

Purificación rápida de anticuerpos monoclonales empleando un gel TSK-butilo 650 (S).

L. COSTA¹, E. M. PÉREZ¹, M. FREYRE², L. MARTÍNEZ² y C. MELLA¹.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado 6162, La Habana, Cuba.

¹ Agrupación de Planta Piloto.

² Agrupación de Híbridomas y Modelos Animales.

Recibido en diciembre de 1989

Aprobado en enero de 1990

RESUMEN

Se evaluó la cromatografía de interacción hidrofóbica de alta resolución a nivel analítico como método alternativo en la purificación de anticuerpos monoclonales (AcM) anti interferón alfa 2b humano recombinante. Como soporte fue utilizado un gel TSK-butilo 650(S) de alta rigidez.

Se optimizaron las condiciones de corrida para obtener la máxima pureza del AcM anti interferón alfa 2b recombinante CB-IFNA2.1. Resultó necesario modificar el gradiente de elución para purificar otros AcM del mismo isotipo y especificidad, evidenciándose que el gel de butilo muestra una capacidad adicional de diferenciación entre inmunoglobulinas del tipo IgG1.

La eliminación de pasos de diálisis y de desalinización, así como la alta pureza de los anticuerpos obtenidos son las principales características de la purificación utilizando este tipo de matriz.

SUMMARY

High resolution hydrophobic interaction chromatography was used as an alternative purification method for anti alpha 2b interferon monoclonal antibodies (MAbs).

A TSK-butyl 650(S) gel was employed as matrix due to its high rigidity.

Chromatographic conditions were optimized to obtain the anti alpha interferon MAbs CB-IFNA2.1

with high purity. It was necessary to modify the elution gradient to purify other MAbs of the same specificity and isotype, thus proving that the butyl gel shows an additional capacity of differentiation among IgG1 immunoglobulins.

The purification process using this kind of gel is characterized by its rapidity, -because the dialysis and desalting steps are avoided,- and the high purity of the antibodies.

INTRODUCCION

Las aplicaciones crecientes de los anticuerpos monoclonales (AcM) en infinidad de procedimientos clínicos de diagnóstico *in vivo* e inmunoterapia, en la purificación de productos biológicos por cromatografía de afinidad y en procedimientos analíticos tales como técnicas de marcaje, inmunoensayos, etc. (Gavilondo, 1984; Gavilondo, 1987; Larrick y Gavilondo, 1989) enfatizan la necesidad de disponer de métodos de purificación rápidos, simples y de bajo costo que permitan obtener un producto con la calidad adecuada a su aplicación.

Los procedimientos clásicos para la purificación de AcM provenientes de fluido ascítico involucran el uso de un

fraccionamiento inicial con sulfato de amonio (aunque recientemente se ha introducido la precipitación con ácido caprílico [Temponi *et al.*, 1989]), seguido por una cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa. Las condiciones de elución son suaves, por lo que se logran altos recobrados de la actividad del AcM. Sin embargo, para lograr resoluciones óptimas se necesitan tiempos de corrida muy extensos que llevan aparejados grandes gastos de reactivos. Además, en este tipo de geles suaves no es posible el empleo de altos flujos, pues ocurre un aumento considerable de la presión en el sistema.

La cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución permite la purificación de inmunoglobulinas, obviando muchos de los problemas inherentes a los geles suaves. La principal desventaja que aún persiste en este tipo de cromatografía es el pretratamiento extensivo de la muestra para eliminar el exceso de sal, ya sea por diálisis, cromatografía, ultrafiltración etcétera (Danielsson, 1987). Los sistemas de alta resolución necesitan, además, requerimientos técnicos más complejos, y por tanto más costosos, que frenan su escalado, aunque se está desarrollando a gran velocidad la cromatografía de alta resolución preparativa.

En los últimos años se ha demostrado la efectividad de la cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución para la purificación de AcM, sin embargo, este método como único paso cromatográfico no es muy eficiente y se propone su empleo combinado con otras técnicas como intercambio aniónico, gel filtración, etcétera. (Separation News, 1986).

La cromatografía de afinidad (matriz con proteína A, proteína G o el antígeno) es uno de los métodos más utilizados en la purificación de AcM (Separation News,

1986), fundamentalmente porque la sustancia purificada presenta una contaminación mínima de proteasas y elimina de la preparación los ácidos nucleicos contaminantes.

