

Tratamientos analíticos de muestras de IFN alfa 2b h-rec. para su cuantificación por ELISA

E.M. PÉREZ, L.C. PÉREZ, V.M. MARAÑÓN y C.M. MELLA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en enero de 1990

Aprobado en mayo de 1991

RESUMEN

La obtención de interferón 2b humano recombinante (IFN alfa 2b hr) en *E. coli*, en forma insoluble, hace necesario el estudio del tratamiento de las muestras para su cuantificación mediante un sistema inmunoenzimático tipo ELISA. De los sistemas analíticos ensayados para la extracción de proteína insoluble, el óptimo resultó una modificación del tampón Laemmli con 1 % de SDS y 2,5 % de 2-mercaptoetanol. Las proteínas de la cepa productora y la mayoría de los sistemas tampones empleados no influyeron sobre el reconocimiento inmunológico del interferón a diluciones mayores de 1/500.

SUMMARY

A double monoclonal ELISA which detects both soluble and insoluble recombinant Human Interferon alpha 2 (r-hIFN alpha 2) was applied for controlling the process. From the analytical systems of the extraction assayed for the insoluble protein, the optimal was a modification of Laemmli buffer using 1 % SDS and 2.5 % 2-mercaptoethanol. It was proved that at dilutions higher than 1:500 neither the strain proteins nor the majority of the buffers used interfere with the assay.

INTRODUCCION

Isaacs y Lindenmann, en el año 1957, descubrieron una sustancia capaz de inhibir

la multiplicación viral, a la cual llamaron interferón (Isaacs y Lindenmann, 1957).

Los interferones son proteínas o glicoproteínas producidas por varios tipos de células específicas previamente inducidas. Según su estructura molecular, existen tres tipos de interferones: alfa, beta y gamma.

Los interferones alfa se producen en células mononucleares, su peso molecular es aproximadamente 20 kDa, son resistentes a pH extremos como pH 2 y estables hasta temperaturas de 56°C. En virtud de la limitada disponibilidad de interferón obtenido por vía convencional (a partir de leucocitos humanos), se ha impuesto en la actualidad la tecnología del ADN recombinante para su producción en gran escala (Pestka *et al.*, 1987). Sin embargo, el interferón obtenido por esta vía puede aparecer en forma de agregado intracelular e insoluble. Ello hace necesario su extracción, solubilización, renaturalización y disponer, además, de métodos analíticos que permitan cuantificar la proteína de forma rápida, simple y reproducible con pequeños volúmenes de muestra, en todas las etapas del proceso de producción.

La técnica de titulación antiviral ha sido ampliamente utilizada en la evaluación del interferón; sin embargo, el tiempo prolongado que se requiere para la obtención de los resultados, su costo, la variabilidad del método y la necesidad de condiciones especiales para su realización, la hacen impracticable como método de control de procesos productivos, reservándola como criterio de actividad del producto final. Por estas razones, la técnica inmunoenzimática en fase sólida ELISA la hemos empleado en el control del proceso productivo del interferón alfa.

La División de Hibridomas y Modelos Animales del CIGB obtuvo anticuerpos monoclonales contra el interferón (Duarte *et al.*, 1987) y desarrolló un sistema de ELISA (Cruz *et al.*, 1989), el cual se vio limitado por la composición muy variable de las muestras de las diferentes etapas del proceso de producción, haciéndose necesario un estudio detallado de las condiciones de extracción y aplicación en el ensayo.

Con el objetivo de cuantificar mediante este sistema de ELISA el IFN soluble, e insoluble, del proceso de producción, se estudiaron las condiciones de extracción del IFN en busca de mejores rendimientos y se evaluó la influencia de las condiciones empleadas (tampones, sustancias utilizadas y proteínas extrañas).

MATERIALES Y METODOS

Antígeno

El interferón alfa 2b hr, empleado como patrón en el ensayo, fue obtenido en una cepa de *E. coli* (Silva *et al.*, 1988) y purificado en la Planta Piloto del CIGB. Se evaluó por los métodos de determinación de proteínas de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y Bradford

(Bradford, 1976), por absorción a 280 nm y por determinación de nitrógeno total.

Extracción y solubilización del interferón insoluble

Se tomó el volumen de muestra equivalente a 20, dividido entre la densidad óptica del cultivo y se centrifugó 30 minutos a 4500 rpm. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 2 ml de tampón de extracción, se calentó a 90°C un tiempo apropiado y se centrifugó 30 minutos a 15 000 rpm. En el sobrenadante se obtuvo el interferón solubilizado.

