ARTICULOS ORIGINALES CORTOS/ SHORT ORIGINAL PAPERS

CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA EL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

Rodolfo Valdés¹, Jorge Luis Leyva², Ernesto González³, Damián Mainet², Lourdes Costa³

¹División de Producción de Anticuerpos Monoclonales. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. CIGB. Apartado Postal 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba. ²División de Producción de Anticuerpos Monoclonales. Centro Nacional de Biopreparados. CNB.Apartado Postal 6048, Habana, Cuba, ³División de Control de Calidad. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. CIGB, Apartado Postal 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba

Recibido en agosto de 1993. Aprobado en agosto de 1994

Key words: Monoclonal antibody, immunoadsorbent, HBvsAg, hepatitis B

SUMMARY

Two monoclonal antibodies specific to the hepatitis B virus surface antigen generated by fusion of BALB/C plasmatic cell were purified from ascitic fluid for their evaluation in immunoadsorption experiments. These monoclonal antibodies are IgM and IgG class of immunoglobulin and they are secreted by the same cell line. They were purified by Protein A-Sepharose FF (Pharmacia) and subsequently they were separated by use of gel filtration procedure in Sephacryl 300-HR (Pharmacia). The affinity constants of both monoclonal antibodies measured by non competitive immunoassay were very similar: 1.9 x 10⁻¹⁰ M for IgM and 4.9 x 10⁻¹⁰ M for IgG. The adsorption capacity, elution capacity and release of monoclonal antibodies from the matrix were evaluated in immunogels produced by chemical coupling using cyanogen bromide. The results obtained in this work show that both monoclonal antibodies coupled under same chemical conditions remain constant their recognition capacity of the antigen and additionally, adsorption, elution capacity and release of antibodies from immunogel are improved for IgM.

RESUMEN

Dos anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, generdos por fusión de células plasmáticas de ratones Balb/c, fueron purificados a partir de fluído ascítico para su evaluación en experimentos de inmunoadsorción. Estos anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas de clase IgM e IgG, y son secretados por la misma línea celular. Ellos fueron purificados mediante proteína A-Sefarosa FF (Pharmacia) y posteriormente se separaron para

su uso por procedimiento mediante filtración en gel de Sephacryl-300-HR (Pharmacia). La constante de afinidad para ambos anticuerpos se midió mediante un inmunoensayo no competitivo, cuyos resultados fueron muy similares: 1.9 x 10⁻¹⁰M para la IgM y 4.9 x 10⁻¹⁰M para la IgG. La capacidad de adsorción, y de elución y desprendimiento del anticuerpo de la matriz se evaluaron mediante los inmunogeles producidos por acoplamiento químico usando bromuro de cianógeno bajo las condiciones de elución del antígeno. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que ambos anticuerpos acoplados bajo las mismas condiciones químicas mantienen de inmovilización mantienen su capacidad de reconocimiento del antígeno, y adecuadamente la capacidad de adsorción, elución y liberación de anticuerpo fueron mejores para la IgM.

INTRODUCCION

La tecnología de acoplamiento de anticuerpos a matrices para inmunopurificación ha sido ampliamente utilizada para la obtención de preparaciones de moléculas activas y puras (Scopes, 1987). Para los inmunoadsorbentes, la característica funcional más importante es que conserven la capacidad de reconocimiento de la molécula contra la cual fueron generados los anticuerpos. Sin embargo, cuando se quiere remover sustancias no deseadas seleccionando el antígeno a partir de una mezcla biológica, es necesario considerar algunos aspectos para lograr un elevado nivel de pureza.

El diseño debe basarse, en primer lugar, en el análisis del tipo de contaminantes a remover y no en el nivel de pureza inicial, como aspecto esencial para optimizar la eficiencia (Scopes, 1987).

