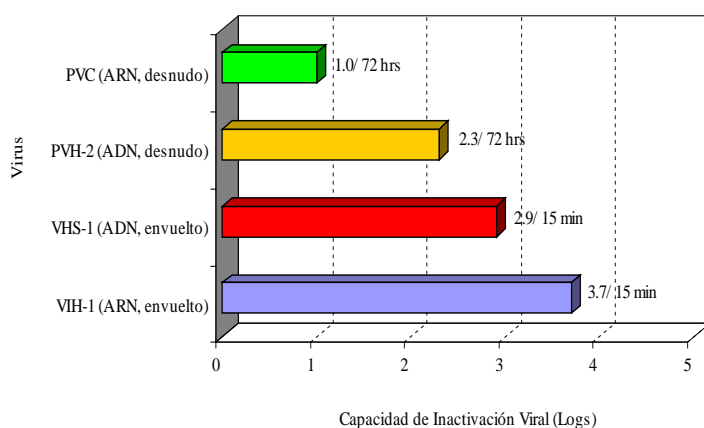


Figura 27. Resumen de la capacidad de inactivación de virus modelos por el etanol al 20%.

4.12. Resultados de la capacidad de inactivación de virus modelos del ácido cítrico 100 mM; pH 3.

4.12.1. Estabilidad del AcM CB.Hep-1 en ácido cítrico 100 mM; pH 3.

Los anticuerpos pueden disociarse de la Protein A-Sepharose utilizando concentraciones moderadas de solventes orgánicos fuertes (Gagnon, 1996). Pero la probabilidad de desnaturalización del anticuerpo de interés obliga al uso de otros agentes de elución. La elución en este tipo de cromatografía es básicamente llevada a cabo mediante una reducción del pH, lo cual implica también riesgo de desnaturalización pero en un menor grado que con los solventes orgánicos. Aprovechando la bondad de esta cromatografía de afinidad de eluir el AcM CB.Hep-1 con ácido cítrico 100 mM; pH 3, procedimos a medir la capacidad de inactivación viral de este tampón. Antes de evaluar su capacidad de inactivación viral, evaluamos la estabilidad del AcM CB.Hep-1 en este tampón para estimar el tiempo de los posteriores estudios de inactivación viral. En la [figura 28](#) se observa la actividad específica del AcM CB.Hep-1 en ácido cítrico 100 mM; pH 3, donde se demostró que este AcM conservó cerca de un 80% de su actividad específica al cabo de 7 hrs en estas condiciones. Se consideró este límite de 80% porque el ELISA utilizado para medir concentración del AcM CB.Hep-1 puede tener un coeficiente de variación interensayo de hasta 20%.

La actividad específica del AcM CB.Hep-1 se evaluó también en este tampón pero en presencia de cada virus modelo. Los resultados son comparables con los obtenidos en los experimentos de inactivación del AcM CB.Hep-1 en ausencia de virus modelos, demostrando así que la presencia de estos no aporta

pérdida de la actividad específica del AcM CB.Hep-1 durante 7 hrs por debajo del valor preestablecido (70%, especificación de calidad) (Fig. 29). El análisis de varianza de simple factor aplicado para un 95% de confianza tampoco mostró diferencias significativas entre estas muestras ($p=0.7600$).

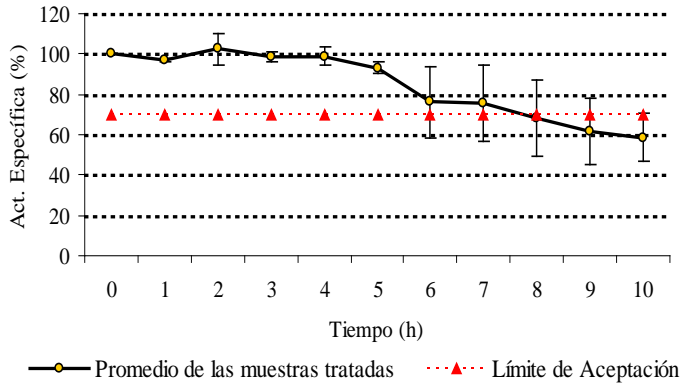


Figura 28. Cinética de inactivación del AcM CB.Hep-1 en ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C. Esta curva representa la media y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad de tres réplicas. (●) Promedio de la actividad específica del AcM CB.Hep-1 incubado en ácido cítrico.

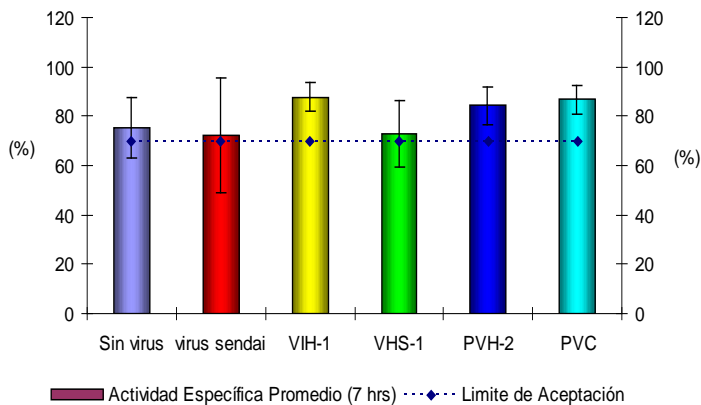


Figura 29. Actividad específica del AcM CB.Hep-1 en presencia de virus modelos en ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C. Estas barras representan la media y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad de tres réplicas experimentales.

4.12.2. Virus envueltos (virus sendai, VIH-1 y VHS-1)

Virus sendai (virus de ARN)

Para medir la capacidad de inactivación del virus sendai a pH ácido con independencia de la temperatura, se incubaron las muestras en ácido cítrico 100 mM; pH 3, 4°C y se compararon con un control viral incubado a 4°C pero a pH fisiológico. El inóculo viral incubado a pH fisiológico no perdió su capacidad infectiva en 7 hrs en ninguno de los experimentos realizados. Sin embargo, la inactivación del virus sendai a pH ácido ocurrió en la primera hora de incubación, lo cual indica que la misma fue dependiente del pH y no de la temperatura. El máximo valor de inactivación del virus sendai demostrado en este experimento con ácido cítrico 100 mM; pH 3, 4°C fue de 7.4 ± 0.20 Logs en 1 h (Fig. 30).

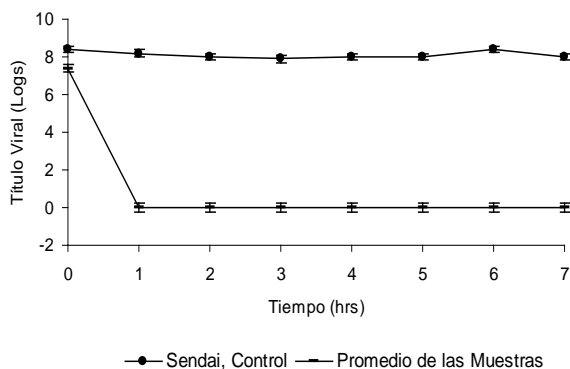


Figura 30. Inactivación del virus sendai en ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C. Estas curvas representan la media de tres réplicas y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales pero a pH neutro. (–) Media del título viral de las muestras experimentales tratadas a pH ácido.

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (virus de ARN)

Para investigar la capacidad de inactivación del VIH-1, se utilizaron 7.7 Logs de este virus modelo. La capacidad de inactivación viral demostrada fue $4.8 \pm 0.17/10$ min (Fig. 31). Esto garantiza que cualquier *Retrovirus* que pueda estar presente en el eluato de la cromatografía de afinidad basada en Protein-A Sepharose en un momento dado no puede llegar al final del proceso con capacidad infectiva. El tampón utilizado sólo evidenció toxicidad en las células MT4 en la dilución 1:2 por lo que se puede considerar que no se afectan los resultados experimentales.

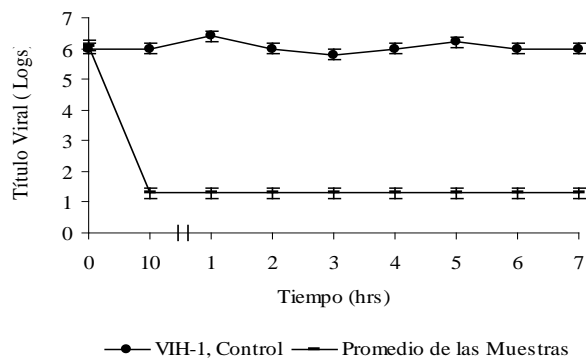


Figura 31. Inactivación del VIH-1 en ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C. Este gráfico representa la media y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales pero a pH neutro. (—) Media del título viral de las muestras experimentales tratadas a pH ácido. El número 10 en el eje x significa 10 min.

Virus herpes simple humano tipo 1

El VHS-1 posee baja capacidad de resistencia a pH ácido (Harbour y Woodhouse, 1990). Esta baja resistencia se debe también a la presencia de envoltura viral con proteínas que se desnaturalizan ante esta condición química. En este trabajo, la exposición del VHS-1 a una temperatura de 4°C a pH fisiológico durante 7 hrs no afectó su capacidad infectiva. Sin embargo, el ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C manifestó un potente poder de inactivación sobre el VHS-1, alcanzándose un factor de inactivación de 8.3 ± 0.25 Logs en 1 h (Fig. 32).

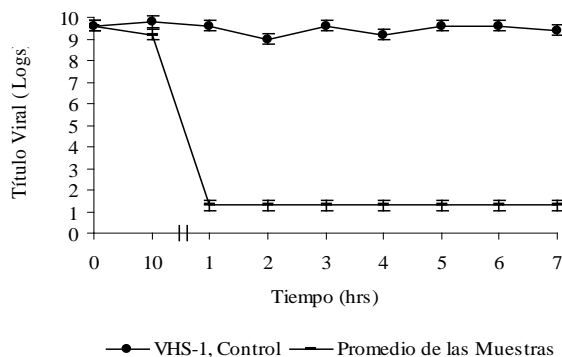


Figura 32. Inactivación del VHS-1 en ácido cítrico 100 mM; pH 3, 4°C durante 7 hrs. Estas curvas representan la media de tres réplicas y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales pero a pH neutro. (—) Media del título viral de las muestras experimentales tratadas a pH ácido. El número 10 en el eje x significa 10 min.

4.12.3. Virus desnudos (PVH-2, PVC)

Poliovirus humano tipo 2 (virus de ARN)

El tampón de elución de la cromatografía de afinidad se desafió con 12 Logs del PVH-2 debido a los altos títulos que alcanza este modelo viral en cultivo de células susceptibles a su replicación. No se observó

inactivación de este virus bajo estas condiciones, por lo cual este paso del método de purificación del AcM CB.Hep-1 no aporta nivel de inactivación (0.1 ± 0.39 Logs/7 hrs) de virus con propiedades físico-químicas similares al PHV-2 (Fig. 33).

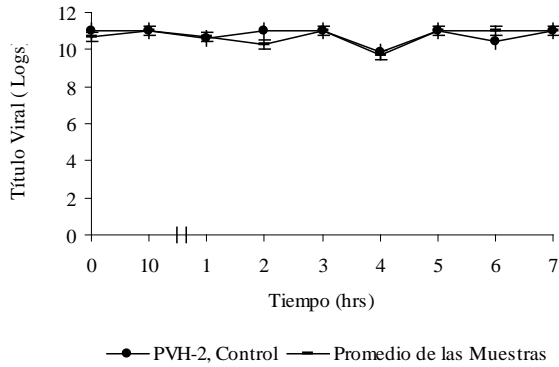


Figura 33. Inactivación del PVH-2 en ácido cítrico 100 mM; pH 3, 4°C durante 7 hrs. Estas curvas representan la media y el intervalo de confianza para un 95 de probabilidad de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales pero a pH neutro. (—) Media del título viral de las muestras experimentales tratadas a pH ácido. El número 10 en el eje x significa 10 min.

Parvovirus canino

La exposición del PVC a una temperatura de 4°C a pH fisiológico durante 5 hrs no afectó su infectividad, pero el ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C inactivó 5.2 ± 0.26 Logs/1 h (Fig. 34). Esto demuestra que el método de obtención del AcM CB.Hep-1 sí tiene capacidad de inactivación del PVC y por ende de los virus más resistentes, parvovirus, que pueden contaminar la fuente biológica. Como se aprecia en la figura 34 el nivel de inactivación no aumentó significativamente en el tiempo después de la hora de incubación hasta 5 hrs. Posterior a este tiempo no se observó capacidad de inactivación de este tampón sobre el PVC.

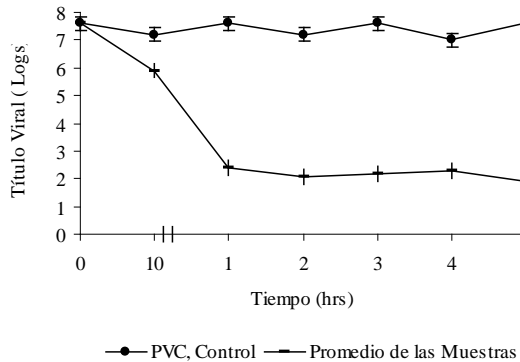


Figura 34. Inactivación del PVC en ácido cítrico 100 mM; pH 3, 4°C durante 7 hrs. Estas curvas representan la media y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales pero a pH neutro. (—) Media del título viral de las muestras experimentales tratadas a pH ácido.

Resumen de los experimentos de inactivación en ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C.

Los resultados coinciden con que los virus menos resistentes son los virus envueltos (sendai, VIH-1 y el VHS-1), mientras que la ausencia de envoltura hace más resistente a los virus ante los agentes físico-químicos (PHV-2 y PVC). No obstante, la inactivación del PVC puede considerarse un aspecto importante para este diseño del método de purificación, ya que este virus, al igual que el PVH-2 son los que menos se remueven en la cromatografía de afinidad debido a su pequeño tamaño. Estos resultados demuestran también que la ausencia de envoltura no es una condición necesaria para el análisis de la

resistencia de los virus ante los agentes físico-químicos, ya que se observó una diferencia de 4 Logs de inactivación entre ambos virus desnudos (Fig. 35).

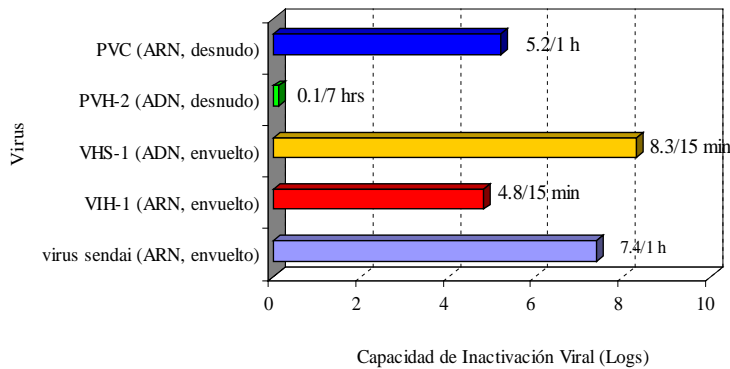


Figura 35. Resumen de la capacidad de inactivación de los virus modelos en ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C. Estos valores representa la media de la capacidad de inactivación de tres réplicas experimentales por cada virus modelo.

4.13. Resultados de la determinación de la capacidad de inactivación de virus modelos en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C.

4.13.1. Recuperación del AgsVHBr durante el tratamiento térmico.

Teniendo en cuenta que durante la purificación del AgsVHBr hay un paso de calentamiento de este antígeno a 60°C durante 2 hrs en presencia de KSCN 3M, procedimos también a medir la capacidad de inactivación viral de este tratamiento. Los primeros experimentos de recuperación del AgsVHBr se realizaron en ausencia de virus modelos, donde los resultados demostraron una recuperación de esta molécula superior al 90% y una alta repetibilidad entre las réplicas experimentales. Posteriormente, procedimos al análisis de la influencia del inóculo viral en la recuperación de AgsVHBr. Los resultados aparecen de forma comparativa en la figura 36. Como se aprecia en la misma no hay diferencias significativas en la recuperación del AgsVHBr en presencia de los virus modelos empleados en este ensayo de acuerdo al solapamiento de los intervalos de confianza de las medias y al análisis de varianza (ANOVA de simple factor) para un 95% de confianza ($p=0.7293$).

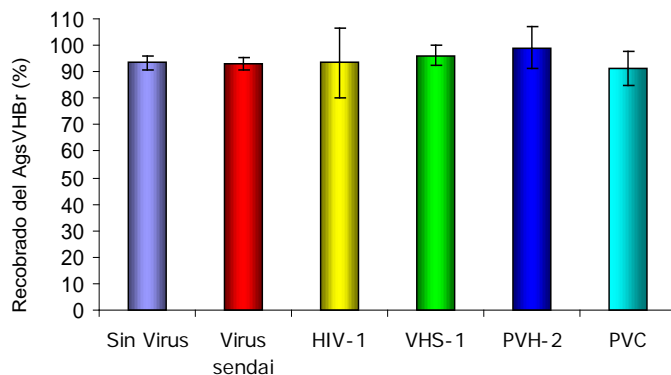


Figura 36. Recuperación del AgsVHBr en presencia de virus modelos en el paso de calentamiento en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C. Las barras significan el porcentaje de recuperación promedio del AgsVHBr y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad.

4.13.2. Virus envueltos (virus sendai, VIH-1 y VHS-1) virus sendai (virus de ARN)

Para verificar la capacidad de inactivación del virus sendai que posee el tampón Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C, se inocularon tres eluatos de la cromatografía de inmunoadfinidad del método de purificación del AgsVHBr con 7.2 Logs respectivamente. Los resultados indican que a partir de los primeros 10 min no se observó muerte de los huevos embrionados de pollos demostrando así la inactivación de este virus en este período de tiempo (7.2 ± 0.21 Logs/10 min) (Fig. 37). El tampón Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM; pH 7.2 empleado para medir el efecto citopático no mostró toxicidad en los huevos embrionados de pollos.

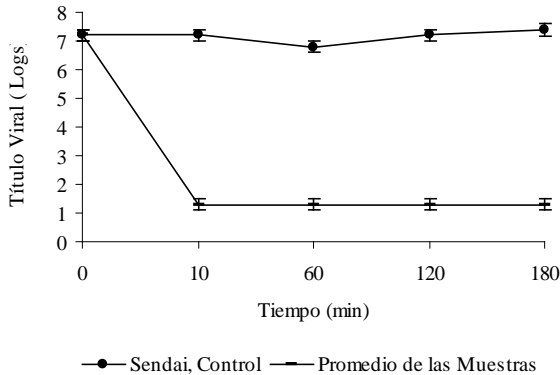


Figura 37. Inactivación del virus sendai en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C durante 180 min. Estas curvas representan la media y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales sin KSCN 3M. (—) Media de las muestras de virus tratadas con Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C.

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (virus de ARN)

La figura 38 presenta la estabilidad del VIH-1 en el tampón Tris-HCl 20 mM/EDTA 3mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C. Como se observa este virus no fue inactivado en los primeros 10 min (1.98 Logs) aunque sí a los 60 min (5.82 ± 0.22 Logs). Posterior a este tiempo no se pudo demostrar un nivel mayor de inactivación. El tampón Tris-HCl 20 mM/EDTA 3mM; pH 7.2 no mostró toxicidad en la células MT4. Esto es un hallazgo novedoso, ya que no se espera que los virus envueltos, específicamente los Retrovirus que son pocos resistentes a los agente químicos puedan demostrar una capacidad de resistencia superior a los 10 min.

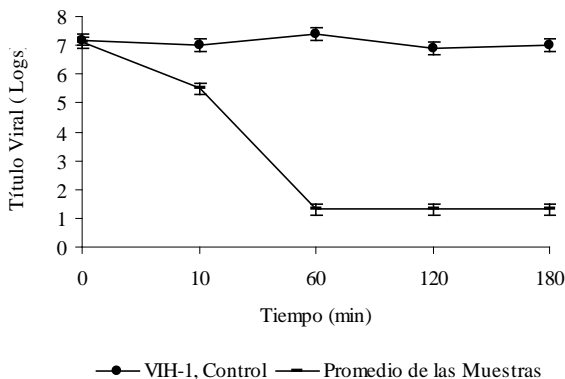


Figura 38. Inactivación del VIH-1 en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C durante 180 min. Estas curvas representan la media y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales sin KSCN 3M. (—) Media de las muestras de virus tratadas con Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C.

Virus herpes simple humano tipo-1 (virus de ADN)

La inactivación VHS-1 provocada por el calentamiento a 60°C en presencia de KSCN 3M fue de 6.96 ± 0.29 Logs en los primeros 10 min de incubación (Fig. 39). Estos resultados coinciden con los obtenidos con los del virus sendai, lo que corrobora que la presencia de la envoltura hace poco resistente a estos virus ante los agentes físico-químicos. El tampón Tris-HCl 20 mM/EDTA 3mM; pH 7.2 no mostró toxicidad en la células Vero.

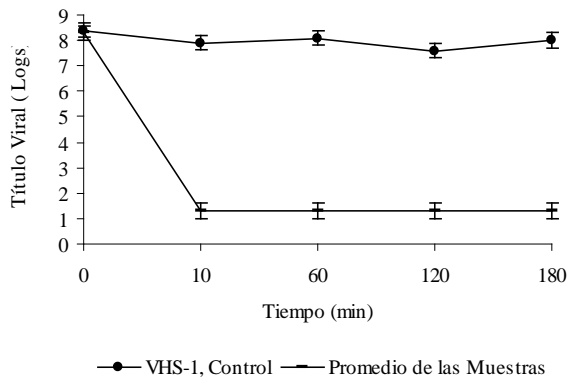


Figura 39. Inactivación del VHS-1 en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C durante 180 min. Estas curvas representan la media y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales sin KSCN 3M. (—) Media de las muestras de virus tratadas con Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C.

4.13.2. Virus desnudos (PHV-2, PVC)

Poliovirus humano tipo 2 (virus de ARN)

El PVH-2 se inactivó a 60°C en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 desde los primeros 10 min de incubación (Fig. 40). Luego de dos horas de tratamiento térmico a 60°C en presencia de KSCN 3M de los eluatos de la cromatografía de inmunoafinidad se logró una inactivación del PVH-2 de 8.23 ± 0.43 Logs. El tampón Tris-HCl 20 mM/EDTA 3mM; pH 7.2 no mostró toxicidad en la células Vero. Esto reviste particular importancia por la alta resistencia manifestada por este modelo viral ante el ácido cítrico 100 mM, pH 3.

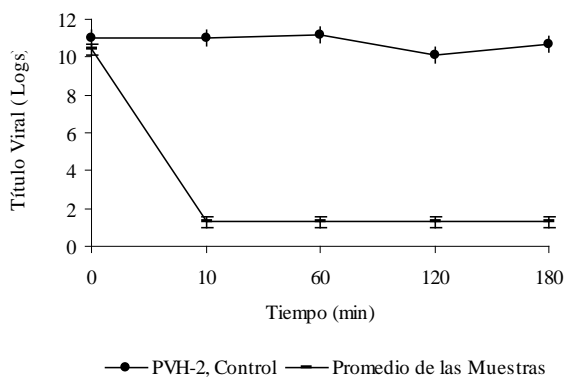


Figura 40. Inactivación del PVH-2 en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C durante 180 min. Estas curvas representan la media y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidad de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales pero en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM pH 7.2. (—) Media de las muestras de virus tratadas con Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C.

Parvovirus canino (virus de ADN)

El PVC se inactivó en 6.41 ± 0.16 Logs a 60°C en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a los 10 min de incubación (Fig. 41). Por lo cual el tratamiento térmico a 60°C durante 2 hrs en

presencia de KSCN 3M es también un paso de inactivación robusto para los virus desnudos de propiedades físico-químicas similares al PVC. El tampón Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM; pH 7.2 no mostró toxicidad en la células LFBM.

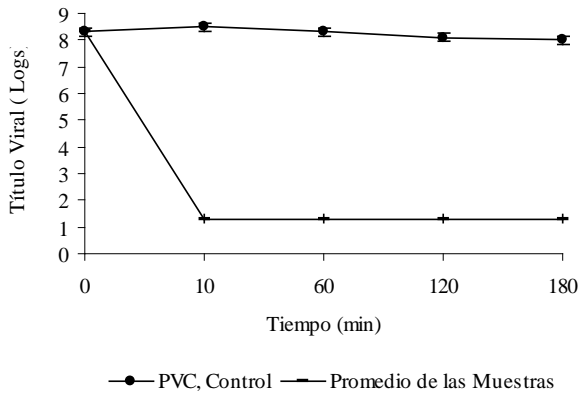


Figura 41. Inactivación del PVC en KSCN 3M a 60°C. Este gráfico representa la media y el intervalo de confianza para un 9% de probabilidad de tres réplicas. (●) Título del control viral en las mismas condiciones experimentales sin KSCN 3M. (—) Media de las muestras de virus tratadas con Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 a 60°C.

Resumen de los resultados de la inactivación de virus modelos con Tris-HCl 20 mM/EDTA 3mM/NaCl 1M/KSCN 3M; pH 7.2 y 60°C.

El calentamiento a 60°C en presencia del agente caotrópico KSCN 3M es el paso más robusto de los estudiados en el método de obtención del AgsVHB a partir de la fermentación de la levadura *Pichia pastoris*. La figura 42 muestra un resumen de los resultados de la inactivación de los virus modelos empleados bajo esta condición. Todos los virus demostraron un alto nivel de sensibilidad a este tratamiento. En el caso del VIH-1 sólo se pudo demostrar 5.8 Logs de inactivación producto del bajo título de la cepa viral en el momento inicial del experimento. Este virus demostró un comportamiento diferente al resto de los virus evaluados, pues se logró inactivar a los 60 min de tratamiento.

