INMUNOADSORBENTES CON CAPACIDAD DE PURIFICACION INCREMENTADA BASADOS EN EL RECUBRIMIENTO DE AGAROSA CON POLIETILENIMINA

José Roberto Hernández, Jorge Segredo, Ever Pérez, Leonardo Canaan-Haden, Vivian Saez y Lorenzo Rodés

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado postal 6162 Cubanacan, La Habana 6, C.P 10600, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en junio de 1994. Aprobado en noviembre de 1994

Key words: Polyethyleneimine-coated agarose; immunoaffinity chromatography

SUMMARY

In this article the coating of agarose particles (sepharose CL-4B) with aminated polymer film of polyethyleneimine is described. Two types of activated gels were used: agarose-aldehyde and cyano-agarose. After introduction of amino groups into the matrices, their crosslinking and functionalization was accomplished by treatment with glutaraldehyde. Monoclonal antibodies anti-interferon were used as a model ligand to evaluate the stability and purification capacity of the affinity supports. High purification levels were achieved with the coated particles used as adsorbents (six times higher than the levels obtained with the non-coated particles). This improvement could be explained by a proper orientation of the immobilized antibodies on the matrix and a better accesibility of the antigen to the biological recognition sites of the antibodies.

RESUMEN

En este estudio se describe el recubrimiento de partículas de agarosa (sefarosa CL-4B) con película de polietilenimina. Para esto fueron empleados dos tipos de geles activados: agarosa-aldehído y ciano-agarosa. Despues de la introducción de grupos amino en las matrices, fue realizado su entrecruzamiento y funcionalización por tratamiento con glutaraldehído. Como ligando modelo fueron usados anticuerpos monoclonales anti-interferón para evaluar la estabilidad y capacidad de purificación de los soportes de afinidad. Los altos niveles de purificación de estos adsorbentes (seis veces mas altos que los niveles obtenidos con las partículas sin el recubrimiento) pudieran estar dados por una adecuada orientación de los anticuerpos inmovilizados en la matriz y a una mejor accesibilidad del antígeno a los sitios de reconocimiento bioespecífico del anticuerpo.

INTRODUCCION

De las tecnologías de separación disponibles hoy día, aquellas que se basan en las interacciones de afinidad son de las más preferidas para la purificación de proteínas y otras biomoléculas de mezclas complejas, debido a su grado inigualable de selectividad. La inmovilización de un anticuerpo (o un antígeno) a geles de agarosa activada con CNBr (1) es una de las formas más utilizadas en éste tipo de cromatografía (inmunoafinidad). La utilización práctica de este método ha sido limitada, a causa de que los derivados de isourea obtenidos son inestables y lábiles al ataque nucleofílico (2-4), dando como resultado la pérdida de proteína del soporte bajo diferentes condiciones experimentales, lo cual contamina el producto final. Un gran número de variantes de estos sistemas, han sido probadas con el objetivo de retener el ligando bajo las drásticas condiciones de elución (5) con muy pocos resultados.

La preparación de inmunoadsorbentes basados en agarosa (sefarosa CL-2B) recubierta con polietilenimina (PEI) y derivatizada con glutaraldehído fue descrita por Stubbings *et al.* (6). En este caso el recubrimiento se realizó mediante adsorción de PEI a partículas de agarosa sin previa activación. Estos inmunoadsorbentes resultaron poseer características similares comparados con los preparados partiendo de cianoagarosa respecto a los niveles de incorporación de anticuerpos y su capacidad de purificación. La retención de los anticuerpos durante el proceso de elución resultó ser muy superior en los inmunoadsorbentes con PEI. El PEI es un polímero catiónico altamente ramificado que contiene grupos amino primarios, secundarios y terciarios en su estructura por lo que se ha utilizado en el recubrimiento de distintos materiales los cuales se emplean como matrices cromatográficas de intercambio iónico (7-8).

En este trabajo fue llevado a cabo el recubrimiento de partículas de agarosa (sefarosa CL-4B) con película de polímero aminado de PEI enlazada covalentemente y derivatizada con glutaraldehído (geles agarosa-PEI-aldehído: APA). Para el recubrimiento fueron empleados dos tipos de geles, aldehído-agarosa y ciano-agarosa. Partiendo de estos geles fueron preparados inmunoadsorbentes con anticuerpos monoclonales anti-interferón y comparados con inmunoadsorbentes sintetizados en base a partículas activadas por diferentes procedimientos y sin recubrimiento. Los resultados

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

obtenidos con relación a la estabilidad y capacidad de purificación de estos inmunoadsorbentes, así como la facilidad de su preparación, brindan una excelente alternativa para la explotación más eficiente de las posibilidades de la cromatografía de inmunoafinidad.

