

Estudio comparativo del proceso de purificación de anticuerpos monoclonales mediante cromatografía de adsorción en hidroxiapatita

Recibido en junio de 1986

A. VELANDIA, A. M. BARRAL, A. M. VÁZQUEZ, R. CASTILLO y B. TORMO

Departamento de Biología Tumoral, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

RESUMEN

En el presente trabajo se compara la purificación de anticuerpos monoclonales de ratón de diferentes clases y subclases (IgG1, IgG2 e IgM) por cromatografía de adsorción en hidroxiapatita (BioRad) y en hidroxiapatita-Ultrogel (LKB). Se analizaron los factores capacidad de adsorción, rendimiento, tiempo de corrida (velocidad de flujo), reciclaje y capacidad de enlazamiento específicos de los anticuerpos obtenidos inmediatamente después de la purificación y posterior a su almacenamiento.

Se concluye que la cromatografía de adsorción en hidroxiapatita, y en específico, luego de que esta sustancia acoplada a un soporte adecuado (HA-Ultrogel), constituye un método fácil, sencillo, rápido y eficiente para la purificación de anticuerpos monoclonales.

SUMMARY

The present article compares the purification of mouse monoclonal antibodies of different classes and subclasses (IgG1, IgG2 and IgM) by adsorption chromatography on hydroxyapatite (BioRad) and hydroxyapatite-Ultrogel (LKB). The analyzed parameters were adsorption capacity, recovery, running times (flow rates), successive cycling and specific binding capacity of the antibodies, immediately after purification and after storage.

It was concluded that adsorption chromatography on hydroxyapatite, specifically after this substance is coupled to an appropriate support (hydroxyapatite-Ultrogel) is an easy, simple, fast and effective method for purification of monoclonal antibodies.

INTRODUCCION

La creciente demanda de anticuerpos monoclonales (AcM) en la investigación y práctica biomédica (Köhler *et al.*, 1981) ha llevado a la búsqueda de métodos de purificación de inmunoglobulinas (Ig) monoclonales que combinen la sencillez, alto rendimiento, poca alteración de las propiedades biológicas de las muestras y capacidad de procesamiento de grandes volúmenes de sobrenadantes de cultivos de hibridomas o ascitis tumorales inducidos por estos en el ratón.

Generalmente, estos métodos involucran algún paso cromatográfico, siendo quizás el más difundido la cromatografía de afinidad en Proteína A-Sepharose (Langone *et al.*, 1982), aunque

también se ha empleado con éxito la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Affigel-Blue (Bruck *et al.*, 1982). Sin embargo, ambos métodos presentan algunas limitaciones relacionadas con el empleo de pH bajos para la elución de las muestras, la no eliminación de las actividades proteolíticas presentes o la inadecuada separación de algunos tipos de Ig.

Recientemente se ha reportado el empleo de la cromatografía de adsorción en hidroxiapatita (HA, Stanker *et al.*, 1985) para la purificación de AcMs; los resultados de este estudio sugieren que esta matriz puede presentar algunas ventajas sobre otros tipos de cromatografías, especialmente en cuanto al volumen de muestra a aplicar, así como en la posibilidad de purificación de IgM monoclonal.

En el presente trabajo se reporta el empleo de la hidroxiapatita como medio de purificación de IgG1, IgG2 e IgM monoclonales de ratón, comparando los resultados obtenidos con la matriz aislada y después de su acoplamiento a un soporte de agarosa.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos monoclonales

Se emplearon tres AcM de ratón con diferentes clases y subclases de Ig: el IOR-T1, que es una IgG2a específica para los linfocitos T humanos maduros (García *et al.*, 1984); el IOR-CEA1, que reconoce al antígeno carcinoembrionario (CEA) y pertenece a la subclase IgG1 (Gavilondo *et al.*, 1985) y el IOR-CEA2, que es un AcM del tipo IgM (Gavilondo *et al.*, 1985).

Para la producción masiva de los AcM se inocularon intraperitonealmente (i.p.) $1-2 \cdot 10^6$ células del hibridoma correspondiente en ratones BALB/cHab, previamente inyectados i.p. con 0,5 ml de Pristane (Aldrich) y el líquido ascítico fue colectado por punción repetida de la cavidad abdominal entre los días 10 y 20. Como control de ascitis libre de AcM se empleó aquel producido por el crecimiento i.p. de la línea del mieloma no secretor P3/x63-Ag8-653 (Kearney *et al.*, 1979).