Tampones empleados en el proceso de extracción

Se emplearon dos soluciones: SDS al 1 % y tampón Laemmli a diferentes concentraciones de SDS y 2-mercaptoetanol de la siguiente forma:

5 % de 2-mercaptoetanol y SDS al 0,5; 1, 2, y 4 %

2,5 % de 2-mercaptoetanol y SDS al 0,5; 1, 2, y 4 %

Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)

Se emplearon placas de PVC (Flow Laboratories, The Netherland) recubiertas con el anticuerpo monoclonal CB-IFN 2.3 (Duarte *et al.*, 1987) disuelto en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato pH 9,6 0,1 M) a una concentración de 10 µg/ml y se incubó a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se lavó la placa una vez con solución detergente de Tween-20 al 0,05 % y se escurrió sobre papel absorbente. Las muestras se aplicaron diluidas convenientemente en tampón PBS con 0,5 % de leche en polvo descremada. Se incubó 30 minutos a 37°C y se repitieron tres lavados.

El anticuerpo monoclonal CB-IFNA 2.4 conjugado con peroxidasa (Cruz *et al.*, 1989) en una dilución de 1/8000 en tampón PBS con 0,5 % de leche en polvo descremada, se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de seis lavados, la reacción fue revelada con 100 µl de ortofenilendiamina al 0,04 % en tampón citrato, pH 5,5 conteniendo 0,04 % de peróxido de hidrógeno. La reacción transcurrió en la oscuridad durante 20 minutos y se detuvo con 50 µl de una solución de H₂SO₄ 2 M. La lectura de la placa se llevó a cabo a 492 nm en un lector de microplacas (MULTISKAN, Flow Laboratories).

RESULTADOS Y DISCUSION

Optimización de las condiciones analíticas de extracción

Es conocido que el incremento en la expresión de los niveles de interferón es proporcional al incremento de este como agregado intracelular e insoluble (Thatcher y Panayotatos, 1986), por lo que en los procedimientos de purificación iniciales se aplican estrategias similares a las empleadas en la purificación de otras proteínas no solubles expresadas en *E. coli* (Devos *et al.*, 1983; Marston *et al.*, 1984; Schoner *et al.*, 1985; Marston, 1986) entre las que se incluyen tratamientos con ultrasonido, enzimas (lisozima) y agentes químicos como desoxicolato de sodio, tritón X-100 y NP-40 entre otros, pero para el pretratamiento de pequeños volúmenes de muestra y la cuantificación del interferón en cada una de las etapas del proceso por ELISA, el empleo de algunas de estas estrategias resultó impracticable.

El uso de SDS al 1 % durante 2 minutos de tratamiento a 90°C ha sido reportado para la extracción del IFN alfa 2b hr del

debris celular (Devos *et al.*, 1983). En la figura 1 se muestra el comportamiento del proceso de extracción y solubilización del IFN en el tiempo, a una temperatura de 90°C. Un tiempo mínimo de tratamiento de 5 minutos muestra una tendencia a aumentar los niveles de extracción de la proteína con respecto al tiempo de 2 minutos previamente reportado.

El tampón Laemmli comúnmente utilizado para la reducción y desnaturalización de las proteínas en las electroforesis en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970) también fue evaluado para la extracción y solubilización del interferón a escala analítica; para ello se estudió la influencia de la composición de SDS y 2-mercaptoetanol. Al estudiar varias muestras del proceso, se observó un recobrado superior en la concentración del interferón extraído cuando se empleó el 2-mercaptoetanol al 2,5 % y el SDS al 2 % (figura 2). Concentraciones mayores de ambos agentes no reportan un aumento en los niveles de interferón, presumiblemente a causa de daños muy severos en la molécula que afectan el reconocimiento inmunológico.