En contraste, las matrices de afinidad presentan baja capacidad, el tiempo de uso de la columna es corto, su preparación es costosa, requieren condiciones drásticas para la elución del anticuerpo y resultan poco económicas para la purificación a escala preparativa (Nau, 1989).

Es bien conocido el empleo de la cromatografía de interacción hidrofóbica para la purificación de mezclas complejas de proteínas con un elevado recobrado de la actividad biológica o enzimática (Zieske, 1986; Padfield, 1988). Generalmente esta se aplica cuando el proceso necesita rapidez en las operaciones, pues permite eliminar etapas de desalinización ya que la muestra se aplica a la matriz en altas concentraciones salinas.

La purificación de inmunoglobulinas no ha quedado ajena a este tipo de separación cromatográfica, reportándose recobrados importantes tanto en masa como en actividad de la inmunoglobulina. Existen geles de interacción hidrofóbica que permiten resolver diferencias entre subclases de inmunoglobulinas (Danielsson *et al.*, 1988), que otros métodos de purificación no logran.

Como desventajas se plantea la elución del AcM en un amplio intervalo de tiempos de retención provocando picos anchos y no bien resueltos, disminuyendo así la posibilidad de lograr preparaciones homogéneas. Además, se ha reportado la necesidad de emplear concentraciones muy elevadas de sulfato de amonio con el objetivo de garantizar la unión de la muestra a la matriz, limitando la efectividad de esta cromatografía en la escala productiva (Nau, 1989). No obstante, el

propio autor señala que con el empleo de nuevas matrices como phenil- superosa, BAKER- BOND HI-Propil,TM etcétera, se han disminuido considerablemente las desventajas de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

En este trabajo presentamos nuestros resultados en la purificación analítica de AcM anti alfa IFN empleando la cromatografía de interacción hidrofóbica de alta resolución. Con este proceso como único paso cromatográfico, después de la precipitación con sulfato de amonio, se obtiene una fracción de inmunoglobulina altamente homogénea.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos monoclonales anti alfa interferón humano recombinante.

Como material de partida en la purificación se emplearon líquidos ascíticos ricos en los AcM anti alfa interferón CB-IFNA2.1; CB- IFNA2.2; CB-IFNA2.3 (Duarte *et al.*, 1987) y CB-IFNA2.4 (Cruz *et al.*, 1990) producidos mediante inoculación intraperitoneal de los hibridomas correspondientes en ratones BALB/c preinyectados con aceite mineral.

Precipitación con sulfato de amonio.

A un volumen de líquido ascítico se le añadieron dos volúmenes de tampón fosfato de sodio 0,1 mol/l, pH 7, seguido por una adición lenta de sulfato de amonio saturado hasta una concentración final del 50 %. Se dejó reposar 30 min a 4°C y seguidamente se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 minutos. Luego de un lavado del precipitado con sulfato de amonio al 60 %, el sedimento obtenido después de centrifugar a 10 000 rpm se resuspendió en tampón fosfato 0,1 mol/l hasta una concentración final de sulfato de amonio de 1 mol/l. De esta manera la muestra quedó lista para proceder al paso cromatográfico.

Separación cromatográfica

Se utilizó un gel TSK butilo 650 (S) (Merck). El gradiente y su duración se varió en función del tipo de anticuerpo a separar. Se emplearon como tampón B una solución de fosfato de sodio 0,1 mol/l pH 7 y como tampón A sulfato de amonio 1 mol/l en tampón B.

El flujo empleado en la separación fue de 1 ml/min y el diámetro de columna 7,5 mm. La detección se efectuó a 280 nm. El equipo de HPLC utilizado está formado por un controlador de gradiente, dos bombas y un detector de longitud de onda fija (LKB), un inyector (Rheodyne) provisto de un lazo de 5 ml, un horno (Knauer) y un registrador de 2 canales (LKB).

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis fue realizada mediante el método de Laemli (Laemli, 1970) utilizando 12,5 % de acrilamida en el gel separador y las muestras fueron reducidas con 2-mercaptoetanol. La tinción de los geles de muestras de inmunoglobulinas se realizó utilizando Coomassie blue R-250 y la de los geles de eluatos de IFN se realizó empleando AgNO₃ al 0,8 %.

Preparación de las matrices de inmunoafinidad.