Tratamiento de los líquidos ascíticos

Los líquidos ascíticos colectados fueron centrifugados sucesivamente a 200 y 10 000 X g para remover los componentes celulares y detritus. Los lípidos y lipoproteínas fueron extraídos mediante adición de cloroformo (v/v) durante 30 minutos, la centrifugación de la mezcla a 800 g durante 30 minutos y la selección de la fase superior, que se sometió a una última centrifugación a 10 000 X g durante una hora. Los sobrenadantes se dializaron toda la noche a 4°C contra 100 volúmenes del tampón fosfato 10 mM pH 6,8 empleado para equilibrar las columnas.

Purificación

Se emplearon como matrices cromatográficas la HA (BioRad) y la HA-Ultrogel (LKB). Con vistas a su comparación, se estimaron los volúmenes totales de las columnas teniendo en cuenta que la HA-Ultrogel contiene aproximadamente 40 por ciento de HA. Se emplearon columnas de 2,5 . 10 cm, con 20 y 10 ml de HA-Ultrogel y HA, respectivamente, ajustándose las condiciones de saturación de las mismas luego de ensayos previos, y seleccionándose la velocidad de flujo y condiciones de corrida inicialmente con un gradiente lineal de tampón fosfato. Las concentraciones de proteína e Ig de los diferentes líquidos ascíticos tratados fueron estimadas por los métodos reportados por Lowry *et al.* (1959) y Hudson y Hay (1980), respectivamente.

Las columnas se lavaron con tampón fosfato 10 mM pH 6,8, hasta la elución de la proteína no enlazada. La separación se ejecutó mediante un gradiente discontinuo (100, 200 y 300 mM) del mismo tampón. Finalmente se lavaron con tampón fosfato 500 mM pH 6,8 y reequilibraron con tampón fosfato 10 mM. Se emplearon velocidades de flujo entre 20 y 30 ml/h para la HA-Ultrogel y entre 5 y 10 ml/h para la HA. Las fracciones fueron colectadas mediante monitoreo directo del proceso de elución a 280 nm.

La clase y subclase de Ig de ratón en las fracciones se determinó mediante inmunodifusión doble (Cuchterlony y Nielsson, 1978) empleando antiseros mono-específicos anti-Igs de ratón (Meloy). La presencia de AcM específicos se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células y tejidos blancos (ver más adelante).

Ensayo de la capacidad de enlazamiento específico de los AcM

La capacidad de enlazamiento específico de los AcM por su antígeno blanco se determinó por IFI antes y después del proceso de elución y posterior a un mes de almacenamiento a 4⁰C, tomando como base una concentración de Ig de 200 µg/ml y realizando diluciones seriadas de ella. El IOR-T1 fue ensayado frente a linfocitos T humanos purificados por métodos descritos previamente (Vázquez *et al.*, 1985). Los AcM IOR-CEA1 e IOR-CEA2 fueron enfrentados a cortes de tejido de colon fetal humano y la positividad determinada por IFI, tal como fue reportado por Gavilondo *et al.*, 1985.

RESULTADOS

Selección de la velocidad de flujo óptima

Inicialmente se realizaron para ambas matrices corridas con valores de velocidad de flujo crecientes con el objetivo de seleccionar la velocidad de flujo máxima que permitiera una buena resolución. Se determinó que para la HA-Ultrogel la velocidad de flujo óptima era de 30 ml/h, mientras que para la HA de aproximadamente 7 ml/h.

Purificación de un AcM IgG1 (IOR-CEA1)

En la tabla 1 se muestran los resultados del proceso de purificación para ambas matrices al aplicar cantidades iguales (7 ml) de líquido ascítico con una concentración de proteína de 11,1 mg/ml de Ig de 3,8 mg/ml. Se observa que el enlazamiento de proteínas e Igs fue ligeramente menor (en 2 y 5 por ciento respectivamente) y la adsorción específica mayor para la HA. En la figura 1 se muestra el perfil de elución obtenido para ambas matrices.

El análisis de la capacidad de enlazamiento específico del AcM antes y después de purificar mostró que esta fue similar para los Ac obtenidos por ambas matrices (dilución óptima 1/10), no encontrándose diferencias con los valores obtenidos antes del proceso. El rendimiento fue ligeramente superior para la HA-Ultrogel.