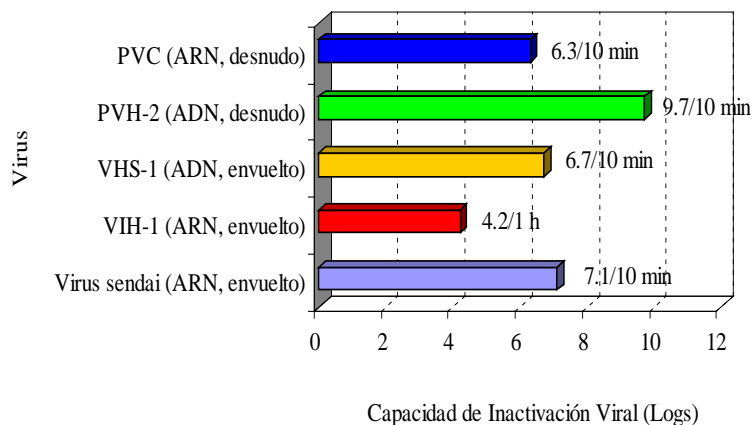


Figura 42. Resumen de la capacidad de inactivación de los virus modelos por el tratamiento térmico en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3mM/ KSCN 3M/ NaCl 1M; pH 7.2 a 60°C. Estos valores representan la media de tres réplicas experimentales por cada modelo viral.

4.14. Capacidad de eliminación de los virus modelos del método de obtención del AgsVHB a partir de *Pichia pastoris*.

Como resumen del trabajo de validación virológica, la Tabla 19 muestra la capacidad de eliminación de cada virus modelo. Por capacidad de eliminación se entiende: la suma de las capacidades ortogonales de

remoción y de inactivación de cada virus modelo, no se incluye la capacidad de inactivación aportada por los procedimientos de higienización y almacenamiento de las matrices cromatográficas. En todos los casos la capacidad de eliminación fue superior a 14.4 Logs lo cual hace seguro al método de obtención del ingrediente farmacéutico activo de la vacuna contra la Hepatitis B, cumpliendo así con las exigencias de las agencias regulatorias para este tipo de producto y con la hipótesis planteada para esta tesis. Los mayores valores de eliminación se observaron en los virus modelos envueltos. Para el VIH-1 que es un virus envuelto se demostró una capacidad de eliminación a nivel de los virus desnudos por el bajo título de la cepa viral al inicio de los experimentos.

Tabla 19. Capacidad de eliminación de los virus modelos empleados en los experimentos de validación del método de obtención del ingrediente farmacéutico activo de la vacuna contra la Hepatitis B. ND significa experimento no realizado.

Propiedades y Pasos Validados	Virus sendai	VIH-1	VHS-1	PVH-2	PVC
Genoma	ARN	ARN	ADN	ARN	ARN
Envoltura	Envuelto	Envuelto	Envuelto	No envuelto	No envuelto
Tamaño (nm)	200	100-200	100-200	28-30	20-30
Cromatografía de Afinidad (Logs)	7.20	4.39	6.03	4.87	2.81
Etanol al 70% (Logs)	ND	4.78/15 min	4.90/15 min	1.86/72 hrs	4.90/12 hrs
Etanol al 20% (Logs)	ND	3.70/15 min	4.00/15 min	2.30/72 hrs	1.20/72 hrs
Acido cítrico 100 mM; pH 3 (Logs)	7.40/1 h	4.80/10 min	8.30/1 h	0.10/7 hrs	5.20/1 h
Tratamiento térmico del AgsVHBr (Logs)	7.10/10 min	5.80/ 1 h	6.96/10 min	8.23/10 min	6.40/10 min
Capacidad de Eliminación (Logs)	21.60	14.99	21.29	14.96	14.41

5. DISCUSION

5.1. Implementación de un método eficiente y consistente de purificación del AcM CB.Hep-1 empleado en la purificación del AgsVHB.

La Hepatitis B es producida por un virus de ADN de doble cadena de 42 nm que pertenece a la familia *Hepadnaviridae*. La membrana externa de este virus contiene el AgsVHB que es el ingrediente activo de las vacunas contra este virus, pues induce la formación de anticuerpos neutralizantes que brindan protección contra el VHB por un largo período de tiempo en humanos (Andre-FE, 1987; Lemon y Davis, 1997; Mahoney y Mark, 1999). La vacunación contra esta patología busca eliminar la transmisión del VHB y prevenir las enfermedades asociadas con este virus (Barker, 1970; Davis, 1989). La posibilidad potencial de producir grandes cantidades de esta proteína se hizo evidente en 1987 por lo cual la vacuna contra la Hepatitis B constituyó de hecho, la primera vacuna recombinante aprobada para uso en humanos (Marquardt y cols., 1987).

Los procedimientos para el aislamiento del AgsVHB producido por vía recombinante han aprovechado la experiencia en la purificación de este antígeno a partir del plasma humano. Dentro de estos se incluyen: la combinación de técnicas de intercambio iónico y de exclusión molecular, combinaciones de precipitación y centrifugación seguidas de ultrafiltración y gradiente isopícnico, detergentes no-iónicos, adsorción a coloides de sílice, diálisis, cromatografía de adsorción empleando hidroxilapatita y la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Hitzeman y cols., 1983; van Wijnendaele y cols., 1987; Hamada y cols., 1988; Gavilanes y cols., 1990; Wei Kuang y cols., 1994; Dejean y cols., 2004; Desombere y cols., 2006).

En 1989 se logró la expresión exitosa del AgsVHB en la levadura *Pichia pastoris* en el CIGB (Muzio y cols., 1989). Este antígeno con fines vacunales se purifica mediante el empleo de la cromatografía de inmunoafinidad con el AcM de ratón CB.Hep-1. Este AcM se obtiene a partir de la producción de ascitis en ratones histocompatibles con el hibridoma CB.Hep-1, lo cual le aporta grandes ventajas en términos de productividad e integridad funcional de la molécula de AcM en comparación con otros métodos, pero también posee inconvenientes desde el punto de vista regulatorio, por la potencialidad del hibridoma, el SFB, los ratones y la ascitis de contaminarse con agentes patógenos al hombre (O. M. S., 1992).

Por lo antes expuesto nos propusimos como objetivo fundamental de esta tesis, la implementación de un método de purificación efectivo, consistente y seguro virológicamente del AcM CB.Hep-1 para purificar el AgsVHB y garantizar un alto grado de seguridad virológica de la vacuna cubana contra la Hepatitis B. Para dar solución a este problema científico, llevamos a cabo en primer lugar, el establecimiento de un método efectivo y consistente de purificación del AcM CB.Hep-1 y en segundo lugar la validación de la capacidad de remoción e inactivación de virus modelos del método de purificación del AcM CB.Hep-1 combinado con el tratamiento térmico en presencia de KSCN que se utiliza en el método de purificación del AgsVHB. Por lo tanto, este trabajo es una contribución para los productores de AcM empleados la inmunopurificación de biológicos de uso en humanos sobre los parámetros críticos para demostrar

consistencia en la obtención de AcMs y la validación virológica del método de obtención del biológico. Desde los comienzos de la tecnología de producción de AcM, los hibridomas desarrollados *in vitro* se inyectaron en la cavidad peritoneal de ratones histocompatibles para colectar grandes cantidades de AcM a partir del fluido ascítico (Colwell y cols., 1986; Hoogenraad y Wright, 1986; Garrison y cols., 1986). Este procedimiento fue bien considerado en aquellos tiempos debido a que los sistemas eficientes de producción *in vitro* no habían sido desarrollados aún. Entre las principales desventajas del método de producción de ascitis podemos citar que es un método muy doloroso debido a la inyección de la sustancia irritante, peritonitis causadas por la irritación, aumento de la tensión abdominal y la evolución del tumor (Jackson y cols., 1999). La contaminación potencial con virus propios del ratón y la variabilidad en la calidad entre los lotes de ascitis, lo cual dificulta mantener la consistencia del método de purificación en ocasiones.

En tal sentido, la justificación del uso masivo de animales para la producción del AcM CB.Hep-1 está dada por el hecho de que el hibridoma CB.Hep-1 es muy bajo productor de IgG *in vitro*. Se han realizado varios experimentos con el objetivo de producir grandes cantidades del AcM CB.Hep-1 en el medio de cultivo empleado en el aislamiento de este hibridoma en reactores de fibra hueca. Sin embargo, en ninguno de los esfuerzos realizados se ha logrado una concentración de AcM que haga factible este procedimiento a escala industrial. No obstante, existen en la actualidad varios trabajos con otros medios de cultivo libre de suero y de proteínas donde la concentración de AcM alcanzada es superior a los 2 g/L lo cual pudiera abrir una alternativa real de estudio para optimizar dicho procedimiento con el objetivo de reemplazar definitivamente los animales. De igual forma varios trabajos de expresión y producción en plantas transgénicas han progresado mucho con este AcM por lo cual ya se está en la fase de optimización de una tecnología consistente de producción a escala industrial (Nadia y cols., 2003).

Está establecido que toda vez que la decisión de aislar el AcM de interés sea a partir de fuentes biológicas con riesgo potencial de virus patógenos para el hombre, ejemplo la ascitis, debe diseñarse un método de purificación con una alta capacidad de remover e inactivar estos agentes patógenos. El cumplimiento de este objetivo conlleva obligatoriamente la demostración previa de la consistencia del método de purificación en cuanto a los parámetros críticos del método y la estabilidad de la molécula de interés, ya que cualquier modificación del método de purificación posterior a la demostración de la capacidad de remoción e inactivación de virus invalida los resultados de esta demostración.

Como elemento primario en la demostración de la consistencia del método de obtención del AcM CB.Hep-1, se estudió la consistencia en la producción de ascitis. Esto se llevó a cabo mediante la inoculación consecutiva de 20 grupos de 2000 ratones BALB/c con 1 millón de células del hibridoma CB.Hep-1 por vía intraperitoneal. La calidad de un producto manufacturado está sujeta a cierta variación fortuita. Las variaciones propias del modelo son inevitables, pero las variaciones fuera de los límites que explican el modelo tienen que ser identificadas y explicadas. El gráfico de control es una herramienta simple para identificar estas variaciones en procesos repetidos y su aplicación supone el ajuste a una

distribución teórica de frecuencia. Los criterios para declarar un proceso controlado estadísticamente aparecen descritos en Gershon, (1991). En este estudio se demostró que la producción de ascitis resultó ser consistente en cuanto a la concentración del AcM CB.Hep-1, ya que no se encontró ningún valor fuera de la zona $\pm 2DS$, ni 9 valores consecutivos por encima o por debajo del valor promedio. El valor promedio de concentración fue 3.13 mg/mL con una desviación estándar de 0.70 mg/mL, lo cual se considera muy pequeña si se analiza la composición del líquido ascítico y la influencia de esta en la determinación de IgG mediante el método de ELISA. Sin embargo sí se observó oscilación de los valores de concentración alrededor del valor promedio. Las razones fundamentales estuvieron en el estado alimenticio de los animales, ya que también se produjo un comportamiento similar en cuanto las proteínas totales en la ascitis y en el procedimiento de extracción de la ascitis, pues en ocasiones el contenido de lípidos fue muy elevado.

Existen varios procedimientos de purificación de AcM a partir de fluido ascítico (Langone, 1982; Jiskoot y cols., 1989; Boi, 2006), pero a la gran mayoría no se le ha evaluado su capacidad de remoción e inactivación viral. La razón de esto es que el uso de esta fuente biológica ha quedado reducido al diagnóstico o algunos estudios preclínicos y clínicos que requieren de una rápida aprobación. En general se trata de que la fuente biológica del AcM de interés se cambie por sobrenadante de células de mamíferos obtenido por procedimientos *in vitro* o por AcM recombinantes expresados en fuentes sin riesgos de contaminación con virus patógenos al hombre (Balt y cols., 1995; Morrow, 2000; Sinacore y cols., 2000).

El diseño de cualquier método de purificación se basa en la aplicación de la molécula de interés y la fuente a partir de la cual será extraída dicha molécula. Para alcanzar un resultado exitoso, la separación de la proteína de interés debe ser considerada desde el inicio de su purificación. Es típico que la separación de AcMs se base en tres pasos principales, pasos de precipitación, purificación por cromatografía de afinidad o de intercambio iónico y cambio de tampón o incremento de la pureza mediante cromatografía de exclusión molecular. El grado de pureza necesario está determinado por el propósito de la preparación final. Por ejemplo, si el AcM es para uso en humano, la preparación debe ser altamente pura, pero también debe estar libre de toxinas, pirógenos y material antigénico. Si el AcM va a ser almacenado por largos períodos de tiempo, la preparación final debe estar libre de cualquier actividad proteolítica.

La alta concentración de AcMs (1-20 mg/mL) en la ascitis constituye una gran ventaja a los efectos de la purificación con alto recobrado y pureza. No obstante, la ascitis posee también varios contaminantes tales como: proteínas, lípidos, ADN y debris celular. Las proteínas mayoritarias del hospedero (albúmina, transferrina e Igs) son de hecho el principal problema. Estas tres proteínas poseen características de separación diferentes; la albúmina, la abundancia; la transferrina, su similitud en cuanto a la carga con las Igs y las Igs del hospedero, su similitud con el AcM de interés. El otro problema de esta fuente es la presencia de actividad proteolítica. Estas desventajas, junto con las consideraciones regulatorias sobre la contaminación potencial con virus patógenos al hombre hacen necesario el diseño de métodos de

purificación robustos.

En general, los AcMs poseen las mismas propiedades que el resto de las proteínas; carga molecular, tamaño molecular, pH isoelectrico, estabilidad y cierto grado de hidrofobicidad. Todas estas características pueden ser utilizadas como ventajas en pasos tales como la precipitación salina. Por otro lado, los AcMs son únicos en el sentido de que poseen un fragmento denominado Fc el cual interactúa de forma específica pero reversible con las moléculas de Proteína A (*S. aureus*) o G (*S. β-hemolytic*) (Richman y cols., 1982; Akerstrom y cols., 1985) las cuales se unen a una matriz cromatográfica y funcionan como soportes cromatográficos.

Cuando se combinan varias técnicas cromatográficas, deben considerarse cuatro parámetros a ser optimizados: resolución, productividad, recobrado y capacidad. Ellos están todos interrelacionados por lo que optimizar uno, puede mejorar o desfavorecer otro. La idea principal debe ser mantener un balance entre ellos.

Teniendo en cuenta este conocimiento, se diseñó un método de purificación del AcM CB.Hep-1 combinando dos precipitaciones salinas, clarificación por centrifugación, cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose, incubación a pH ácido, cromatografía de exclusión molecular, ultrafiltración y filtración esterilizante. La hipótesis de esta tesis supone que este método de purificación en combinación con el tratamiento térmico del AgsVHBr, no sólo permite la obtención del AcM CB.Hep-1 con alta eficiencia, consistencia y pureza sino además brinda una capacidad de remoción e inactivación de virus de 6 Logs por encima del nivel de contaminación viral de las fuentes biológicas.

Como requisito previo a la demostración de la capacidad de remoción e inactivación viral discutiremos entonces los resultados obtenidos en cuanto a la eficiencia y consistencia del método de purificación del AcM CB.Hep-1. La precipitación salina trabaja sobre la diferencia en la solubilidad entre las moléculas. La solubilidad a su vez, difiere de acuerdo al grado de hidrofobicidad por lo cual el incremento de sales puede aumentar las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y causar la precipitación de estas. La precipitación con sulfato de amonio es el método más usado para estos propósitos debido a que este reactivo es altamente soluble, estabiliza muchas proteínas en solución, y ayuda a reducir el contenido de lípidos y carga microbiana.

Este es un método eficiente para todos los tipos de Ig aportando no sólo un poder importante de concentración sino también la reducción de casi el 50% de los contaminantes, creando así las condiciones propicias para el subsiguiente paso cromatográfico. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron un recobrado de IgG promedio de $75.83 \pm 13.50\%$, lo cual está en correspondencia con el recobrado informado para este tipo de precipitación (Gagnon, 1996). Para obtener recobrados superiores en esta técnica es necesario aplicar un método más preciso como la precipitación diferencial empezando por la precipitación de las proteínas más hidrofóbicas que el AcM, lo cual implica un aumento en la pureza y el recobrado de AcM en este paso, pero sacrifica la productividad del método de purificación.

Como se menciona anteriormente el paso que aporta la mayor pureza es la cromatografía de afinidad

debido a la especificidad de la Proteína A por la región Fc de la Ig. La Proteína A es seleccionada a partir del cultivo de *S. aureus* (Gagnon, 1996). Esta proteína tiene un peso molecular estimado por electroforesis de 42 KDa y 6 sitios diferentes de unión a las IgG, 5 de los cuales, muestran una alta afinidad por el Fc de las IgG y 4 diferentes a estos 5 muestran afinidad también por el fragmento de unión al antígeno (Gagnon, 1996). Una molécula de Proteína A inmovilizada puede unir 2 moléculas de IgG en condiciones de saturación (Frick y cols., 1992).

En general, el recobrado de los pasos del método de purificación del AcM CB.Hep-1 se comportó en correspondencia con los resultados esperados para cada uno de estas técnicas de purificación. Contradictoriamente con lo informado, la cromatografía de exclusión molecular para el cambio tampón resultó ser muy variable y funcionar por debajo de la eficiencia esperada. La causa principal parece estar relacionada con problemas analíticos producidos por interferencia de los tampones antes y después de esta cromatografía, ya que después se vuelve a recuperar la cantidad de AcM purificada en la cromatografía de afinidad.

Los resultados esperados resultan de la combinación de los datos de la literatura y de los ensayos preliminares a escala analítica (Gagnon, 1996). Como se observa el paso cromatográfico de menor recuperación fue la cromatografía de afinidad. Sin embargo, esta demostró un recobrado promedio muy cercano, $81.50 \pm 30.40\%$, al esperado aunque con una gran variabilidad, (Fischer y cols., 1999; Fahrner y cols., 1999) por lo cual se puede concluir que el método de purificación puede purificar eficiente y consistentemente el AcM CB.Hep-1 en una escala de 5-60 L de ascitis. El sistema posee una alta productividad, lo cual está en correspondencia con la cantidad de AcM presente en la ascitis, ya que con este diseño es posible obtener entre 30-60 gramos del AcM CB.Hep-1 cada 30 hrs.

La consistencia de este método de purificación quedó estadísticamente demostrada durante la evaluación del recobrado del AcM CB.Hep-1 en 20 purificaciones consecutivas. El recobrado de este AcM de todas las purificaciones estudiadas quedó dentro de los límites establecidos como el promedio \pm 2DS. Sólo una muestra superó el límite superior. Los resultados obtenidos por debajo del recobrado promedio (muestra 1) se corresponden con el uso de una matriz de Protein A-Sepharose con un número de ciclos de purificación superior a 100, momento en cual se produce una caída en la capacidad de adsorción de IgG de esta matriz. En el resto de las muestras donde el recobrado fue inferior a la media se explica por ineficiencia en el proceso de semipurificación.

La otra etapa que posee una pérdida de AcM importante es la semipurificación. Experimentos de inmunomarcaje con preparaciones de anticuerpos policlonales contra IgG murina demostraron una cantidad equivalente al 5% del anticuerpo perdido en el sobrenadante de las precipitaciones salinas. Esto no justifica la optimización de esta etapa, pues el balance costo-beneficio estaría desfavorecido. Sin embargo trabajos posteriores de verificación de este resultado de inmunomarcaje purificando directamente en la cromatografía de afinidad con un sistema de tampones que aumenta la adsorción de la molécula de IgG ratificaron que la pérdida del AcM en esta etapa es real en los niveles de hasta un 20%.

Por lo tanto se recomienda la optimización de etapa de semipurificación en el método de purificación del AcM CB.Hep-1.

La otra forma de evaluar la consistencia del método de purificación fue caracterizando bioquímicamente la molécula de AcM CB.Hep-1. La integridad molecular del AcM CB.Hep-1 obtenido mediante este método de purificación se evaluó mediante varias técnicas analíticas. En todas las muestras analizadas por electroforesis el valor de pureza fue superior al 90%. Este ensayo además brindó un patrón de identidad típico para las IgG de ratón, una banda correspondiente con la cadena pesada (50-55 kDa) y una con la cadena ligera (25 kDa), mientras que en las condiciones no reductoras se observó una banda mayoritaria sobre los 150 kDa. De igual forma, la distribución molecular medida por HPLC-exclusión molecular demostró valores superiores al 95%, lo cual corresponde con el valor exigido para anticuerpos de uso terapéuticos o para inmunopurificar biológicos (O. M. S., 1992). El análisis de isotipaje confirmó los resultados de la actividad específica, pues no se observó otra Ig contaminante a la IgG-2b cadena kappa, lo cual es probable por la presencia de anticuerpos endógenos de ratón (Ey y cols., 1978) y por el hecho de que la cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose es realmente una pseudo-afinidad, ya que no discrimina entre anticuerpos de la misma subclase.

El mapeo tríptico de ambas cadenas de la molécula de IgG demostró igual patrón de digestión en tres muestras consecutivas. Para este análisis se purificaron previamente ambas cadenas y las modificaciones en los péptidos de estas se determinaron por la aparición de fracciones diferentes después de la digestión o del corrimiento en el tiempo de retención de los péptidos resultantes. Los resultados evidenciaron alta consistencia en la homogeneidad de la molécula de IgG obtenida con este método de purificación. La modificación en la altura de un pico de la cadena ligera en la muestra 2, está relacionada con las imprecisiones del método cuando se mezclan la molécula de AcM y la enzima. En ocasiones no es muy repetible este procedimiento, lo cual provoca diferencias en la altura de las fracciones.

Para estudiar con más detalles si ocurrieron modificaciones en el reconocimiento del AcM CB.Hep-1 se desarrolló el ensayo de reconocimiento del epítipo, utilizando péptidos lineales del AgsVHBr de 12 aminoácidos y solapados en 6 aminoácidos. Este ensayo se diseñó con péptidos lineales, ya que se había demostrado con anterioridad que este AcM reconoce un epítipo continuo dentro del determinante "a" del AgsVHB. La secuencia reconocida por este AcM coincidió con la reportada anteriormente, CKTCTT, la cual se encuentra ubicada dentro de los péptidos 20 y 21 del AgsVHBr empleados en estos ensayos.

También se secuenció la cadena ligera del AcM, cuyos resultados coinciden con la secuencia predicha a partir de la secuencia de ADN. Esto demuestra que no se produjeron tampoco modificaciones postraduccionales que modifiquen la secuencia de aminoácidos de la molécula. La determinación de la secuencia de la cadena ligera se considera suficiente, ya que su expresión implica la expresión previa de la cadena pesada correcta.

La técnica de isoelectroenfoque es un método electroforético que separa las proteínas de acuerdo a sus puntos isoeléctricos, las proteínas son moléculas anfotéricas, o sea ellas pueden tener cargas positivas, negativas o ser neutras dependiendo del pH en que se encuentren. En este trabajo se midió el pH isoeléctrico de 5 muestras consecutivas del AcM CB.Hep-1 evidenciando un intervalo de pH isoeléctrico entre 7.1-6.50 caracterizado por un patrón de bandeo de hasta 8 bandas, 6 de las cuales siempre se observaron, lo cual es altamente consistente y coincidente con el intervalo y el patrón de bandeo reportado por otros autores para AcM de ratón (Fischer y cols., 1999). No obstante, una de las limitaciones de esta técnica, es que en ocasiones las proteínas pueden asociarse con la anfólita, adquiriendo un punto isoeléctrico diferente al de la proteína libre. Este fenómeno puede causar la aparición de una serie de bandas, ya que la anfólita por sí misma no es una especie única, aunque este fenómeno ocurre con muy poca frecuencia. Los resultados de esta determinación demuestran que durante la purificación del AcM CB.Hep-1 no se producen cambios en la estructura de la proteína en cuanto a la carga iónica, alteración del contenido de carbohidratos, desamidación u otros cambios en la molécula que pueden ocasionar modificaciones en el patrón de isoelectroenfoque.

Otro elemento importante de caracterización bioquímica es la determinación de la constante de afinidad (K_{af}) de la molécula. La K_{af} de los AcMs ha sido estudiada por varios métodos incluyendo radioinmunoensayo competitivo y ELISA (Kato y cols., 1993; Seligman, 1994; Winzor y Sawyer, 1996). Para entender el impacto de la determinación de la K_{af} en un sistema de fase sólida, es obligatorio hacer un análisis de curvas sigmoidales no competitivas, lo que permite generar una ecuación a partir de la ley de acción de las masas que utiliza la cantidad total de AcM adicionado a la placa de ELISA (Betty y cols., 1987). En esencia, este método compara la densidad óptica (50%) de 2 curvas sigmoidales de diluciones seriadas del AcM aplicado a la placa con 2 concentraciones de antígeno diferentes. La estimación de la K_{af} usando este ELISA no competitivo fue bastante consistente, rápida y confiable, ya que fue comparada con otro método más exacto, Bioacore, que consiste en la determinación de la K_{af} de una molécula biológica dada a un ligando inmovilizado. El promedio de la K_{af} del AcM CB.Hep-1 medido en 7 muestras diferentes fue $7.61 \pm 6.9 \times 10^8 M^{-1}$, lo cual lo describe como un AcM de alta afinidad (nanomolar). Este parámetro es importante medirlo porque en función de la K_{af} se seleccionan las condiciones de adsorción y de elución en la cromatografía de inmutafinidad. Como puede verse el valor de la K_{af} no cumple con las condiciones ideales para que este AcM sea empleado en la cromatografía de inmutafinidad, ya que este exige condiciones drásticas de elución del antígeno. Sin embargo, la especificidad de este AcM por un epítoto continuo beneficia de manera importante la selección de una

preparación de AgsVHBr con adecuadas propiedades para ser usado como ingrediente activo de la vacuna contra la Hepatitis B.

La necesidad de medir impurezas críticas es también esencial para evaluar el método de purificación y para que el AcM pueda ser usado en la clínica y en otras aplicaciones. En tal sentido, el ADN de ratón es considerado un contaminante crítico por su carácter oncogénico (ter Avest, 1992). Debido a que el paso principal de purificación se basa en la interacción específica del Fc de la Ig con la Proteína A es lógico suponer que el nivel de ADN en el AcM CB.Hep-1 purificado sea bajo. Este nivel fue corroborado mediante el empleo de un sistema de cuantificación de ADN basado en oligonucleótidos sintéticos que contienen secuencias homólogas y conservadas del ADN ratón. En ninguna de las muestras evaluadas, el nivel de contaminación sobrepasó los 3.9 pg ADN/mg AcM. Es válido destacar que el nivel de aceptación de este contaminante por las agencias regulatorias es de 10 pg ADN/mg AcM, aunque también Lambert informó un valor de 10 pg ADN/5 mg AcM (Lambert, 1989). A este resultado aportó en gran medida el bajo nivel de contaminación con ADN de ratón presente en la ascitis como fuente del AcM CB.Hep-1, por lo cual un especial cuidado debe prestársele al procedimiento de separación de células durante la clarificación de la ascitis, ya que el método de purificación no ha sido validado para determinar el valor teórico máximo de eliminación de ADN del hospedero.

