Reducción del tiempo de purificación de la IgG2b mediante cromatografía de afinidad por proteína A

✍ Sigifredo Padilla, Andrés Tamayo, Enio Socorro, Ricardo Pierrat, Aniebris Marrero, Tatiana Álvarez, José A Montero, Janet García, Maité Pérez, Raudel Sosa, Neysi Ibarra, Rodolfo Valdés

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba. Telf.: (53-7) 21 8008; Fax: (53-7) 33 6008; E-mail: neysi.ibarra@cigb.edu.cu

RESUMEN

Durante el proceso de purificación de la forma recombinante del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (AgsHBr), se utilizan inmunoadsorbentes que tienen el anticuerpo monoclonal (AcM) CB.Hep-1 (IgG2b) como ligando. La demanda creciente de una vacuna condujo al escalado y optimización del proceso de producción de este AcM. Este trabajo tuvo como objetivo variar las condiciones de la cromatografía de afinidad por proteína A-sefarosa 4 de alto flujo. La aplicación de la muestra en tampón fosfato salino a pH 8 y la elución del AcM de interés mediante un gradiente decreciente de pH paso a paso desde ácido cítrico 0,1 M pH 5 hasta ácido cítrico 0,1 M pH 3, se sustituyó por la aplicación de la muestra en ácido cítrico 0,1 M pH 5 —los contaminantes eluyen isocráticamente— y la posterior elución del AcM (IgG2b) con ácido cítrico 0,1 M pH 3. La aplicación de este procedimiento permite obtener una molécula de AcM con alto grado de pureza (> 90%) y disminuir en 30% el tiempo de duración de la cromatografía. De esta forma, se obtiene el mismo recobrado que con el método que se emplea actualmente.

Palabras claves: AgsHB, anticuerpos monoclonales, IgG2b, IgG2b contra AgsHB, proteína A, purificación

Biotecnología Aplicada 2000;17:109-111

ABSTRACT

Reduction in the Time of IgG2b Purification by Protein A Affinity Chromatography. During the purification step of the recombinant hepatitis B surface antigen (HBsAg), CB.Hep-1 (IgG2b) monoclonal antibody (MAb) immunosorbents are used. The increasing need of a vaccine led to the scaling up and optimization of MAb production step. The aim of this work was to modify the performance conditions of the protein A sepharse-4 Fast Flow (PASFF) affinity chromatography. Consequently, binding buffer (phosphate-buffered saline) and elution buffer (decreasing pH gradient from 0.1 M citric acid pH 5 to pH 3), were replaced by 0.1 M citric acid pH 5 (where contaminants and other IgG elute isocratically) and elution of IgG2b with 0.1 M citric acid pH 3. This change allowed us to obtain a molecule with a high purity degree (> 90%) and a 30% reduction in performance time. The yield is the same as in the current method.

Keywords: HbsAg, IgG2b, IgG2b to HBsAg, monoclonal antibodies, protein A, purification

*I*ntroducción

Desde su desarrollo [1], los anticuerpos monoclonales (AcM) han cobrado gran importancia en las producciones biomédicas, no sólo en el diagnóstico (identificación de hormonas, antígenos virales o bacterianos e, incluso, de grupos sanguíneos y tejidos), la terapia de muchas enfermedades y la dosificación de medicamentos, sino también en la purificación de mezclas complejas de sustancias con funciones biológicas importantes (proteínas, hormonas, toxinas). El uso de AcM en los procesos de inmunopurificación de biomoléculas, ha permitido establecer procedimientos reproducibles, eficientes y escalables [2- 4].

Por lo general, los AcM se purifican mediante cromatografía de afinidad por proteína A, debido a la alta capacidad que ésta posee para unirse específicamente a la región Fc de las inmunoglobulinas. La obtención de un producto de pureza y recobrado elevados, ha hecho que este procedimiento se utilice ampliamente a pesar de su limitación fundamental: la contaminación del producto por el desprendimiento de ligando [5]. La optimización de este procedimiento ha sido el objetivo fundamental de los investigadores relacionados con el tema [6], por lo que en este estudio se comparó el uso de soluciones ácidas con el uso de tampón fosfato (PBS) pH 8, con el propósito de disminuir el tiempo de cada ciclo de purificación. Como resultado, se propone un procedimiento nuevo para la aplicación de la muestra rica en el AcM CB.Hep-1 en la columna de Sefarosa-proteína A de alto flujo . El AcM CB.Hep-1 ha demostrado ser una herramienta poderosa y eficaz en la detección y purificación de la forma recombinante del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (AgsHBr) [7]. La demanda creciente de vacunas contra este virus que causa trastornos graves del hígado e, incluso, cáncer hepático [8], ha hecho obligatoria la optimización de los procesos de purificación del AcM CB.Hep-1 que forma parte del inmunogel para la purificación del AgsHBr.

*M*ateriales y Métodos

Equipamiento

El sistema de cromatografía líquida de baja presión fue adquirido en Amersham Pharmacia Biotech (Suecia) y consiste en una bomba peristáltica P-1, un

1. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifity. Nature 1975; 256:495–7.