Tabla 1

PURIFICACION DE UN AcM IgG1 (IOR-CEA1) EN HA Y HA-ULTROGEL

	HA	HA-Ultrogel
mg proteína aplicada	77,5	77,5
mg proteína aplicada/ml gel	7,7	3,8
mg proteína enlazada	24	24,52
mg Ig aplicada	2,6	2,6
mg Ig aplicada/ml gel	0,26	0,13
mg Ig enlazada	2,2	2,32
Adsorción específica*	0,22	0,115
Rendimiento (por ciento)**	85	89
* mg Ig enlazada/ml gel		
** (mg Ig obtenida/mg Ig aplicada) X 100		

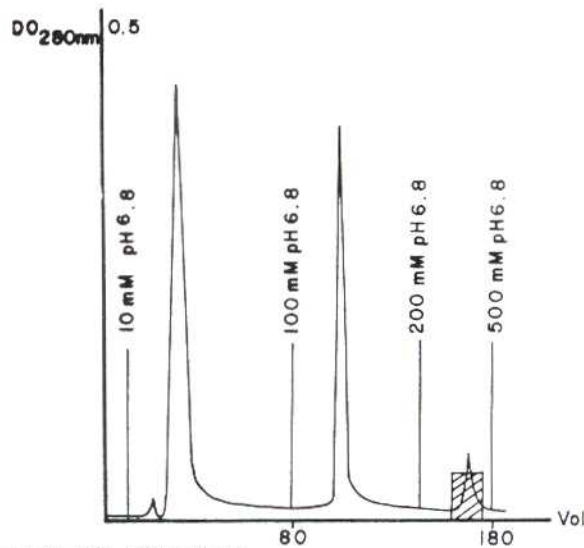


FIG. 1. Purificación de un AcM IgG1 (IOR-CEA1).

Condiciones de separación:

Muestra: líquido ascítico 11,1 mg/ml, 7 ml.

Elución: gradiente discontinuo de tampón fosfato pH 6,8 (10, 100, 200 y 500 mM).

Velocidad de flujo: 30 ml/h (HA-Ultrogel) y 7 ml/h (HA).

Purificación de un AcM IgG2a (IOR-T1)

Para este AcM inicialmente se analizó el efecto del volumen de líquido ascítico depositado en las columnas sobre la resolución lograda en los perfiles de elución. En la figura 2 se muestran los perfiles obtenidos al aplicar volúmenes crecientes (0,625; 1,25; 2,5 y 5 ml) de líquido ascítico con una concentración de proteínas de 7,3 mg/ml y de Igs de 1,8 mg/ml, observándose el mejor rendimiento para un volumen aplicado de 5 ml. La tabla 2 muestra los resultados de la purificación, donde se observa un enlazamiento mayor de proteínas e Igs para la HA-Ultrogel con respecto a la HA (en 28 y 32 por ciento, respectivamente). La adsorción específica se incrementó en 25 por ciento para la HA.

Tabla 2

PURIFICACION DE UN AcM IgG2a (IOR-T1) EN HA Y HA-ULTROGEL

	HA	HA-Ultrogel
mg proteína aplicada	36,5	36,5
mg proteína aplicada/ml gel	3,65	1,8
mg proteína enlazada	14,5	20,3
mg Ig aplicada	9	9
mg Ig aplicada/ml gel	0,9	0,4
mg Ig enlazada	5,3	7,8
Adsorción específica*	0,53	0,4
Rendimiento (por ciento)**	58,8	87,5