El otro contaminante crítico es la Proteína A (*S. aureus*) desprendida de la matriz de afinidad. Como se menciona anteriormente, la cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose para la purificación de AcM es una herramienta muy poderosa para la purificación a partir de cualquier fuente (Langone, 1982). No obstante, también posee varias desventajas, entre las que tenemos el alto costo y el desprendimiento de un ligando "tóxico". Las especies que pudieran desprenderse y contaminar el producto final han demostrado ser altamente tóxicas en animales y humanos (Gagnon, 1996). Estas especies son: Proteína A y/o sus fragmentos, complejos Proteína A y/o sus fragmentos-Ig completas, Proteína A-fragmentos de Ig (Balint, 1984; Besinger y cols., 1984; Bloom y cols., 1989). Por esta razón, evidenciar bajos niveles de Proteína A en el AcM purificado es también otra muestra de la robustez del método de purificación.

El desarrollo de un sistema de cuantificación de Proteína A tiende a ser altamente complejo, debido al reconocimiento del fragmento Fc de las Ig por la Proteína A, excluyendo sólo las Ig de aves (Larsson y cols., 1992). La otra razón es que generalmente este ensayo debe ser realizado en presencia de altas concentraciones de Ig, lo cual tiende a producir grandes interferencias. No obstante, se han descrito algunos inmunoensayos para cuantificar Proteína A, donde muchos de estos son sistemas ELISA con doble anticuerpos (Bloom y cols., 1989; Lucas y cols., 1988; Lucas y cols., 1991; Godfrey y cols., 1992; Considine y cols., 1996).

Para medir el nivel de este contaminante en las preparaciones del AcM CB.Hep-1 se estableció y validó un ELISA no competitivo con alta sensibilidad en presencia de IgG. El coeficiente de variación intra e interensayo fue 4.36 y 8.63% respectivamente. Para eliminar la interferencia de la IgGs, las muestras se

calentaron a 100°C durante 3 min, condición en la cual la Proteína A fue estable. El contenido de Proteína A determinado en varias muestras del AcM CB.Hep-1 nunca excedió los 2 ppm. Esta cantidad es muy baja en comparación con los resultados obtenidos por otros autores quienes informaron valores superiores a 64 ppm (Lucas y cols., 1988; Bloom y cols., 1989). Por lo cual estos valores además de demostrar la robustez de este método de purificación de AcM, no constituyen niveles de contaminación que pueden inducir toxicidad.

En aras de ratificar la aplicabilidad de este método de purificación del AcM CB.Hep-1 se consideró importante también el análisis de la estabilidad de la molécula del AcM purificada y de su capacidad de purificación del AgsVHBr, toda vez que este será empleado como ligando en la cromatografía de inmunoafinidad de este antígeno y de su estabilidad como inmunogel. Para estudiar la estabilidad de esta molécula se realizó un estudio durante 25 meses almacenado el AcM CB.Hep-1 en Tris 20 mM/Na Cl 150 mM; pH 7.6 a 4°C y -20°C. El diseño de este estudio contempló el análisis de la actividad específica y la pureza del AcM de tres muestras de AcM CB.Hep-1 purificadas independientemente. Ambos parámetros fueron evaluados mediante una prueba de significación de la pendiente basada en la distribución t-Student para un nivel de significación de 95%. Los resultados mostraron la conclusión de que durante este tiempo el AcM CB.Hep-1 almacenado a 4°C ó -20°C no es degradado (>90%) y conserva su actividad específica por encima del valor preestablecido de 70%.

La cromatografía de inmunoafinidad es capaz de purificar con un alto recobrado biomoléculas en un sólo paso de purificación (Yarmush y cols., 1994). Debido a que los AcMs son reactivos muy caros, la aplicabilidad de este método depende del número de ciclos de purificación de la columna cromatográfica, permitiendo que se distribuya el costo a lo largo del tiempo de uso de inmunogel. En cualquier caso, el uso de estos geles de inmunoafinidad dependerá además de la optimización del método de purificación donde el máximo de producto sea obtenido con el mínimo de anticuerpo y de pasos adicionales de purificación. Esta técnica se considera bien establecida, cuando es capaz de brindar información sobre el desprendimiento de ligando, inactivación del ligando, vida media de la columna, capacidad de elución y pureza del antígeno eluido. En tal sentido, es válido señalar que la información sobre estos temas a escala industrial es bastante escasa en la literatura por lo cual los resultados aquí expuestos pueden ser una información de interés para los productores y usuarios de este tipo de geles cromatográficos.

La preparación del inmunoadsorbente requiere de un soporte disponible y de una química de acoplamiento apropiada para unir fuerte y efectivamente el ligando. En la actualidad existen varios tipos de soportes que cumplen con características tales como macroporosidad, estabilidad mecánica, fácil activación, hidrofiliidad y baja capacidad de unión inespecífica. Las matrices de afinidad más populares son las de agarosa, un componente especial purificado del Agar (Wilchek y Miron, 1999). Por otro lado, existen también muchos métodos de activación de los soportes cromatográficos. Dichos métodos pueden incluirse en dos categorías: aquellos que producen una inmovilización no orientada y los que producen una inmovilización uniformemente orientada (Wilchek y Miron, 1999). El método del CNBr es el más

popular dentro de los no orientados para la agarosa. Este método es relativamente simple y puede desarrollarse enteramente en soluciones acuosas, además la eficiencia de su inmovilización es cercana al 100%. Una desventaja de este método es el desprendimiento del ligando en el tiempo debido a la inestabilidad del enlace isourea a través del cual el ligando es inmovilizado. Además, este enlace posee carga positiva a pH neutro imponiéndole cierto carácter iónico a la matriz.

Los resultados de esta tesis muestran una elevada consistencia en cuanto al porcentaje de acoplamiento, pureza, capacidad de elución y desprendimiento de ligando. En todos los casos, la eficiencia de acoplamiento fue superior al 95% lo cual garantiza consistencia en la densidad de ligando que es un parámetro crítico para el comportamiento de este tipo de inmunogel, sobre todo porque es un método de inmovilización al azar.

En cuanto a la capacidad de elución, el valor obtenido estuvo en el intervalo de 100 a 300 μg AgsVHBr/mg AcM. No se domina bien la causa de esta diferencia. Los resultados más recientes indican que esta variabilidad parece estar muy asociada a la eficiencia del protocolo de ruptura de la levadura *Pichia pastoris*, al porcentaje de saturación de la columna y a la concentración de AgsVHBr aplicada a la matriz, parámetro que tiene una gran variabilidad en el método de producción de esta proteína.

La IgG desprendida puede inducir una respuesta inmune no deseada o neutralizar parte del antígeno utilizado para este propósito. La especificación establecida para este producto es 3 ng IgG/ μg AgsVHBr. En ninguna de las muestras evaluadas se obtuvo un valor superior a este límite, por lo cual los efectos anteriormente mencionados no se producen. Para apoyar esto podemos afirmar que la administración xenogénica de AcM de ratón en humanos no ha resultado para muchos casos en una respuesta anti-IgG de ratón. La respuesta del humano ha ocurrido en valores cercanos a los 500 μg y hasta 1 gr de IgG de ratón y sobre todo cuando se administran dosis repetidas (Lambert, 1989). De acuerdo al nivel máximo de contaminación con IgG de ratón del AgsVHBr, lo que podría recibir un adulto serían menos de 60 ng de IgG por dosis, lo cual representa un valor muy bajo con respecto a la dosis necesaria para inducir una respuesta en humanos.

Como etapa final de la caracterización bioquímica de esta molécula, se abordó la estabilidad del inmunogel CB.Hep-1. Para esto, se emplearon 3 inmunogeles independientes a los cuales se le midió su capacidad de elución y desprendimiento del ligando en un tiempo de almacenamiento de 20 meses en tampón PBS 150 mM, pH 7.6 a 4°C. El análisis de los resultados evidenció que el inmunogel CB.Hep-1 es estable durante 12 meses, ya que se encontró una disminución significativa en la capacidad de elución del AgsVHBr en uno de los inmunogeles después de este tiempo de almacenamiento. El desprendimiento de ligando nunca excedió el valor de 3 ngIgG/ μg de AgsVHBr en los 20 meses de evaluación.

Como conclusión de la implementación de un método purificación del AcM CB.Hep-1 consistente y de los trabajos de caracterización bioquímica de la molécula de CB.Hep-1 se puede afirmar que este método de purificación permitió la obtención efectiva y consistente de una molécula del AcM CB.Hep-1 con alta integridad molecular, estabilidad y capacidad de purificar el AgsVHBr, lo cual garantizó que se pudiera

proceder a demostrar su capacidad de remoción e eliminación de virus modelos para garantizar así la seguridad virológica de la vacuna contra la Hepatitis B.

5.2. Demostración de la capacidad de remoción e inactivación de virus modelos del método de purificación del AcM CB.Hep-1 y del tratamiento térmico del AgsVHBr.

La seguridad viral de los productos biológicos para uso en humanos es de extrema importancia. Nuevos e inesperados agentes aparecen ocasionalmente en la producción de biológicos tales como: el VHA (Linnen y cols., 1996), el parvovirus B19 (Azzi y cols., 1992) y el herpesvirus 8 (Moore y cols., 1996). La estrategia para el control de estos agentes biológicos (Homburger y Thomann, 1994) ha sido desarrollada para controlar las fuentes a partir de las cuales se origina el producto, ya que las células derivadas de colonias no controladas de animales son la fuente habitual de contaminación viral. En esta tesis se emplearon varios métodos de detección de virus para investigar la presencia de estos agentes patógenos en la línea celular, ratones y ascitis. Todas las técnicas empleadas fueron seleccionadas de acuerdo a los métodos recomendados para estos propósitos (O. M. S., 1987; O. M. S., 1992; I. C. H., 1997; F. D. A., 2001).

Estas técnicas fueron: microscopía electrónica de transmisión, ensayos de foco ampliado S+L- y de placa XC para caracterizar *Retrovirus*, aislamiento de virus en líneas celulares sensible a replicación viral y detección de virus en modelos animales tales como: huevos embrionados, ratones adultos, cobayos y ratones lactantes; ensayos de serología para evaluar el estatus microbiológico de las colonia de ratones, la prueba de MAP y la detección de virus adventicios en células sensibles a replicación viral.

La premisa básica de la discusión de esta tesis es que todos los virus no deseados y agentes infecciosos en general puedan ser excluidos del producto final. Existen numerosas razones para adoptar este punto de vista. La más importante es que los ensayos para detectar agentes virales conocidos son muy específicos y por lo tanto están dirigidos a la detección de virus cuyas propiedades físico-químicas no están muy generalizadas dentro un amplio número de virus ([Anexo 24](#)).

Los *Retrovirus* tipo A que han sido identificado en las células de mamíferos carecen de las proteínas de la envoltura por lo cual no pueden atravesar la membrana citoplasmática (Herr y Spell, 1985). Por esta razón, estas partículas virales no están asociadas con la patogenicidad de estos virus, aunque si se ha demostrado que poseen secuencias genómicas transponibles que pueden activar oncogenes en las células hospederas. La determinación de *Retrovirus* por el método de microscopía electrónica de transmisión en el hibridoma CB.Hep-1 demostró ausencia de partículas retrovirales tipo A, por lo que debido a la incapacidad de este tipo de virus de transmitirse verticalmente no puede esperarse presencia de dichas partículas en las células de este hibridoma.

Weiss reportó en 1982 que la línea celular NS-1 contenía elevados niveles de partículas retrovirales tipo A, pero que también liberaban otro tipo de partículas retrovirales, las denominadas tipo C. Algunas de estas partículas poseían capacidad infectiva para células humanas *in vitro*. Estudios posteriores demostraron que al menos el 20% de las líneas celulares de hibridomas expresan un alto nivel de estas

partículas (Lubiniecki, 1989).

En este trabajo se demostró a través de la técnica de microscopía electrónica de transmisión que el hibridoma CB.Hep-1 presenta partículas parecidas a *Retrovirus* tipo C. Debido a que estas partículas se observaron también en el mieloma parental es lógico suponer el origen de las mismas en el hibridoma aunque no se descarta otro. Una estrategia para lograr la eliminación de las partículas retrovirales en los hibridomas sería la utilización de un mieloma parental que no aporte este tipo de virus. Sin embargo, la secuencia de los *Retrovirus* está codificada en todos los cromosomas por lo cual es difícil suponer que pueda obtenerse un mieloma parental carente de dicha información génica.

Para caracterizar aún más estas partículas parecidas a *Retrovirus* presentes en el hibridoma CB.Hep-1 se procedió a desarrollar las técnicas de foco ampliado S+L- y de placas XC. El ensayo de focos S+L- tiene el propósito de determinar *Retrovirus* tipo C xenotrópicos, o sea es un ensayo que consta de la especificidad requerida para demostrar infección retroviral en células heterólogas a las de ratón (Peebles, 1975). Ya que la infección *in vitro* con el virus de la leucemia murina xenotrópica no induce cambios morfológicos, se utilizó una línea celular de visión (MiCl₁. ATCC CCL 64.1), la cual contiene el genoma defectivo del virus del sarcoma murino. Como resultado, una super-infección de esta línea celular con el virus de la leucemia murina reconstituye la replicación del virus del sarcoma murino y la formación de focos, por lo que los especialistas la consideran una medición indirecta de *Retrovirus* tipo C.

La ausencia de focos en el análisis de las muestras de este hibridoma evidenció que a pesar de que la microscopía electrónica de transmisión muestra partículas parecidas a los *Retrovirus* tipo C atravesando la membrana plasmática, estas no son capaces de replicarse en una célula de primates en caso de llegar a estar presente en nuestro preparado vacunal. Sin embargo esta afirmación no puede ser absoluta por las limitaciones con la sensibilidad de la técnica, ya que otros autores han informado que sólo una partícula Retroviral dentro de un millón tiene capacidad de formar focos en este tipo de ensayo (Adamson, 1998).

El otro ensayo de caracterización de *Retrovirus* empleado fue el de placas XC el cual es específico para detectar infección de *Retrovirus* de ratón pero sólo con capacidad para infectar líneas celulares de ratas o ratón (Rowe y cols, 1970). En este ensayo se utilizó como indicador la línea celular (SC-1) la cual carece de restricción Fv-1, y es capaz de detectar el virus de la leucemia murina ecotrópico. Esta línea celular es también altamente susceptible a la infección del virus de la leucemia murina pero esta infección es no citopática, por lo que en aras de detectar la presencia de este virus, la monocapa de células SC-1 se cubrió con células susceptibles XC. Los resultados de la determinación de este tipo de virus en el hibridoma CB.Hep-1 fueron también negativos, lo cual evidencia que las partículas parecidas a *Retrovirus* que se ven atravesando la membrana citoplasmática de las células de este hibridoma no son capaces de replicarse tampoco en células del mismo origen. Esta observación coincide con lo informado por otros autores (Lubiniecki y May, 1985), aunque la causa por la cual estas partículas parecidas a virus por su morfología y localización, detectadas por la técnica de microscopía electrónica de transmisión, han perdido su carácter infectivo no está esclarecida aún.

Existen otros virus que pueden estar presentes en las líneas celulares. Por ejemplo, las células pueden tener infecciones latentes o persistentes de herpesvirus, los cuales pueden ser transmitidos verticalmente de una célula a su generación, ya que el genoma viral persiste en su genoma celular (I. C. H., 1997). Tales virus pueden ser expresados constitutiva o inesperadamente. Estos virus pueden ser introducidos en las líneas celulares por diferentes rutas como la generación de una línea celular a partir de un animal previamente infectado, el uso de reactivos biológicos contaminados como el SFB o componentes del mismo y por contaminación durante la manipulación de las células.

El SFB es una vía de contaminación viral que está directamente relacionada con el sustrato celular. Por ejemplo, el uso del SFB en los cultivos agrega la posibilidad de contaminación con el virus de la rinotraqueitis bovina, virus de parainfluenza bovina y virus de la diarrea bovina (Harbour y Woohouse, 1990). Más recientemente el descubrimiento de la encefalopatía espongiiforme bovina en el ganado bovino en el Reino Unido incrementó la presión sobre el tema (Harbour y Woohouse, 1990). Se discute mucho también sobre la difícil tarea de detectar los pestivirus, ya que es muy complicado distinguir entre los componentes virales y los celulares. Este problema se produce porque los pestivirus tienen bajos niveles de replicación en células en cultivo y porque casi todos los suplementos del cultivo celular de origen bovino están contaminados con un nivel casi indetectable de este tipo de virus (Collet y cols., 1989). En esta tesis no se realizó la caracterización adicional de esta fuente potencial de contaminación viral, ya que no contamos con sistemas validados de cuantificación o detección de este tipo de virus, sin embargo todos los SFB utilizados poseen certificados del fabricante de ausencia de virus bovinos, el origen es de países sin incidencia de encefalomiелitis espongiiforme bovina y además no se evidenció efecto citopático de ningún tipo en el hibridoma CB.Hep-1 ([Anexo 3](#)).

La otra fuente potencial de contaminación viral está dada por el empleo de virus que pueden ser introducidos durante el proceso de obtención del AcM o por el uso de excipientes contaminados durante la formulación. En la literatura no aparece información detallada sobre la presencia de estos virus en líneas celulares murinas pero Wiebe y cols., (1989) encontraron que 7 de 44 virus infectaron células CHO-K1 (Ej. virus de la parotiditis y diferentes tipos de parainfluenza 1, 2, y 3). Estos dos tipos de fuentes de contaminación al igual que la endógena deben ser considerados en el diseño del método general de obtención del biológico con un énfasis particular en los esquemas de purificación.

El [Anexo 24](#) muestra de forma resumida los ensayos más empleados y sus limitaciones para la detección de virus adventicios. En resumen, el monitoreo del hibridoma CB.Hep-1 no demostró expresión de virus adventicios según los resultados de la prueba de MPA e inoculación en células sensibles a replicación viral, inoculación en huevos embrionados de pollos, cobayos, ratones adultos y ratones lactantes ([Anexos 10-13](#)).

Adicionalmente, la colonia de ratones y la ascitis fueron pesquisadas también para la presencia de virus endógenos por los métodos de ensayos serológicos y MAP respectivamente. El listado de los virus evaluados aparece en los [Anexos 14 y 15](#). En ninguna de las muestras evaluadas se observó presencia de

anticuerpos específicos para estos virus por lo cual se puede concluir que estos virus no están presentes en las muestras evaluadas. Este resultado respalda la utilización de estas fuentes biológicas para la obtención del AcM CB.Hep-1 y del AgsVHBr, ingrediente activo de la vacuna contra la Hepatitis B.

Sin embargo, esta afirmación no es absoluta porque Shek, (1987) sugirió que este ensayo es sólo aplicable para 13 virus, ya que el resto de los virus (coriomeningitis linfocítica, citomegalovirus de ratón, rotavirus de ratón, virus elevador de la lactato deshidrogenasa y el virus tímico) no necesariamente inducen la formación de anticuerpos.

Por estas razones es imprescindible demostrar la capacidad de remoción e inactivación del método de purificación del AcM CB.Hep-1 y del AgsVHBr para garantizar la seguridad virológica de la vacuna contra la Hepatitis B. Esto permitirá evidenciar que el método de purificación del AgsVHBr removerá y/o inactivará los virus que se conocen que contaminan la materia prima o que pudieran hacerlo durante el proceso de obtención del biológico y que además el método eliminará o inactivará nuevos o predecibles contaminantes virales.

El otro ensayo empleado para detectar virus adventicios en las ascitis fue la inoculación en células sensibles a replicación viral ([Anexo 23](#)). En este caso se utilizaron dos líneas celulares de primates (Vero ATCC 81, células de riñón de monos Rhesus, y A9 ATCC 171, células humanas diploides de pulmón) para confirmar que cualquier virus que se haya identificado mediante los ensayos específicos o que fuese introducido de forma adventicia no posee capacidad de infectar estas líneas celulares. Los resultados tampoco evidenciaron efecto citopático en las muestra de ascitis analizadas.

Para demostrar la capacidad de remoción e inactivación de virus, varios pasos del método de purificación son desafiados con cantidades deliberadas de virus modelos (Darling y Spaltro, 1996). Por varias razones incluyendo la escala, los experimentos de remoción e inactivación viral no pueden hacerse en el sistema de purificación en el cual se obtiene el biológico de interés (Berthold y cols., 1992). Por ende, un elemento crítico en este tipo de experimento es el desescalado del método de purificación, aspecto que debe ser demostrado antes de comenzar los experimentos de desafío con virus modelos.

El nivel de purificación de la versión desescalada del método de purificación debe ser lo más cercano posible al de la escala real de producción. En tal sentido, los factores a considerar para validar el desescalado fueron detallados por Sofer, (1996). Entre los más importantes se pueden citar: concentración de proteínas en la muestra aplicada a las columnas cromatográficas, temperatura, flujo lineal, tiempo de residencia para el caso de la cromatografía de afinidad, contenido de sales de los tampones, longitud de la tuberías que unen las columnas cromatográficas con los sistemas de detección, el material de las celdas cromatográficas y el tipo de material de las mangueras.

La validez del desescalado del método purificación del AcM CB.Hep-1 quedó demostrada para la cromatografía de afinidad. Este método se diseñó para que cumpliera con el 1% de la escala real de purificación o sea una escala 1/100 para cubrir un volumen de 5 a 60 L de ascitis como volumen inicial en la purificación del AcM CB.Hep-1. Los criterios más importantes que se tuvieron en cuenta fueron: Tr

constante, la razón de carga, volumen inicial, pH y conductividad de los tampones, volumen del inóculo viral, temperatura y el flujo lineal. De estos el más importante fue mantener constante el Tr en el paso que más aporta a la pureza del AcM CB.Hep-1, la cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose.

Los resultados de las especificaciones de calidad en los experimentos de desescalado fueron similares a los exigidos para este producto en la escala de producción. La pureza del AcM CB.Hep-1 fue superior al 90%, mientras que la actividad específica fue también superior a la especificación aprobada de 70%. El rendimiento del método de purificación osciló entre 1-2 mg/mL demostrando que el desescalado brindó un AcM CB.Hep-1 con la misma integridad molecular que el método de purificación a escala real. El análisis estadístico no demostró diferencias significativas entre estas variables según la prueba de comparación de medias basada en la distribución t-Student para un 95% de confianza.

Los resultados de la actividad específica, pureza y rendimiento del AcM CB.Hep-1 tampoco se afectaron cuando se validó el desescalado en presencia de cada virus modelo porque en ningún caso los valores obtenidos para estos parámetros fueron inferiores a los establecidos como especificación de calidad. No obstante, se demostró diferencias significativas en la actividad específica del AcM CB.Hep-1 ($p=0.0176$) en el experimento de desescalado en presencia del virus sendai; diferencias significativas en la pureza del AcM purificado cuando se desescaló en presencia del virus sendai y del PVC ($p=0.0289$). En cuanto al rendimiento, las diferencias significativas se observaron en los experimentos desarrollados con el VHS-1 y el PVH-2 ($p=0.0341$). Estos resultados demuestran un comportamiento diferente de cada modelo viral en la cromatografía de afinidad, lo cual está dado por sus propiedades de poseer proteínas que pueden interactuar de forma inespecífica con la matriz cromatográfica y tener diferencias en el tamaño.

Ante la gran heterogeneidad viral ([Anexo 25](#)), uno de los aspectos más polémicos es la selección del virus modelo para validar. La cantidad de virus a utilizar depende de la profundidad con que se quiera caracterizar el método de purificación y sobre todo del número de contaminantes virales presente en la fuente biológica. No obstante, debido a la potencialidad del sistema de presentar virus de cualquier tipo, los virus modelos se han agrupado de la siguiente forma para los estudios de validación: 1) virus de ADN con envoltura, 2) ADN sin envoltura, 3) ARN con envoltura y 4) ARN sin envoltura. También se trata de escoger virus con diferencias en su capacidad de resistencia ante los agentes físico-químicos y diferencias en el tamaño. Entre otras consideraciones que deben tenerse en cuenta para seleccionar los virus modelos está que alcancen altos títulos en cultivo y que exista un sistema confiable de cuantificación para la detección en cada paso del sistema de purificación.

En este trabajo se utilizaron los siguiente virus modelos: virus sendai, VIH-1, VHS-1, PVH-2 y PVC. Estos virus modelos cubren un amplio intervalo de propiedades físico-químicas. En ellos se encuentran virus pequeños, grandes, envueltos, desnudos, de ARN y ADN. También su resistencia ante los agentes físico-químicos es diversa, desde virus muy sensibles o poco resistentes como el virus sendai, el VIH-1 y el VHS-1 hasta virus muy resistentes como el PVH-2 y el PVC.

Levy y cols., publicaron en 1984 que la purificación de AcM a partir de ascitis mediante la cromatografía

de afinidad basada en Protein A-Sepharose eliminó completamente todo el virus de la leucemia murina y su ácido nucleico, aún cuando este se adicionó en cantidades superiores a las normalmente encontradas. La OMS fue el primer órgano internacional en tomar la iniciativa de facilitar la estandarización y aceptación de las líneas celulares como sustratos para la producción continua de biológicos con la aprobación de la vacuna contra el virus de la poliomielitis en la década del 80 (O. M. S., 1987). Esta estandarización aparece también muy bien desarrollada en el trabajo relacionado con el proceso y aprobación regulatoria del activador tisular del plasminógeno (Builder y cols., 1989). Builder demostró 4 Logs de remoción en cada uno de los pasos desafiados del método de purificación (intercambio iónico, cromatografía de afinidad en Protein A-Sepharose y cromatografía de exclusión molecular) siendo el factor de eliminación total de virus 12 Logs.

