

REFERENCES

1. WINTER, G. and C. MILSTEIN (1991). *Nature* 349:293.
2. MILENIC, D. E. et al. (1991). *Cancer Res.* 51:6363-6371
3. AYALA, M. et al. (1992). *BioTechniques* 13:790-799
4. GAVILONDO, J. et al. (1993). Abstr. Book, 4th IBC Conf.
5. EVAN, G. I. et al. (1985). *Mol & Cell. Biol.* 5:3610-3616
6. WHITLOW, M. et al. (1993). *Prot. Engineering* 6:989-995
7. BORREBAECK, C. et al (1992). *Bio-Technology* 10:697-698
8. GRUEN, L. C. et al. (1993). *Eur. J. Biochem* 217:319-325

VARIABLE REGION SEQUENCES MODULATES PERIPLASMIC EXPORT OF A scFv ANTIBODY FRAMENT, SPECIFIC FOR HEPATITIS-B SURFACE ANTIGEN, IN *E. coli*

Marta Ayala¹, María E. Fernández-de-Cossío¹, Leonardo Cannaán-Haden¹, Robert F. Balini²,
James W. Lerrick², Jorge V. Gavilondo¹.

¹*Center for Genetic Engineering and Biotechn, P.O.Box 6162, La Habana, Cuba.* ²*Palo Alto, Institute of Molecular Medicine, USA*

INTRODUCTION

Recent developments in recombinant DNA technology make possible the production of Fab, Fv, and single-chain Fv (scFv) antibody fragments in genetically engineered microorganisms (1). Applications of recombinant Fab and scFv include the elucidation of antigen-antibody interaction, imaging, drug and toxin targeting, catalysis, immunomodulation, immunotherapy, neutralization, and detoxification. Recently authors* have also shown that antibody fragments could have potential for the immunopurification (2). We have produced a bacterial scFv specific for a recombinant Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). Using expression vectors designed for periplasmic export we found that the scFv nevertheless remained associated to bacterial insoluble material. We will show evidence suggesting that positively charged aminoacids of the heavy chain V-region (V_H) could be responsible for the association of the scFv to the bacterial inner membrane.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

RNA was extracted from the anti-HBsAg mouse hybridoma CB-Hep.1, and cDNA synthesized. PCR was used for the assembly of the scFv (VL-L-VH or VH-L-VL) gene, including a 14 aminoacid spacer between VH and VL regions, and for site-directed mutagenesis of the VH domain. The sequenced gene was inserted for export into the secretion vectors pPACIB.1 and pPACIB.3, bearing OmpA secretion signal and for intracellular expression into pPACIB.4 and pPACIB.5

vectors. All vectors bear 6-histidine coding domain that are fused at the N- or C-terminal of the mature protein. Several *E. coli* strains were transformed and expression induced with beta indoleacrylic acid. Western Blots (WB) of SDS-PAGE bacterial material were developed with a specific anti Fab rabbit antibody. The activity of fragments was monitored by specific ELISA against HBsAg. The proteins were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC).

RESULTS AND DISCUSSION

A high expression level was found for the scFv (VH-L-VL) in pPACIB.1 and pPACIB.3 when strain MM294 was used (ca. 15% of total bacterial protein). While both vectors have a bacterial secretion signal, the synthesized protein is not secreted into the periplasm. Extraction studies and electron microscopy indicate that the scFv is associated to the insoluble membrane fraction. This fraction was solubilized with 6M Urea, and the scFv with a 60% of purity renatured by extensive dialysis against PBS. The renatured scFv binds to the antigen in a direct ELISA. Two different versions of the scFv fragment were cloned into the pPACIB.1 vector; one of them with mutated VH domain (Arg 16-Gly) and the other with change in domain order (VL-L-VH). These changes brought forth the export active scFv to periplasm, suggesting that framework 1 positively charged aminoacids of the VH region could be responsible for the association of the scFv to the bacterial membrane, as have been suggesting by other different studies (3).