El uso de anticuerpos monoclonales es aconsejable sobre las preparaciones basadas en anticuerpos policlonales, ya que estas últimas muestran a menudo diferente representatividad del anticuerpo específico, lo que podría afectar la capacidad de adsorción del sistema.

Por otra parte, la selección de un anticuerpo monoclonal debe ser hecha cuidadosamente. En los trabajos de inmunoafinidad una de las características más importantes a considerar es la constante de afinidad (Scopes, 1987). Una constante de afinidad elevada implica la utilización de condiciones drásticas de elución, que pueden resultar en pérdida de actividad o cambios estructurales del antígeno durante la desorción y quizás del propio anticuerpo.

Entre los criterios fundamentales a tener en cuenta para lograr un inmunoadsorbente ideal están: alta inmovilización del ligando, retención de la actividad del ligando inmovilizado, unión del producto con alta capacidad, lograr el mínimo de uniones inespecíficas, elución con un alto grado de rendimiento en volúmenes mínimos, regeneración del inmunoadsorbente con máxima rapidez y mínima pérdida, así como una larga vida del gel (Scopes, 1987).

Este trabajo estuvo dirigido a evaluar la capacidad de adsorción, desorción y desprendimiento de dos anticuerpos secretados por un mismo clon de hibridoma bajo las condiciones de elución del antígeno (Fontirrochi *et al.*, 1993).

MATERIALES Y METODOS

Purificación de anticuerpos

La purificación se realizó a partir de ascítis de ratones Balb/C inoculados con el hibridoma CB/HEP/I productor de ambos anticuerpos IgM/IgG. Las inmunoglobulinas se precipitaron con (NH4)₂ SO₄ al 50% de saturación durante 2 h a 4°C, seguido por una centrifugación a 7000 xg durante 20 min a 4°C, posteriormente el precipitado se resuspendió en PBS 0.15M, pH 8 y desalinizó por filtración en gel de Sephadex G-25M (Pharmacia), La fracción proteica fue purificada mediante una cromatografía de afinidad por proteína A Sepharose FF (Pharmacia) (Danielson et al., 1988), donde se utilizó como tampón de adsorción PBS 0.15 M pH 8 y de elución ácido cítrico 0.2 M, pH 3. La solución de elución que contenía la mezcla de ambos anticuerpos se neutralizó a pH 7.5 con Tris (hidroximetil-aminometano) (BDH) en una relación de 10 mg/mL. Seguidamente se realizó una cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-25M (Pharmacia) para cambio de tampón a Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 7.6. La fracción de proteína obtenida en esta cromatografía Se purificó por filtración en gel de Sephacryl-300HR (Pharmacia) para separar la IgM de la IgG. Ambas fracciones se procesaron por filtración en gel de Sephadex G-25M para cambio de tampón hacia tampón carbonato-bicarbonato de sodio, pH 8.3, para su posterior inmovilización. Todas la fracciones obtenidas en el proceso de purificación por pasos cromatográficos se monitorearon por absorbancia a 280 nm (Uvicord, Pharmacia).

Determinación de proteínas totales

Todas las determinaciones de proteínas correspondientes a la purificación de los anticuerpos y del antígeno se realizaron según los procedimientos descritos por el método de Lowry et al. (1951). La albúmina sérica bovina se utilizó como patrón de determinación de la concentración de proteínas (Lowry et al., 1951).

Electroforesis en condiciones reducidas

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 12%. Las muestras de proteínas se resuspendieron en 2% de 2-mercaptoetanol, 2% de SDS (duodecil sulfato de sodio), 0.05% de Tris-hidroximetil aminometano (BDH) pH 6.8 y 10% de glicerol (Laemmli, 1970). Las preparaciones se calentaron durante 10 min antes de ser aplicadas en el gel. La electroforesis se realizó a 250 V y 30 mA, durante 1 h y los geles se tiñeron con azul brillante de Commassie R-250 en 40% de metanol y 10% de ácido acético. La pureza se determinó por densitometría mediante un densitómetro (Ultrascan Lasser Densitometer 2202, LKB, Broma).