Crawford y cols., 1987) describieron un método de purificación del AcM UCHD4 específico para el antígeno RhD de eritrocitos humanos, producido por un clon de células B inmortalizadas con el virus de Epstein-Barr. Este método removió el virus de Epstein-Barr y el ADN hasta el límite de detección. El esquema de purificación implicó: la filtración desde 0.22 μm hasta 0.1 μm , tratamiento con ADNasa y cromatografía de inmunoafinidad usando un AcM anti-IgG humana. Tanto este trabajo como el informado por Mannucci y cols., (1989) donde se purificó el Factor VIII para su uso a escala industrial demostraron la alta capacidad de remoción que ofrece la cromatografía de inmunopurificación.

El objetivo principal de nuestro estudio de remoción fue demostrar entre 3-5 Logs de remoción, ya que estos son los resultados informados para este tipo de cromatografía de afinidad (Martin, 1985; Harbour y Woodhouse, 1990). La cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose demostró una alta capacidad de remoción para todos los virus evaluados excepto para el PVC. Los virus envueltos evaluados (sendai, VIH-1 y VHS-1) no mostraron afinidad por el soporte cromatográfico, ya que esencialmente todos los virus infecciosos se encontraron en la fracción no adsorbida. Esto evidenció la ausencia de interacciones fuertes entre las proteínas de la envoltura y la matriz cromatográfica en nuestras condiciones de adsorción del AcM CB.Hep-1. Probablemente este efecto de asociación del virus con la matriz se minimizó por la presencia de grandes cantidades de IgG que saturan tanto el interior como el exterior de las perlas, ya que la IgG manifiesta una alta afinidad por la Proteína A. Otros de los posibles factores relacionados puede ser la baja fuerza iónica del tampón de adsorción del AcM CB.Hep-1.

Con el PVH-2 se observó interacción con la matriz cromatográfica, provocando que la capacidad de remoción fuera sólo de 4.9 Logs de los 9.2 Logs aplicados. Estos resultados coinciden con los resultados de otros autores que han demostrado que determinados virus pequeños muestran afinidad por el medio cromatográfico (O' Neil y Balkovic, 1993). Para el caso del PVC sólo se pudo demostrar 2.81 Logs de remoción. En cierto modo estos resultados están también en correspondencia con lo descrito por otros autores, ya que lo que se recomienda para remover este tipo de virus es la cromatografía de intercambio iónico (Cameron y cols, 1997).

En general, la presencia de envoltura parece incrementar la afinidad que los virus poseen por los soportes

cromatográficos donde el mecanismo de interacción se basa en interacciones electrostática debido a la presencia de glicoproteínas cargadas positivamente en la membrana plasmática. Pero esto no descarta que este tipo de interacción se pueda producir también con proteínas de la nucleocápsida de los virus desnudos. Además se especula que puede ocurrir cierto grado de agregación de las partículas virales, dificultando así su remoción de los geles cromatográficos.

En esta tesis, el PVH-2 y el PVC, ambos virus desnudos y de muy pequeño tamaño tuvieron un comportamiento diferente a de los virus envueltos en la cromatografía de afinidad. Estos virus demostraron un 65.2% y un 47.5% de interacción con la matriz respectivamente. Producto de que estos son virus desnudos para los cuales no se ha informado interacción con los soportes cromatográficos, la explicación que justifica este tipo de retención es el pequeño tamaño de los mismos con respecto a los demás virus evaluados. Esta característica física le permite una mejor accesibilidad al interior de las perlas, provocando un retardo considerable de los mismos dentro del lecho cromatográfico.

En resumen la cromatografía de afinidad en Protein A-Sepharose bajo las condiciones de adsorción evaluadas es muy adecuada para la eliminación de altos niveles de contaminación de virus envueltos de mediano y gran tamaño y virus con propiedades similares al PVH-2, mientras que para los virus desnudos y de pequeño tamaño como el PVC no funciona eficientemente. Por esta razón es mandatorio evaluar la capacidad de inactivación de los procedimientos de higienización y de almacenamiento de este gel cromatográfico y los procedimientos de inactivación viral para aumentar así la capacidad de inactivación viral del método de obtención del AgsVHBr.

En tal sentido, el etanol es uno de los solventes habitualmente recomendado para los pasos de higienización y almacenamiento de los geles cromatográficos, pero esta recomendación se basa en la excelente capacidad del etanol para inactivar bacterias gram-positivas y gram-negativas, *Mycobacterium tuberculosis* y varios hongos. Varios virus lipofílicos como el VHS y el VIH son susceptibles también a los alcoholes. Otra razón que justifica su uso como agente higienizante es la estabilidad de la Proteína A en este solvente orgánico. Sin embargo, otros virus (desnudos) suelen ser menos sensibles a la acción del etanol.

Existen varios trabajos publicados sobre el efecto del etanol en la inactivación viral (Sekura, 1991; Ruibal, 1999) pero el porcentaje empleado de etanol suele ser muy elevados o los tiempos de incubación prolongados, lo cual atenta contra el recobrado y la estabilidad de la molécula de interés.

La demostración de la capacidad de inactivación de virus retenidos en el interior de las matrices cromatográficas completan los datos requeridos para proponer el uso de este solvente orgánico en los métodos de purificación de moléculas para uso en humanos. En esta tesis el etanol se utilizó al 70% para higienizar la matriz Protein A-Sepharose, mientras que para almacenarla se utilizó al 20%. Teniendo en cuenta que el método de remoción de virus desnudos, en especial el PVC, no resultó ser todo lo eficiente que se necesita, y que los solventes orgánicos desnaturalizan con facilidad determinadas proteínas, procedimos a evaluar la capacidad de inactivación del etanol al 70 y al 20% del VHS-1, VIH-1, PVH-2 y

el PVC. La importancia de estos experimentos radica en que acumulaciones sucesivas de virus en los geles cromatográficos afectan la capacidad de unión de los mismos y modifica su capacidad de remoción, por lo que no considerar este elemento, nos puede llevar a una sobreestimación de la capacidad de remoción del método de purificación.

Los experimentos desarrollados poseen novedad metodológica ya que usualmente los experimentos de inactivación se realizan desafiando determinado volumen del solvente orgánico que se desee con altas cantidades de virus, pero no consideran el efecto que puede tener la interacción virus-matriz cromatográfica sobre el poder inactivador de un solvente dado.

Teniendo en cuenta este importante factor, procedimos a mezclar los virus modelos con la matriz cromatográfica y con el etanol y no el virus modelo con el etanol solamente. En contra de este procedimiento se puede plantear que siempre habrá cierta cantidad de virus que no podrá cuantificarse por quedar incluida dentro del gel, especialmente para los virus pequeños.

Los resultados evidenciaron que el etanol al 70% inactivó 4.7-4.9 Logs para el VIH-1, VHS-1 y el PVC respectivamente. Atendiendo a estos resultados puede concluirse que el empleo de etanol al 70% como agente higienizante de la matriz de afinidad es un paso robusto de inactivación viral, ya que provoca más de 4 Logs de inactivación. La segunda conclusión es que su poder de inactivación bajo las condiciones experimentales evaluadas es relativamente independiente de la presencia de envoltura, ya que se demostró 4.9 Logs/12 hrs de inactivación para el PVC el cual es el virus de mayor resistencia informada entre los evaluados. Sin embargo, si se analiza detalladamente los resultados se concluye que el PVH-2 es muy resistente, o sea que sólo se pudo inactivar el 50% del PVC aplicado y en no menos de 12 hrs, mientras que para el VIH-1 y el VHS-1 (virus envueltos) la capacidad de inactivación se observó en sólo 15 min.

Los resultados obtenidos para el PVC, reprodujeron los hallazgos de Harris y cols., (1974) donde se demostró más de 5.7 Logs en varias sustancias químicas. De lo anterior se deduce que la presencia de matriz cromatográfica no afectó la capacidad de inactivación del etanol sobre este virus en comparación con el sistema virus y solvente orgánico sólo.

Con respecto al PVH-2, se evidenció sólo 1.9 Logs de inactivación en presencia del etanol al 70% en 72 hrs (Fig. 24A, 26). Estos resultados están en concordancia con otros trabajos donde se informa la baja capacidad del etanol para la inactivación de virus desnudos. La capacidad de inactivación de este solvente se potencia cuando se combina con un gran contenido de agua, con altas temperaturas o con otras sustancias químicas de gran capacidad de inactivación de virus (Hodde y Hiles, 2002). Para inactivar el PVH-2 recomendamos el uso de NaOH, ya que Cameron y colaboradores., (1997) informaron más de 8 Logs de inactivación en sólo 20 min a 20°C con NaOH 1M. Esto implicaría hacer un estudio de estabilidad de la Protein A-Sepharose bajo estas condiciones para corroborar su estabilidad.

En el estudio con el etanol al 20% bajo las condiciones habituales de almacenamiento de la matriz Protein A-Sepharose se obtuvo un nivel apreciable de inactivación de virus envueltos en 15 min (VIH-1, 3.7 Logs y VHS-1, 4.0 Logs). Por el contrario, no se demostró inactivación importante de los virus desnudos <2.3

Logs en 72 hrs, por lo cual podemos resumir que el almacenamiento de la matriz en etanol al 20% no aporta una capacidad importante de inactivación de virus desnudos. Una recomendación de este trabajo puede ser estudiar otros solventes o sustancias químicas que ofrezcan un mayor nivel de inactivación de virus modelos en presencia de la matriz de afinidad Protein A-Sepharose.

Como queda demostrado la cromatografía de afinidad basada en Protein-A Sepharose no es suficiente por sí sola para garantizar más de 6 Logs de remoción de virus por encima del nivel de contaminación de la fuente biológica. Por esta razón decidimos evaluar la capacidad de inactivación viral de otros dos pasos del método de purificación de AcM CB.Hep-1 y del AgsHVBr. En general se recomienda que los procesos de inactivación viral tengan lugar después de los pasos de remoción, o sea cuando el producto final ha sido envasado para que no ocurra ninguna contaminación posterior con virus adventicios. Pero esto no es una regla, ya que en ocasiones el producto de interés, o cualquier otro compuesto que sea parte de la formulación final, no resisten las condiciones de inactivación necesarias.

Las guías de las agencias regulatorias recomiendan la incorporación de métodos de inactivación química durante la obtención de los AcMs, aún cuando estos puedan reducir el recobrado final, pues algunos pueden disminuir la actividad biológica o modificar la estructura de la molécula de interés (I. C. H., 1997). En resumen las estrategias de inactivación pueden ser divididas en dos grandes categorías. La categoría que involucra los métodos físicos y la que involucra los métodos químicos.

Martin demostró en 1985 que los *Retrovirus* murinos son particularmente sensibles a pH ácidos y sobre todo a la reducción brusca del pH. Encontró una reducción de 4.0 Logs a pH 3.5 y que la cromatografía de afinidad puede tener carácter dual, es decir, de remoción y de inactivación, ya que se combinan ambos efectos, el provocado por el intervalo de exclusión de la matriz y por el uso de tampones ácidos para disociar el AcM de la Proteín A-Sepharose.

Aunque no existen muchos datos relevantes en la literatura en cuanto a la inactivación de virus en los procesos de obtención de AcMs, sí existe suficiente información sobre la inactivación viral en los procesos de producción de vacunas. Jiang y colaboradores., (1986) informaron que el recobrado del antígeno D del poliovirus fue significativamente mayor cuando este virus se inactivó con formalina en vez de β -propiolactona. En otro estudio se demostró que la β -propiolactona requiere menos tiempo para la inactivación viral y por consiguiente la pérdida del antígeno también es menor (Le Grippo, 1960). La β -propiolactona demostró ser efectiva para inactivar un amplio rango de virus, entre ellos: el virus de la encefalomiocarditis, virus de la hidrofobia, herpesvirus, sarampión o rubéola, parotiditis, influenza (A y B) y hepatitis (Le Grippo y Hartmant, 1955).

Posterior a estos estudios se ha investigado más sobre los procedimientos de inactivación viral relacionados con el fraccionamiento del plasma. Existe ya un enorme cuerpo de datos referidos a la inactivación viral en los métodos de purificación de productos obtenidos a partir de la sangre (Horowitz, 1985; Horowitz, 1988; Borovec y cols., 1998; Ruibal y cols., 1999). La pasteurización ha sido adoptada para la inactivación del VHB en preparaciones de albúmina (60°C durante 10 hrs). Todos los productos

que han recibido este tratamiento tienen una estadística excelente en cuanto a la no aparición de agentes infecciosos de tipo viral. Pero desafortunadamente este método no es exitoso para inactivar partículas virales en productos lábiles como las Ig. Como consecuencia, se han desarrollado un número de estrategias nuevas de inactivación para prevenir la transmisión viral en los hemoderivados. Estas estrategias incluyen:

- a). Métodos físicos tales como: enfriamiento con etanol, calentamiento de productos que han sido previamente congelados a temperaturas que oscilan entre -60°C y -80°C por un tiempo de 30 a 90 hrs, calentamiento con agitación en presencia de un N-heptano, calentamiento con vapor, calentamiento en presencia de estabilizadores con diferentes tipo de azúcares y glicina, modificaciones de los protocolos de pasteurización (Helderbrant y cols., 1985; Horowitz y cols., 1985; Levy y cols., 1985; Petricciani y cols., 1985; Quinnan y cols., 1985; Smith y cols., 1985).
- b). Tratamientos químicos tale como: tratamiento en solución con mezclas de solventes y detergentes; tratamiento en solución con β -propiolactona con o sin radiaciones ultravioleta (Le Grippo y cols., 1964; Stephan y Kotitschk, 1987; Horowitz y cols., 1988; Mannucci y Colombo, 1988).

La mayoría de estos procedimientos son muy eficientes para inactivar el VIH pero no totalmente efectivos para inactivar el virus de la hepatitis no A no B, no obstante, muchos de estos procedimientos pudieran ser muy efectivos para inactivar virus murinos, considerando siempre la poca resistencia de las Igs a estos métodos.

Antes de abordar las estrategias de inactivación empleada en este trabajo se revisó la capacidad de resistencia de los virus murinos a los agentes físico-químicos. El [Anexo 26](#) presenta una información resumida de la capacidad de resistencia de los virus murinos. De este resumen se extrae, que hay 7 virus sensibles al pH ácido, 3 virus sensibles al pH básico, 12 virus sensibles a los diversos solventes orgánicos y 16 virus sensibles a la temperatura (hasta 60°C). Los otros aspectos que se consideraron para el diseño de la estrategia de inactivación viral fueron: las propiedades del AcM CB.Hep-1 o sea, su capacidad de resistencia a los diversos agentes físico-químicos y cuales de estos agentes químicos están aprobados para su uso en humanos.

Está demostrado que los virus envueltos son los más sensibles a los diferentes procedimientos de inactivación. De ellos los *Retrovirus*, que revisten particular importancia para nuestro trabajo, ya que son los virus que parecen estar presentes en nuestra línea celular, son especialmente sensibles a pH ácidos o a cambios bruscos del pH del medio. Por lo tanto, debido a que los AcMs son desprendidos de la columna de afinidad Protein A-Sepharose a pH ácido decidimos evaluar primero la capacidad de inactivación del tampón ácido cítrico 100 mM; pH 3 a 4°C .

Para abordar este estudio se evaluó la capacidad del AcM CB.Hep-1 de mantener el reconocimiento del AgsVHBr bajo estas condiciones. Los resultados ratificaron que en ausencia de virus, el AcM CB.Hep-1 modelos es capaz de mantener el 80% de su capacidad de reconocimiento del AgsVHBr durante 7 hrs, lo cual brinda un amplio intervalo de tiempo para los experimentos de inactivación viral. La comparación

estadística del parámetro de actividad específica del AcM CB.Hep-1 en ácido cítrico 100 mM; pH 3 en presencia de los virus modelos no mostró diferencias significativas para un 95% de confianza según el análisis de varianza de simple factor ($p=0.7600$), lo cual evidencia la no influencia de estos virus en el reconocimiento de este AcM.

Todos los virus envueltos se inactivaron en un valor superior a 4.8 Logs, llegando a alcanzar valores de 7 Logs en 1 h bajo esta condición. Estos resultados son esperados, pues la presencia de envoltura aporta poca resistencia ante los agentes físico-químicos, ya sea por los cambios conformacionales producidos en las proteínas fusogénicas virales o por afectación directa de la estabilidad de la envoltura.

Por el contrario, el PVH-2 demostró alta resistencia a esta condición experimental, pues sólo se demostró 0.1 Logs de inactivación lo que se considera despreciable por la sensibilidad del método de medición del título viral. Se ha planteado que la alta estabilidad de este tipo de virus se debe a la presencia de una cápsida de gran diámetro, incluso en ocasiones se postula la presencia de dos cápsidas lo cual los hace muy resistente a las condiciones gastrointestinales (White y cols., 1991).

Se demostró un factor de inactivación muy alto para el PVC en tampón (5.2 Logs /1 h). Estos resultados coinciden con los informados por otros autores, ya que se informa que el virus diminuto de ratón (parvovirus) es capaz de mantener su infectividad hasta valores de pH cercanos a 12 y perder su infectividad en valores de pH cercanos a los evaluados en este trabajo (2-3) pero a elevadas temperaturas. Este virus mantiene un elevado porcentaje de su infectividad a pH 2 durante 7 días a una temperatura de 4°C (Harris y cols., 1974). Este resultado garantiza que el método de purificación del AcM CB.Hep-1 no permite que este tipo de virus pase con capacidad infectiva a la purificación del AgsVHBr, aún en caso de estuvieran presente en la fuente biológica y no fuera eliminado durante la cromatografía de afinidad.

Resumiendo los resultados obtenidos a nivel del método de purificación del AcM CB.Hep-1 podemos afirmar que sólo para uno entre todos los virus modelos evaluados, no fue posible demostrar un nivel de remoción e inactivación superior a 6 Logs por encima de la fuente biológica, el PVH-2. La suma de la capacidad de remoción e inactivación durante la purificación del AcM CB.Hep-1 llega a 5 Logs para este virus.

Procedimos entonces a evaluar otro paso de purificación pero en este caso dentro del método de purificación del AgsVHBr. Este tipo de análisis es válido porque a partir del año 2001 la FDA aprobó considerar ambos métodos de purificación del biológico para la demostración de la capacidad de remoción e inactivación total de virus modelos (F. D. A., 2001).

Como se explica en el [Anexo 26](#) hay varias opciones de inactivación de estos dos virus resistentes. Sin embargo, las sustancias químicas comúnmente empleadas para inactivar virus de este tipo (formalina y β -propiolactona) resultan de poco interés para el método de purificación del AgsVHBr, ya que en el mismo existen varios pasos con un alto potencial para eliminar virus como la propia inmunocromatografía y el calentamiento a 60°C del AgsVHBr en presencia del agente caotrópico KSCN 3M. Introducir nuevos pasos implicaría entre otros aspectos validar métodos de determinación de estas sustancias introducidas

en el proceso.

La desnaturalización térmica tiene aplicaciones industriales y biosanitarias importantes, como la esterilización del material o la conservación de alimentos. Las proteínas también se desnaturalizan como consecuencia de su exposición a los agentes caotrópicos. Estos agentes interfieren con los enlaces no covalentes que mantienen la estructura tridimensional de la proteína, y provocan su desorganización por transición a un estado conformacional desordenado. En esta tesis se estudió la capacidad de inactivación del paso de incubación del AgsVHBr en Tris-HCl 20 mM/EDTA 3 mM/NaCl 1M/KCSN 3 M; pH 7.2 a 60°C durante 2 hrs. Este estudio de inactivación a nivel de la obtención de este antígeno es muy importante por los resultados obtenidos durante la evaluación del método de purificación del AcM CB.Hep-1 para los virus desnudos, ya que los mismos pudieran estar presentes en altos títulos en la fuente biológica.

Los experimentos de recuperación del AgsVHBr bajo estas condiciones en presencia de los diferentes virus modelos reprodujeron los resultados de la obtención del AgsVHBr propiamente dicho. En todos los casos el AgsVHBr fue recuperado en más del 90% en 180 min de incubación. El análisis estadístico empleando un ANOVA de simple factor para un nivel de confianza de 95% demostró la ausencia de significación ($p=0.7293$), corroborando el hecho de que la presencia de grandes cantidades de virus en este tratamiento no afectó la recuperación del AgsVHBr.

Sin embargo, para el caso de los virus modelos empleados, esta combinación de factores evidenció un potente efecto inactivador. En general todos los virus evaluados fueron completamente inactivados a los 10 min de tratamiento. Esta evaluación, constituye el primer informe de inactivación viral bajo estas condiciones de trabajo. Siempre que la proteína de interés sea resistente al agente caotrópico KSCN 3 M a 60°C este podría ser utilizado como potente agente inactivador viral.

Interesantemente, el VIH-1 necesitó 1 h para lograr su inactivación completa, demostrando así un nivel de resistencia superior a los virus desnudos evaluados. Esto puede deberse al nivel de carbohidratos de la proteína de la envoltura gp 120. Smale y colaboradores, (2000) demostraron que las altas temperaturas inhiben la hidrólisis de los azúcares en glucosa y fructosa para favorecer la formación de una estructura llamada Glyoxal en compañía de otros azúcares libres. Estos azúcares libres tienen un alto poder reactivo con los grupos aminos libres de las proteínas, lo cual provoca una oligomerización importante de las proteínas mediante un mecanismo basado en el intercambio de grupos tioles-disulfidos. Estas estructuras suelen ser muy resistentes al calor.

Finalmente, los resultados presentados en esta tesis sobre la implementación de un método de purificación del AcM CB.Hep-1 que combinado con el tratamiento térmico del AgsVHBr obtenido a partir de la levadura *Pichia pastoris* apoyan la justificación científica de la utilización de este AcM en la cromatografía de inmunoafinidad del proceso de obtención del ingrediente activo de la vacuna contra la Hepatitis B, ya que le brinda un alto grado de selectividad, recobrado, factor de concentración y originalidad con respecto a otros métodos de obtención de este antígeno. Además se demostró la alta

capacidad de remoción y/o inactivación de virus >6 Logs (virus sendai: 21.6 Logs, VIH-1: 14.99 Logs, VHS-1: 21.29 Logs, PVH-2: 14.96 Logs y PVC: 14.41 Logs) por encima del nivel de contaminación de la fuente biológica, lo cual permite afirmar la seguridad virológica de la vacuna contra la Hepatitis B.

6. CONCLUSIONES

1. El método de purificación del AcM CB.Hep-1 es efectivo, consistente y permite obtener una preparación de anticuerpo estable, de alta pureza y bajo nivel de contaminación de ADN de ratón y Proteína A, lo cual permite a su vez, obtener inmunogeles con la calidad y estabilidad requeridas para la purificación del AgsVHBr.
2. El hibridoma de ratón CB.Hep-1(48/1/5/4), los ratones BALB/c y la ascitis pueden ser empleados para la obtención del AcM CB.Hep-1, ya que no presentan contaminación con virus patógenos al hombre.
3. El desescalado de la cromatografía de afinidad basada en Protein A-Sepharose, empleando como criterio el tiempo de residencia constante, permite reproducir las especificaciones de calidad exigidas al AcM CB.Hep-1 purificado a escala industrial.
4. El método de purificación del AcM CB.Hep-1 brinda un alto grado de remoción e inactivación de los virus envueltos y el parvovirus canino. Por el contrario, este método posee un bajo nivel de inactivación del poliovirus humanos tipo 2.
5. El método de higienización de la matriz Protein A-Sepharose con Etanol 70% es efectivo para inactivar virus envueltos y también virus desnudos con propiedades físico-químicas similares al parvovirus canino, pero no es efectivo para inactivar el poliovirus humano tipo 2.
6. El almacenamiento de geles cromatográficos con Etanol 20% durante 72 hrs es efectivo para inactivar virus envueltos, pero no para inactivar virus desnudos.
7. El tratamiento térmico del AgsVHBr en presencia del KSCN es un paso robusto de inactivación de virus envueltos y desnudos en sólo 1 h de tratamiento.
8. El método de obtención del AgsVHBr, componente activo de la vacuna contra la Hepatitis B, tiene una capacidad de eliminación de virus envueltos y desnudos mayor de 14.4 Logs, lo cual asegura que no lleguen patógenos virales al hombre.

7. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la optimización la etapa de semipurificación del método de purificación el AcM CB.Hep-1.
2. Se recomienda la validación de la capacidad del método de purificación del AcM CB.Hep-1 para eliminar ADN de ratón.
3. Se recomienda la caracterización más detallada las partículas esféricas de 100-200 nm parecidas a Retrovirus tipo C detectadas por microscopía electrónica de transmisión en el hibridoma CB.Hep-1 para definir sus propiedades biológicas.
4. Se recomienda realizar estudios que demuestren el nivel de retención de virus desnudos de las matrices cromatográficas después de sucesivos ciclos de purificación de materiales contaminados con cantidades deliberadas de virus modelos.
5. Se recomienda la evaluación de otros agentes higienizantes (NaOH 1M) de matrices para inactivar virus desnudos con propiedades parecidas al poliovirus humano tipo 2 así como condiciones de higienización y almacenamiento más robustas para inactivar virus desnudos en general.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Accomazzo, M. A., Grant, D. C. (1986). Mechanisms and devices for filtration of critical process gasses”, fluid filtration: gas, volume 1, ASTM STP 975, R. R. Raber, (ed) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA: 402-420.
2. Adamson, S. R. (1998). Experiences of virus, retrovirus and retrovirus like particles in Chinese hamster ovary and hybridoma cells used for production of protein therapeutics. *Dev. Biol. Stand.* 93: 89-96.
3. 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.
4. Agraz, A., Quiñones, Y., Expósito, N., Breña, F., Madruga, Y., Pentón, E., Herrera, L. (1993). Adsorption-desorption of recombinant hepatitis B surface antigen (r-HBsAg) from *P. pastoris* on diatomaceous earth matrix: optimization of parameters for purification. *Biotech. Bioeng.* 42: 1238-1244.
5. Akerstrom, B., Brodir, T., Reis, K., Björk, L. (1985). Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal or policlonal antibodies. *J. Immunol.* 13: 2589-2592.
6. André, F. E. (1990). Overview of 5-year clinical experience with a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine.* 8: S74-S78.
7. 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.
8. Azzi, A., Zakrzewskan, K., Morfini, M., Mariana, G., Mannuci, P. (1992). Human parvovirus B19 infection in hemophilic first infused with high purity, virally attenuated factor VIII concentrates. *Ann. Journal Hematology.* 39: 228-230.
9. Baker, D. G. (1998). Natural pathogens of laboratory mice, rats, rabbits and their effects on research. *Clinical Microbiology Rewies.* 231-266.
10. Balint, Jr. J. (1984). Tumoricidal response following over immobilized Protein A: Identification of immunoglobulin oligomers in serum after perfusion y their partial characterization. *Cancer Res.* 44: 734.
11. Ball-Goodrich, L. J., Johnson, E. (1994). Molecular characterization of a newly recognized mouse parvoviurs. *J. Virol.* 68: 6476-6486.
12. Balls, M. (1995). Reduction, refinement and replacement: The end of an era and new challenges. *Atlas.* 23: 744-745.
13. Balt, B. C., Yakannanar, U. M., Seng, V. (1995). Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. *Bioseparation.* 5: 41-52.
14. Barker, L. (1970). Transmission of serum hepatitis. *J. Ann. Med. Assoc.* 211: 1509-1512.
15. Barkon, M. L., Haller, B. L., Virgin IV, H. W. (1996). Circulating immunoglobulin G can play a critical role in clearance of intestinal reovirus infection. *J. Virol.* 70: 1109-1116.
16. Bartal, A. H., Hirshaout, Y. (1987). Retrovirus and hybridoma formation, bystyer or active participants? In: Bartal and Hirshaut (Ed) *Methods of hybridoma formation.* Human press, USA: 41-60.
17. Barthold. S. W., Smith A. L., Bhatt, Y P. N. (1993). Infectivity, disease patterns and serologic profiles of reovirus serotype 1, 2 and 3 in infant y weanling mice. *Lab. Anim. Sci.* 43: 425-430.
18. Beasly, R. P., Lin, C. C., Hwang, L.Y. (1984). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22, 707 men in Taiwan. *Lancet.* 2: 1129-1133.
19. Beatty, D. J., Beatty G. B., Vlahos, W. G. (1987). Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods.* 100: 173-179.