MATERIALES Y METODOS

Equipamiento cromatográfico

Para la evaluación de los inmunoadsorbentes se utilizó una bomba peristáltica modelo 2232, un monitor UV modelo 2238, un recorder modelo 2210 y una columna XK 16/20 de Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden).

Materiales

Glicidol ($C_3H_6O_2$), bromuro de cianógeno (CNBr), hidróxido de sodio (NaOH) y bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) fueron obtenidos de Fluka Chemie (Buchs, Switzerland); polietilenimina (PEI) (PM 50 000 a 60 000 D) de Sigma (ST Louis, MO. U.S.A.); Glutaraldehído [$OCH(CH_2)_3CHO$], borohídruro de sodio ($NaBH_4$), y periodato de sodio ($NaIO_4$) de Merck (Darmstadt, FRG); Acrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina (TEMED), Perlas de sefarosa CL-4B de Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). Todos los otros reactivos empleados en el trabajo fueron de grado analítico.

El antígeno utilizado fue interferón (IFN) recombinante humano alfa 2b (IFN α2b Hu-r) suministrado con un alto grado de pureza (mayor del 95%) por la planta de producción del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).Los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-interferón utilizados (CB-IFNA 2.4) (anti-IFN) fueron suministrados por la División de Hibridomas y Modelos Animales del CIGB.

Activación del soporte

La sefarosa CL-4B fue activada por cada uno de los métodos siguientes:

1)**Cianoagarosa**. Una cantidad de 5 mL de gel decantado fue activado con bromuro de cianógeno según se describe en (1, 9-12).

2)**Geles agarosa-aldehído**. Estos geles con concentración variable de grupos aldehído superficiales de 30 μmoles, 45 μmoles y 70 μmoles fueron preparados poniendo a reaccionar 5 mL de gel decantado con glicidol (2,3-epoxipropanol) y posterior oxidación con periodato de sodio. La preparación y la determinación de los grupos aldehído en los geles fue realizada según lo describe Guisan *et al.*(13).

Obtención del soporte activado (APA)

La sefarosa CL-4B (5 mL de gel decantado) una vez activada por uno de los métodos descritos anteriormente, se puso a reaccionar con PEI (4% v/v) en solución acuosa (volumen total 10 mL) durante 4 h en un rotoevaporador con agitación lenta, a temperatura de laboratorio. Las perlas recubiertas con el polímero aminado fueron separadas mediante filtración y lavadas con agua destilada (8 x 50 mL), glicina (0.3 M, 3 x 50 mL), NaCl (0.5 M, pH 2.3, 3 x 50 mL) y finalmente con agua destilada hasta que el pH de la misma fuese neutro. Posterior al recubrimiento de las partículas con el PEI, se procedió a la introducción de grupos aldehídos reactivos en la superficie; para ello se resuspendió el gel en una disolución de glutaraldehído (1% v/v) en agua destilada (volumen total 10 mL) y en un tiempo de reacción de 4 h a temperatura de laboratorio. Seguidamente las perlas fueron separadas por filtración y lavadas con agua destilada (300 mL).

Acoplamiento de los anticuerpos a las diferentes matrices

Los anticuerpos fueron dializados previamente en tampón bicarbonato de sodio 0.1 M, carbonato de sodio 0.1 M, cloruro de sodio 0.5 M, pH 8.3.

Una vez concluido el acoplamiento, para todos los casos se separan las partículas del sobrenadante en un filtro, y se lava con agua destilada (3x50 mL).

La cantidad de AcM anti-IFN unida a la matriz fue estimada a partir de la diferencia de los análisis del sobrenadante por espectrofotometría a 280 nm.

1. Geles Tipo I

a). ciano-agarosa.

b). aldehído-agarosa.

2. Geles Tipo II

a). APA sin reducción de los grupos aldehídos superficiales.

b). APA con reducción de los grupos aldehídos superficiales, añadiendo al medio de reacción una cantidad de 30 mg de borohidruro de sodio durante 2 h más.