Los inmunoadsorbentes se preparan con AcM CB-IFNA2.1 purificado por el método propuesto en este trabajo o por cromatografía de intercambio iónico (Duarte *et al.*, 1987). Los AcM purificados por una y otra vía se acoplaron a una matriz de Sepharosa CL 4B, activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia), según el protocolo recomendado por el fabricante.

Para comparar ambas matrices se aplicó el antígeno (IFN) a la columna equilibrada con una solución de Na₂HPO₄ 1 g/l; KH₂PO₄ 0,26 g/l; NaCl 0,2 g/l y KCL 0,2 g/l. Después de lavar la columna el IFN fue eluido con una solución de glicina 0,3 mol/l pH 3,2.

La cuantificación del IFN se realizó mediante un sistema inmunoenzimático tipo ELISA (Cruz *et al.*, 1990).

Identificación de los AcM anti IFN

Para la identificación de los AcM se empleó un sistema inmunoenzimático tipo ELISA indirecto con el antígeno fijado a la placa de poliestireno (Duarte *et al.*, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSION

La utilidad de los geles de interacción hidrofóbica para la purificación de AcM ha sido señalada previamente por su capacidad de recobrar grandes cantidades de inmunoglobulinas activas con bajo índice de

desnaturalización. En el presente trabajo, donde iniciamos el proceso de limpieza del material usando la precipitación con sulfato de amonio, el uso de un gel de interacción hidrofóbica constituye el paso "natural" que permite la aplicación directa del material rediseñado sin interferencia del sulfato residual.

El empleo del gradiente de 156 minutos desde 37 hasta 100 % del tampón B para la purificación del AcM 2.1, nos permitió obtener una buena resolución cromatográfica. La fracción de inmunoglobulina eluyó en corto tiempo y alcanzó una elevada pureza (figura 1), quedando libre de albúmina de suero de ratón, transferrina y otras proteínas contaminantes del fluido ascítico. Estos datos validan al gel de TSK-butilo 650(S) como soporte de alta resolución para inmunoglobulinas.

Teniendo en cuenta la buena resolución obtenida en el proceso resulta muy factible el escalado del proceso utilizando un gradiente discontinuo que simplificaría el equipamiento a utilizar. La posibilidad de utilizar este gel de alta rigidez en sistemas de baja presión ha mostrado resultados favorables en la separación de proteínas recombinantes (datos aún no publicados); el hecho de poder aplicarlo a la purificación de inmunoglobulinas a escala preparativa disminuiría considerablemente el proceso.

Para comprobar que el AcM CB-IFNA 2.1 conserva su actividad después del proceso de purificación y teniendo en cuenta que este es utilizado en la producción de inmunoabsorbentes para la purificación por cromatografía de afinidad del alfa IFN, se preparó una matriz de afinidad con el

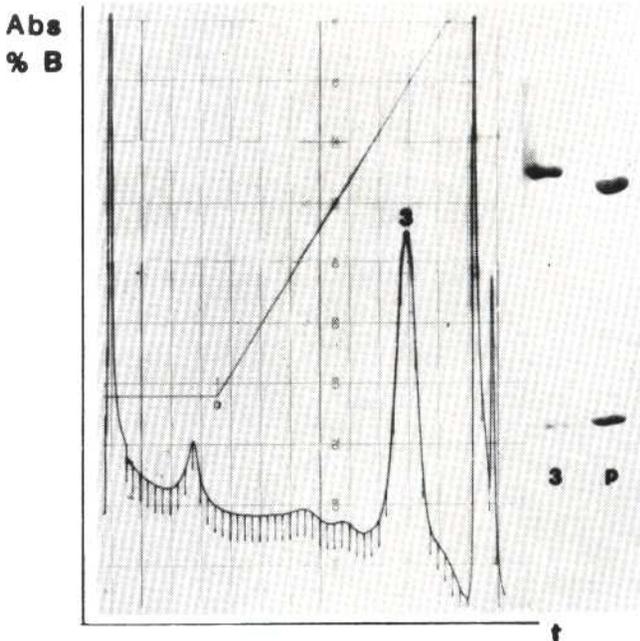


FIG. 1. Perfil cromatográfico de la purificación del AcM 2.1

Gradiente lineal desde 37 % hasta 100 % de tampón B

Tiempo de gradiente: 156 min.

Conjuntamente se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción de inmunoglobulina activa (3) y de un patrón de inmunoglobulina humana (p).