* mg Ig enlazada/ml gel

** (mg Ig obtenida/mg Ig aplicada) X 100

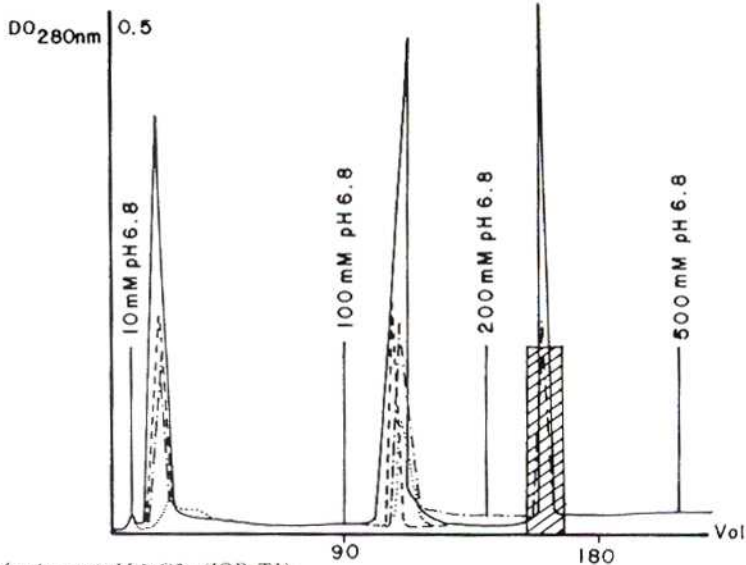


FIG. 2. Purificación de un AcM IgG2a (IOR-T1).

Condiciones de separación:

Muestra: líquido ascítico 7,3 mg/ml.

Volúmenes aplicados (ml): 5; 2,5; 1,25 y 0,625.

Elución: gradiente discontinuo de tampón fosfato pH 6,8 (10, 100, 200 y 500 mM).

Velocidad de flujo: 30 ml/h (HA-Ultrogel) y 7 ml/h (HA).

La capacidad de enlazamiento específico del AcM por HA-Ultrogel ensayada por IFI mostró un incremento con respecto al Ac sin purificar desde 1/40 hasta 1/64, mientras que para el purificado por HA permaneció en el valor inicial. El rendimiento por HA-Ultrogel fue mayor en 33 por ciento.

Purificación de un AcM IgM (IOR-CEA2)

En la tabla 3 se muestran los resultados de la purificación de 5 ml de líquido ascítico con una concentración de proteínas de 5 mg/ml y de Igs de 2 mg/ml. El análisis de los resultados

Tabla 3

PURIFICACION DE UN AcM IgM (IOR-CEA2) EN HA Y HA-ULTROGEL

	HA	HA-Ultrogel
mg proteína aplicada	25	25
mg proteína aplicada/ml gel	2,5	1,2
mg proteína enlazada	12,7	16,4
mg Ig aplicada	10	10
mg Ig aplicada/ml gel	1	0,5
mg Ig enlazada	2	5,5
Adsorción específica*	0,2	0,275
Rendimiento (por ciento)**	20	55

* mg Ig enlazada/ml gel
 ** (mg Ig obtenida/mg Ig aplicada) X 100

indica que el enlazamiento de proteínas e Igs fue mayor para la HA-Ultrogel en 23 y 64 por ciento respectivamente. La adsorción específica también fue superior para esta matriz en 27 por ciento, al igual que el rendimiento en 64 por ciento (la capacidad de enlazamiento específico del AcM aumentó en ambos casos luego de la purificación desde una dilución óptima de 1/10 a 1/30). El perfil de elución se muestra en la figura 3.

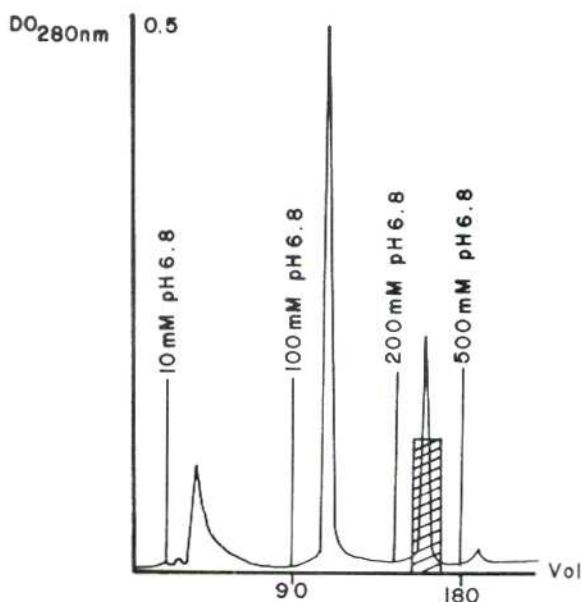


FIG. 3. Purificación de un AcM IgM (IOR-CEA2).

Condiciones de separación:

Muestra: líquido aseptico 5 mg/ml, 5 ml.