ELISA para la cuantificación de anticuerpos específicos

Las placas de PVC (Costar) se recubieron con AgsvHBr a una concentración de 10 µg/mL en NaHCO3 100 mM, pH 9.6, 20 min a 50°C. Las placas se lavaron con PBS 0.15 M/0.05% Tween 20. Las muestras en varias diluciones se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente e incubaron durante 1 h con un anticuerpo antiinmunoglobulinas total de ratón generado en carnero conjugado con peroxidasa (Sigma) y diluido 1000 veces en PBS 0.15 M/0.05% Tween 20/0.5% BSA, posteriormente se lavaron e incubaron durante 20 min con solución sustrato (5 µL H₂O₂,5 mg de OPD (Merck) diluidos en 10 mL de citrato 50 mM, pH 5.5). La reacción se detuvo con 250 mM de SO₄H₂ (50 μL/pozo) y la absorbancia se midió a 492 nm en un lector de ELISA (Titertek). Los valores de adsorción del blanco fueron restados a las muestras para eliminar el fondo. Se utilizó una curva patrón de CB/HEP/I para cuantificar la actividad de las muestras (Fontirrochi et al., 1993).

Ensayo para determinar constante de afinidad

El ensayo se realizó según Beatty et al. (1987). Placas (Titertek) recubiertas con AgsHB a 2.5, 1.25 y 0.625 μg/mL en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM durante 20 min a 50°C, posterior a lo cual se realizaron lavados de 3 a 5 veces con Tween 20 al 0.05% en H₂O. Se bloqueó con PBS 150 mM/1% leche (150 μL/pozo) 1 h a 37°C. Las muestras se aplicaron 2 h a temperatura ambiente a partir de 12 μg/mL en diluciones de base 4 hasta 20 ng/mL para ambos anticuerpos disueltos en PBS 150 mM/1% leche. El anticuerpo anti inmunoglobulinas de ratón en carnero conjugado con HRP 1/400 se aplicó durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente y se añadió tampón sustrato (5 μg de OPD/citrato-fosfato 0.1 M pH 5, 5 μL de H₂O₂). La reacción se detuvo con 250 mM de H₂SO₄ (50 μL/pozo) y la absorbancia se midió a 492 nm.

ELISA para la cuantificacion de AgsvHB

Placas Marxisorp (NUNC) se recubrieron con anticuerpos de carnero previamente inmunizados con el AgsvHB a una concentración de $10~\mu g/mL$ en NaHCO $_3~100~mM$ pH 9.6,

15 min a 50°C, las placas se lavaron con PBS 0.15 M/0.05% Tween 20. Las muestras fueron aplicadas en varias diluciones a partir de 1/100 en tampón PBS 0.15 M pH 7.5 e incubadas durante 1 h a 50°C. Las placas se lavaron nuevamente e incubaron durante 1h a 50°C con el anticuerpo anti-AgsvHb conjugado con peroxidasa (Sigma) 1/1000 en PBS 0.15 M/0.05% Tween 20/0.5% BSA. Se repitieron los lavados y se incubó durante 15 min con solución sustrato (5 µL H₂O₂, 5 mg de OPD) diluidos en 10 mL de citrato 50 mM, pH 5.5. La reacción se detuvo con 250 mM de H₂SO₄ (50 μL/pozo) y la absorbancia se midió a 492 nm. Los valores de adsorción del blanco fueron restados a las muestras para eliminar el fondo. Los valores de concentración del antígeno eluido se calcularon a partir de una curva patrón previamente estandarizada con una solución de concentración conocida de antígeno recombinante puro.

