

ESTUDIO COMPARATIVO MEDIANTE DIFERENTES SOLUCIONES PARA ELUIR EL INTERFERÓN ALFA RECOMBINANTE DE UNA COLUMNA DE INMUNOAFINIDAD

José R Hernández,¹ ✉ Miriela Gil,² Yaí Cruz,¹ Rebeca Bouyón,¹ Jorge Segredo² y Lorenzo Rodés²

¹División de Producción de Interferones; ²División de Química Física.

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

Tel: (53-7) 21 8164, 21 8466; Fax: (53-7) 33 6008, 21 8070; E-mail: miriela.gil@cigb.edu.cu

ABSTRACT

Three solutions were tested to elute the recombinant human alpha 2b interferon (IFN), from an affinity column containing monoclonal antibodies CB IFN 2.4: 1) glycine - NaCl - HCl, 2) acetic acid - NaCl and 3) urea - NaCl - acetic acid. The best performance was obtained with the solution containing urea. The protein was eluted at a higher pH with a higher resolution process and a recovery of the product 18 % greater than the HCl - glycine solution. The presence of urea at low concentrations in the elution modified the antigen-antibody interaction and avoided the aggregation between the IFN molecules. This allowed to concentrate the resulting IFN solution to values greater than 1.5 mg/mL without precipitation of the protein.

Key words: recombinant α IFN, elution, IFN, immunoaffinity chromatography

Biotecnología Aplicada 1998;15:30-33

RESUMEN

Para eluir el interferón (IFN) alfa 2b humano recombinante, adsorbido a una columna de inmunofinidad cargada con anticuerpos monoclonales CB IFN 2.4, se usaron 3 soluciones: 1) glicina - NaCl - HCl; 2) ácido acético - NaCl y 3) urea - NaCl - ácido acético. Los mejores resultados se obtuvieron con la solución urea - NaCl - ácido acético, en la cual el IFN fue eluido de la columna a un pH mayor, sin pérdida en la resolución del proceso y con un incremento del 18 % de la recuperación del producto. La presencia de urea a bajas concentraciones en la solución de elución modificó el nivel de la interacción antígeno-anticuerpo y evitó la agregación entre las moléculas de IFN; ello permitió concentrar los eluatos hasta valores superiores a 1,5 mg/mL sin observarse precipitación.

Palabras claves: interferón α recombinante, elución, IFN, cromatografía de inmunofinidad

Introducción

Los interferones (IFN) alfa son proteínas de valor terapéutico por su actividad antitumoral, antiviral e inmunorreguladora (1). La expresión del IFN alfa 2b humano recombinante en *Escherichia coli*, a partir de la tecnología del ADN recombinante, ha conducido a su obtención en grandes cantidades con un alto nivel de pureza, y ha permitido que se aplique de manera eficaz en el tratamiento de diversas afecciones (2).

La preparación con una calidad adecuada para su uso clínico, a partir de materiales crudos, requiere de diferentes pasos de purificación. Desde su descubrimiento por Isaacs y Linderman (1), hasta la actualidad, los procedimientos para la purificación del IFN han evolucionado y comprenden tanto técnicas convencionales como la cromatografía de inmunofinidad mediante anticuerpos monoclonales (AcM) (3-6). Este tipo de cromatografía es muy usada para la purificación de moléculas biológicas complementarias que pueden interactuar específica y reversiblemente unas con otras, tales como antígeno

y anticuerpo, enzima y sustrato y hormona y receptor. La purificación del IFN alfa natural leucocitario con AcM se realizó por primera vez en 1978 (7) y, en 1981, se utilizó en la purificación del recombinante (8). El desarrollo de esta técnica facilitó los procesos de purificación a gran escala.

La selección de las condiciones que se emplean en la etapa de elución durante la cromatografía de inmunofinidad depende del grado de fortaleza de las interacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y de las características propias del antígeno que se desea purificar. Estas interacciones se denominan covalentes, entre las que se encuentran: las hidrofóbicas, las de enlace iónico, las de puente de hidrógeno y las de fuerzas de Van der Waals (9).