20. Bennette, J. G. (1960). Isolation of a non-pathogenic tumor-destroying virus from mouse ascites. *Nature*. 187: 72-73.
21. Bentvelzen, P., Briinkhof, J. (1980). Ubiquity of natural antibodies to the mammary tumor virus in mice. *Arch. Geschwulstforsch.* 50: 193-203.
22. Berthold, W., Walter, J., Werz, W. (1992). Experimental approaches to guarantee minimal risk of potential virus in purified monoclonal antibodies. *Cytotechnology*. 9: 189-201.
23. Besinger, W. I., Bukner, C. D., Clif, R. A., Thomas, E. D. (1984). Clinical trials with staphylococcal Protein A. *J. Biol. Resp.* 3: 353-347.
24. Besselsen, D. G., Pintel, D. J., Purdy, G. A., Besch-Williford, C. L., Franklin, R. R., Hook, Jr., Riley, L. K. (1996). Molecular characterization of newly recognized rodent parvovirus. *J. Gen. Viol.* 77: 899-911.
25. Bishop, J. M., Varmus, H. E. (1975). The molecular biology of RNA tumor viruses. *Cancer: A Comprehensive Treatise*, vol. 2, F. F. Becker, ed. New York: Plenum: 1-48.
26. Bitter, G. A. (1988). Hepatitis B vaccine produced in yeast. *J. Med. Virol.* 25: 123-140.
27. Builder, S. E., Ogez, J. R., Paoni, V. R., Arathoon, N. F., Lubiencki, A. S. (1989). Process development and regulatory control of tissue plasminogen activator. In: Spier RE, Griffiths JB, Crooy P and Stephenne J (eds) *Advances in animal cell biology and technology*: 452-464. Butterworths, Guildford.
28. Blomqvist, S., Brun, L. A., Stenvik, M., Home, T. (2003). Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from health vaccine and containing a chimeric capsid protein V1. *J. Gene. Virol.* 84: 573-580.
29. Bloom, J. W., Wong, M. F., Mitra, G. (1989). Detection and reduction of Protein A in immobilized Protein A purified monoclonal antibody preparation. 117: 83-89.
30. Blumberg, B. S., Gerstely, B. S. J., Humgerford, D. A., London, W. T., Sutnick, A. J. (1967). A serum antigen in down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Annals of Internal Medicine*. 66: 924-931.
31. Boi, C. (2007). Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification. *Journal of Chromatography*. 848. 1: 19-27.
32. Borovec, S., Broumis, C., Adcock, W., Fang, R., Uren, E. (1998). Inactivation kinetic of model and relevant blood-bore viruses by treatment with sodium hydroxide and heat. *Biologicals*. 3: 237-244.
33. Brancroft, W. H., Mundon, F. K., Russell, P. K. (1972). Detection of additional antigenic determinants of Hepatitis B antigen. *J. Immunol.* 109: 985-992.
34. Brian, D. K., Priscilla, J., Wright, R., Briasco, K. (1997). Demonstrating process robustness for chromatography purification of a recombinant protein. *BioPharm*. October: 36-46.
35. Brown, P., Preece, A. M., Will, G. R. (1992). Friendly fire in medicine: hormone, homograft and Creutzfeld-Jakob disease. *The Lancet*. 340. 4: 24-27.
36. Brownstein, D. G., Smith, A. L., Jackoby, R. O., Johnson, E. A., Hansen, G., Tattersall, P. (1991). Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of minute virus of mice y regulation by host genotype. *Lab. Invest.* 65: 357-364.
37. Brownstein, D. G., Smith, A. L., Johnson, E. A., Pintel, D. J., Naeger, L. K., Tattersall, P. (1992). The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression the small non-structural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J. Virol.* 66: 3118-3124.
38. Bruss, V., Vieluf, K. (1995). Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J. Virol.* 69: 6652-6657.
39. Buckholz, R. G., Gleeson, M. A. G. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnol.* 9: 1067-1072.

40. Budkowska, A., Bedossa, P., Groh, F., Louise, A., Pillot, J. (1995). Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain. *J. Virol*; 69: 840-848.
41. Burns, J. W., Krishnaney, A. A., Vor, P. T., Rouse, R. V., Yerson, L. J., Greenberg, H. B. (1995). Analysis of homologous rotavirus infection in mouse model. *Virology*. 207: 143-153.
42. C. D. C. Center for Disease Control and Prevention. (2002). Achievements in public health: hepatitis B vaccination. United State, 1982-2002. Morbidity and mortality, weekly report, 51. 2: 529-552.
43. C. P. M. P., Committee for Proprietary Medical Products. (1988). Guidelines on the production and quality control of monoclonal antibodies of murine origin intended for use in man. TIBTECH. January. 6: 5-8.
44. Cadranel, S., Zeglhache, S., Fernández, A., Safary, A., Yré, F. (1987). Vaccination of newborns of HBsAg-positive carrier mother with a rDNA hepatitis B vaccine. *Postgrad Med. J.* 63: 159-160.
45. Caethew, P. (1986). Is rodent virus contamination of monoclonal antibody preparations for human use in human therapy a hazard? *J. Gen. Virol.* 67: 963-974.
46. Cameron, R., Davies, J., Adcock, W., MacGregor, A., Barford, P. J., Cossart, Y., Harbour, C. (1997). The removal of model viruses. Poliovirus type 1 and canine parvovirus, during the purification of human albumin using ion exchange chromatography procedures. *Biologicals*. 25: 391-401.
47. Camperi, S. A., Iannucci, N. B., Albanesi, G. J., Oggero, E. M., Etcheverrigaray, M., Messeguer, A., Albericio, F., Cascone, O. (2003). Monoclonal antibody purification by affinity chromatography with ligands derived from the screening of peptide combinatorial libraries. *Biotechnol. Letter*, 25, 18: 1545-1548.
48. Carman, W. F., Thomas, H., Domingo, E. (1993). Viral genetic variation, hepatitis B as clinical example. *Lancet*. 341: 349-353.
49. Carman, W. F., Zanetti, A. R., Karayiannis, P., Ware, J., Manzillo, G., Tanzi, E., (1990). Vaccine-induced escape mutant of Hepatitis B virus. *Lancet*. 336: 325-329.
50. Chisari, F., Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 29-60.
51. Colle, J. H., Saron, M. F., Truffa-Bachi, P. (1993). Altered cytokine genes expression by non con A-activated spleen cells from mice infected by LCV. *Immunol. Lett.* 35: 247-253.
52. Collet, M. C., Moening, V., Hurtinek, M. C. (1989). Recent advances in pestivirus research. *Gen. Virol.* 70: 253-266.
53. Collins, J., Starkey, W. G., Walls, T. S., Clarke, J., Worton, K. K., Spencer, A. J., Haddon S. J., Osborne, M. P., Cyy, D. C. A., Stephen, J. (1998). Intestinal enzyme profiles in normal and rotavirus infected mice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7: 264-272.
54. Collins, T., Pomery, C., Jordan, M. C. (1993). Detection of latent cytomegalovirus DNA in diverse organs of mice. *J. Infect. Dis.* 168: 725-729.
55. Colwell, D. E., Michael, S. M., McGhree, J. R. (1986). Method for generating a high frequency of hybridoma producing monoclonal IgA antibodies. *Method of Enzymology*. 121: 42-51.
56. Considine, P. J., Duggan, P., Eadie, A. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of Protein A. *Biosci. Rep.* 6: 933-936.
57. Cook, I. (1993). Reovirus type 3 infection in laboratory mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 41: 651-660.
58. Crawford, D. H., Azim, T. (1987). The use of Epstein-Barr virus for the production of human monoclonal antibody secreting cell line. In: Brown J (ed) *Human monoclonal antibodies: 1-6*. IRL press, Oxford Washintong DC.
59. Cross, S. S., Morse, H. C., Asofsky, R. (1976). Neonatal infection with thymic virus. Differential effects on T cells mediating the graftversus host reaction. *I. Immunol.* 117: 635-638.
60. Cruz, S., Duarte, C., Ferrá, E., Fontirrochi, G., Vázquez, J., Martínez, L., Arteaga, N., Pérez, E., Gavidondo, J. (1990). Cuantificación de interferón alfa 2b humano recombinante. *Bioteconología. Aplicada.* 7: 132-141.

61. Cuff, C. F., Cebra, C. K., Lavi, E., Molowitz, E. H., Rubin, D. H., Cebra, J. J. (1991). Protection of neonatal mice from infection by immune serum and gut derived lymphocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 310P: 307-315.
62. Cuff, C. F., Cebra, C. K., Rubin, D. H., Cebra, J. J. (1993). Developmental relationship between cytotoxic alpha beta T cell receptor positive intraepithelial lymphocytes and Peyer's patch lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 23: 1333-1339.
63. Dane, D. S., Cameron, C. H., Briggs, M. (1970). Virus like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1: 695-698.
64. Darling, J. A., Spaltro, J. (1996). Process validation for viral removal. Considerations for design of process studies y viral assays. *Biopharm*, October: 42-48.
65. Davis, L. G. (1989). Horizontal transmission of hepatitis B virus. *Lancet.* I: 893-901.
66. Dawe, C. J., Freund, R., Myel, G., Ballmer-Hofer, K., Talmage, D., Benjamin, T. (1987). Variations in polyoma virus genome type in relation to tumor induction in mice: characterization of wild type strains with widely differing tumor profiles. *Am. J. Pathol.* 127: 243-261.
67. De Deken, R., Brandt, J., Celulemans, F. (1994). Influence of priming and inoculation dose on the production of monoclonal antibodies in two age groups of BALB/c mice. *Hybridoma.* 12: 53-57.
68. De Geus, B., Hendriksen, C. M. (1998). In vivo y In vitro production of monoclonal antibodies: current possibilities y future perspectives. 4th Forum in Immunology. *Res. Immunology.* 6. 149: 533-620.
69. De la Torre, J. C., Mallory, M., Brot, M., Gold, I., Koob, G., Oldstone, M. B., Masliah, E. (1996). Viral persistence in neurons alters synaptic plasticity and cognitive functions without destruction of brain cells. *Virology.* 220: 508-515.
70. Dejean, A., Carloni, G., Brechot, C., Tiollais, P., Wain-Hobson, S. (2004). Organization and expression of the hepatitis B sequences clones from hepatocellular carcinoma tissue DNA. *Journal of Cellular Biochemistry.* 20: 293-301.
71. Desombere, I., Willems, A., Gijbels, Y., Leroux-Roels, G. (2006). Partial delipidation improves the T-cell antigenicity of hepatitis B virus surface antigen. *J. Virol.* 80, 7: 3506-3514.
72. Dykewicz, C. A., Dato, V. M., Fisher-Hocg, S. P., Howarth, M. V., Perez-Oronoz, G. I., Ostroff, S. M., Gary, H., Schonberger, L. B., MacCormick, J. B. (1992). Lymphocytic choriomeningitis outbreak associated with nude mice in a research institute. *JAMA.* 267: 1349-1353.
73. E. M. E. A. (1996). Virus validation studies: design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses: 1-22.
74. Eble, B. E., Lingappa, V. R., Ganem, D. (1986). Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol. and Cell Biology.* 6: 1454-1463.
75. Einarsson, M., Kaplan, L., Pertorf, H. (1981). A two-step procedure for the purification of hepatitis B surface antigen. *Vox Dang.* 41: 91-97.
76. Epstein, L. G., Brown, P. (1997). Bovine spongiform encephalopathy a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology.* 48: 469-471.
77. Erickson, G. A., Bolin, S. R., Landgraf, J. G. (1991). Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risk and concern. *Devel. Biol. Standard.* 75: 173-175.
78. Ernest-Cabrera, K., Wilchek, M. (1988) Immunoaffinity chromatography and its application for the purification of pharmaceutically active proteins. *Med. Sci. Res.* 16: 305-310.
79. Esser, C., Radbruch, A. (1990). *Annual Review Immunol.* 8: 717-735.
80. Ey, P. L., Prowse, S. J., Jenkis, C. R. (1978). Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. *Immunochemistry.* 15: 429-436.
81. F. D. A. (2001). Guidance for monoclonal antibody used as reagent in drug manufacturing: 1-11.

82. F. D. A. Office of biologics research and review. (1987). Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use.
83. Fahrner, L.R., Blank, G., Zapata, G. (1999). Expanded bed Protein A affinity chromatography of a recombinant humanized monoclonal antibody: process development, operation and comparison with a packed bed method. *Journal of Biotechnology*. 75: 273-280.
84. Fatlovich, G. (2003). Natural history of hepatitis B. *J. Hepatol*. 39: 50-58.
85. Field B. (2001). *Field Virology*. Fourth Edition. Vol. 1. Chapters 23-90. Edited by Lippincon Willimas y Wilkis.
86. Fischer, R., Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res*. 9: 279-299.
87. Fischer, R., Liao, Yu-Cai., Drossard, J. (1999). Affinity purification of a TMV specific full size antibody from a transgenic tobacco suspension culture. *Journal of Immunological Method*. 226: 1-10.
88. Fischinger, P. J., Blevins, C. S., Nomura, S. (1974). Simple quantitative assay for both xenotropic murine leukemia and ecotropic feline leukemia viruses. *Journal of Virology*. 67: 288-291.
89. Fisher, S. G., Weber, L., Carbone, M. (1999). Cancer risk associated with simian virus 40 contaminated polio vaccines. *Anticancer Res*. May-Jun; 19 (3B): 2173-80.
90. Fontirrochi, G., Dueñas, M., Fernández de Cossio, M.E., Fuentes, P., Pérez, M., Mainét, D., Ayala, M., Gavilondo, J., Duarte, C. (1993). A mouse hybridoma cell secreting IgG y IgM antibodies with specificity for the hepatitis B surface antigen. *Biotecnología Aplicada*. 10: 24-30.
91. Foster, J. D. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats, and mice. *Annals NT Acad. Sci*. 724: 300-303.
92. Fradkin, J. E., Schonberger, L. B., Mills, J. L. (1991). Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United State. *JAMA*. 265: 880-884.
93. Freund, R., Dubensky, T., Bronson, R., Sotnikov, A., Carroll, J., Benjamin, T. (1992). Polyoma tumorogenesis in mice: Evidence for dominant resistance and susceptibility genes of the host. *Virology*. 191: 724-731.
94. Frick, M., Wikstrom, S., Forsen S., Drakenberg, T., Gomi, H., Sjobring, U. (1992). Convergent evolution among immunoglobulin G-binding bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 15. 89: 8532-8536.
95. Fry E. M. (1984). General principles of process validation. *Pharmaceutical engineering*, May-June: 34- 37.
96. Gagnon, P. (1996). Purification tools for monoclonal antibodies. First published by Validation Biosystems, Inc, 5800, Tuscon, USA, AZ 85750: 155-203.
97. Ganem, D., Varmus, H. E. (1987). The molecular biology of the hepatitis B virus. *Ann. Rev. Biochemistry*. 56: 51-693.
98. Garrison, R. N., Kaelin, L. D., Galloway, R. H., Heuser, L. S. (1986). Malignant ascites. Clinical and experimental observations. *Annals of Surgery* 203: 644-651.
99. Gavilanes, F., Gómez, G. J., Aracil, M., González, R., J., Ferragut, J., Guerrero, E., Peterson, D. (1990). Role of lipids in maintaining the structural and antigenic properties of protein components. *Biochemistry Journal*. 265: 857-864.
100. Gerlich, W. H. (1991). Hepatitis B surface proteins. *J. Hepatol*. (Suppl 4), 13: S90-S92.
101. Gerlich, W. H., Deepen, R., Heerman, K. H., Krone, B., Lu, X. Y., Seifer, M., Thomssen, R. (1990). Protective potential of hepatitis B virus antigens other than the S gene protein. *Vaccine*. 8: S63-S68.
102. Gershon, Mark. (1991). Statistical process control for the pharmaceutical industry. *Journal of Parenteral Science of technology*. 45: 41-50.

103. Ghendon, Y. (1990). WHO strategy for global elimination of hepatitis B new cases. *Vaccine*. 8: 129-133.
104. Gillioli, R., Sakadura, J. K., Andrade, A. G., Kraft, V., Meyer, B., Rangel, H. A., (1996). Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. *Lab. Anim. Sci.* 46: 582-584.
105. Godfrey, M. A. J., Kwasowski, P., Clift, R., Marks, V. (1992). A sensitive enzyme-linked immunosorbent for the detection of staphylococcal Protein A (SpA) presents as a trace contaminant of murine immunoglobulins purified on immobilized Protein A. *J. Immunol. Methods*. 149: 21-27.
106. Gold, L. H., Brot, M. D., Polis, I., Schroeder, R., Tishon, A., De la Torre, C. J., Oldstone, M. B., Koob, G. F. (1994). Behavioral effects of persistent LCV infections in mice. *Behav. Neural. Biol.* 62: 100-109.
107. Gossmann, J., Lohler, J., Utermohlen, O., Lehmann-Grube, F. (1995). Murine hepatitis caused by LCV II. Cells involved in pathogenesis. *Lab. Invest.* 72: 559-570.
108. Grein, J. L., Purcell, M. D. (1983). New approach to hepatitis B vaccines. En: Alan, R. Liss, Inc. (Ed). New York: *Viral Hepatitis and delta infection*: 369-377.
109. Griffiths, J. B. (1988). Cell substrates and world health. *Cytotechnology*. 1: 111-112.
110. Guida, D., Fejer, G., Piroski, A., Brosnan, F., Horwits, S. (1995). Mouse adenovirus type 1 causes a fatal hemorrhagic encephalomyelitis in CB57BL/6 but not in BALB/c mice. *J. Virol.* 69: 7664-7681.
111. Halder, M., Emblenton, J. M., Fischer, R., De Gues, B., Hendrisken, C., De Leeuw A. W., Marx, U, Balls, M. (1988). Comments on Appendix C of National Institute of Health. Response to the petition of American anti-vivisection society to prohibit the use of animals in production of monoclonal antibodies. *Atlas*. 26: 549-554.
112. Hamada, N., Sugahara, K., Shiosaki, K., Adachi, K. Mixokami, K. (1988) Method for purification of HNS antigen. United States Patent 4: 738-926.
113. Hamelin, C., Lussier, G. (1998). Genotypes differences between the mouse adenovirus strains FL y K87. *Experimental*. 44: 65-66.
114. Harbour, C., Woodhouse, G. (1990). Viral contamination of monoclonal antibody preparation: potential problems and possible solutions. *Cytotechnology*. 4: 3-12.
115. Harris, E. R., Coleman, H. P., Morahan S. P. (1974). Stability of minute virus of mice to chemical and physical agents. *Applied Microbiology*. 28: 351-34.
116. Hart, A. C. (1995). Transmissible spongiform encephalopathies. *J. Med. Microbiol.* 42: 153-155.
117. Heermann, K. H., Gerlich, W. S. (1991). Surface proteins of hepatitis B viruses. In: McLachlan, A. (ed.) *Molecular Biology of the hepatitis B Viruses*. CRC Press, Boca Raton: 109-144.
118. Heermann, K. H., Goldmann, U., Schwartz, W. Seyffarth, T., Baumgarten, H., Gerlich, W. H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B Virus containing the pre-S sequence. *J. Virol.* 52: 396-402.
119. Held, W., Acha-Orbea, H., MacDonald, H. R, Wayer, G. A. (1994). Superantigens and retroviral infections: insights from mouse mammary tumor virus. *Immunol. Today*. 15: 184-190.
120. Heldenbrandt, C. M., Gomperts, E. D., Kasper, C, K., Mc Dougal, J. S., Friedman, A. E., Hwang, D. S., Mushmore, E., Jordan, S., Miller, R., Sergis, D. E., Lam, W. (1985). Evaluation of two viral inactivation methods for the preparation of safer factor VII and factor IX concentrate. *Transfusion* 25: 510-515.
121. Hendriksen, C. F. M. de Leeuw, W. (1998). Production of monoclonal antibodies by ascites method. In laboratory animals. *Res. Immunology*. 149: 535-542.
122. 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.
123. Herr, J., Spell, D. (1985). Type A particles in heterohybridomas: precaution for human antibody purification. *Journal of ultrastructural research*. 92: 80-85.

124. Hitzeman, R. A., Chen, C., Hagie, F., Patzer, E. J., Lui, D., Estell, D. A., Miller, V., Yaffe, A., Klein D. G., Levinson, A. D., Opperman, H. (1983). Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. *Nucleic Acids Res.* 10: 2745-2763.
125. Hodde, J., Hiles, M. (2002). Virus safety of a porcine derived medical device: evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnology and Bioengineering.* 70: 211-216.
126. Homberger, F. R., Thomann, P. E. (1994). Transmission of murine virus and mycoplasmas to laboratory mouse colonies with respect to housing conditions. *Lab. Anim.* 28: 113-120.
127. Honstead, J. (1996). The regulatory dilemma of newly emerging diseases. Bovine spongiform encephalopathy. *FDA Veterinarian.* March/April: 5-8.
128. Hoogenraad, N., Wright, C. J. (1986). The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production. *Method of Enzymology.* 121: 375-385.
129. Horowitz, B., Piet, M. P. J., Prince, A. M., Edwards, C. A., Lippin, A., Walakouits, L. (1988). Inactivation of lipid enveloped viruses in labile blood derivatives by unsaturated fatty acids. *Vox Sang.* 54: 14-20.
130. Horowitz, B., Wiebe, M. E., Lippin, A., Vandersa, J., Stryker, M. H. (1985). Inactivation of viruses in labile blood derivatives. *Transfusions.* 25: 523-527.
131. Howard, C. (1986). The biology of Hepadnaviruses. *J. Gen. Virol.* 67: 1215-1235.
132. Hubert, M., Barin, F., Goudeau, A. (1982). Large-scale isolation of the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen by gel filtration in 6 M guanidinium chloride. *J. Virol. Methods.* 3: 349-354.
133. I. C. H. (1997). International conference of harmonization; guidance of viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human and animal origin. 24: 51074-51084.
134. Ichida, F., Yoshikawa, A., Mizokami, M., Yamamoto, M., Inaba, N., Takamizawa, H., Ohmura, T., Ohmizu, A. J., Uemura, Y., Nishida, M. (1988). Clinical study of recombinant hepatitis B vaccine. *J. Inter Med. Res.* 16: 231-236.
135. Ijaz, M. K., Sabara, M. I., Alkarmi, T., Frenchick, P. J., Ready, K. F., Longson, M., Dar, F. K., Babiuk, L. A. (1993). Characterization of two rotaviruses differing in their in vitro and in vivo virulence. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 963-971.
136. Ijaz, M. K., Sabara, M. I., Frenchick, P. J., Babiuk, L. A. (1987). Assessment of intestinal damage in rotavirus infected neonatal mice by a D-xylose adsorption test. *J. Virol. Method.* 18: 153-157.
137. Jackson, R. L., Trudel, L. J., Fox, G. J., Lipman, N. (1999). Monoclonal antibody production in murine ascites. Production and characteristics. *Laboratory Animal Science.* 49: 81-85.
138. Jacoby, R. O., Ball-Goodrich, L., Besselen, D. G., MacKisic, M.D., Riley, L. K., Smith, A. L. (1996). Rodent parvovirus infections. *Laboratory Animal Science.* 46: 370-380.
139. Jiang, S., Bye, D., Cos, J., C. (1986). Inactivation of poliovirus with beta-propiolactone. *J. Biol. Standard.* 14: 103-109.
140. Jiskoot, W., van, Hertooij, J. J., Kleingebbenek, J. W., van der Velden, T., Crommilin, D. J., Beuveny, E., C. (1989). Optimization of purification conditions and scaling up. *J. Immunol. Method.* 124: 143-156.
141. Jones, S. L., Cox, J. C., Pearson, E. J. (1990). Increased monoclonal antibody ascites production in mice primed with Freund's incomplete adjuvant. *J. Immunol. Methods.* 129: 227-231.
142. Jonhson, V., Byngton, R. (1979). Quantitative assays for virus infectivity. *Basic Virology Techniques:* 71-76.
143. Jun Chai, X., Zheng Lin, Y., Jun Qin, J., Zhang Jiang, C. (2006). The purification of recombinant hepatitis B surface antigen by hollow fibre Ultrafiltration membrane diafiltration. *Biotechnology Technique.* 6: 381-384.
144. Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., Foeller, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest 5th, (ed) US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242.
145. Kafatos, F. C., Jones, C. W., Efstratiadis, A. (1970). Determination of nucleic acid homologies and relative concentration by dot hybridization procedures. *Nuclei Acid Research.* 7: 1541-1552.