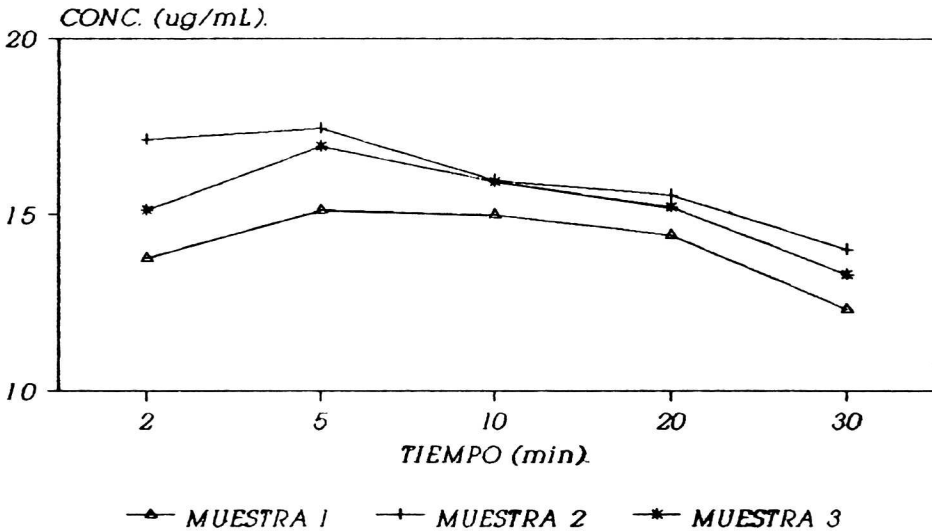


FIG. 1. Cinética de extracción con SDS al 1 % y calentamiento a 90°C.

Con esta variante escogida se continuó la cinética de extracción hasta 30 minutos a temperatura constante de 90°C. Se tomó como extracción máxima los 10 minutos de tratamiento debido a la mayor cantidad de interferón extraído (figura 3).

Se estudió comparativamente el comportamiento de un número representativo de

fermentaciones, empleando las condiciones analíticas de extracción seleccionadas para el SDS al 1 % y el tampón Laemmli. En todos los casos hubo diferencias entre los niveles de extracción obtenidos al usar cada uno de los sistemas, resultando superiores al utilizar el tampón Laemmli (figura 4). Es de suponer que la

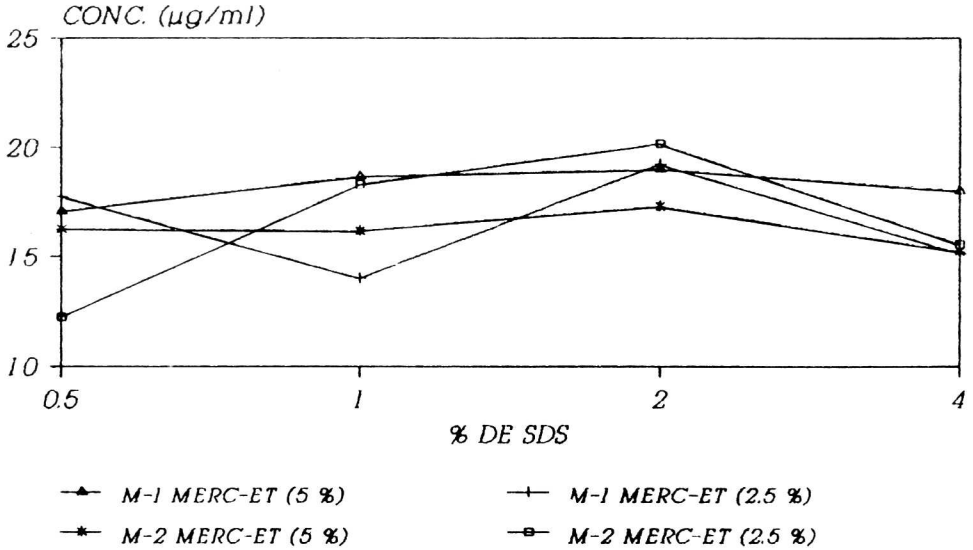


FIG. 2. Ensayo con diferentes % de SDS y 2-mercaptoetanol en el tampón de extracción a 90°C.