El método típico utilizado para la disociación del complejo Ag-Ac en este tipo de cromatografía es el cambio de pH en la fase móvil (10-12), combinado con el uso de reactivos como el tiocianato de potasio y el cloruro de sodio, los cuales inducen la desnaturalización reversible de las proteínas. En ocasiones,

1. Isaacs A, Linderman J. Virus interference. *Proc Soc London Ser B* 1957;147: 58-267.

2. Nagata S, Taira H, Hall A, Jhonsrud L, Streuli M, Escadi J et al. Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 1980; 284:316-320.

3. Rubinstein M, Rubinstein S, Familletti P, Gross MS, Waldman A, Pestka S. Human leukocyte interferon purified to homogeneity. *Science* 1978;202:1289-1290.

4. Knight E. Purification of interferon. *Pharmac Ther* A 1978;2:439-446.

5. Hsiang-Fu K, Yu-ching E, Moschera J, Tsai K, Bekesi E, Chang M et al. Purification of recombinant human immune interferon. *Methods in Enzymology* 1986; 119:204-210.

6. Berg K, Heron I, Halmiton R. Purification of human interferon by antibody affinity chromatography using highly adsorbed anti-interferon. *Scand J Immunol* 1978;8:429-436.

✉ Autor de correspondencia

debido a la fuerte interacción del complejo Ag-Ac, es necesario usar reactivos como la urea y el cloruro de guanidina a concentraciones elevadas. Estas drásticas condiciones de elución, en muchos casos, desnaturalizan las moléculas purificadas y desactivan el ligando de afinidad (13).

En este trabajo se analiza el uso de urea a bajas concentraciones en la elución de IFN a partir de una columna cargada con un gel de afinidad con AcM anti-IFN, comparándola con otros sistemas de elución reportados.

Materiales y Métodos

Equipamiento cromatográfico

Se utilizaron una bomba peristáltica modelo 2232, un monitor UV modelo 2238, un registrador modelo 2210 y una columna XK 16/20, todos de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia).

Reactivos

Todos los reactivos empleados eran de calidad analítica (Merck, Darmstadt, RFA).

Inmunopurificación

El material filtrado en un volumen de 47 mL que contenía el IFN renaturalizado (14) a una concentración de 50 μ g/mL fue bombeado a una columna (XK 16/20), empacada con 5 mL de Sefarosa CL 4B, activada con CNBr y que tenía acoplado AcM del tipo CB-IFN A 2.4, con una capacidad de 0,5 mg de IFN por mililitro de gel (15) (suministrada por el departamento de matrices cromatográficas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB). La columna se equilibró con 25 mL de PBS pH 7,2 a un flujo de 1,67 mL/min. Este flujo se mantuvo constante en todos los pasos del proceso de separación. Después de aplicada la muestra, el gel se lavó con 60 mL de PBS-NaCl pH 7,2. El IFN fue desorbido de la columna usando tres soluciones:

- Solución de elución 1 (glicina 0,35 M-NaCl 0,3 M)
- Solución de elución 2 (NaCl 0,2 M)
- Solución de elución 3 (urea 0,5 M-NaCl 0,2 M)

Las soluciones se ajustaron a pH 2,3; 2,8 y 3,1. Para la solución 1 se utilizó ácido clorhídrico y para las soluciones 2 y 3 ácido acético. La solución 3 se ajustó además a pH 3,5 con ácido acético.

El eluato de afinidad se concentró 7 veces en un sistema de ultrafiltración de membrana plana (USA) usando una membrana YM 10. El concentrado se ajustó a pH 4,8 con NaOH 2 M. La proteína precipitada se separó filtrando el material por membrana de acetato de celulosa 0,2 μ m (Sartorius, Alemania).

La fracción no eluida de la columna se determinó por la diferencia entre la cantidad de IFN que se adsorbe al gel y la cantidad eluida para cada sistema de elución. Para la desorción de esta fracción, una vez

concluido el proceso cromatográfico con cada una de las variantes, se lavó la columna con la solución 1 a pH 2,3. Según experimentos previos se conoce que todo el IFN adsorbido a la columna eluye con esta solución (15).

La capacidad de purificación de la matriz fue expresada como la masa de IFN que se retiene específicamente en el inmunoabsorbente.

Técnicas analíticas

La concentración de IFN en los eluatos, así como en los lavados de las columnas se determinó por el método de Lowry *et al.* (16).