AcM purificado por cromatografía de interacción hidrofóbica y se comparó con un inmunoabsorbente preparado a partir del AcM purificado por el método convencional (intercambio aniónico) en cuanto a la cantidad de antígeno adsorbido y eluido de la matriz, así como la pureza del IFN eluido.

Como se muestra en la figura 2, no se observó diferencia significativa en las

cantidades de IFN adsorbidas y eluidas en cada una de las matrices de afinidad.

La pureza del IFN eluido de la matriz no se afectó al emplear la cromatografía de interacción hidrofóbica como procedimiento de purificación del AcM CB-IFNA 2.1. Como se muestra en la electroforesis de la figura 3, la molécula de proteína está libre de contaminantes, proteína oligomerizada o degradada.

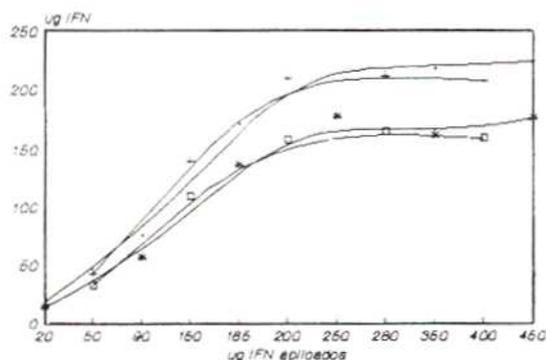


FIG. 2. Cantidades de IFN adsorbidas y eluidas en matrices de afinidad.

Adsorción (AcM obtenido por intercambio aniónico).

Adsorción (AcM obtenido por interacción hidrofóbica).

Elución (AcM obtenido por intercambio aniónico).

Elución (AcM obtenido por interacción hidrofóbica).

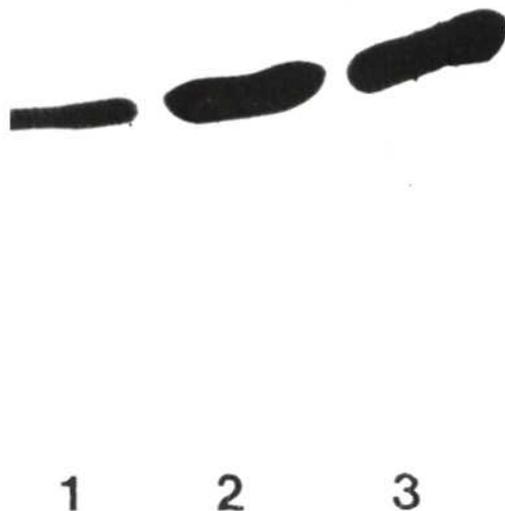


FIG. 3. Electroforesis en gel poliacrilamida bajo condiciones de reducción.

1) Patrón de IFN, 2) Eluato de afinidad de AcM purificado por intercambio iónico, 3) Eluato de afinidad de AcM purificado por interacciones hidrofóbicas.

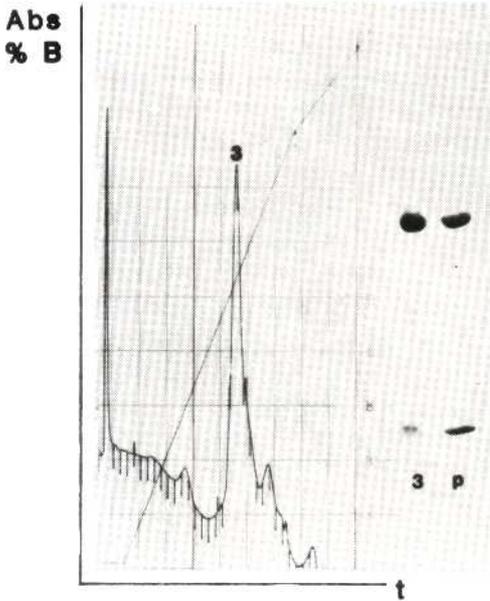


FIG. 4. Perfil cromatográfico de la purificación de AcM 2.2. Gradiente lineal (primera etapa) 0-80 % de tampón B, (segunda etapa) 80-100 % de tampón B. Tiempo de gradiente: 124 minutos (primera etapa), 60 minutos, (segunda etapa). Conjuntamente se muestra la electroforesis en gel de piliacrilamida: 3) fracción de inmunoglobulina activa, p) patrón de inmunoglobulina humana.