Una cantidad de AcM anti-IFN de 2,5 mg / mL gel (5 mg / mL gel para los geles tipo I), fueron puestos a reaccionar con las partículas del gel (5 mL de gel decantado) en el tampón de diálisis, en un rotoevaporador con agitación lenta y a temperatura de 4°C por espacio de 3 h y 2,5 h más a temperatura de laboratorio. El esquema de la reacción de acoplamiento se muestra en la figura 1.

3. Geles de agarosa-PEI

Una cantidad de AcM anti-IFN de 2,5 mg/mL gel fueron puestos en contacto con las partículas de gel agarosa-PEI (AP) (5 mL de gel decantado) en las mismas condiciones que los geles tipo II.

No se detectó diferencia en los análisis de anticuerpos del sobrenadante por espectrofotometría a 280 nm antes y después del experimento de adsorción.

Estabilización adicional de los anticuerpos inmovilizados

Los geles APA (5 mL de gel decantado) fueron resuspendidos en agua destilada conteniendo glutaraldehído (0,5% v/v) (volumen total 10 mL) durante 2 h. Posteriormente se les añadió 60 mg de borohidruro de sodio (6 mg/mL) durante una hora y a continuación fue añadida etanolamina (1 mL) durante 1 h bajo las mismas condiciones de acoplamiento.

Finalmente cada inmunoadsorbente obtenido fue separado por filtración y lavado con agua destilada (3x50 mL) y almacenado a 4°C en etanol acuoso al 20%.

Capacidad de adsorción

Cada inmunoadsorbente (4 mL de gel decantado) fue empacado en una columna (20 cm x 1.6 cm d.i.) y lavado sucesivamente con PBS pH 7.2, glicina-ácido clorhídrico pH 2.3 y de nuevo con PBS. Interferón alfa 2b hu-r (16 mL) fue bombeado a la columna que contiene cada inmunoadsorbente (50 cm/h). La elución de las proteínas adsorbidas inespecíficamente fue llevada a cabo con PBS-NaCl pH 7.2. El interferón fue desorbido posteriormente con glicina-ácido clorhídrico pH 2.3 (100 cm/h). Cada inmunoadsorbente fue entonces lavado con PBS y almacenado nuevamente en 20% de etanol acuoso.

La cantidad de interferón en la muestra aplicada inicialmente, la cantidad eluída y la cantidad en la muestra que pasó por la columna fue determinada por el método de Lowry (14); además las muestras de antígeno eluido