La concentración de IFN en el extracto renaturalizado y filtrado, así como en el material no adsorbido, se determinó por un sistema ELISA diseñado tipo *sandwich*, con 2 AcM con epítopes diferentes [AcM de captura CB alfa-IFN 2,3 (CIGB) y AcM de revelado CB alfa-IFN 2,4-POX (CIGB)] (17). El reconocimiento de la proteína se detectó por marcaje enzimático.

Resultados y Discusión

Para los 3 sistemas estudiados a pH 2,3, la fracción no eluida fue cero (Tabla 1), o sea, todo el IFN que se adsorbió al gel fue eluido, por lo cual no afectó la capacidad de desorción ni el perfil de elución de la columna de inmunoafinidad. En la Figura 1 se muestra el perfil cromatográfico del proceso de inmunopurificación del IFN con la solución 1. Para las soluciones 2 y 3 el comportamiento fue similar.

En el caso de la solución 3, la relación de IFN eluido por volumen de inmunoabsorbente fue menor, debido a que, a partir de la primera corrida, disminuyó drásticamente la cantidad de IFN adsorbido a la columna, en comparación con la solución 1 (Figura 2). Esta disminución podría estar asociada a la inactivación de los anticuerpos inmovilizados, debido a su desnaturalización irreversible a causa de la combinación de un pH muy ácido con la utilización de la urea (la presencia de IgG en los eluatos no fue detectada por ELISA).

Al aumentar el pH de 2,3 a 2,8, se observó que con la solución 3 hubo una mayor elución respecto a las soluciones 1 y 2 (Tabla 1). En este caso, todo el IFN adsorbido en la columna eluye, mientras en los otros dos casos la fracción no eluida fue de 11 y 20 %, respectivamente. Estos resultados indican que, en condiciones menos ácidas, la presencia de la urea en la solución de elución contribuye a la disminución de la fortaleza de la interacción Ag-Ac, lo cual ayuda a lograr una recuperación del IFN de 18 y 11 % más en relación con las soluciones 1 y 2, respectivamente.

El aumento en el pH de 2,8 a 3,1 no provocó cambios en el perfil de elución (la fracción no eluida se mantuvo en 0 %) para el sistema 3, no así para los sistemas 2 y 1, en los cuales la fracción no eluida se

7. Levy W, Rubinstein M, Shively J, del Valle U, Lai C, Moschera J *et al.* Amino acid sequence of a human leucocyte interferon. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 8:6186-6190.

8. Staehlin T, Hobbs D, Hsiangfu H, Lai C, Pestka S. Purification and characterization of recombinant human leucocyte interferon with monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1981; 256:9750-9754.

9. Van Oss C, Good R, Chaudhury M. Nature of the antigen-antibody interaction. *J of Chromatog* 1986;376:111-119.

10. Meurs E, Laurent A, Suab I, Montagnier L. Purification of human leucocyte interferon to homogeneity with the use of a monoclonal antibody: detailed technique and parameters. *Ann Virol (Inst. Pasteur)* 1983;134E:361-374.

11. Tarnowski S, Roy S, Liptak R, Lee D, Ning R. Large scale purification of recombinant human leukocyte interferons. *Methods in Enzymology* 1986;119:153-165.

12. Axen R, Porath J, Ernback S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* 1967;214:1302-1304.

13. Ernst-Cabrera K, Wilthek M. Immunoaffinity chromatography and its application for the purification of pharmaceutically active proteins. *Med Sci Res* 1988;16:305-310.

14. Quiñones Y, Agraz A, Silva A, Padrón G, Mella C, Díaz R *et al.* High purity recombinant human alpha-2 interferon free from oligomeric forms in *E. coli*. *Highlights Modern Biochemistry* 1989;2:1237-1246.

15. Hernández J, Segredo J, Pérez E, Cañan-Haden L, Sáez V, Rodés L. Inmunoabsorbentes con capacidad de purificación incrementada basados en el recubrimiento de agarosa con polietilimina. *Biotecnología Aplicada* 1994; 11:236-240.

16. Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-269.

17. Pérez E, Pérez L, Maraño V, Mella C. Tratamientos analíticos de muestras de IFN alfa 2b h. rec. para su cuantificación por ELISA. *Biotecnología Aplicada* 1991;8:392-399.

Tabla 1. Resumen del proceso de purificación a los pH 2,3; 2,8 y 3,1. En todos los casos la cantidad de IFN aplicado a la columna fue de 2,35 mg. Los resultados son el promedio de 5 corridas.