146. Kato, S., Sohma, Y., Tareshima, M., Sada, E., Tsugawa, M. (1993). A rapid method for determination of the association constant of monoclonal antibodies. *J. of Fermentation and Bioengineering*. 76.6: 451-454.
147. Kenedy, R. C., Eicberg, J. W., Lyford, R., Dreesman, G. (1986). Anti-idiotypic antibodies vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science*. 232: 220-23.
148. Knaak, C. A., Hawrlechko, A. M. J. (1998). A systematic approach to the validation of monoclonal antibody manufacturing process. *Research Focus*. 1. 7: 300-308.
149. Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*. 256: 495-497.
150. Kohn, J., Wilcheck, M. A. (1982). A new approach for cyanogen bromide activation of Sepharose at neutral pH, which yields activated resins, free of interfering nitrogen derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 878-882.
151. Kozbor, D., Newerly, W. A., Tripputi, P., Cole, S. P. C., Weibel, J., Roder, J. C., Croce, C. M. (1985). Specific immunoglobulin production and enhanced tumorigenesis following ascites growth of human hybridomas. *Journal of Immunological Methods*. 81: 31-42.
152. Krugman, S., Giles, J. P. (1970). Hepatitis virus, effect of heat on the infectivity and antigenicity of the MS-1 and MS-2 strains. *J. Infect. Dis.* 122: 432-496.
153. Kumar, V., Bansal, V., Rao, K. V. S. (1992). Comparison of immune response to a native viral antigen and synthetic peptide derived from it, implication for vaccine development. *Vaccine*. 10: 814-816.
154. Kurz, M. (2007). Upstream processing: regulatory considerations regarding quality aspects of monoclonal antibodies. *Bio Pharm International*. Jul (1): 1-13.
155. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
156. Lambert, J. K. (1989). Regulatory aspect of the use of immunoaffinity reagents. *Journal of Chem. Tech. Biotechnol.* 45: 45-75.
157. Langone, J. J. (1982). Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptor produced by streptococci and pneumococci. *Adv. Immunol.* 32: 157-252.
158. Langridge, W. H. R. (2000). Edible vaccines. *Sci. Am.* 283: 48-53.
159. Larsson, A., Wejaker, R. E., Fosberg, P. O., Lindahl, T. (1992). Chicken antibodies: a toll to avoid interference by complement activation in ELISA. *J. Immunol. Methods* 156: 79-83.
160. Lavi, E., Wang, Q., Weiss, R. Gonatas, K. (1996). Syncytia formation induced by coronavirus infection is associated with fragmentation and rearrangement of Golgi apparatus. *Virology*. 221: 325-334.
161. Le Grippo, G. A. (1960). Investigation of the use of beta-propiolactone in virus inactivation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 83: 578-594.
162. Le Grippo, G. A., Hartman, F. W., (1955). Antigenicity of beta-propiolactone inactivated by virus vaccines. *J. Immunol.* 75: 123-127.
163. Le Grippo, G. A., Wolfram, B. R., Rupe, C. (1964). Human plasma treated with ultraviolet and propiolactone inactivated by virus vaccines. *J. Immunol.* 75: 123-127.
164. Lem, S., Manus, H. B., Gooley, A. A., Williams, K. L., Rylant, D. B. (1999). Purification of monoclonal antibodies from ascitic fluid using preparative electroforesis. *J. Chromatography*. 827: 329-335.
165. Lemon, S. M., David, L. T. (1997). Hepatitis B vaccine to prevent viral hepatitis. *The new England Journal of Medicine*. 16: 336. 3:196-204.
166. Lerner, R. A., Gree, N., Alexy, H., Liu, F. T., Bentley, G., Lecropsy, A., Delepierre, M. (1994). Less épitope de l'enveloppe du virus de l'hépatite B: approche structurale. *Pathol. Biol.* 42: 761-766.
167. Levy, J. A. (1983). Mouse plasmacytoma cell produce infection type C particles. *Lancet II*: 52.

168. Levy, J. A., Lee H. M., Kawahata, R. T., Spitler, L. E. (1984). Purification of monoclonal antibody from mouse ascites eliminates contaminating infectious mouse type C viruses and nucleic acids. *Cli. Exp. Immunol.* 56.1:114-120.
169. Levy, J. A., Mitra, G. A., Wong, M. F., y Mozen, M. M. (1985). Inactivation by wet and dry heat of AIDS associated Retrovirus during factor VIII purification from plasma. *Lancet* .1: 1456-1457.
170. Lieber, M. M., Todaro, G. J. (1975). Mammalian type C RNA viruses. *Cancer: a comprehensive treatise*, vol. II, F. F. Becker, (eds). New York: Plenum Press: 91-130.
171. Lilly, F., Mayer, A. (1980). Genetic aspects of murine type-C viruses and their hosts in oncogenesis. *Viral Oncology*, G. Klein, (eds). New York: Raven Press: 89-108.
172. Linnen, S. J. (1996). Molecular disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*. 271: 505-508.
173. Little, M., Kipriyanov, S. M., Le Gall, F., Moldenhauer, G. (2000). Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology Today*. 21: 364-370.
174. Lowry, D. H., Rosebroug, N. J., Farr, A. L., Randal, R. (1951). Protein measurement with foling phenol reagent. *J. Biol. Chemical*. 193: 256-269.
175. Lubeck, M. D., Davis, A. R., Greenberg, P. D., Coombs, R. W., Zarlign, J., Arditi, D. E. (1989). Immunogenicity and efficacy testing in chimpanzees of an oral hepatitis B vaccine based on liver recombinant adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6763-6767.
176. Lubiniecki, A. S. (1999). Endogenous retrovirus of continuous cell substrates. In: Spier, Griffith J.B. Crooy P and Stephenne J., (eds) *Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses*: 85-92. Butterworths, Guildford.
177. Lubiniecki, A. S., May, L. H. (1985). Introduction to regulatory practice in novel biotechnology, in Lubiniecki AS Vargo (eds): *Regulatory practice for pharmaceutical production*. Wiley-Liss, NY: 1-12.
178. Lucas, C., Mora-Worms, M., Chen, A. B. (1991). The measurement of staphylococcal Protein A in immunoglobulin preparations. *Biologicals*. 19: 271-279.
179. Lucas, C., Nelson, C., Peterson, M. L., Frie, S., Vetterlein, D., Gregory, T., Chen, A. B. (1988). Enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) for the determination of contaminants resulting from the immunoaffinity purification of recombinant proteins. *J. Immunol. Methods*. 113: 112—113.
180. Lugo, N. (1998). Elements of downstream bioprocess validation. *BiotePharm*, June: 18-26.
181. Lukacher, A. E., Freund, R., Carroll, J. P., Bronson, R. T., Benjamin, T. L. (1993). PyVs: A dominantly acting gene in C3H/BiDa mice conferring susceptibility to tumor induction by polyoma virus. *Virology*. 196: 241-248.
182. MacCallum, F. O. (1947). Homologous serum Jaundice. *Lancet*. 2: 691-692.
183. Mahoney, F. J., Mark, K. (1999). Hepatitis B vaccine. Chapter 10 in *vaccine*, 3rd (ed) Stanley A. Plot week and Walter. An Orenstein, ed W. B. Saunders Company, Philadelphia: 159-182.
184. Mahy, B. W., Dykewicz, C., Fisher-Hoch, S., Ostroff, S., Tipple, M., Sánchez, A. (1991). Virus zoonoses and their potential for contamination of cell cultures. *Dev. Biol. Sty.* 75P: 183-189.
185. Manivel, V., Ramesh, R., Pya, S., Rao, K. V. S. (1992). A synthetic peptide spontaneously self-assembles to reconstruct a group specific. Conformational determinant of hepatitis B virus surface. *J. Immunol.* 148: 4006-4001.
186. Mannucci, M., Colombo, M. (1988). Virucidal treatment of clotting factor concentrates. *Lancet*. II: 782-785.
187. Marquardt, O., Heermann, K. H., Seifer, M., Gerlich W. H. (1987) Cell-type dependent expression and secretion of hepatitis B virus pre-S1 surface antigen. *Postgrad Med. J.* 63. 2: 41-50.
188. Martin, D. W. (1985). An overview of risk association with viruses endogenous to cell substrates. In: Hopps, H. E. and Petricciani J. C., (eds) *Abnormal cells, new products and risk*: 29-35. Tissue culture association. Gaithersburg.

189. Marx, U., Emblenton, M.J., Fischer, R., Gruber, F. P., Hansson, U., Heuer, J., de Leeuw, W. A., Logtenber, T., Merz, W., Portelle, Straughan, D. W. (1997). Monoclonal Antibody Production. Report and recommendation of the ECVAM Workshop 23, Atlas 25: 121-137.
190. Matsuzawa, A., Nakano, H., Yoshimoto, T., Sayama, K. (1995). Biology of mouse mammary tumor virus (MMTV). *Cancer Lett.* 90: 3-11.
191. McArdle, J. (1999). Consideration of advantages and disadvantages of in vitro and ascites production of Mabs. The third world congress on alternatives and animal use in the life Sciences. Proceeding of the production of monoclonal antibodies Workshop. Bologna, Italia: 13-15.
192. McArdle, J. (2000). The prohibition of routine ascites production of monoclonal antibodies in the United States: A successful application of the alternatives approach to biomedical research. *Atlas.* 38: 725-729.
193. McCormick, J. B., Sasso, D. R., Palmer, E. R., Kile, M. P. (1982). Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever as a member of the bunyaviridae. *Lancet.* 765-768.
194. McNeal, M. M., Broome, R. L., Ward, R. L. (1994). Active immunity against rotavirus infection in mice is correlated with viral replication and titers of serum Rotavirus IgA following vaccination. *Virology.* 204: 652-650.
195. Melegari, M., Scaglioni, P., Wands, R. (1997). The small envelope protein is required for secretion of a naturally occurring hepatitis B virus mutant with pre-S1 deleted. *J. Virol.* 71: 5449-5454.
196. Mikkat, S., Koy, C., Ulbrich, M., Ringel, B., Glocker, M. (2004). Mass spectrometric protein structure characterization reveals cause of migration differences of haptoglobin alpha chains in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomic.* 4: 3921-3932.
197. Minor, P. (1989). Adventitious viral agents in biological products. *Develop. Biol. Stand.* 70: 173-179.
198. Mitchel, M. (2000). The epidemiology of hepatitis B. Hepatitis B workshop. September 8-10. Bethesda, Maryland (www.Hepatitis.com).
199. Mitchell, B. M., Leung, A., Stevens, J. G. (1996). Murine cytomegalovirus DNA in peripheral blood in latently infected mice is detectable only in monocytes y polymorfonuclearleucytes. *Virology.* 23: 198-207
200. Miyata, H., Kishikawa, M., Kondo, H., Kai, C., Watanabw, Y., Oshawa, K. Sato, H. (1995). New isolates of pneumonia virus of mice (PVN) from Japanese rat colonies and their characterization. *AADE Ed. J.* 44: 95-104
201. Moore, S. J. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* 70: 549-558.
202. Moroney, S., Pluckthun, A. (2005). Modern antibody technology: the impact on drug development. In: *Modern biopharmaceuticals* (Knablein, J ed). Vol 3, 1st ed, 1147-1186, Weinhein: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA.
203. Morrow, K. J., (2000). Monoclonal antibody production techniques. *Genetic Engineering News.* 20. 14: 21-26.
204. Morse, S. S. (1987). Mouse thymic necrosis virus: a novel lymphotropic agent. *Lab. Anim. Sc.* 37: 717-725.
205. Moskophidis, D., Bategay, M., van der Broek, M., Laine, E., Hoffmann- Rohrer, U., Zinkernagel, R. M. (1995). Role of the virus and host variables in virus persistence of immunological disease caused by a non-cytolytic virus. *J. Gen. Virol.* 76: 381-391.
206. Mosley, J. W. (1975). The epidemiology of viral hepatitis: An overview. *Am. J. Med Sci.* 270: 253-270.
207. Murphy, F. A., Simpson, D. I. H., Whitfield, S. G., Klotnik, I., Carter, G. B. (1971). Marburg virus infection in monkeys. Ultrastructural studies. *Laboratory Investigation.* 24: 279-291.
208. Muzio, V., Pentón, E., Palau, M., García, J., Ramírez, V., Izquierdo, M., Herrera, L. (1989). Clonaje y expresión en *Saccharomyces cerevisiae* del AgsVHB. Tercer Seminario Cubano sobre Interferón. Primer Congreso Iberoamericano de Biotecnología. Abril 17-22. Habana.

209. National Research Council. (1991). Infectious diseases of mice and rats: a report of the Institute of Laboratory of Animal Resources Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. National Academic Press, Washington D.C.
210. Nelson, J. B., Tarnowski, G. S. (1960). An oncolytic virus recovered from Swiss mice during passage of an ascitic tumor. *Nature* 188: 886-867.
211. Neurath, A. R., Strick, N., Huang, C. Y. (1980). Confirmatory evidence for the association of hepatitis B surface antigen with antigenic determinants reactive with antibodies present in some anti-HBe-positive sera. *J. Gen. Virol.* 48: 53-61.
212. Neurath, R., Prince, M. A., Lippin, A. (1976). Purification of hepatitis B surface antigen. Patent Number 3994870, USA.
213. Newsome, P. M., Coney, K. A. (1985). Synergistic rotavirus and *Escherichia coli* diarrhea infection in mice. *Infect. Immun.* 45: 573-574.
214. Nicklas, W., Kraft, V., Meyer, B. (1993). Contamination of transplantable tumors cell lines and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab. Anim. Sci.* 43: 296-300.
215. Nicklas, W., Rugoya, S., Wenklin, G. (2002). Felasa recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea-pig and rabbit experimental units. *Laboratory Animals.* 36: 20-42.
216. Nishikawa, A. H. (1983). En: Scouten, W. H. (ed). *Solid-phase biochemistry*. Wiley. New York: 17-78.
217. Nolan, G. P. (1997). Hunter and suker viruses. *Cell.* 90: 821-825.
218. Norder, H., Hammas, B., Lofdahl, S., Courouse, A. M., Magnius, L. O. (1992). Comparison of the aminoacid sequences of nine different serotypes of Hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J. Gen. Virol.* 73: 1202-1208.
219. Nozaki, C. H., Miyahara, A., Fijiyama, A., Hamada, F., Ohtomo, N., Matsubara, K. (1985). Two mammalian cell systems for propagation of hepatitis B virus genome in extrachromosomal and chromosomically integrated states. Production of the surface and E antigens. *Gene.* 38: 39-44.
220. O. M. S. (1987). Acceptability of cell substrates for production of biologicals: 747.
221. O. M. S. (1992). Public health issues related to animal and human spongiform encephalopathies: Memory from a WHO meeting. *Bulletin of World Health Organization.* 70. 2: 183-190.
222. O. M. S. (1996). Bovine Spongiform Encephalopathy. Fact Sheet. No 113, April.
223. O. M. S. Expert Committee on Biological Standardization. (1992). Good manufacturing practices for biological products. Forty-second report. Technical Report Serie, No 822.
224. O' Neill, H. C. (1991). Resistance to ectromelia virus infection in mice. Analysis of H-2 linked gene effects. *Arch. Virol.* 118: 253-259.
225. O'Neil, F. P., Balkovich, S. E. (1993). Virus harvesting and affinity based liquid chromatography. *Biotechnology.* 11: 173-176.
226. Ohnishi, Y., Yoshimura, M., Ueyama, Y. (1995). Lactic dehydrogenase virus (LDHV) contamination in human tumor xenografts and its elimination. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 538-539.
227. Okochi, K., Murakami, S. (1968). Observation on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang.* 15: 374-385.
228. Osborn, J. E. (1982). Cytomegalovirus and other herpesvirus: 267-292. In H. L. Foster. H. D. Small and J. G. Fox, (eds). *The mouse in biochemical research. Vol II. Diseases.* Academ. Press, Inc, New York.
229. P. P. O. (1999). PPO 4.09.098.99. Metodología para la tinción de geles de isoelectroenfoque corridos en Phast System usando nitrato de plata.
230. Paddock, C., Ksiazek, T., Camer, J. A. (2005). Pathology of fatal lymphocytic choriomeningitis virus infection in multiple organ transplant recipients from a common donor. *Med. Pathol.* 2005. 18: 263A-264A.
231. Páez, R., Agraz, A., Herrera, L. (1993). The recovery of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) from recombinant *P. pastoris* strain, disruption and precipitation studies. *Acta Biotechnol.* 13: 117-122.

- 232.Papaevangelou, G., Romeliotou, A. (1987). New vaccine against hepatitis B. Eur. J. Epidemiol. 3: 1-4.
- 233.Parkman, P. D. (1996). Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. Dev. Biol. Stand. 88: 5-7.
- 234.Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., Mackay, P., Leadbetter, G., Murray, K. (1979). Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. Nature. 282: 575-579.
- 235.Patience, C., Takeuchi, Y., Cosset, F., Weiss, A. (1998). Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. J. Virol, April. 72. 4: 2671-2676.
- 236.Patterson, M. K. (1973). Measurement of growth and viability of cells in culture. In Jacoby WB, Pastan IH Eds. Meth. Enzymol. Academic Press, London: 58.
- 237.Peebles, P. T. (1975). An *in vitro* induction assay for xenotropic murine leukemia viruses, feline leukemia virus C, and the feline primate viruses RD-114/CC/M-7. Virology.67: 288-296.
- 238.Pendley, C., Scantz, A., Warner, C. (2003). Immunogenicity of therapeutic monoclonal antibodies. Current Opinion in Molecular Therapeutic. 5: 172-179.
- 239.Pentón, E. (1992). Procedure for the obtainment of the hepatitis B virus recombinant surface antigen with a higher immunogenic quality and its use as a vaccine. European Patent Publication No. EP 480525.
- 240.Pentón, E., Muzio, V., González, G. M. (1994). Hepatitis B virus (HBV) infection and its prevention by a recombinant DNA viral surface antigen (rec-HBsAg) vaccine. Biotecnología Aplicada. 11: 1-11.
- 241.Percy, H., Barthold, W. (1993). Pathology of laboratory rodent and rabbits. Iowa State University Press Ames, Iowa. 47. 2: 15-46.
- 242.Pérez, L., López, S., Beldarraín, A., Arenal, D., Pentón, E. (1994). Purification of recombinant hepatitis B surface antigen (rec-HBsAg) from *P. pastoris*: a process development study. In: Galindo, E., Ramírez, O. T., (ed) Advances in Bioprocess Engineering. Kluwer, Netherlands: 527-534.
- 243.Perkus, M. E., Piccini, A., Lipinkas, B. R., Paoletti, E. (1985). Recombinant vaccinia virus, immunization against multiple pathogens. Science. 229: 981-984.
- 244.Peterson, N. C. (2005). Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells and immunoglobulins. ILAR Journal. 46: 314-319.
- 245.Petre, J., Van Wijnedaele, F., De Neys, B., Conrath, K., Van Opstal, O., Hause, P. (1987). Development of Hepatitis B vaccine from transformed yeast cells. Postgrad Med. J. 63: 73-81.
- 246.Petricciani, J. C., Mac Douglas, J. S., Evatt, B. L. (1985). Case for concluding that heat treated licensed anti-haemophilic factor is free from HTLV-III. Lancet. II: 890-891.
- 247.P.N.O 5090. (2005). Ensayo in vitro para detectar la presencia de virus adventicios.
- 248.Pollock, J. I., Virgin IV, H. W. (1995). Latency without persistence of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. J. Virol. 69: 1762-1768.
- 249.Powell, J., Weller, R. O., Kennedy, P., Preece, M. A., Whitcombe, E. M. Newson-Davis, L. (1985). Creutzfeld-Jakob disease after administration of human growth hormone. Lancet ii: 244-246.
- 250.P. P. O. 4.10.084.94. (2007). Diseño y explotación de los gráficos de control estadístico de procesos: 1-20.
- 251.P. P.O. 4.09.082.91. (2005). Determinación de trazas de ADN de ratón contaminado en muestras de afinidad y monoclonales de alfa interferon, gamma interferon y AgsHB.
- 252.Prince, A. M. (1968). An antigen detected in the blood during the incubation period of serum Hepatitis. Proc. Natl. Acad. Sci. 60: 814-821.
- 253.Quinnan, G. V., Wells, M. A., Wittek, A. E., Phelan, M. A., Mayner, R. E., Fsinston, S., Purcell, R. H., Epstein, J. S. (1985). Inactivation of human T-cell lymphotropic virus, type III by heat, chemicals and irradiation. Transfusion 26: 485-483.
- 254.Quiñones, Y., Agraz, A., Silva, A., Padrón, G., Mella, C., Díaz, R., Quintana, M., González, M., Besada, V., Duarte, C., Sierra, G., Fernández, J., Ubieta, R., Morales, J., Castellanos, L., Morera, V., Furrázola, G.,

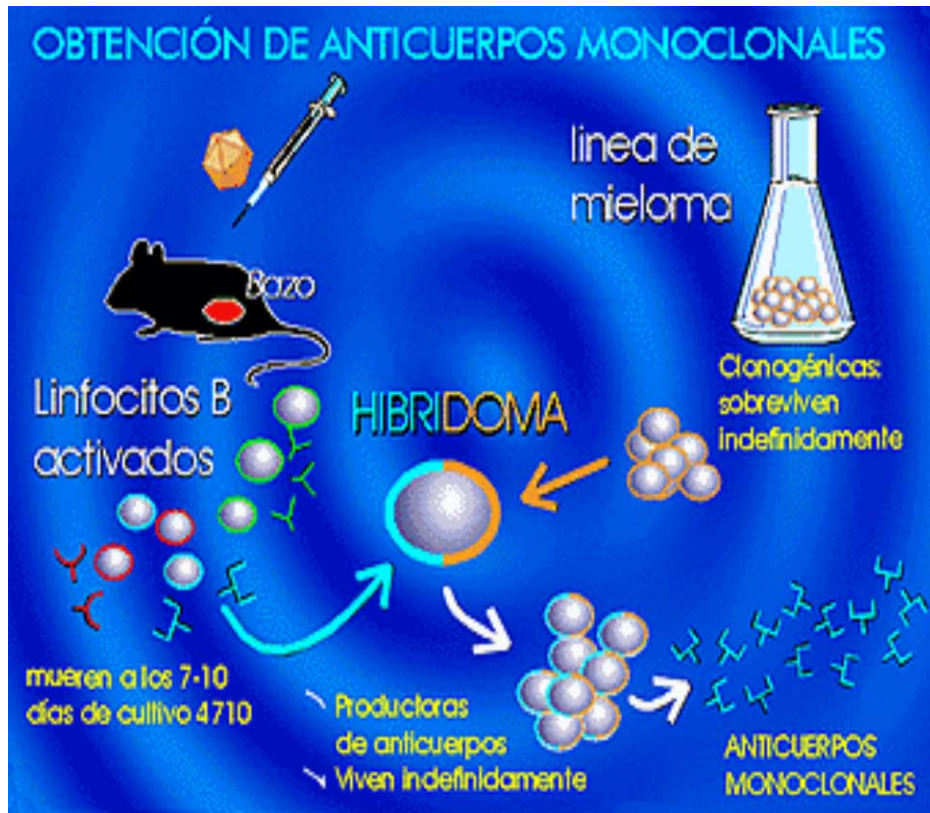
- Montero, M., Santos, A., Díaz, A. Herrera, L. (1989). High purity recombinant human alpha-2 interferon free from oligomeric forms in *E. coli*. *Highlights Modern Biochem.* 2: 1237-1246.
255. Ramírez, N., Rodríguez, M., Ayala, M., Cremata, J., Pérez, M., Martínez, A., Linares, M., Hevia, Y., Paez, R., Valdés, R., Gavilondo, J., Selman-Housien, G. (2003). Expression and characterization of an anti-hepatitis B surface antigen glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco plants, and its use in immunopurification of its target antigen. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 38: 223- 230.
256. Reed, L. J., Muench, H. (1938). A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27: 439-497.
257. Richman, D., Clevelan, H., Oxman, N., Jakson, M. (1982). The binding of staphylococcal Protein A by the sera of different animal species. *J. Immunol.* 128: 2300-2305.
258. Romanos, A., Scorer, A., Calre, J. (1992). Foreign gene expression in yeast. *Yeast*. 8: 423-488.
259. Romanos, M. A. (1995). Advances in the use of *P. pastoris* for high level gen expression. *Current Opinion in Biotechnology*. 6: 527-533.
260. Rousseau, M. C., Saron, M. F., Bronqui, P., Bourgeade, A. (1997). Lymphocytic choriomeningitis virus infection in southern France: for case reports and a review of the literature. *Eur. J. Epidemiology*. 13: 817-823.
261. Rowe, W. P. (1961). The epidemiology of mouse polyoma infection. *Bacteriol. Rev.* 25:18-31.
262. Rowe, W. P., Pugh, W. E., Hartley, J. W. (1970). Plaque assay techniques for murine leukemia viruses. *Virology*. 42: 1136-1139.
263. Ruibal, J. I., Romero, E., Mas, T., García Z. R. (1999). Inactivación del VDVB (modelo experimental de la hepatitis C) por pH bajo y tratamiento por calor de inmunoglobulinas humanas endovenosas. *Sangre*. 44. 5: 352-356.
264. Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Sakaki, M., Fujji, Y., Yoshiba, T. (1994). A field isolate of Sendai virus: its high virulence to mice and genetic divergence from prototype strain. *Arch. Virol.* 135: 159-164.
265. Sambrook, J., Frstsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Second edition (ed) Cold Spring Harbor Laboratory, Press USA.
266. Schellenkens, H., De Reus A. D., Peetermans J. H., Van Eerd, P. (1987). The protection of chimpanzees against Hepatitis B viral infection using a recombinant yeast derived hepatitis B surface antigen. *Postgrad. Med. J.* 63: 93-96.
267. Schlegel, A., Immelmann, A., Kempf, C. (2001). Virus inactivation of plasma derived-proteins by pasteurization in the persence of guenidine hydrochloride. *Transfusion*. 41: 382-359.
268. Schodel, F., Sprengel, R., Weimer, T., Ferholnz, D., Schneider, R. Will, H. (1989). Animal hepatitis B viruses. En: Klein, G. (ed). *Advance in viral oncology*. Raven Press, Ltd. New York. 8: 73-102.
269. Schunnrman, J., Bell, B., Gätner, K., Hedrich, J., Hansen, K., Kruijt, C., de Very, P., Leyten, R., Maeder, J., Moutier, R., Mohle, U., Vankerkom, J., Boot, R., Broekhueizen, R., Dormans, J., van Herck, H., Hermans, C., Hoekman, J., Van der Logt, J., van Wiik, Vos, G., van Zutphe, M. (1992). Comparative evaluation of the immune status of congenitally athymic and euthymic rat strains bred and maintained at different institutes. 1. Euthymic rats. *J. Exp. Anim. Sci.* 35: 16-32.
270. Secher, D. S., Burke, D. C. (1980). A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. *Nature*. 285: 446-450.
271. Sekura, C. (1990). Validation of removal of human retrovirus. *Develop. Biol. Standard*. 75: 133-143.
272. Seligman, S. (1994). Influence of solid phase antigen in competition ELISA on calculated antigen-antibody dissociation constants. *Journal of Immunological Method*: 101-110.
273. Sell, M. A., Chen, M. L., Acs, G. (1987). Production of hepatitis B virus particles in Hep-2 cells transfected with cloned Hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1005-1009.