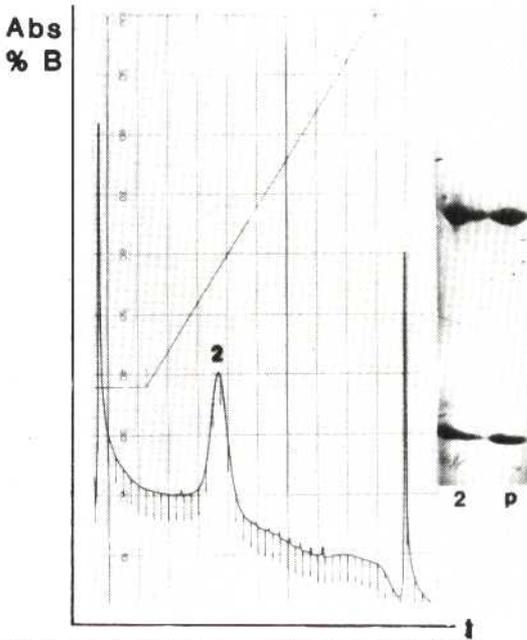


FIG. 5. Perfil cromatográfico de la purificación del AcM 2.3. Gradiente lineal desde 37-100% de tampón B. Tiempo de gradiente 156 min. Se muestra el patrón electroforético 2) fracción de inmunoglobulina activa, p) patrón de inmunoglobulina humana.

La capacidad del AcM como ligando fue semejante, independientemente del proceso de purificación utilizado, quedando verificado que el uso de concentraciones elevadas de sales no provoca desnaturalización de la molécula del anticuerpo.

Este proceso cromatográfico se extendió a la purificación de otros AcM anti alfa IFN. Para lograr las mejores condiciones de separación, el AcM CB-IFNA 2.2 fue eluido empleando un gradiente lineal en dos tiempos partiendo de una concentración inicial de sulfato de amonio de 1 mol/l (figura 4). Sin embargo, el AcM CB-IFNA 2.3 fue aplicado en una concentración salina de 1 mol/l pero la elución en un corto intervalo de tiempo de retención se logró mediante la aplicación de un gradiente lineal de 156 min (figura 5). Las condiciones de separación del

CB-IFNA 2.4 fueron similares a las del AcM CB-IFNA 2.1 (figura 6). En todas las separaciones se logró obtener una fracción de inmunoglobulina con una elevada pureza y la identificación de los AcM anti IFN empleando el ELISA descrito en Materiales y Métodos mostró resultados positivos en todas los casos.

Los cuatro anticuerpos monoclonales mostraron diferente grado de hidrofobicidad al eluir a diferentes concentraciones de sulfato de amonio, a pesar de presentar todos el mismo isotipo. El AcM CB-IFNA 2.1 fue el que mostró una mayor hidrofobicidad al eluir más tardíamente de la matriz.

Resulta interesante destacar que las muestras se aplicaron en una concentración de sulfato de amonio no mayor de 1 mol/l, lo cual es una ventaja pues abarata el

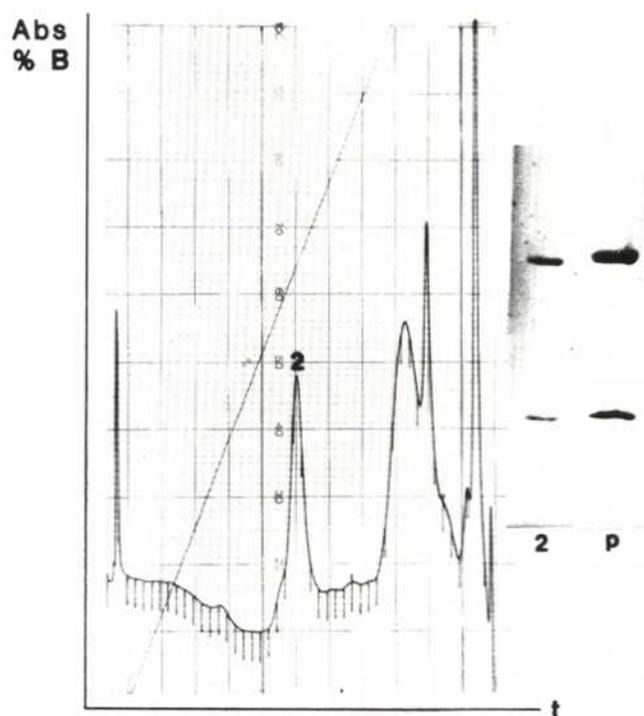


FIG. 6. Perfil cromatográfico de la purificación del AcM 2.4. Gradiente lineal desde 0-100 % de tampón B durante 156 min. Patrón electroforético 2) fracción activa de AcM 2.4, p) patrón de inmunoglobulina humana.

sistema de purificación, sobre todo si se tiene en cuenta que con otras matrices, por ejemplo la alquil superosa, la concentración inicial de sulfato de amonio para la purificación de AcM es 2 mol/l (Danielsson et al., 1987).