ELISA para cuantificar anticuerpos desprendidos de la matriz

Las placas de PVC (Costar) se recubrieron a una concentración de 10 µg/mL de anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón en carnero en tampón NaHCO3 100 mM, pH 9.6 durante 3 h a 37°C. Las placas se lavaron con PBS 0.15 M/0.05% Tween 20 y se bloquearon con PBS 0.15 M/1%leche. Las muestras diluidas en PBS 0.15 M/Tween 20, 0.05%/leche 0.05% se aplicaron durante 3 h a 37°C. Las placas se lavaron con PBS 0.15 M/0.05% Tween 20, 10 veces y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo anti- nmunoglobulinas totales de ratón generado en carnero y conjugado con peroxidasa (Sigma) 1/1000 en PBS 0.15 M/0.05% Tween 20/0.5% BSA, durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con el mismo tampón de lavado y se incubaron durante 15 min con solución sustrato (5 µL H₂O₂, 5 mg de OPD) diluido en 10 mL de Citrato 50 mM, pH 5.5. La reacción se detuvo con 250 mM de SO₄H₂ (50 μL/pozo) y la absorbancia se midió a 492 nm en un lector de ELISA (Titertek). Los valores de concentración de las inmunoglobulinas eluidas se calcularon a partir de patrones estandarizados de IgG e IgM de ratón.

Inmunoadsorbentes

Las inmunoglobulinas se inmovilizaron en Sepharose CL-4B (Pharmacia) por el método del bromuro de cianógeno (Matson et al., 1988). La relación de acoplamiento para todos los casos fue de 5 mg de anticuerpo/mL de gel. Los grupos activos remanentes se bloquearon por la adición de glicina 0.2 M, pH 8.0, en una relación 2 veces el volumen de gel. Los valores de inmovilización obtenidos para cada inmunoadsorbente se midieron según el método de Lowry et al. (1951).

Cromatografía de inmunoadsorción

La inmunopurificación se realizó a partir de una muestra semipurificada por adsorción negativa a una matriz de intercambio iónico de DEAE celulosa. Las muestras se adsorbieron en los diferentes inmunogeles (IgG, IgM e IgG+ IgM) empacados en una columna de geometría 1.7 x 3.5, previamente equilibrada con tampón tris 20 mM/NaCl 1M/EDTA 150 mM, pH 8 a un flujo lineal de 25 cm/h. Como tampón de elución se utilizó Tris 20 mM/NaCl 1 M/EDTA 150 mM/tiocianato de potasio 3 M, pH 8. Toda la cromatografía se siguió por absorbancia a 280 nm. Posteriormente, para eliminar la interferencia del tiocianato de potasio 3 M, se realizó una diálisis durante 10 h contra H₂O destilada.

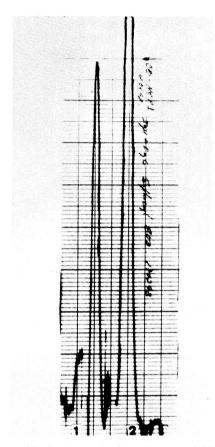


Fig. 1. Separación de la mezcla de anticuerpos IgM e IgG por Sephacril-300 HR (Pharmacia), flujo lineal 6 cm/h, temperatura 20°C, detección por absorbancia 280 nm, volumen de muestra 20 mL, concentración de proteína 5.4 mg/mL y tampón de corrida Tris 20 mM, NaCl 0.15 M pH 7.6. fracción 1: Anticuerpo IgM; fracción 2: Anticuerpo IgG.

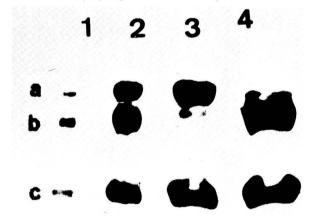


Fig. 2. Análisis de pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 12.5% en condiciones reducidas de las fracciones eluidas en la cromatografía en gel filtración (S-300 HR), 20 µg de proteínas de cada fracción fueron aplicados; línea 1: patrón de peso molecular compuesto por: a)Cadena pesada de IgM de ratón 70 kD; b)Cadena pesada de IgG de ratón 55 kD; c)Cadenas ligeras de IgM y de IgG de ratón 22 kD; línea 2: mezcla de anticuerpos purificados por proteína A-Sefarose; línea 3: fracción 1; línea 4: fracción 2.