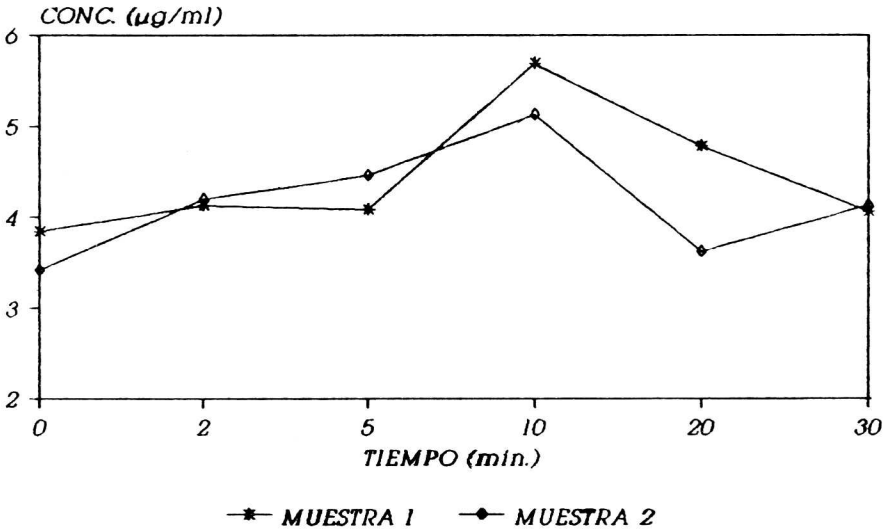


FIG. 3. Cinética de extracción con tampón Laemmli a 90°C.

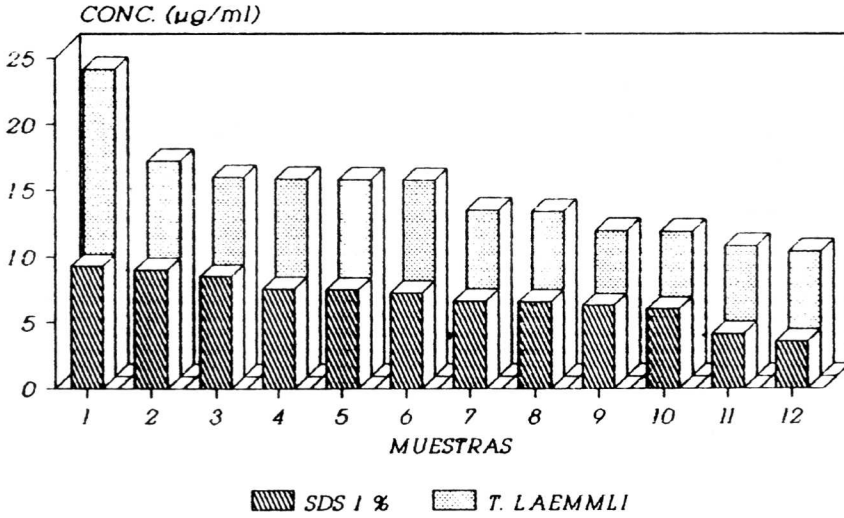


FIG. 4. Comparación de extracciones en muestras de fermentaciones con diferentes tampones.

combinación de ambos agentes presentes en el tampón Laemmlí (SDS y mercapto), logra una extracción más eficiente de la proteína.

Influencia de los sistemas tampones y las diluciones de las muestras

El uso de detergentes iónicos (SDS) y agentes reductores como el 2-mercaptoetanol, interfieren el reconocimiento entre las proteínas y los anticuerpos inmovilizados en la placa; este fenómeno está relacionado con la conservación de los puentes disulfuro y con el mantenimiento de la conformación tridimensional de la molécula (Barasoain *et al.*, 1989; Gardas *et al.*, 1988; Lydon *et al.*, 1985; Morehead *et al.*, 1984; Wetzel, *et al.*, 1983). Por esta razón se hizo necesario evaluar el efecto de los sistemas de extracción empleados sobre el reconocimiento inmunológico. Para esto se empleó un patrón de interferón que fue tratado con los sistemas de extracción antes descritos y sometido a diluciones, de manera que la concentración final de

interferón fuera de 10 ng/ml y el efecto de los agentes de extracción estuviera disminuido en 100, 200, 500, 1000 y 2000 veces.

Cuando se empleó el SDS al 1 %, a diluciones superiores a 1/200, no se afectó el valor de concentración esperado para el patrón (figura 5). Sin embargo al utilizar la extracción de Laemmlí fue necesario realizarle diluciones superiores a 1/500 para eliminar la interferencia.

Es evidente que la combinación del tratamiento con 2-mercaptoetanol SDS y el calor producen afectaciones mayores a la molécula, que solo se reparan mediante la aplicación de diluciones mayores, por lo que se reafirma la evidencia que tanto el CB-IFN 2.3 como el CB-IFN 2.4 detectan epítopes conformacionales de la molécula.

Con estos ajustes analíticos en las diluciones se aseguraron recobrados entre 90 y 110 % de la concentración de IFN con respecto a los valores calculados para el patrón no tratado con los tampones de extracción. Iguales criterios se aplican al análisis de muestras que han sido sometidas a tratamientos con estos agentes.