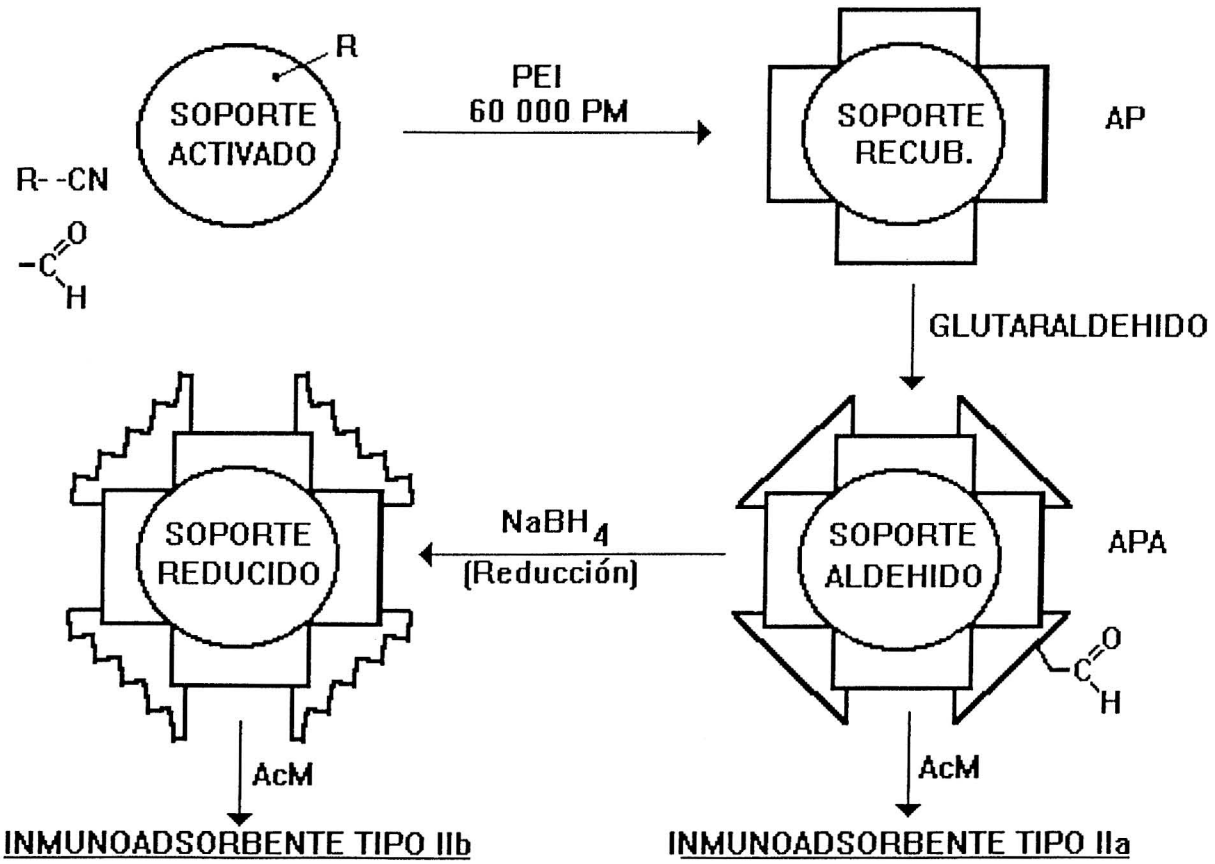

Fig.1. Esquema de reacción para el acoplamiento de los anticuerpos a la matriz activada por dos vías diferentes: CNBr (ciano-agarosa) y glicidol (agarosa-aldehído); unión covalente posterior de la molécula de PEI(gel agarosa-PEI:AP) y entrecruzamiento y funcionalización con glutaraldehído (geles agarosa-PEI-aldehído: APA) .

fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) bajo condiciones de reducción acorde a (15).

Los inmunoadsorbentes fueron evaluados por la capacidad de purificación como la masa de interferón a purificar que se retiene específicamente en el inmunoadsorbente.

RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 2 muestra la capacidad de purificación de dos inmunoadsorbentes obtenidos a partir de diferentes vías de activación de la sefarose CL-4B, ambos bajo las mismas condiciones de trabajo.

Los niveles de antígeno eluido promedio, procesado por más de 10 corridas, fueron similares en ambos casos, lo cual nos hace suponer que el método de activación utilizado en este tipo de inmunoadsorbente no tiene una relación directa con la capacidad de purificación del mismo. Los resultados de la figura 3 muestran que esto también se cumple

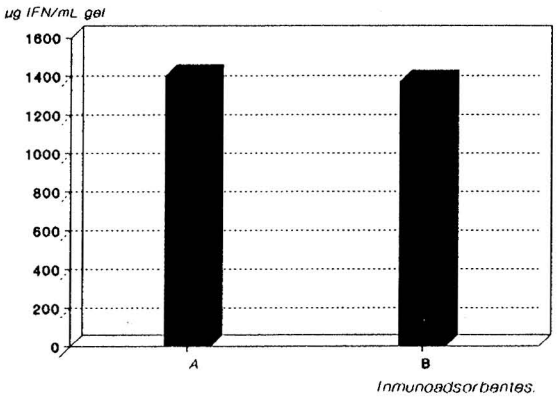

Fig. 2. Capacidad de purificación de la sefarosa CL-4B activada con (a) CNBr (b) Glicidol. En ambos casos las partículas fueron recubiertas con PEI y entrecruzadas con glutaraldehído al 1%. La relación de IgG en el acoplamiento fue de 2.5 mg/mL gel.

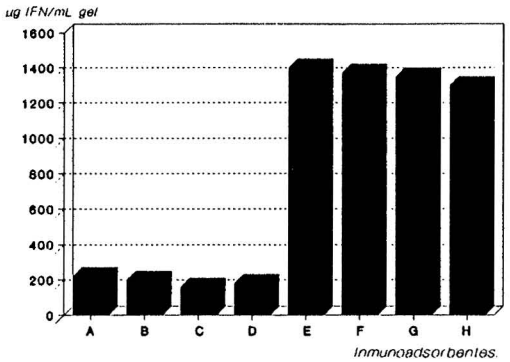

Fig.3. Capacidad de purificación (a) ciano-agarosa (b) aldehído-agar osa 30 µmoles (c) aldehído-agarosa 45 µmoles (d) aldehído-agarosa 70 µmoles; Para todos los casos sin recubrir con PEI y una relación de 5 mg IgG/mL gel. (e) ciano-agarosa (f) aldehído-agarosa 30 µmoles (g) aldehído-agarosa 45 µmoles (h) aldehído-agarosa 70 µmoles; Para todos los casos con recubrimiento de PEI y entrecruzamiento con glutaraldehído y una relación de 2.5 mg IgG/mL gel.