RESULTADOS Y DISCUSION

El interés de usar anticuerpos monoclonales para la remoción específica de sustancias y/o moléculas ha conducido a realizar estudios de caracterización de algunos efectos de la inmovilización entre los que se puede citar, la capacidad de unión al antígeno (Scopes, 1987). El hibridoma CB-Hep.1 secreta 2 anticuerpos monoclonales específicos para el HBsAg (Fontirrochi et al., 1993). Los mecanismos que hacen posible esta propiedad, y el origen de este clon, están en estudio. Nosostros hemos abordado la caracterización inmunoquímica de estos 2 anticuerpos monoclonales específicamente los aspectos relativos a sus capacidades de unión y elución del HBsAg. cuando se emplea en la inmunopurificación. Para ambos anticuerpos la pureza, medida por análisis densitométrico, se calculó superior al 97% después de la cromatografía en Sephacryl 300 HR (Pharmacia), como puede observarse en las figuras 1 y 2.

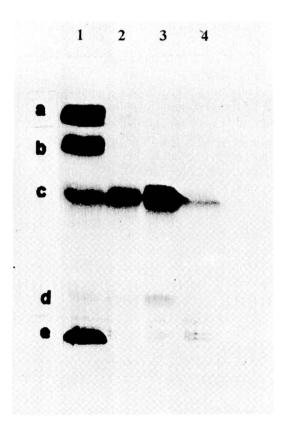


Fig. 3. Análisis de pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida a 12.5% en SDS y condiciones reducidas de las fracciones eluídas de la cromatografía de inmunoafinidad. Las fracciones fueron aplicadas siguiendo relación de volumen; línea 1: patrón de peso molecular compuesto por: a) Albúmina Bovina 67 kD; b) AgsvHB 41 kD (dímero); c) AgsvHB 24 kD (monómero); d) Interferón alfa recombinate 18 kD; e) Lisozima 14 kD; línea 2: eluato del inmunogel de IgG; línea 3: eluato del inmunogel de IgM; línea 4: eluato del inmunogel de la mezcla IgG/IgM.

Tabla 1

Porcentaje de pureza de los anticuerpos acoplados y relación entre número de moléculas y mg de anticuerpos

Ac	Pureza (%)	Peso molecular (x 10 ³ Da)	No de moléculas por mg de Ac.	Pureza del eluato a (%)
IgG 2b	94	150	39.7 x 10 ¹⁷	70
IgM	99	900	6.6 x 10 ¹⁷	73
IgG+ IgM	55/42	150/900	21 x 10 ¹⁷ / 27 x 10 ¹⁶	48

a: valor promedio para n= 3. Ac: anticuerpo inmovilizado

Es de destacar que ambos anticuerpos coeluyen en la cromatografía de afinidad en proteína A Sepharose CL-4B al mismo pH, aun cuando uno de los dos anticuerpos es de clase IgM, la cual ha sido reportada como incapaz de ligar la proteína A, lográndose esta unión sólo en condiciones de alta concentración de sales y pH elevado. En estos casos la elución también se ha realizado a pH bajos (3.5-3.0) (Mariani et al., 1989). Esto pudiera deberse a que la región de unión a la proteína A concentrada en el dominio CH2 y alguna participación del dominio CH3 para la IgG y en los dominios CH3 y CH4 para la IgM de ambos anticuerpos no difieran considerablemente.