274. Sephered, M. C., Boillic, S. G., Sterling, I. D. Houslay, M. (2004). Remodeling of the PDE4D4 cAMP phosphodiesterase isoform profile upon monocyte-macrophage differentiation of human U937 cells. 142: 339-351.
275. Shah, K., Nathanson, N. (1976). Human exposure to SV40: review and comment. *Am. J. Epidemiol.* 103: 1-12.
276. Shakhov, N., Wang, H., Acha-O., H., Pauley, J., Wei, Z. (1993). A new infectious mammary tumor virus in the milk of mice implanted with C4 hyperplastic alveolar nodules. *Eur. J. Immunol.* 23: 2765-2769.
277. Shek, W.R. (1987). Detection of murine viruses in biological materials by the mouse antibody production test. In L. Seaver SS (ed) *Commercial production of antibodies: 3-16.* Marcel Dekker, In. N.Y. and Basel.
278. Shesking D. J. (2000). *Handbook of parametric and non parametric statistical procedures.* Edited by Chapman and Hall/ CRC, London.
279. Shishido, T., Muraoka, M., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., Kuroda, S., Fukuda, H., and Kondo, A. (2006) Secretory production system of Bio-nanocapsules using a stably transfected insect cell line. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 73: 505-511.
280. Sinacore, M. S., Drapeau, D., Adamson, S. R. (2000). Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Mol. Biotechnol.* 15. 3: 249-257.
281. Skea, D. L., Underdown, B. J. (1991). Acquired resistance to *Giardia muris* I X- linked immunodeficient mice. *Infec. Immun.* 59: 1733-1738.
282. Skelly, J., Howard, C. R., Zuckerman A. J. (1979). Analysis of hepatitis B surface antigen components solubilized with Triton X-100. *J. Gen. Virol.* 44. 3: 579-689.
283. Smales, C. M., Pepper, D., James, D. C. (2000) Mechanisms of protein modification during model anti-viral heat-treatment bioprocessing of beta-lactoglobulin variant A in the presence of sucrose. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 32: 109-119.
284. Smith, A. L., Jacoby, R. O., Johnson, E. A., Paturso, F., Bhatt, P. N. (1993.) In vitro studies with an orphan parvovirus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 43: 175-182.
285. Smith, G. L., Mackett, M., Moss, B. (1983). Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B surface antigen. *Nature.* 302: 490-495.
286. Smith, J. K., Winkleman, L., Evans, D. R., Haddon, M. E., Sims, G. (1985). A pasteurized antitrombin III concentrate for clinical use. *Vox Sang,* 48: 325-332.
287. Sofer, G. (1996). Validation: ensuring the accuracy of scales-down chromatography Models. *BioPharm.* October: 51-54.
288. Song, J. Y., Chun, B. C., Kin, S. D., Black, L. J., Kim, S. H., Sohn, J. W., Cheong, H. J., Kim, W. J., Park, S. C., Kim, M. J. (2006). Epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome in endemic area of republic of Korea 1995-1998. *J. Korea Medicine.* 21: 614-620.
289. Spurr, A. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electronic microscopy. *Journal of Ultrastructural Research.* 26: 31-43.
290. St. Pierre, Y., Potworowski, E. F., Lussier, G. F. (1987). Transmission of mouse thymic virus. *J. Gen. Virol.* 68: 1173-1176.
291. Stellrecht-Broomhall, K. A. (1991). Evidence for immune-mediated destruction as mechanism for LCMV induce anemia in persistently infected mice. *Viral Immunol.* 4: 269-280.
292. Stephan, W., Kostitschk. (1987). Safety of beta-propiolactone/UV treated PPSB (factor IX concentrate). *Thromb. Res. Suppl. VII:* 58.
293. Stephen, L. J., Cox, J. C., Pearson, J. E. (1990). Increased monoclonal antibody ascites production in mice primed with Freund's incomplete adjuvant. *Journal of Immunological Methods.* 129: 227-231.
294. Stum, D. C., Thienpont, M., Collen, D. (1986). Isolation and characterization of single chain urokinase (prourokinase) and urokinasa-inhibitor complex. *J. Biological Chemistry.* 261: 1267-1273.

- 295.Szmuness, E., Stevens, C.E., Harley, E. J., Zang, E. A., Qleszko, W. R., William, D. C., Sadowsky, R., Morrison, J. M., Kellner, A. (1980). Hepatitis B vaccine. Demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high risk-population in the United States. *N. Engl. J. Med.* 303: 833-841.
- 296.Takashi, I., Shuichi, Y. (2005). Optimization of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography. Application of simple methods with linear gradient elution experimental data. *Journal of Chromatography.* 1069.1: 99-106.
- 297.Tam, J. P. (1992). Chemically defined synthetic immunogenic vaccines by multiple antigen peptide approach. En: Wayne, C. Koff and Howard, R. (Ed). *Vaccine Research and Developments.* New York: Marcel Dekker, Inc.1: 50-87.
- 298.Tanabayashi, K. R. W. Campus. (1996). Functional interaction of paramyxovirus glycoproteins: Identification of a domine in Sendai virus HN which promotes cells fusions. *J. Virol.* 70: 6112-6118.
- 299.Ter Avest, van Zoolen, E. J., Spijker, I. E., Osterhause, A. D. van Steenis, G., van Kreyl, C. G. (1992). Purification process monitoring in monoclonal antibody preparation: contamination with viruses, DNA and peptide growth factors. *Biological.* 20: 177-186.
- 300.Theiler, M., Smith, H. H. (1937). The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation of human immunization. *J. Exp. Med.* 65: 787-800.
- 301.Tishom, A., Salmi, A., Ahmed, R., M. B. Oldstone. (1991). Role of viral strains and host genes in determining levels of immune complexes in a model system: implications for HIV infections. *AIDS Res. Human Retroviruses.* 7: 963-969.
- 302.Tsutsui, Y., Kashiwai, A., Kawuamura, N., Aiba-Masago, S., Kosugi, I. (1995). Prolonged infection of mouse brain neurons with murine cytomegalovirus after pre and perinatal infection. *Arch. Virol.* 140: 1725-1736.
- 303.Tyler, K. L., Mann, M. A., Fields, B. N. H., Virgin, IV. (1993). Protective anti-reovirus monoclonal antibodies and their effects on viral pathogenesis. *J. Virol.* 67: 3446-3453.
- 304.Valdés, R., Ibarra, N., González, M., Álvarez, T., Llambias, R., Pérez, C., Quintero, O., Fischer, R. (2001). CB.Hep-1 hybridoma growth and antibody production using protein-free medium in hollow fiber bioreactor. *Cytotechnology.* 035: 145-154.
- 305.Van de Veen, J., Mes, A. (1973). Experimental infection with mouse adenovirus in adult mice. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 42: 235-241
- 306.Van Nie, R., Hilgers, J. (1976). Genetic analysis of mammary tumor induction and expression of mammary tumor virus against in hormone treated ovariectomized mice. *J. Natl. Cancer. Inst.* 56: 27-32
- 307.Van Wijnendaele, F., Simonet, G. (1987). Method for the isolation and purification of Hepatitis B surface antigen using polysorbate. *United States Patent.* 4. 649: 192.
- 308.Virgin IV, W., Tyler, Y. K. L. (1991). Role of immune cells in protection against and control of reovirus infection in neonatal mice. *J. Virol.* 65: 5157-5164.
- 309.Wajjwalku, W., Takahashi, M., Miyaishi, O., Lu, J., Sakata, K., Yokio, T., Saga, S., Imai, M., Matsuyama, M., Hoshino, M. (1991). Tissue distribution of mouse mammary tumor virus (MMTV) antigens and new endogenous MMTV loci in Japanese Laboratory mouse strain. *J. Cancer. Res.* 82: 1413-1420.
- 310.Walmsley, A. M., Amtzen. C. J. (2000). Plant for delivery of edible vaccines. *Curr. Opin Biotechnol.* 11: 126-129.
- 311.Weï-Kuang, C., Chung, H. K., Ching-Chuan, C., Jen-Ning, T. (1994). Two-step cell disruption for the extraction of membrane associated recombinant protein from *S. cerevisiae*. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 721, 1: 365-373.
- 312.Weis, R. A. (1982). Hybridomas produce viruses as well as antibodies. *Immunol. Today.* 3: 292-294.
- 313.Weisbroth, S. H. (1996). Post-indigenous disease: changing concepts of disease in laboratory rodents. *Lab. Ani.* 25: 25-33.

314. White, E. M., Grun, J. B., Sur, Ch. S., Sito, A. F. (1991). Process validation for virus removal. *Biopharm.* May: 34-37.
315. White, J. D., Shirey, F. G, French, G.R., Huggins, J. W., Brand, O. M., Lee, H. W. (1982). Hantaan virus, etiological agent of Korean hemorrhagic fever has bunyaviridae-like morphology. *Lancet*: 768-771.
316. Wiebe, M. E., Beker, F., Lzar, R., May, L., Casto, B., Semense, M., Fautz, C., Garnick, R., Miller, C., Masover, G., Bergman, D., Lubiniecki, A. S. (1989). A multifaceted approach to assume that recombinant tPA is free of adventitious virus, In: Spier, Griffith J.B. Crooy P and Stephenne J. (ed) *Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses*: 98-71. Butterworth, Guilford.
317. Wilchek, M., Miron, T. (1999). Thirty years of affinity chromatography. *Reactive and Functional Polymer.* 41: 263-268.
318. Willkomme, H. (2006). Viral safety. Safety issues with recombinant technologies, assessment of clinical trial material. *BioProcess International.* February.
319. Winzor, L. D., Sawyer, H. W. (1996). Evaluation of affinity constants by competitive binding assays: removal of empiricism from the Müller method. *Analytical biochemistry.* 241: 180-185.
320. Wood, W. B., Duts. S., Cross, S. (1981). Neonatal infection with mouse thymic virus: spleen and lymph node necrosis. *J. Gen. Virol.* 57: 139-147.
321. Xu, L., Wroma, T. J., Dubley, J. P. (1996). Exogenous mouse mammary tumor virus (MMTV) infection induces endogenous MMTV sag expression. *Virology.* 215: 113-123.
322. Yarmush, M. L., Weiss, M. A., Antonsen, P. K, Odde, J. D., Yarmush, M. D. (1994). Immunoaffinity purification: basic principles and operational considerations. *Biotechnol. Adv.*10: 413-440.
323. Yré, F. E., Safary, A. (1987). Summary of clinical finding on Engerix-B, genetically engineered yeast derived Hepatitis B vaccine. *Postgrad Med. J.* 63: 169-177.
324. Zanetti, A. R., Tanzi, E., Manzillo, G. (1982). Hepatitis B variants in Europe. *Lancet.* 2: 1132-1133.
325. Zhou, W., Bi, J., Janson, J. C., Dong, A., Li, Y., Zhang, Y., Huang, Y., Su, Z. (2005). Ion-exchange chromatography of Hepatitis B virus surface antigen from a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *J. Chromatography A.* 18; 1095:119-25.
326. Zuckerman, A. J. (1985). New hepatitis B vaccines. *Brit. Med. J.* 290: 492-496.
327. Zuckerman, A. J. (1987). The development of novel hepatitis B vaccines. *Bull W.H.O.* 65: 265-275.
328. Zutphen, L. F. M., Balss, M. (1996). Animal alternatives welfare and ethics. *Development in Animal and Veterinary Sciences, 27.* Proceedings of the second world congress on alternatives and animal use in the life sciences, held in Utrecht, the Netherlands. October: 20-24.

Nota: El autor y los tutores conocen el por ciento de actualización que deben tener las referencias, pero este tipo de trabajo pasó a ser contenido de compañías farmacéuticas desde hace ya varios años, por lo cual el por ciento mayoritario de las referencias se publicaron hace más de una década.



Método de Generación de Anticuerpos Monoclonales.



Ratón BALB/c mostrando la distensión abdominal producto del tumor ascítico. John McArdle, Ph.D. "Alternatives to Ascites Production of Monoclonal Antibodies" *Animal Welfare Information Center Newsletter*, 8(3):1-2, 15-18, Winter 1997/1998.

AE. 610 T 994398

Certificate of Analysis



Product Fetal Bovine Serum
Triple 0.1 um Sterile Filtered

Lot #: AHA7694 Catalog #: SH30088 Expiration Date: Jan 2003

Test/(Method)	Specification	Units	Results
Endotoxin (Limulus Amebocyte Lysate- Gel Clot)	For Information Only	EU/ml	50
Hemoglobin (O-Tolidine)	For Information Only	mg/dl	40
Sterility Testing Bacteria and Fungi (USP XXIII)	No Growth		No Growth
Virus Testing (9CFR 113.53)			
Fluorescent Antibody			
Bluetongue	Not Detected		Not Detected
Bovine Adenovirus	Not Detected		Not Detected
Bovine Parvovirus	Not Detected		Not Detected
Bovine Respiratory Syncytial Virus	Not Detected		Not Detected
Bovine Virus Diarrhea	Not Detected		Not Detected
Rabies	Not Detected		Not Detected
Reovirus	Not Detected		Not Detected
Cytopathogenic Agents -e.g. IBR	Not Detected		Not Detected
Hemadsorbing Agents -e.g. PI3	Not Detected		Not Detected
Mycoplasma			
(Large Volume, Direct Culture)	Not Detected		Not Detected
(Fluorescent Antibody)	Not Detected		Not Detected
(Hoechst DNA Stain)	Not Detected		Not Detected

This product was manufactured from Fetal Bovine blood collected in USDA inspected abattoirs located in the United States. Collection and processing are done only by HyClone employees. This product has not come from cattle born, raised, shipped through, or slaughtered in countries where BSE is known to exist.



Stephen Raat
Quality Control Department

8974295

SS0175

1725 South HyClone Road, Logan, Utah 84321 • In U.S. Call 1-800-HYCLONE, Outside U.S. Call 435-753-4584

Certificado de Análisis del Suero Fetal Bovino empleado en el cultivo de las líneas celulares

LISIDA

Laboratorio de Investigaciones
del SIDA
Carretera de Tapaste y 8 vías San José de las Lajas

CERTIFICADO DE CEPAS

La cepa VIH -1 IIB utilizada para los estudios de validación fue donada por el Dr. Mark A. Wainberg del Centro de SIDA McGills, Montreal, Canadá, en Abril de 1992, y ha sido utilizada en nuestro centro para estudios de susceptibilidad y resistencia a AZT y como control positivo en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) con buenos resultados.

Se ha extraído ADN de líneas celulares infectadas con esta cepa que se ha empleado como controles en estudios de secuenciación genómica en nuestro Centro y en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.



Dr. Regina Zonia Martín García
subdirectora

Líneas celulares utilizadas en el ensayo de validación de hemoderivados.

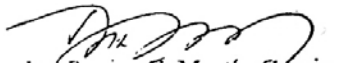
- MT4 donada por el Dr Mark Wainberg de la Universidad Mc Gill, Canadá.1992.
- Vero procedentes de la ATCC. 1989.
- MDBK procedentes de la ATCC.1990.
- LFBC donada por el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario, Ciudad de la Habana, Cuba. 1993.

Las células se mantuvieron en congelación a -196°C . Después de descongeladas tuvieron una rápida recuperación, durante el tiempo que se utilizaron en el estudio mantuvieron la viabilidad celular entre 95%-100%.

Las pruebas de esterilidad realizadas resultaron negativas a microorganismos, no mostraron contaminación cruzada con otras líneas celulares. Los estudios realizados no mostraron variaciones con respecto a las células originales recibidas.

No se detectó presencia de VIH en la línea celular MT4, por ensayo de ELISA de captura de antígeno p24 y microscopia electrónica.

Las líneas celulares se mantuvieron y trabajaron con medios de cultivo, suplementos y reactivos certificados, los cuales se comprobaron que estaban libres de agentes contaminantes y que no resultaban tóxicos para el crecimiento y mantenimiento de las células.


Dr. Regina Z. Martín García
Subdirectora CICDC.



CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA Carretera de Tapaste y Autopista Nacional. San José de las Lajas Apartado 10. La Habana
Teléfono: 089 - 3383 al 90 Telex 056-119

CERTIFICADO DE CEPA VIRAL

Por este medio certifico que las cepas **STHENDAL** del **HERPES VIRUS** (Enfermedad de Aujeszky) y **NADL** del virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD-V), proceden del Instituto de Veterinaria de Hungría y del Instituto Zooprofiláctico de Piamonte, Italia respectivamente.

Estas cepas han sido utilizadas como referencia en diferentes técnicas de diagnósticos como seroneutralización, PCR, entre otras con buenos resultados.

Maria Teresa Frías
Dr. M, Dr. en C. Vet.
Jefe Grupo Virología

IPK**INSTITUTO "PEDRO KOURI"****MINISTERIO DE SALUD PUBLICA****CENTRO COLABORADOR DE LA "OMS"****PARA EL ADIESTRAMIENTO E INVESTIGACIONES EN MALACOLOGIA MEDICA
Y CONTROL BIOLÓGICO DE VECTORES Y HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS****CENTRO COLABORADOR DE LA "OMS"****PARA ENFERMEDADES VIRICAS****CERTIFICADO DE CEPA VIRAL**

Se entrega cepa de Poliovirus tipo 2 (cepa Sabin) recibida del National Institute for Biological Standards and control de Inglaterra den fecha 13 de marzo 1992. La cepa vino acompañada de una carta en que dice textualmente:

Ampoules of Sabin II (so+3) code number 71/302. En el IPK se le han dado 4-5 pases : primero en Hep II y el resto en Vero.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pedro Más Lago", is positioned above the printed name.

Dr. Pedro Más Lago
J' Laboratorio de Enterovirus IPK

Arroyo Arenas, 20 de Junio de 1967
"Acta 30 de la caída en combate del
"Guerrillero Heroico y sus compañeros"

Dr. Laboratorio Virología
Defensa Civil
San José de las Lajas

Dr. Centro Nacional de Epidemiología
y Diagnóstico. C. de la Habana.

ASIT: Certificación de cepas.

La cepa de parvovirus canino entregada a ustedes es de origen
autóctono, identificada con el No. de Caso 7164 clasificada por
los siguientes métodos:

Caracterización química.

Identificación serológica con suero referente procedente de los
Laboratorios Centrales de Hungría.

Morfológicamente por Microscopía Electrónica.

Respetablemente.

Dr. Delia Rodríguez Perera
Especialista Virología
CENEDI



Vto. Bno. Dr. Rafael Hernández Varela
Director
CENEDI

División Roedores Gnotobióticos
CENPALAB
 INSTITUCIÓN NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

BG.C.C.BI.98

Certificado de Salud

No. _____


Especie: Ratón	Sistema protegido de origen: SPA		
Línea: BALBIC CENP	Número de lotes: 38	Total de cajas: 10	
Total: 1600 Machos - Hembra 1600	Peso: 16-18 gr	Edad: 5 P.M.	
Centro de destino: CIB			
Fecha de expedición: 10/01/00	Hora de expedición: 10 P.M.		

EXAMEN CLINICO

Los animales a la inspección clínica no muestran desviaciones de los parámetros de salud establecidos para esta especie y línea, cumpliendo con las especificaciones de calidad dadas por el productor.

BACTERIOLOGIA *						RESULTADOS						RESULTADOS											
Entidad	Método	Neg	Pos	No testado	Fecha	Entidad	Método	Neg	Pos	No testado	Fecha	Entidad	Método	Neg	Pos	No testado	Fecha						
Salmonella spp.	Cult/Serol	X			26/09/99	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serol	X			26/09/99												
Streptobacillus moniliformis	Cultivo			X		Cytophlox feraxii	Cultivo	X			26/09/99												
Streptococcus β hemolítico	Cult/Serol	X			26/09/99	Pasteurella pneumotropica	ELISA	X			21/11/99												
Bordetella bronchiseptica	ELISA	X			21/11/99	Coccidiosis piliformis	Ing Clínica	X			26/09/99												
Corynebacterium kutscheri	ELISA	X			21/11/99	Legionella spp.	ELISA	X			28/09/99												
PARASITOLOGIA						RESULTADOS						PATOLOGIA						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	MSD	No testado	Fecha	Examen macroscópico: (Fecha) 14/05/99																	
Endoparásitos	DIRFLUT		X		4/11/99	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas																	
Klebsiella spp.	DIRFLUT		X		4/11/99																		
Toxoplasma gondii	ELISA		X		4/11/99																		
Ectoparásitos	INSPECCION		X		4/11/99																		
VIROLOGIA * (SEROLOGIA)						RESULTADOS						RESULTADOS											
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha						
Virus de la Hepatitis (MHV)	ELISA		X		20/09/99	Tiroides	ELISA			X													
Reovirus Tipo 3 (RDO 3)	IFA		X		20/09/99	Rotavirus (EDM)	IFA		X		14/09/99												
Encelbomavirita (TMEV)	ELISA		X		20/09/99	Polyoma	IFA		X		14/09/99												
Pneumonia del ratón (PVM)	ELISA		X		20/09/99	Adenovirus (MAD)	FA/ELISA		X		14/09/99												
Virus diminuto del ratón (MVM)	ELISA		X		20/09/99	Hantán virus	ELISA			X													
Lactato deshidrogenasa (LDH)	ALIT			X		Coronavirus Int. (ICM)	IFA		X		14/09/99												
Echovirus	FA/ELISA		X		14/09/99	SENDV	ELISA		X		14/09/99												
Virus K	IFA		X		14/09/99	Citomegalovirus (MCMV)	IFA		X		14/09/99												
						Mycoplasma pulmonis	ELISA			X													

* Según lo certificado por la División de Aseguramiento de la Calidad del Centro Tecnológico para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al programa de revisiones de los roedores criados y mantenidos en sistema gnotobiótico y por comité de los animales de nuestra institución. Válido para el 1° Trimestre del año 2000



ANIMALES DE LABORATORIO

Aprobado por: _____
 Especialista de Aseguramiento de la calidad

Vis. Gen: _____
 División de Roedores Gnotobióticos

Certificado de Salud de los Ratones empleados en la producción de ascitis

Academisch Ziekenhuis Nijmegen



MEDICAL MICROBIOLOGY

4. CRITERIA

The test is considered valid if virus-induced cytopathogenic changes and/or hemadsorption are observed in the positive controls and not in the negative controls. The test sample is considered positive when cytopathogenic changes and/or hemadsorption are found.

5. RESULTS AND CONCLUSION

Date initiation study : August 13th 1996
 Date completion study : September 17th 1996
 Study director : Dr. F. Heessen.

The test was valid. Positive control cultures displayed the expected type of cytopathogenic effect; positive control cultures, infected with influenzavirus A displayed positive hemadsorption. No cytopathogenic effects or positive hemadsorption were observed in the negative control cultures and test sample cultures. The result indicates that the test sample does not contain viruses which can produce cytopathogenic effects or hemadsorption in any of the tissue cultures used.

Head of Laboratory for Tissue Culture and
Antigen Preparation.

Nijmegen, Date September 17th 1996

6. REFERENCES

- Lennette, E.H., and Schmidt, N.J., 1979. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th edition, American Public Health Association, Washington.

7. RECORD MAINTENANCE

Protocol, data sheet and a copy of the final report and all correspondence between the ICLAS laboratory and the client will be maintained within a central file in the laboratory. These records will be retained for a period of ten years following submission of the final report to the client. Responsibility for maintaining samples of the test sample rests solely with the client.

Page 3/4

isolation assay in tissue cultures

Certificado del Ensayo de detección de virus en células sensibles a replicación viral del hibridoma CB.Hep-1.

Academisch Ziekenhuis Nijmegen



MEDICAL MICROBIOLOGY

BIOSAFETY TESTING

final report

isolation assay in embryonated eggs

Client:

CIGB, HAVANA CUBA DR NEYSI ZARRA
BDC ORDER: CD 794 L

at sample designation
(as provided by the client):

HEP 1 JV 11996 RECEIVED 10/12-1998

Laboratory-code:

HEP 1 JV 11996

Report date:

4/3 - 1999

Test results:

NO INDICATIONS FOR THE PRESENCE OF
VIRUSES AFTER INOCULATION OF YELK SAC

Katholieke *Universiteit* Nijmegen**CENTRAL ANIMAL LABORATORY**
 Directoraat Faculteit
 der Medische
 Wetenschappen
 Centraal
 Dierenlaboratorium

Date : October 23, 1996.
 To : Dr. J. v.d. Logt
 From : J.J.G.W. Hendriks / J.P. Koopman
 Copy to : B. v.d. Weem
 Concerning : Results 'in vivo biosafety test'.

ons kenmerk

datum

In reference to the in vivo safety test, for the material HEP1 I.V. 11996, offered by your Cuban relation, I hereby send you the results.