La cromatografía de interacción hidrofóbica de alta resolución empleando como gel la matriz TSK butilo 650(S) resultó una herramienta importante para la purificación de anticuerpos monoclonales. Se destacó la rapidez de operación, pues permite trabajar a flujos elevados y elimina pasos de diálisis o desalinización, ya que la muestra se aplica a elevadas concentraciones de sulfato de amonio. La concentración inicial de sulfato de amonio empleada fue aproximadamente la mitad que la reportada en la literatura.

El gel TSK-butilo 650(S) mostró una elevada capacidad para diferenciar, en cuanto al carácter hidrofóbico, inmunoglobulinas de igual isotipo, lo cual enriquece considerablemente los métodos de purificación de anticuerpos monoclonales.

REFERENCIAS

- ANONIMO (1986). *The HIC alternative*. Separation News 13.3.
- ANONIMO (1986). *Monoclonal Antibody purification*. Separation News 13.4.
- ANONIMO (1986). *The use of Protein-A Sepharose to purify murine IgG monoclonal antibodies*. Separation News 13.5.
- CARLSSON, M., A. HEDIN, M. INGANAS, B. HARFAST y F. BLOMBERG (1985). *Purification of in vitro produced mouse monoclonal antibodies. A two-step procedure using cation exchange chromatography and gel filtration*. J. Immunol. Methods 79: 89-98.
- CRUZ, S., C. DUARTE, E. FERRA, G. FONTERROCHE, J. VAZQUEZ, L. MARTINEZ, N. ARTEAGA, E. PEREZ y J. GAVILONDO (1990). *Cuantificación de interferón alfa 2b humano recombinante mediante anticuerpos monoclonales*. Interferón y Biotecnología 7(2). En prensa.
- DANIELSSON, A., A. LJUNGLÖF y H. LINDBLOM (1987). *One-step purification of monoclonal antibodies from mouse ascites using FPLC. A screening of different techniques*. Poster at the Seventh International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides. Nov. 2-4, 1987. Washington D.C.
- DANIELSSON, A., A. LJUNGLÖF y H. LINDBLOM (1988). *One-step purification of monoclonal IgG antibodies from mouse ascites. An evaluation of different adsorption techniques using high performance liquid chromatography*. J. Immunol. Methods 115: 79-88.
- DUARTE, C., M.E. FERNANDEZ DE COSSIO, G. SIERRA, E. PENTON, A. AGRAZ, G. FURRAZOLA y A. AGUILERA (1987). *Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón recombinante alfa 2. Su empleo en la purificación y detección del antígeno*. Interferón y Biotecnología 4: 221-232.
- GAVILONDO, J. (1984). *Anticuerpos monoclonales: producción y aplicaciones*. Rev. Cub. Invest. Biomed. 3:98-111.
- GAVILONDO, J. (1987). *Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales*. Interferón y Biotecnología 4(1): 1-16.
- LAEMLI, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage*. Nature (Lond.) 227K1: 680-685.
- LARRICK, J. y J. GAVILONDO (1989). *Anticuerpos Monoclonales humanos*. Interferón y Biotecnología 6(2): 11-131.
- NAU, D.R. (1989). *Chromatographic methods for antibody purification and analysis*. BioChromatography 4: 4-18.
- PADFIELD, P. J. y R. M. CASE (1988). *Separation of the protein present in pancreatic juice using hydrophobic interaction chromatography*. Anal. Biochem. 171: 294-299.
- TEMPONI, M., T. KAGESHITA, F. PEROSA, R. ONO, H. OKADA, y S. FERRONE (1989). *Purification of murine IgG monoclonal antibodies by precipitation with caprylic acid: comparison with other methods of purification*. Hybridoma 8: 85-95.
- ZIESKE, L. R. (1986). *Protein purification and maintenance of enzymatic integrity by hydrophobic interaction HPLC*. Chromatogram 4-5.