La relación de inmovilización de los anticuerpos que se logró en los tres inmunoadsorbentes fue superior at 98%, o sea, superior a 4.89 mg/mL. El análisis de la capacidad de adsorción de estos inmunogeles demostró, en primer lugar, que los tres inmunoadsorbentes utilizados en el estudio tienen una selectividad similar por la molécula de AgsvHB de 24 kD (figura 3), aunque con un nivel de eficiencia menor para el caso de la mezcla de anticuerpos, donde la pureza del eluato disminuyó al 48% (Tabla 1). En segundo lugar, se comprobó que el inmunogel con mayor capacidad de adsorción es el de IgM, que superó ligeramente la capacidad de adsorción del gel de IgG, y de forma significativa al que contiene la mezcla de ambos anticuerpos (50% con respecto a la observada en la IgM y 58.2% con respecto a la IgG) (tabla 2).

Es significativo destacar las potencialidades de la IgM en cuanto a su capacidad de adsorción, siendo comparable con la de la IgG, sin embargo, la cantidad de moléculas de IgM inmovilizadas es aproximadamente 6.6 veces menor (tabla 1), debido a su talla molecular. Esto pudiera ser explicado por varias vías: (a) capacidad de formación de estructuras pentaméricas de gran valencia que provocan la formación de un enrejado con

Tabla 2
Relación de antígeno adsorbido y eluido por miligramo y número de moléculas de anticuerpo inmovilizadas

Ac	μgAgAd / m L	μgAgAd / mgAc	μgAgEl / m L	μgAgEl / mgAc	Recobrado (%)
IgM	254	50.2	213	42.6	85
IgG	218	43.6	95	18.2	44
IgM/IgG	127	25.4	87	17.4	69

Ac: anticuerpo inmovilizado.

μgAgAd/mL: microgramos de antígeno adsorbido/mililitro de gel μgAgAd/mgAc: microgramos de antígeno adsorbido/miligramo de antícuerpo.

µgAgEl/mL: microgramos de antígeno eluido/mililitro de gel μgAgEl/mgAc: microgramos de antígeno adsorbido/miligramo de antícuerpo.

Recobrado: (AgEl/AgAd) x 100%

múltiples sitios de unión al antígeno, (b) menor alteración de las regiones involucradas en el reconocimiento del antígeno durante la reacción de acoplamiento o, incluso, (c) disminución de interferencias entre moléculas a la concentración utilizada durante la inmovilización.

Adicionalmente, para IgM pudiera sugerirse el establecimiento de interacciones superficiales con la matriz a diferencia de la IgG, cuyas interacciones con el interior de la matriz están más favorecidas por su menor tamaño molecular. Ello pudiera ocasionar disminución en su capacidad de adsorción debido a las características del antígeno, como por ejemplo su talla.

La elución de un antígeno de una columna de inmunoafinidad debe ser rápida y sencilla. Tres tipos de eluciones son posibles. La interacción antígeno-anticuerpo puede ser interferida o bloqueada por (1) tratamiento con condiciones desnaturalizantes, por ejemplo bajos pH y agentes caotrópicos; (2) adición de cantidades de pequeñas moléculas que simulen el sitio de reconocimiento, y/o (3) tratamiento con un agente que induzca un cambio conformacional y permita la liberación del antígeno (Scopes, 1987).

En este trabajo las condiciones de elución como se índican corresponden con el grupo (1), o sea, se utilizó un agente caotrópico, el tiocianato de potasio, para eluir el antígeno.

Los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de elución demuestran una mayor eficiencia del inmunogel de la molécula de IgM, obteniéndose valores de elución de 2.3 y 2.4 veces superiores al

de IgG y a la mezcla respectivamente, expresado en µgAg/mgAc (tabla 2). Esto se analiza con más claridad si se tiene en cuenta el número real de moléculas de anticuerpos inmovilizados por mililitro de matriz (tabla 1) y se puede explicar por el mismo efecto de interacciones superficiales que deben establecerse en el caso de la IgM, lo que garantizaría que las condiciones de elución establecidas resulten óptimas.