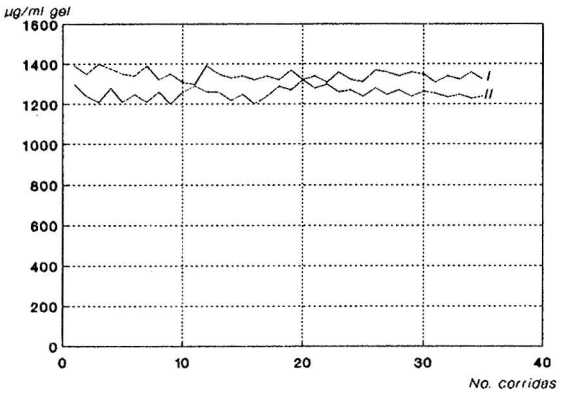

Fig.4. Capacidad de purificación (|) APA sin reducción de los grupos aldehídos superficiales (||) APA con reducción de los grupos aldehídos superficiales. Ambos inmunoadsorbentes fueron evaluados por más de 30 corridas en operación contínua.

para la cantidad de grupos activos en la superficie (medidos en micromoles) antes del recubrimiento con PEI. En esta figura, además se puede observar como los niveles de purificación de inmunoadsorbentes obtenidos a partir del acoplamiento de los anticuerpos a geles tipo I son 6 veces inferiores a estos mismos geles, pero recubiertos con PEI (Tipo II).

Es muy probable que estos resultados estén intimamente condicionados por las características estructurales de la molécula de PEI, la cual debe ocasionar transformaciones muy sustanciales en la morfología del soporte.

El PEI es un polímero catiónico con alto grado de ramificación que presenta en su estructura grupos amino primarios, secundarios y terciarios. Observaciones y resultados anteriores (6, 16) sugieren que las cadenas del PEI se difunden en el interior y se entrelazan con las matrices poliméricas, entrecruzándose iónicamente consigo mismas y con las moléculas de proteínas cercanas a la región superficial.

Durante el tratamiento con glutaraldehído de las partículas recubiertas con PEI tiene lugar, además de la introducción de grupos aldehídos reactivos en el gel, un intenso proceso de formación de enlaces entrecruzados entre las cadenas de PEI situados en la superficie de las partículas. Al parecer, este proceso origina profundas alteraciones en las propiedades superficiales de las partículas, destacándose entre otras un aumento considerable de su hidrofobicidad.

Un comportamiento similar fue observado con anterioridad para el caso de partículas de silica recubiertas con PEI, donde el carácter hidrofílico de estas está dado precisamente por la ausencia de enlaces entrecruzados en la capa superficial de PEI (17).

Los altos niveles de antígeno eluido de los inmunoadsorbentes del tipo II en comparación con los obtenidos del tipo I son consecuencia de un alto grado de conservación de la capacidad de unión de los anticuerpos inmovilizados, lo que debe estar asociado a los factores de orientación de los anticuerpos en la matriz y la accesibilidad del antígeno a los sitios de reconocimiento bioespecífico del anticuerpo inmovilizado. Esto pudiera explicar la alta capacidad de purificación que poseen estos adsorbentes, inclusive a más baja densidad de ligando (2.5 mg/mL gel), en comparación con la lograda con los adsorbentes obtenidos sin el recubrimiento de las partículas con PEI y en los cuales la densidad de ligando fue de 5 mg/mL gel.

En relación con la orientación de los anticuerpos en la matriz se pudiera pensar que una adsorción superficial pasiva orientada del anticuerpo favoreciendo la exposición de los sitios de reconocimiento antigénico antes de la etapa de unión covalente al soporte, desempeñe un papel preponderante en este proceso, dadas las características del recubrimiento de PEI, una vez que es sometido a un proceso de entrecruzamiento y funcionalización con glutaraldehído. Estas suposiciones se ven apoyadas por los resultados obtenidos en los experimentos de incorporación de anticuerpos a geles APA con y sin reducción de los grupos aldehído superficiales (figura 4) y su comportamiento en más de 30 corridas cromatográficas, como también por la no adsorción de anticuerpos a geles AP en condiciones de alta fuerza iónica (Materiales y Métodos).