Solución	Proteína eluida (mg)	Recobrado Afinidad (%)	IFN/Volumen de gel (μ g/mL)	Fración no eluida (%)
pH 2,3				
1	2,01	86	402	0
2	2,1	89	420	0
3	1,29	55	258	0
pH 2,8				
1	1,78	76	355	20
2	1,94	83	388	11
3	2,2	94	440	0
pH 3,1				
1	1,75	74	350	22
2	1,81	77	362	16
3	2,16	92	432	0

incrementó hasta 16 y 22 %, respectivamente. Los resultados obtenidos con el sistema 3 en comparación con los sistemas 2 y 1 confirman la observación anterior del efecto que tiene este agente en la disociación del complejo Ag-Ac. En la mayoría de los sistemas de afinidad —fundamentalmente en aquellos donde prevalecen las interacciones tipo enlace de hidrógeno y van der Waals— la disociación se alcanza con un decrecimiento del pH del medio acuoso; sin embargo, en los sistemas Ag-Ac en los cuales existen además enlaces de tipo hidrofóbicos y electrostáticos, la disociación se ve favorecida con el uso de aditivos como la urea (8).

Es característico en el proceso posterior a la inmunopurificación, que al aumentar la concentración de proteínas en la solución de elución se formen agregados moleculares que precipitan. Esta tendencia se acentúa durante el proceso de ajuste a pH 4,8. En nuestro estudio se lograron resultados favorables con

el sistema 3, donde los eluatos obtenidos fueron concentrados hasta 1,77 mg/mL para pH 2,8 y hasta 1,57 mg/mL para pH 3,1, sin que se detectara precipitación. Para los otros dos sistemas estudiados, se observó precipitación a partir de valores superiores a 0,6 mg/mL. Todo el IFN purificado por este sistema se estimó con un grado de pureza superior al 95 % por electroforesis en gel de poliacrilamida (datos no mostrados).

La aplicación de la solución 3 con urea (pH 3,1) aporta resultados de marcado interés práctico. Al poder desorber y concentrar la proteína a un pH mayor, ésta se somete a cambios menos drásticos, lo cual repercute en el incremento del nivel de estabilidad del inmunoabsorbente. Los AcM, al encontrarse sometidos a condiciones de explotación más favorables para la retención de su actividad específica, prolongan su tiempo de vida útil. En efecto, los niveles de purificación obtenidos con el inmu-

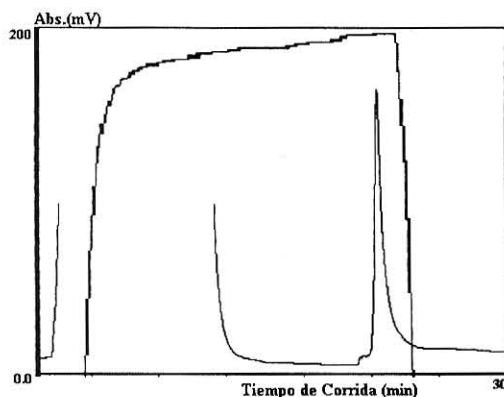


Figura 1. Perfil cromatográfico del proceso de adsorción y elución del IFN alfa de la columna de inmunoafinidad (Solución de elución 1, pH 2,3).

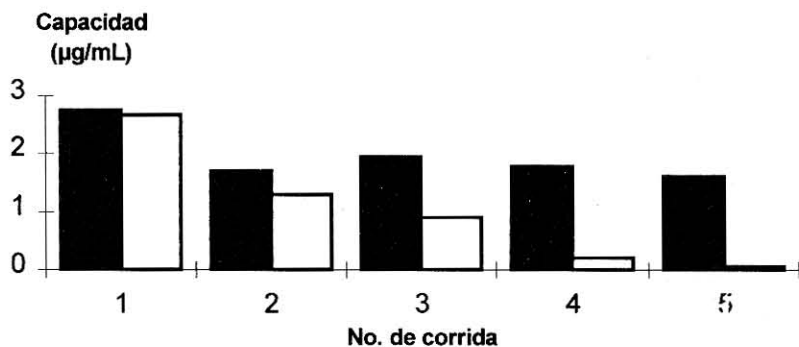


Figura 2. Cantidad de IFN eluido de la columna de inmunoafinidad para diferentes corridas: ■ Solución de elución 1 (glicina 0,35M-NaCl 0,3M), □ Solución de elución 3 (urea 0,5M-NaCl 0,2M).

noadsorbente utilizado para la elución con el sistema 3, se mantuvieron estables durante más de 30 ciclos cromatográficos realizados a los pH 2,8; 3,1 y 3,5; no así con los otros dos sistemas estudiados en los cuales se observó una disminución en la capacidad de adsorción de las columnas (Figura 3). Esta disminución se ha reportado anteriormente para los geles de inmunoadfinidad obtenidos por el método de activación con bromuro de cianógeno en condiciones de elución a pH inferiores a 3,1 (16).