Esto se reflejó en un incremento en el recobrado de 97 y 78% con respecto a la IgG y la mezcla respectivamente, usándose como criterio la relación entre la cantidad total de antígeno adsorbido y el eluido (tabla 2). Sobre este aspecto se continúa trabajando, ya que el hecho de que exista una recuperación menor en el caso de la IgG pudiera significar un tiempo de vida media menor del inmunoadsorbente con respecto al de la IgM, por efecto de saturación del gel dependiente del número de corridas.

El efecto de mayor elución de antígeno no debe estar influenciado por la menor afinidad de la IgM, ya que la diferencia en afinidad de ambos anticuerpos pudiera considerarse despreciable.

Los resultados obtenidos indican la necesidad de buscar mejores condiciones de elución para los tres casos, debido a que en ninguno se obtuvo la liberación completa del antígeno adsorbido. Probablemente sea necesario hacer combinaciones de varios agentes eluyentes para permitir la máxima liberación, ya que la utilización independiente de otros agentes desnaturalizantes como pH extremos, tampoco provocó una liberación total o mayoritaria (datos no mostrados). Si estas nuevas combinaciones no resultaran, debe analizarse la sustitución de esta mezcla de anticuerpos, que tienen constantes de afinidad del orden de 10-10 M, por otro de similar especificidad, pero de constante de afi-

Tabla 3

Cantidad de anticuerpo desprendido y veces que purifican los inmunogeles.

Ac	ngAc/µgAg	VP	
IgM	0.2	11	
IgG	1.4	9	
IgM/IgG	0.4	26	

Ac: especie del anticuerpo inmovilizado.

ngAc/µgAg: nanogramos de anticuerpo desprendido/microgramos de antígeno eluido.

VP: veces que purifica el inmunogel. Actividad específica inicial/ Actividad específica final.

Actividad específica: Relación de cociente entre la cantidad de proteína específica y el valor de proteínas totales.

nidad próxima a 10⁻⁸ M, la cual se considera óptima en esta cromatografía para favorecer la elución (Scopes, 1987).

Por último, resulta de interés el desprendimiento diferencial de anticuerpos en los inmunogeles conteniendo IgG, IgM y la mezcla de ambas. El mayor desprendimiento correspondió a IgG, que fue 5 veces mayor con respecto a la IgM y 2.75 veces con respecto a la mezcla (tabla 3). Este resultado debe ser considerado en la estimación de la vida útil del gel, ya que el desprendimento de la molécula del adsorbente, unido al 44% de elución del antígeno limita considerablemente la utilización del sistema (datos no mostrados).

REFERENCIAS

- BEATTY, J.D.; B.G. BEATTY; W.J.C. VLAHOS (1987). Measurement of monoclonal antibody affinity by non competitive ensyme immunoassay. J. of Immunology Methods 100:173-179.
- DANIELSON, A.; A. LJUNGLOF; H. LINDBLOM (1988). One step purification of monoclonal IgG antibodies from mouse ascites. J. of Immunol. Methods 115:79-88.

- FONTIRROCHI, G.; M.DUEÑAS; M.E FERNANDEZ; P. FUENTES; M. PEREZ; M. AYALA; J. GAVILONDO; C. DUARTE (1993). A mouse hybridoma cell line secreting IgG and IgM antibodies with specificity for the hepatitis B virus surface. Biotecnologia Aplicada 10 (1):24-30.
- 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. FARR; R.J. RANDAL (1951). Protein measurements with folin-phenol reagent. J. Biol. Chemical 193:256-269.
- MARIANI. M.; M. CIANFRIGLIA; A. CASSONE (1989). Is mouse IgM purification on Protein A possible. Immunology Today 10:4.
- MATSON, S.R., C.M. LITTLE (1988). Strategy for the immobilization of monoclonal antibodies on solid-phase support. J. of Chromatography 458:67-77.
- SCOPES, R. K. (1987). Protein Purification. Second Edition. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, London, Tokyo, pp 126-167.