Todo el interferón purificado por estos geles fue estimado con un grado de pureza mayor del 95% por electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 5); además estos materiales fueron biológicamente activos acorde con los resultados de los bioensayos específicos realizados (tabla 1).

Fig. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 12,5%. Lineas A-H: interferón eluido de distintos inmunoadsorbentes; Línea I: patrón de interferón; Línea J: patrón de pesos moleculares.

Tabla 1
Actividad biológica y específica de diferentes eluatos de los inmunoadsorbentes.

Inmunoadsorbentes	Actividad biológica (IU/mL)	Actividad específica (IU/mg)
Ciano-agarosa		
Eluato No.1	4.00E+ 07	1.08E+ 08
Eluato No.2	4.87E+ 07	1.08E+ 08
Eluato No.3	5.03E+ 07	1.16E+ 08
Agarosa-PEI-Aldehído		
Eluato No.1	5.10E+ 07	1.50E+ 08
Eluato No.2	3.56E+ 07	1.96E+ 08
Eluato No.3	3.56E+ 07	1.10E+ 08

REFERENCIAS

1. CUATRECASAS, P.; M. WILCHEK and C.B. ANFINSEN (1968). Selective Enzyme Purification by Affinity Chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**:636-643.
2. WILCHEK, M. and K. ERNST-CABRERA (1987). From Affinity Chromatography to HPAC. *Protein Purification: Micro to Macro*, 163-165.
3. WILCHEK, M. and K. ERNST-CABRERA (1988). Immunoaffinity Chromatography and its Application for the Purification of Pharmaceutically Active Protein. *Med. Sci. Res.*, **16**:305-310.
4. UBRICH, N.; P. HUBERT; V. REGNAULT; E. DELLACHERIE and C. RIVAT (1992). Compared Stability of sefarosa-Based Immunoadsorbents Prepared by Various Activation Methods. *J. Chromatogr-Biomed. Applicat.*, **584**:17-22.
5. KOWAL, R. and R.G. PARSONS (1980). Stabilization of Protein immobilized on sefarosa from Leakage by Glutaraldehyde Crosslinking. *Anal. Biochem.*, **102**:72-76.
6. STUBBINGS D.; M.O. BUBB and J.D. CONRADIE (1993). Two Methods for The Introduction of Amino Groups into Agarose-Based Matrices: Their Use in Immunoaffinity Chromatography. *Anal. Biochem.*, **210**:159-162
7. PARK, T. G.; S. COHEN and R. LANGER (1992). Controlled Protein Release from Polyethyleneimine-Coated Poly(L-lactic Acid)/Pluronic Blend Matrices. *Pharmaceutical Research*, **9**:37-39.
8. ROUNDS, M.A.; W.D. ROUNDS and F.E. REGNIER (1987). Poly (Styrene-Divinylbenzene)-Based Strong Anion-Exchange Packing Material for High-Performance Liquid Chromatography of proteins. *J. Chromatogr.*, **397**:25-38 .
9. STAEHLIN,; T., D.S. HOBBS; H. HSIANGFU, C.Y. LAI and S.PESTKA (1981). Purification and Characterization of Recombinant Human Leukocyte Interferon with Monoclonal Antibodies. *J. Biol. Chem.*, **256**:9750.
10. AXEN, R.; J. PORATH and S. ERNBACk (1967). Chemical Coupling of Peptides and Protein to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. *Nature* **214**:1302-1304.
11. PORATH, J.; R. AXEN and S. EMBACK (1967). Chemical Coupling of Protein to Agarose. *Nature*, **215**:1491.
12. PHARMACIA (1983). Affinity Chromatography. *Priciples and Methods.*
13. GUISAN, J.M.; A. BASTIDA; C. CUESTA; R. FERNANDEZ-LAFUENTE and C. M. ROSELI (1991). Immobilization-Stabilization of-chymotrypsin by Covalent Attachment to Aldehyde-Agarose Gels. *Biotechnol. and Bioeng.*, **38**:1-9
14. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH; A.L. FARR and R. J. RANDALL (1951). Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-269.
15. LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of Estructural Protein During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
16. PARK, T.G., S. COHEN and R. LANGER (1992). Controlled protein release from polyetilenimine-coated poly (L-lactic acid)/pluronic blend matrices. *Pharmaceutical Research*, **9**:37-39.
17. HENRY, M.P. (1991). Design requirements of silica-based matrices for biopolymer chromatography. *J. Chromatogr.*, **544**:413-443.