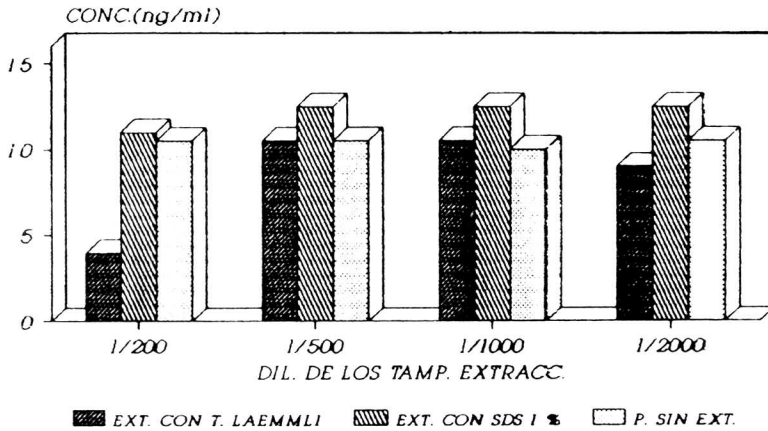


FIG. 5. Efecto de los tampones de extracción y de la dilución sobre el patrón de interferón de 10 ng/ml de concentración final.

También se evaluó la influencia de las proteínas contaminantes de dos cepas de *E. coli* sobre el recobrado del interferón durante el proceso de extracción. Para ello se añadió una cantidad conocida de interferón a extractos de cada cepa, para una concentración final de interferón de 10 ng/ml. Ambas muestras se sometieron al mismo proceso de extracción establecido con el tampón Laemmlí.

En las diluciones de trabajo establecidas no hubo influencia de las proteínas

contaminantes sobre el proceso de extracción del interferón (figura 6). La disminución de la concentración de interferón observada para la dilución de 1/200 fue ocasionada por la influencia del método de extracción sobre el ensayo de detección, como se observó anteriormente.

Se estudió, además, el efecto de la urea y el cloruro de guanidina a diferentes concentraciones sobre la cuantificación del interferón, por ser estos agentes comúnmente empleados en los procesos de

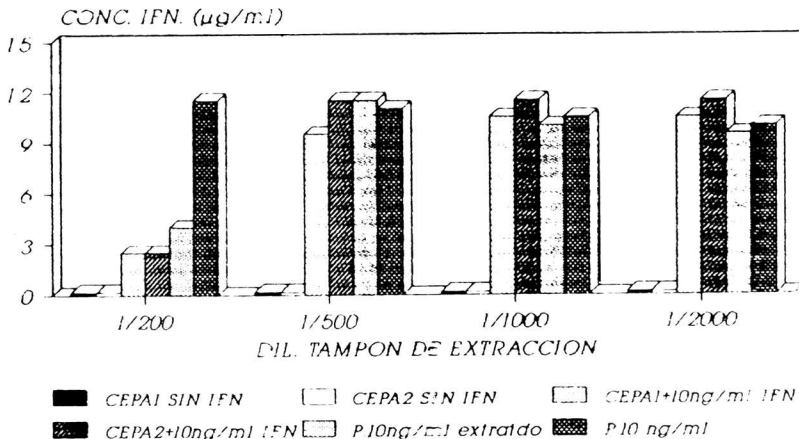


FIG. 6. Efecto de la extracción y proteínas de las cepas en el recobrado del patrón de interferón de 10 ng/ml de concentración final.

extracción en proteínas recombinantes insolubles. Todas las concentraciones determinadas en presencia de urea y cloruro de guanidina fueron diferentes de los valores de concentración esperada para el interferón patrón, viéndose afectada la determinación por ELISA (datos no presentados).

En el análisis de las muestras de eluatos de afinidad (tampón de elución, glicina pH 2,3) hubo diferencias con respecto a la concentración de interferón obtenida cuando se ajustó el pH a 7 antes de la determinación (datos no presentados). A pesar de que el IFN es estable a pH ácido (Stewart, 1979), el pH empleado para la desadsorción del IFN de la columna de inmunoafinidad (pH 2,3) interfiere severamente el reconocimiento inmunológico.

CONCLUSIONES

Se escogió como sistema de extracción analítico la modificación del tampón Laemmli de 2,5 % de 2-mercaptoetanol y 2 % de SDS, con 10 minutos de tratamiento a 90°C, con lo cual se logró mayor extracción del interferón que al emplear el SDS al 1 % a 5 minutos de tratamiento.