Para el sistema 3 aparece una fracción no eluida del 11 % al aumentar el pH de 3,1 a 3,5; se observó un segundo pico (Figura 4) al aplicar glicina (pH 2,3) después de la elución. Eso indica que, al aumentar el pH

hasta 3,5, la presencia de urea en la solución de elución no es suficiente para debilitar las interacciones Ag-Ac,

Conclusiones

La presencia de urea en la solución de elución mejora sensiblemente el proceso de inmunopurificación de IFN y contribuye al incremento de los niveles de recuperación hasta un 18 % más con respecto a los sistemas de elución usualmente empleados y permite concentrar el IFN a valores superiores a 1,5 mg/mL. En primer lugar modifica el nivel de la interacción Ag-Ac (disminuyéndola) y, en segundo lugar, al solvatar las proteínas contribuye de manera eficaz a evitar la agregación entre las moléculas de IFN.

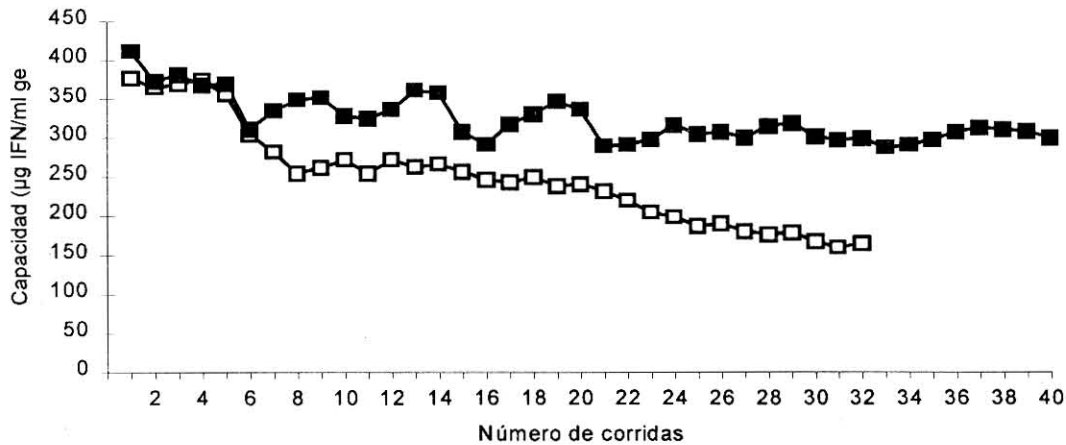


Figura 3. Capacidad de purificación obtenida para diferentes ciclos cromatográficos: ■ Solución de elución 3 (urea 0,5 M-NaCl 0,2 M), □ Solución de elución 1 (glicina 0,35 M-NaCl 0,3 M).

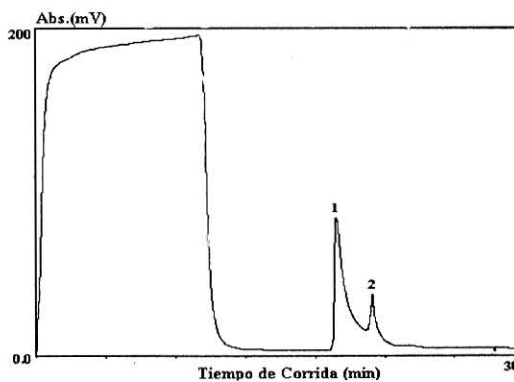


Figura 4. Perfil cromatográfico del proceso de adsorción y elución del IFN alfa de la columna de inmunoadfinidad a un pH 3,5 utilizando como sistema de elución la urea: pico 1, perfil de elución con la solución 3; pico 2, fracción eluida con la solución 1 a pH 2,3 después del proceso de elución con urea.