In the tests with both the guinea-pigs and the adult mice, no particular clinical signs are noticed between the moment of injection (sept. 5th) and that of euthanasia (oct. 14th).

Besides, we included three litters of suckling mice in the test, of which two litters comprised over ten animals: 9, 12 and 16 young ones. The litters of 9 and 12 were born (and injected) at september 8th, the other one day later. In this part of the test we have to remark that within the litter of 12 sucklings, a high diversity in growth was observed. Both extreme large and small animals were found (6:6). Although the difference in size was striking, no signs of illness or weakness were observed. After consulting our veterinarian, there was decided not to perform obduction. Not one of the suckling mice died within the period of six weeks observation. The animal supplier, Harlan Netherland B.V., responded that nothing mentioned above was ever observed in their production colony.

I hope that this is enough information for now and I leave the drawing of conclusions and further decisions up to you and your relation.

With kind regards,

J. Hendriks,
 Head dept. Small Animals.

Dr. J.P. Koopman,
 Veterinarian.

bijlage(n)

centraal dierenlaboratorium

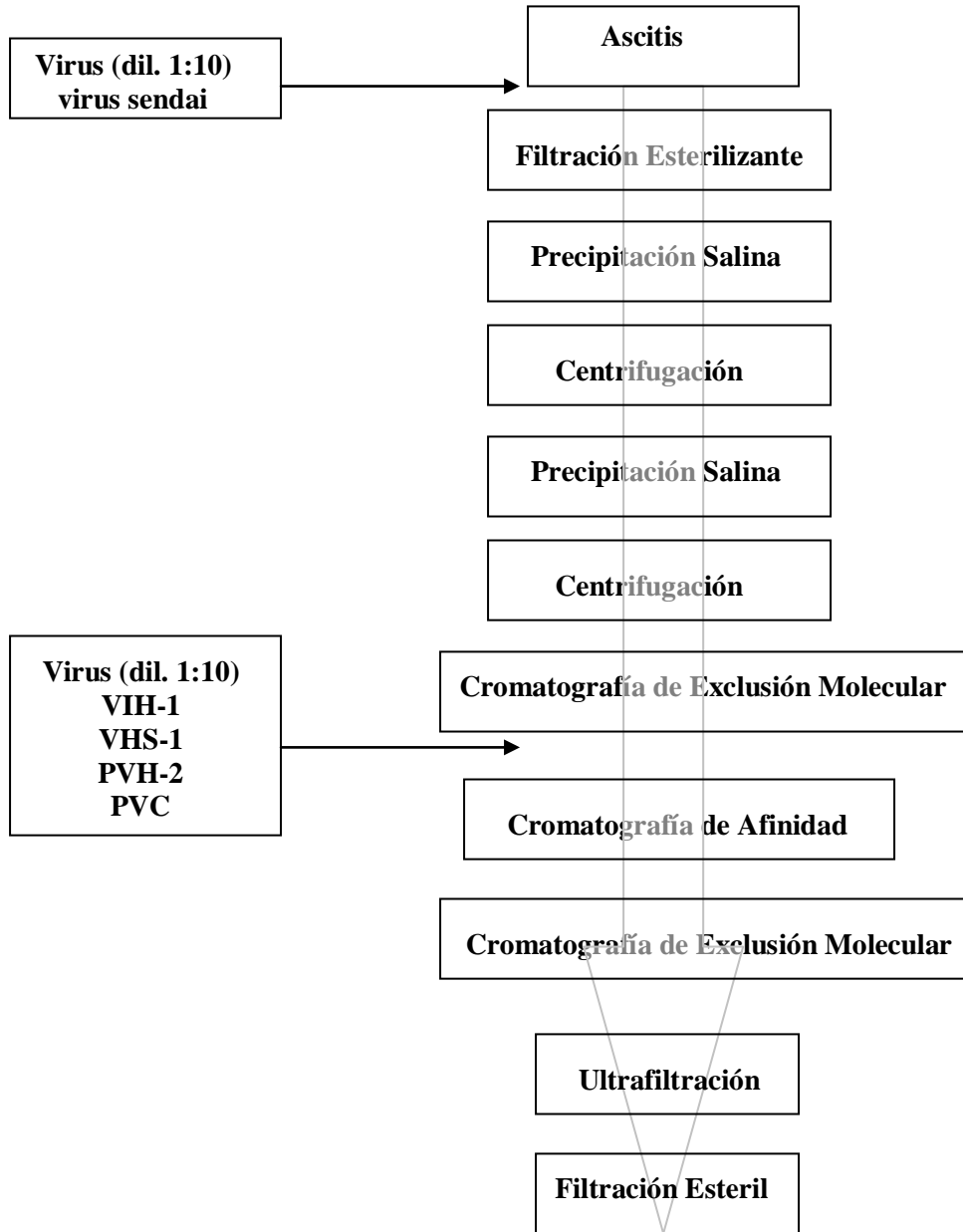
Telefoon (024) 361 35 57
 Fax (024) 361 63 75

Postadres:
 Postbus 9101
 6500 HB Nijmegen

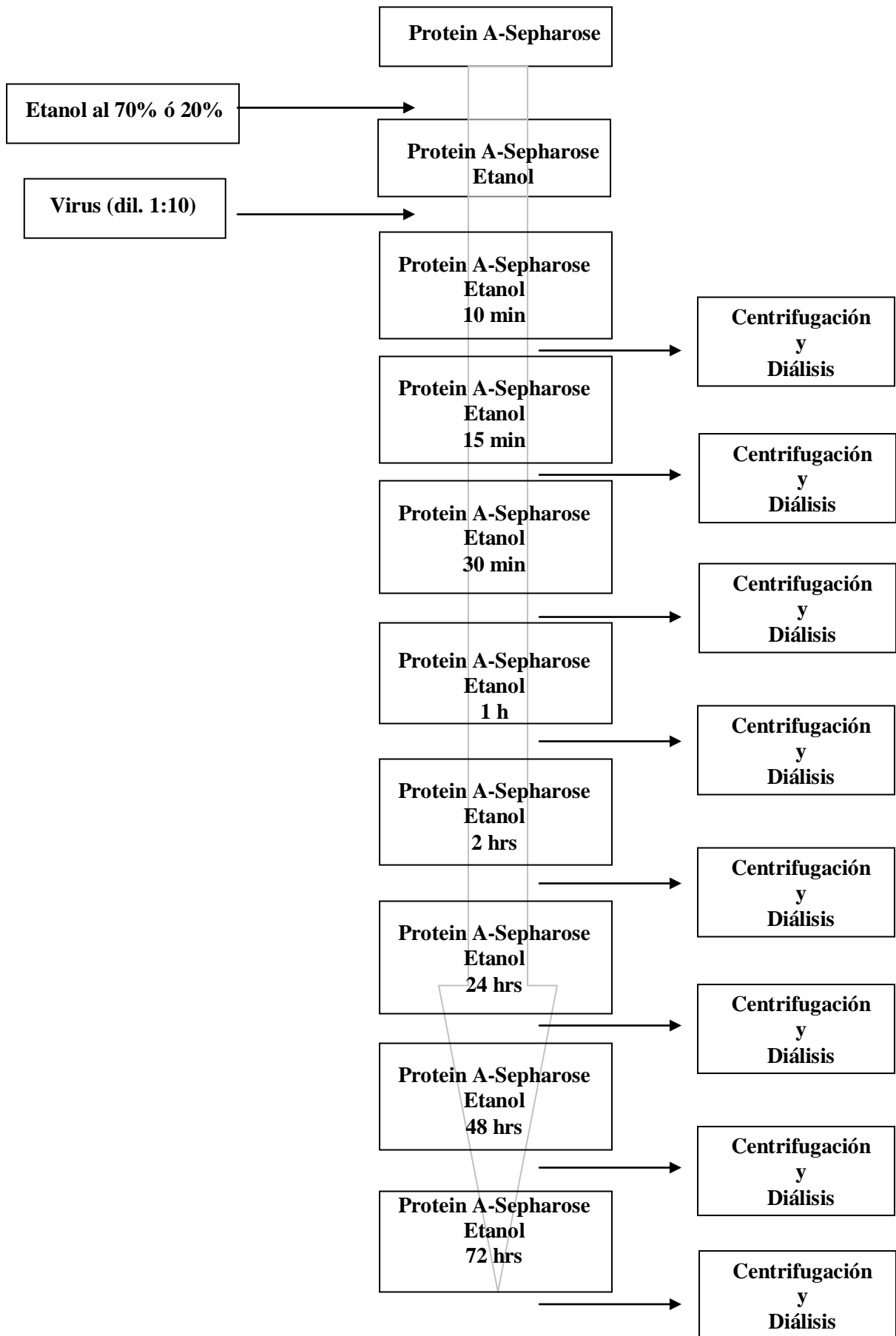
Bezoekadres:
 Geert Grootplein 29
 Nijmegen

Certificado del Ensayo de detección de virus en ratones y cobayos del hybridoma CB.Hep-1

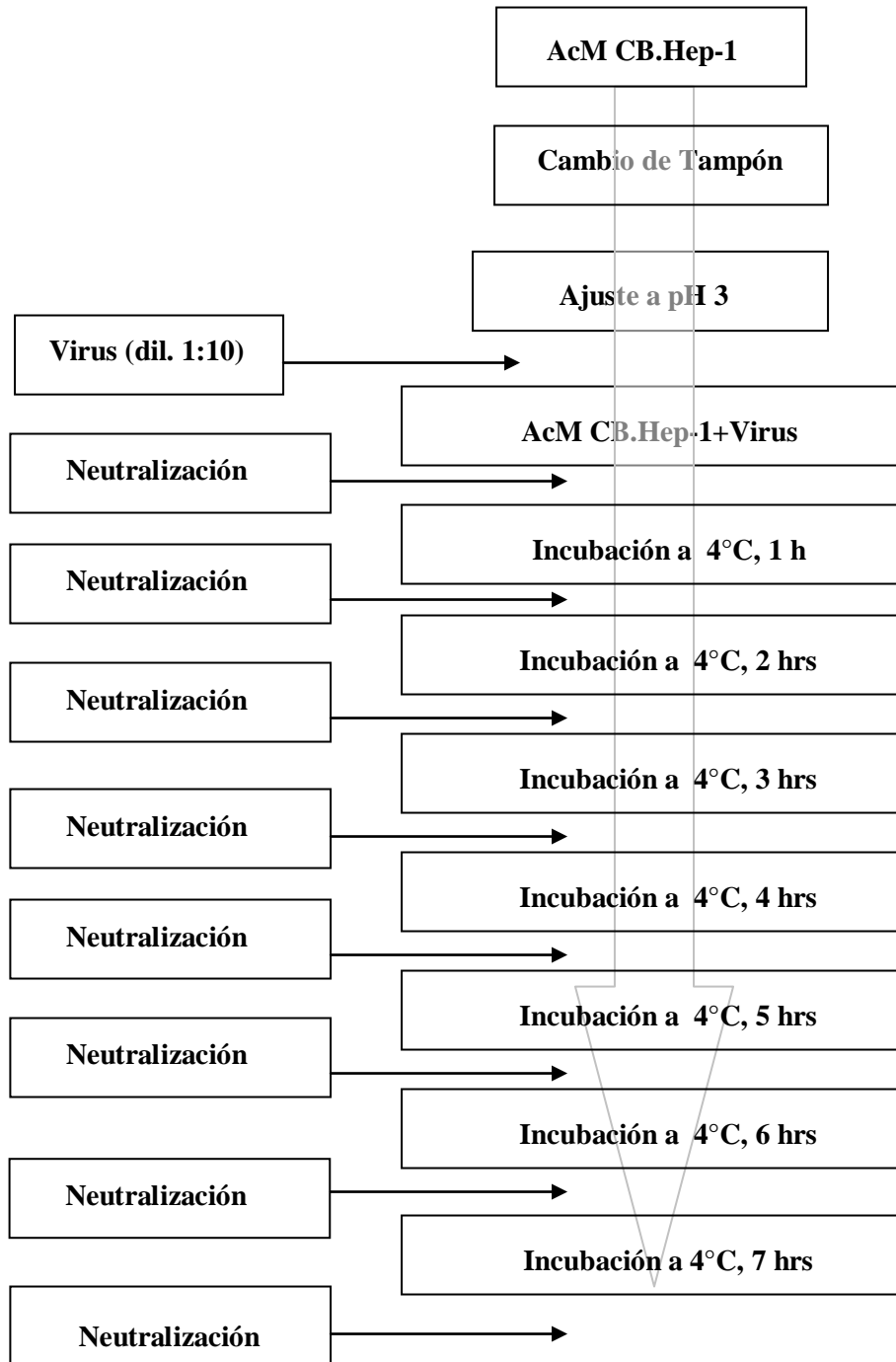
- 1.MENITSGFLGPLB
- 2.GFLGPLLVLQAGB
- 3.LVLQAGFFLLTRB
- 4.FFLLTRILTIPQB
- 5.ILTIPQSLDSWWB
- 6.SLDSWWTSLNFLB
- 7.TSLNFLGGSPVCB
- 8.GGSPVCLGQNSQB
- 9.LGQNSQSPTS~~N~~HB
- 10.SPTS~~N~~HSP~~T~~SCPB
- 11.SP~~T~~SCPPICPGYB
- 12.PICPGYRWMCLRB
- 13.RWMCLRRFIIFLB
- 14.RFIIFLFILLLCB
- 15.FILLLCLIFLLVB
- 16.LIFLLVLLDYQGB
- 17.LLDYQGMLPVCPB
- 18.MLPVCPLIPGSTB
- 19.LIPGSTTTSTGPB
- 20.TTSTGPCKTCTTB
- 21.CKTCTTPAQNSB
- 22.PAQNSMFPSCCB
- 23.MFPSCCCTKPTDB
- 24.CTKPTDGNCTCIB
- 25.GNCTCIPIPSSWB
- 26.PIPSSWAFAYLB
- 27.AFAKYLWEWASVB
- 28.WEWASVRF~~S~~WLSB
- 29.RF~~S~~WLSLLVPFVB
- 30.LLVPFVQWFVGLB
- 31.QWFVGLSPTVWLB
- 32.SPTVWLSAIWMMB
- 33.SAIWMMWYWGPSB
- 34.WYWGPSLYSIVSB
- 35.LYSIVSPFIPLLB
- 36.PFIPLLP~~I~~FFCLB
- 37.LLPIFFCLWVYIB



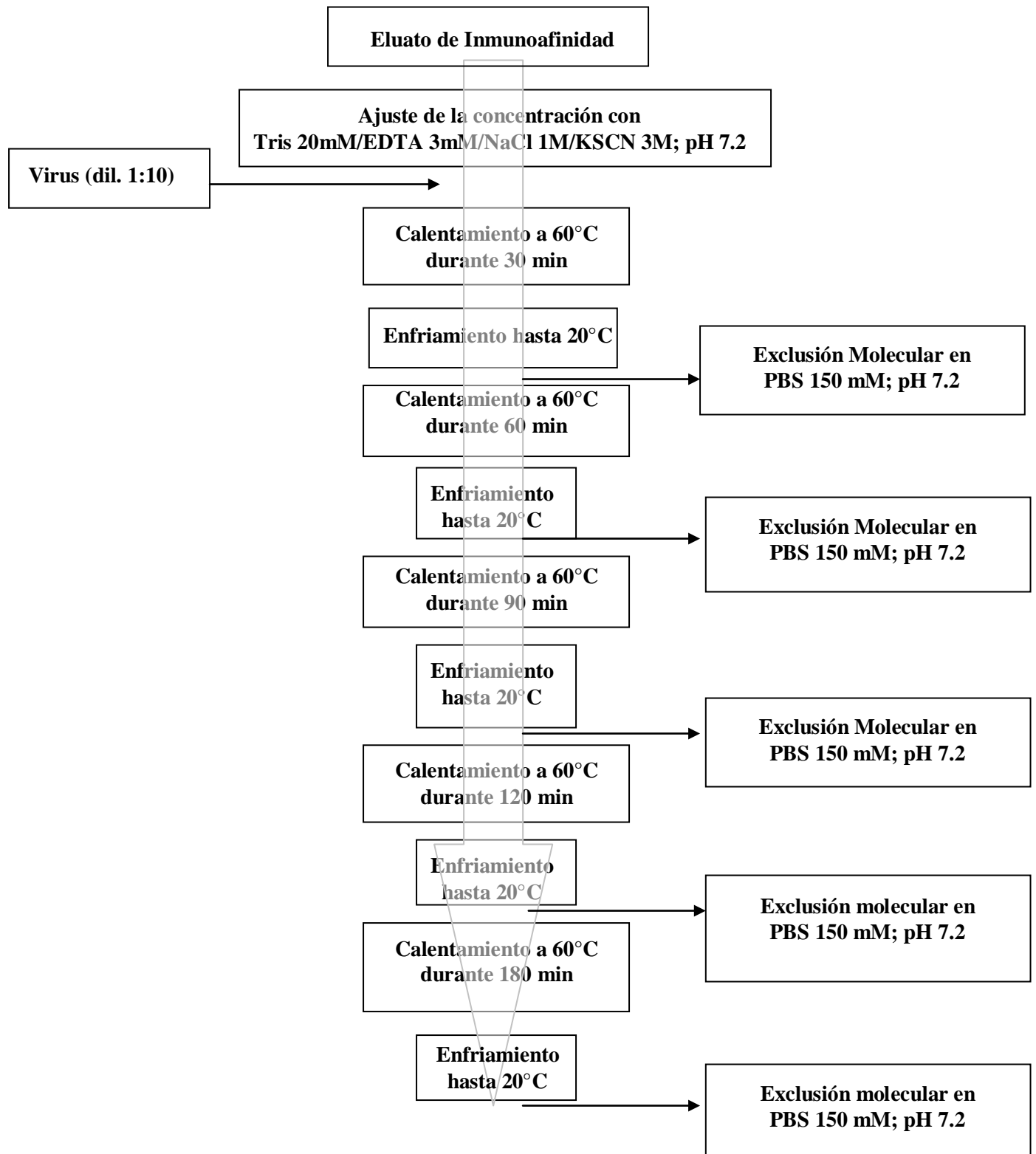
Protocolo para demostrar la capacidad de remoción de virus modelos del método de purificación del AcM CB.Hep-1.



Protocolo para demostrar la capacidad de inactivación viral del Etanol al 70% y al 20%.



Protocolo para demostrar la capacidad de inactivación de virus modelos en ácido cítrico 100 mM pH 3, 4°C.



Protocolo para demostrar la capacidad de inactivación viral en Tris 20mM/EDTA 3 mM/NaCL 1M/KSCN 3M pH 7.2, a 60°C.



FINAL REPORT

Q-ONE BIOTECH PROTOCOL # 37014

TITLE : S⁺L⁻ Focus Assay:
In Vitro Detection of Infectious Murine Xenotropic Retroviruses

SPONSOR : Swiss Federal Institute of Technology,
Laboratorium für Biochemie 1,
ETH-Zentrum,
CH-8092, Zürich,
SWITZERLAND.

CONTACT : Dr. R. Valdes

SPONSOR SAMPLE DESIGNATION : ~~CB.Hep-1 (S⁺L⁻ assay)~~

Q-ONE BIOTECH ACCESSION NUMBER : 691313

REPORT DATE : 10th January 1997

STUDY DIRECTOR : Dr. Carol McLean

TEST RESULTS : S⁺L⁻ focus forming virus was not detected in the test article.

Certificado del Ensayo de caracterización de Retrovirus S+L- al hibridoma CB.Hep-1



FINAL REPORT

Q-ONE BIOTECH PROTOCOL # 37015

TITLE : XC Plaque Assay:
In Vitro Detection of Infectious Murine Ecotropic Retroviruses.

SPONSOR : Swiss Federal Institute of Technology,
Laboratorium für Biochemie 1,
ETH-Zentrum,
CH-8092 Zürich,
SWITZERLAND.

CONTACT : Dr. R. Valdes

SPONSOR SAMPLE DESIGNATION : CB. Hep-1 (XC assay)

Q-ONE BIOTECH ACCESSION NUMBER : 691303

REPORT DATE : 22nd January 1997

STUDY DIRECTOR : Dr. Carol McLean

TEST RESULTS : XC plaque forming virus was not detected in the test article.

Certificado del Ensayo de caracterización de Retrovirus XC al hibridoma CB.Hep-1



Centro de Inmunología Molecular

Ciudad de la Habana, 10 de noviembre del 2003
"Año de Gloriosos Aniversarios de Martí y del Moncada"

Por este medio certifico que las muestras de líquido ascítico del AcM CBHEPI lotes 001/03, 002/03, 003/03, 004/03, 005/03, 006/03, 007/03, 008/03, 009/03, 010/03, 011/03, 012/03, 013/03, 014/03, 015/03, 016/03, 017/03 y 018/03 fueron testadas mediante el ensayo *in vitro* para la presencia de virus adventicios así como por el ensayo de hemadsorción con eritrocitos de primate, resultando todos los lotes negativos a la presencia de contaminación viral.



Lic. Lidmila López Matilla
Esp. Ensayos Biológicos

MSc. Nivis Perea Perea
Departamento Control de la Calidad

Certificado del ensayo de determinación de virus en muestras de ascitis en células sensibles a réplicación viral

Ensayos para detectar virus y sus limitaciones.

Ensayos	Material a Evaluar	Capacidad de Detección	Limitaciones del Ensayo
Serológicos	Suero de los animales	Antígeno virales específicos	Dependiente del tipo de virus, del tipo de antígeno y de la respuesta de anticuerpo
Producción de anticuerpos	Lisado de células Medio de cultivo Ascitis Anticuerpo puro	Antígeno virales específicos	Agentes infecciosos para el animal empleado en el sistema de pesquisaje
<i>In vivo</i> Ratones adultos Ratones lactantes Cobayos Huevos embrionados	Lisado de células Medio de cultivo	Rango amplio de virus patógenos al humano	Agente que no se replica o produce enfermedad en animales
<i>In vitro</i>	Células Lisados de células Medio de cultivo	Rango amplio de virus patógenos al humano	Agente que no se replica o produce efecto citopático en el sistema seleccionado
Microscopía Electrónica de Transmisión	Células viables Sobrenadante libre de células	Virus y partículas semejantes a virus	Ensayo cualitativo
Reverso transcriptasa	Sobrenadante libre de células	Retrovirus	Sólo detecta la enzima activa Interpretación con dificultad por el fondo que se produce debido a la presencia de enzimas celulares
Ensayo de infectividad para Retrovirus Reacción de la polimerasa en cadena	Sobrenadante libre de células Células, fluidos de cultivo y otros materiales	Retrovirus infecciosos Secuencia específica de virus	Retrovirus que no se replican en placas o focos en el sistema seleccionado No indica si el virus es infectivo y se necesitan sondas específicas para cada virus

Clasificación de los virus murinos según su capacidad de infectar primates *in vitro* o *in vivo*.

Virus Murinos	Familia	Sistemas	Grupos según (OMS)
Coriomeningitis linfocítica	Arenaviridae	Hematopoyético	I
Hantaan	Bunyaviridae	Múltiples	I
Reovirus tipo 3	Reoviridae	Digestivo	I
Rotavirus	Reoviridae	Digestivo	I
Sendai	Paramyxoviridae	Respiratorio	I
Pneumonia	Togaviridae	Respiratorio	II
Citomegalovirus	Herpesviridae	Digestivo	II
LDH	Togaviridae	Hematopoyético	II
Tumores de mama	Retroviridae	Dermal	II
Tímico	Herpesviridae	Digestivo	II
Parvovirus	Parvoviridae	Digestivo	II
Theiler	Picornaviridae	Nervioso	II
Ectromelia	Poxvirus	Múltiple	II
Hepatitis	Coronaviridae	Múltiple	II
Diminuto de ratón	Parvoviridae	Múltiple	II
Adenovirus	Adenoviridae	Múltiple	II
Poliomavirus	Papoviridae	Múltiple	II
Retrovirus	Retroviridae	Hematopoyético	II

Resistencia de los virus murinos ante los agentes físico-químicos.

Virus	Genoma	Envoltura	Resistencia a la Temperatura	Resistencia al pH	Resistencia a los Solventes Orgánicos
Hantaan	ARN	Si	Sensible 37°C	Sensible pH 5	No reportado
Sendai	ARN	Si	Sensible 37°C	Sensible pH 5	Sensible a solventes lipídicos
LCMV	ARN	Si	No informado	Sensible pH 5.5 y 8.5	Sensible a solventes lipídicos
Reovirus 3	ARN	No	60°C 30 min	Resistente	Resistente
Rotavirus de Rata	ARN	No	56°C 30 min	Sensible pH 3	Resistente al eter
Retrovirus	ARN	Si	Sensible a la temperatura	Sensible pH 5	Sensible a solventes lipídicos
Diminuto	ADN	Si	80°C 2hrs	Resistente hasta pH 12	Resistente a cloroformo, eter y alcohol
Ectromelia	ADN	Si	60°C 30 min	No reportado	Sensible al hipoclorito de sodio (100 µg/ mL) y formolaldehido
K	ADN	No	70°C 3 hrs	Resistente	No reportado
Polioma	ADN	No	Alta resistencia	Alta resistencia	Alta resistencia
Thymic	ADN	Si	56°C 30 min	No reportado	20% eter 2h/2°C
Pneumonia de ratón	ARN	Si	56°C 30 min	No reportado	No reportado
LDH	ARN	Si	4°C	Sensible pH ácido	Sensible a solventes lipídicos
Rotavirus de ratón	ARN	No	Inestable de 24 a 37°C	Sensible pH 3	Resistente al eter
Adenovirus	ADN	No	56°C 15 min	Resistente	Resistente al eter
Hepatitis de ratón	ARN	Si	56°C 30 min	Resistente	Sensible a solventes lipídicos
Theiler	ARN	Si	50-55°C 30 min	No reportado	Sensible 50% alcohol y acetona
Citomegalovirus	ADN	Si	50-55°C 30 min	Sensible pH ácido	Sensible a solventes lipídicos
Toolan (Kilham)	ADN	No	80°C 2 hrs	Resistente hasta pH 12	Resistente a cloroformo, éter y alcohol
Sialodacryoadenitis	ARN	Si	56°C 30 min	No reportado	Sensible a solventes lipídicos