Elución: gradiente discontinuo de tampón fosfato pH 6,8 (10, 100, 200 y 500 mM).

Velocidad de flujo: 30 ml/h (HA-Ultrogel) y 7 ml/h (HA).

Capacidad de enlazamiento específico de los AcM purificados después del almacenamiento

Los tres AcM producidos por ambos esquemas de purificación almacenados a 4°C en soluciones conteniendo 0,02 por ciento de azida sódica mantuvieron su capacidad de enlazamiento por las células y tejidos blancos por al menos un mes.

DISCUSION

El presente trabajo tuvo como objetivos analizar el uso de la cromatografía de adsorción en HA para la purificación de AcMs y comparar el comportamiento de la HA después del acoplamiento a un soporte de agarosa, con respecto a la matriz aislada.

Entre las ventajas de la cromatografía de adsorción frente a la cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharose, la vía quizás más frecuentemente aplicada para la purificación de AcMs, están: a) el uso de condiciones suaves de elución que garantizan un daño menor del AcM purificado; la cromatografía en HA emplea un pH 6,8 en contraste con los pH entre 3 y 4 empleados

en el caso de la proteína A-Sepharose: *b*) la posibilidad de incrementar el rendimiento en la purificación de IgG1 por la HA, limitada por el otro método por la baja afinidad de la proteína A por esta subclase de Ig (Ey *et al.*, 1978), y *c*) la posible eliminación de actividades proteolíticas presentes en las muestras (Stanker *et al.*, 1985). Esto último pudiera contribuir a que los AcM purificados por cromatografía de adsorción mantuvieran su actividad un mes después del proceso.

Aunque la introducción de la cromatografía en DEAE-Affigel-Blue ha eliminado las tres desventajas anteriormente mencionadas para el uso de la proteína A-Sepharose, sin embargo no es posible evitar la copurificación de la transferrina con las Igs, lo que hace necesario un paso de cromatografía ulterior. De ahí que la cromatografía de adsorción en HA sea una alternativa sencilla y recomendable a los métodos antes mencionados.

A causa de que la HA presenta una serie de problemas de índole práctico, como bajas velocidades de flujo, necesidad de reempaquetamiento después de cada corrida, etcétera, se ha introducido la HA-Ultrogel, que consiste en cristales de HA acoplados a una matriz de agarosa. El estudio comparativo de las dos matrices sobre la base de factores tales como adsorción neta de proteínas e Igs, adsorción específica, rendimiento y capacidad de enlazamiento específico de los AcM purificados fue uno de los objetivos de nuestro estudio. Igualmente se consideraron características como velocidad de flujo, repetibilidad de las corridas, estabilidad de los AcM durante el almacenamiento, etcétera.

Para comparar la HA sin soporte y como HA-Ultrogel se empleó una cantidad de esta última equivalente a la HA sin soporte. Ello condujo a la duplicación del volumen total del gel, lo que tuvo repercusión en los valores más bajos de adsorción específica en el caso de la IgG1 e IgG2a a pesar de la adsorción neta mayor para la HA-Ultrogel.

Analizando ambas matrices por subclase de Ig, podemos observar que los valores de adsorción específica presentan un orden decreciente en el sentido IgG2a, IgG1, IgM para la HA, mientras que para la HA-Ultrogel este es IgG2a, IgM, IgG1. Estas variaciones probablemente se originaron por diferencias de afinidad entre la matriz y la molécula de Ig, dadas por variaciones estructurales de esta última. En cuanto al aumento de adsorción específica de IgM para la HA-Ultrogel puede relacionarse con la atenuación del impedimento estérico existente en la HA relacionado con el mayor tamaño de la IgM.

Para el AcM de la subclase IgG1 no se registraron diferencias mayores en cuanto a rendimiento, proteína e Ig enlazada y adsorción específica, aunque excepto este último, todos los valores fueron ligeramente superiores para la HA-Ultrogel. La capacidad de enlazamiento específica del AcM no varió después del proceso de purificación.