A successful intracellular expression was confirmed when the pPACIB.5 vector was used, while no expression was detected when the pPACIB.4 vector was employed. These results indicate that the human IL-2 coding region (58 aa) 5' to the protein, is a potent factor in successful expression of heterologous protein in bacteria.

REFERENCES

1. PLUCKTUN, A. et al. (1991). *Biotechnology* 9:273-278
2. PIERCE, J. J. et al. (1993). *J. of Chrom.* 629:161-168
3. BECKWITH, J. and D. BOYD (1990). *Cell* 62:1031-1033

INMOVILIZACION DE PROTEINA A DE *Staphylococcus aureus* EN CELULOSA MACROPOROSA ESFERICA DE PRODUCCION NACIONAL

Gil Sh.¹, I. Giraldino², J. Delfín¹, L. Dávalos¹, M. Chávez¹, J. Díaz¹, O. Quintela³ y J. M. Guisán⁴

¹Departamento de Bioquímica, Fac. de Biología, UH; ²EPB "Carlos J. Finlay", C. Habana, Cuba; ⁴Instituto de Catálisis y Petróleo-química, C.S.I.C. Madrid, España. ³UIP-Cuba 9, MINAZ.

INTRODUCCION

El desarrollo de una industria para la obtención de anticuerpos monoclonales (AcMs) constituye uno de los objetivos biotecnológicos priorizados en el país. En este proceso es muy utilizada la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) por su capacidad de unión inespecífica a la región Fc de la mayoría de las inmunoglobulinas. Por estas razones y tomando en consideración los resultados satisfactorios obtenidos en nuestro laboratorio, con la utilización de celulosa macroporosa esférica de producción nacional en la inmovilización de tripsina (1) e inhibidores de proteasas (2), se decidió estudiar la inmovilización de SpA en este soporte. En el presente trabajo se obtienen e investigan dos preparados, Cel-SpA y celulosa-glicidol-SpA (Cel-Glic-SpA), con características favorables que les permiten ser empleados en la purificación de AcMs.

MATERIALES Y METODOS

La celulosa con un tamaño de partícula de 40 a 80 μm fue oxidada con periodato de sodio y activada con glicidol (1, 3). La cromatografía de afinidad en ambas matrices se realizó a través del procedimiento descrito por Pharmacia (4). En estos procesos se utilizó Inmunoglobulina G humana (IgGh) y líquido ascítico T₃ producidos en el Instituto de Hemoderivados y los Laboratorios de CIM respectivamente. Se estudia-

ron la estabilidad de las matrices durante los procesos oxidativos y de inmovilización, así como la pureza de las fracciones eluídas (4 y 5). Además, se realizó el estudio hidrodinámico de los preparados (4).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los mejores valores obtenidos de recobrado (7.8 mg IgGh/mL gel), grado de inmovilización (GI) (4.1 mg SpA/mL gel) y grado de oxidación (GO) (73.9 $\mu\text{moles NaIO}_4/\text{mL gel}$) para el sistema Cel-SpA resultan satisfactorios si tenemos en cuenta los antecedentes que se describen sobre este tema (5 y 6). Por otro lado, es evidente que el soporte Cel-Glic-SpA es más eficiente al alcanzar un GO de 110.6 $\mu\text{moles NaIO}_4/\text{mL gel}$, un GI de 6.3 mg SpA/mL gel y un alto valor de recobrado (16.1 mg IgGh/mL gel), lo cual corrobora nuestra hipótesis de que las limitaciones difusionales juegan un papel importante en esta cromatografía, pues la matriz que contiene el brazo espaciador muestra ventajas en estos parámetros para cada una de las concentraciones de muestra adicionada en el proceso cromatográfico.

Al aplicar las fracciones eluídas en el sistema SDS-PAGE se obtuvo una única banda electroforética, y 4 bandas en el patrón de la focalización isoeléctrica que corresponden a isoformas de la inmunoglobulina que se desea purificar. El hecho de que no se aprecie desprendimiento de SpA durante el proceso cromatográfico