A diluciones superiores a 1/500 ni el tampón Laemmli modificado, ni el SDS al 1 % afectaron significativamente la detección del interferón en el ELISA.

Las proteínas de las cepas productoras no tuvieron efectos sobre la extracción y detección inmunológica del interferón.

No fue posible la cuantificación absoluta del interferón por el método de ELISA, aun en presencia de concentraciones de 0,1 mM de urea y cloruro de guanidina.

La determinación del interferón se ve afectada en presencia del sistema tampón utilizado en su elución de las columnas de afinidad, por lo que se hace necesario un ajuste del pH para la determinación.

Con estas modificaciones se logró introducir al proceso productivo el empleo satisfactorio del ELISA como método de control.

REFERENCIAS

- BARASOAIN, I.; A. PORTOLES; J.F. ARAMBURU y J.M ROJO. (1989). Antibodies against a peptide representative of a conserved region of human IFN-alpha. Differential effects on the antiviral and antiproliferative effects of IFN. *J. Immunol.* **143**: 507-512.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of the protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248- 254.
- CRUZ, S.; C. DUARTE; E. FERRA; G. FONTIRROCHE; J. VAZQUEZ; L MARTINEZ; N. ARTEAGA; E. PEREZ y J. GAVILONDO (1990). Cuantificación de interferón alfa 2b humano recombinante mediante anticuerpos monoclonales. *Biotecnología Aplicada* **7** (2): 132-141.
- DEVOS, R.; G. PLAETINCK; H. CHEROUTE; G. SIMONS; W. DEGRARE; J. TAVERNIER; E. RAMAUT y W. FIERS (1983). Molecular cloning of human Interleukin 2 cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acid Res.* **11**: 4307-4322.
- DUARTE, C.A.; 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.
- GARDAS, A. E. y A. LEWARTOWSKA (1988). Coating of proteins to polystyrene Elisa plates in the presence of detergents. *Journal of Immunological Methods.* **106**: 251- 255.
- ISACCS, A y J. LINDENMAN (1957). Virus Interferons. I *The Interferón Proc. Roy. Soc. B* **147**: 258-267.

- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly by bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSENBROUGH; A.L FARRY y R. J. RANDALL (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- LYDON, N.B; C. FAVRE; S. BOVE; O. NEYRET; S. BENUREAU; A.M LEVINE; G.F. SEELING; T.L. NAGABHUSHAN y P.P. TROTTA. (1985). Immunochemical mapping of alpha-2 interferon. *Biochemistry* **24**: 4131.
- MARTSON, F.A.O.; P.A. LOWE; M.T. DOEL; J.M. SCHOEMAUER; S. WHITE y S. ANGEL (1984). Purification of calf prochimosine (prorenin) synthesized in *E. coli*. *Biotechnology* **2**: 800-804.
- MARTSON, F.A.O. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E. coli*. *Biochem. J.* **240**: 1-12.
- MOREHEAD, H.; P.D. JOHNSTON y R. WETZEL (1984). Roles of the 29- 138 disulfide bond of subtype A of human Alpha Interferon in its antiviral activity and conformational stability. *Biochemistry* **23**: 2500-2507.
- PESTKA, S.; J.A LANGER; K.C LOON y C.E SAMUEL (1987). Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 727-777.
- SILVA, A.; J. DE LA FUENTE ; G. PEREZ; Y. QUIÑONES; V. JIMENEZ; L. NOVOA y L. HERRERA (1988). Altos niveles de expresión del IFN alfa 2b humano bajo el control del promotor derecho del fago Lambda en *E.coli*. *Interferón y Biotecnología*. **5** (1): 40-46.
- SCHONER, R.O.; L.F. ELLIS y B.E. SCHONER (1985). Isolation and purification of protein granules from *E. coli* cells overproducing bovine growth hormone. *Biotechnology* **3**: 151-154.
- STEWART, W.E. (1989). Characterization of human interferon types and subtypes: physicochemical and pharmacological distinction between interferon types I and II. *Interferon: properties and clinical uses*. Part I, pp. 111-119.
- THATCHER, D. y N. PANAYOTATOS (1986). Purification of recombinant human IFN alpha 2b. *Meth. Enzymol.* **119**: 166-177.
- WETZEL R.; P.D. JOHNSTON y C.W. CZARNICKI (1983). "Roles of the disulfide bonds in human alpha interferon". In: *The Biology of the Interferon System*. E. De Maeyer and Schellekens, eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 101.