Para la IgG2a e IgM sí se observó un enlazamiento de proteína e Ig y un rendimiento mayor para la HA-Ultrogel. La diferencia es notable en el caso de la IgM, probablemente por el efecto ya mencionado del mayor espacio disponible para esta molécula en la HA-Ultrogel. Aquí la adsorción específica también fue superior y se observó un incremento de la capacidad de enlazamiento específico por ambas matrices, probablemente a causa de cierto grado de fragmentación de la molécula pentamérica y al consiguiente aumento de la valencia. Para la IgG2a, el incremento solo se observó para la HA-Ultrogel, lo que puede explicarse por una menor afectación de la Ig en el proceso de purificación.

La HA-Ultrogel presenta además una serie de ventajas de orden práctico, como una velocidad de flujo cinco veces superior a la HA, posibilidad de usar columnas y de corridas repetidas sin necesidad de reempaquetamiento.

De acuerdo con esto podemos concluir que la cromatografía de adsorción en HA y en específico, de esta matriz unida a un soporte adecuado (HA-Ultrogel) constituye un método fácil, sencillo, rápido y eficiente para la purificación de AcM de diferentes clases y subclases.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen los esfuerzos técnicos de Miriam Zaldívar, Ana Veloso y Miriam Merino. La HA-Ultrogel fue generosamente suministrada por el doctor John Ptak, de LKB, Bromma, Suecia.

REFERENCIAS

- BRUCK, C.; D. PORTETTELLE; C. GLINEUR y A. BOLLEN (1982). *One step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE-Affigel-Blue chromatography*. J. Immunol. Methods, 53: 313-319.
- EY, P. L.; S. J. PROWSE y C. R. JENKIN (1978). *Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose*. Immunochemistry 15: 429-436.
- GARCIA, C. A.; J. V. GAVILONDO; J. F. AMADOR; A. M. VAZQUEZ y A. FERNANDEZ (1984). *Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células humanas de origen T. II. Caracterización de los anticuerpos monoclonales IOR-T1 e IOR-T2*. Interferón y Biotecnología 1(3): 29-38.
- GAVILONDO, J. V.; A. M. VAZQUEZ; S. FONG; E. RENGIFO; A. FERNANDEZ; C. A. GARCIA; A. VELANDIA; A. PAVLENKO; S. HERNANDEZ; N. RUISANCHEZ; U. SUNDIN y M. E. FAXAS (1985). *Anticuerpos monoclonales contra el antígeno carcinoembrionario en ensayos inmunohistoquímicos e inmunquímicos*. Interferón y Biotecnología (en proceso de publicación).
- GODING, J. W. (1980). *Production of antibodies by hybridomas*. J. Immunol. Methods, 39: 245.
- HUDSON, C. y F. HAY (1980). *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publications, 2nd. Ed., London, Edinburgh, Boston, Melbourne.
- INSTRUCTION MANUAL. *Hydroxyapatite-agarose gel for adsorption chromatography*. LKB.
- KEARNEY, J. F.; A. RADBRUCH; B. LIESEGANG y K. RAJEWSKY (1979). *A new mouse myeloma line which has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody secreting hybrid cell lines*. J. Immunol. 123: 1548-1550.
- LKB APPLICATION NOTE. *Low pressure affinity liquid chromatography*.
- KÖHLER, G. (1981). *The technique of hybridoma production*. Immunological Methods, Vol. II: 285-298.
- LANGONE, J. (1982). *Application of Immobilized Protein A in immunochemical techniques*. J. Immunol. Methods 55: 277-296.
- LKB APPLICATION NOTE. *Low pressure affinity liquid chromatography*.
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH; A. I. FARR y R. J. RANDALL (1951). *Protein measurement with the Folin-Ciocalteu reagent*. J. Biol. Chem, 193: 265-275.
- OUCHTERLONY, O. y L. A. NIELSSON (1978). *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis*. Handbook of Experimental Immunology (Ed. D. M. Weir), p. 196. Blackwell Scientific Publication. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- STANKER, L. H.; M. VANDERLAAN y M. JUAREZ-SALINAS (1985). *One step purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid by hydroxyapatite chromatography*. J. Immunol. 76: 157-169.
- VAZQUEZ, A. M.; R. GISCOMBE; G. HOLM; A. VELANDIA; U. SUNDIN; G. GONZALEZ; J. GAVILONDO; M. BJÖRKHOLM y C. GARCIA (1985). *IOR-T2: Anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de diferenciación en las células tímicas presente en las células tumorales de pacientes con linfoma T cutáneos* (propuesto para publicar en Interferón y Biotecnología).