2. Anónimo. Monoclonal antibodies: clinical potential of a growth industry. JAMA 1986;242:2161–3.

3. Gavilondo J. Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales. Interferón y Biotecnología 1987; 4(1):1–16.

4. Ostlund C. Large scale purification of monoclonal antibodies. TIBTECH 1986; Nov:288–93.

5. Anónimo. The use of protein Sepharose to purify IgG monoclonal antibodies. Separation News 1986;13(5).

6. Schuler G, Reinacher M. Development and optimization of a single step procedure using protein A affinity chromatography to isolate murine IgG_1 monoclonal antibody from hybridoma supernatants. Journal Chromatography 1991;587:61–70.

✍ Autor de correspondencia

© Elfos Scientiae 2000

detector de señal ultravioleta UV-1 280 nm y un registrador Rec-101. La absorbancia se determinó en un equipo Multiskan Labsystem MS tipo 352, versión 4 (Finlandia).

Purificación del anticuerpo monoclonal

Materia prima. Líquido ascítico rico en el AcM CB.Hep-1 con una concentración de 3,9 mg/mL, obtenido en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba) a partir de la inoculación intraperitoneal del hibridoma CB.Hep-1 en ratones Balb/c.

Precipitación del AcM CB.Hep-1. Se realizó una dilución 1:2 de la ascitis con solución saturada de sulfato de amonio 100% (Merck, Alemania) (conductividad 304 mS/cm, pH 7), con adición a flujo constante durante 3 a 4 h y agitación, y se centrifugó a 4 800 x*g*. El precipitado obtenido se disolvió en un volumen de sulfato de amonio a 50% de saturación equivalente a 30% del volumen inicial de ascitis. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se disolvió en un volumen de PBS equivalente a 20% del volumen inicial de ascitis.

Desalinización. El material obtenido en el paso anterior se clarificó otra vez y se hizo pasar a través de una columna cromatográfica XK 26 (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia), con Sephadex G-25 Coarse (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) a una altura del lecho de 34 cm y equilibrada con PBS (pH 8, conductividad 12-15 mS/cm) a un flujo lineal de 130 cm/h.

Cromatografía de afinidad por proteína A. Se utilizaron cuatro procedimientos para realizar la purificación del AcM [8, 9], cada uno con tres réplicas. Se empleó una columna XK 16 (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) cargada con proteína A-sefarosa 4 de alto flujo a una altura del lecho de 2 cm.

Procedimiento 1 (control experimental). Se tomaron 10 mL de ascitis desalinizada, se diluyeron 1:2 en tampón PBS pH 8 (conductividad 13,9 mS/cm) e inmediatamente se aplicó en la columna cromatográfica equilibrada con esta misma solución a un flujo lineal de 16 cm/h. Después de restablecida la línea base, se lavó la matriz con ácido cítrico 0,1 M pH 5 (Merck, Alemania) para eliminar contaminantes como IgG1 e IgG2a. El AcM de interés se obtuvo en ácido cítrico 0,1 M pH 3 y se mantuvo a este pH durante 1 h como paso de inactivación viral. Luego, se neutralizó la solución con Tris 2 M pH 12.

Procedimiento 2. Se equilibró la matriz con ácido cítrico 0,1 M pH 5 (conductividad 5,39 mS/cm) y se aplicó una muestra de 10 mL de ascitis desalinizada diluida 1:2 en solución de equilibrio. Se eluyó la IgG2b en ácido cítrico 0,1 M pH 3 y se realizó la inactivación viral durante 1 h. Después de ese tiempo, se neutralizó con Tris 2 M pH 12.

Procedimiento 3. Idéntico al procedimiento 2, excepto que se equilibró la matriz con ácido cítrico 0,1 M pH 5 y conductividad 13,25 mS/cm. Este valor de conductividad se logró mediante la adición de citrato de sodio (BDH, Inglaterra).

Procedimiento 4. Idéntico al procedimiento 3, excepto que se adicionó NaCl (Merck, Alemania) para ajustar la conductividad del ácido cítrico 0,1 M pH 5 a 14,02 mS/cm.

A todas las muestras de los cuatros procedimientos se les determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry [11], y la pureza, por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras y no reductoras.

ELISA para cuantificar el anticuerpo monoclonal específico

Se recubrieron placas de poliestireno (COSTAR, E.U.A.) con AgsHBr (10 µg/mL) en solución de recubrimiento ($NaHCO_3$ 0,1 M pH 9,6) y se incubaron durante 12 h a 4 ºC en una cámara húmeda. Después de cinco lavados con solución PBS+Tween 20 0,05% (Merck, Alemania), se añadieron las muestras a diferentes diluciones en solución de bloqueo (PBS + leche descremada 0,5% [OXOID, E.U.A.] + Tween 20 0,05%) y se incubó la placa a 37 ºC por 30 min. S empleó el AcM CB.Hep-1 para hacer la curva patrón. Transcurrido ese tiempo, las placas se lavaron 10 veces como se describió anteriormente. Luego, se incubó por 45 min a 37 ºC con el conjugado antiIgG de ratón (producido en carnero)-peroxidasa de rábano picante (Sigma, E.U.A.) en solución de bloqueo. Después de los 10 lavados, se añadieron como sustratos *o*-fenilendiamina 0.5 mg/mL (Sigma, E.U.A.) y peróxido de hidrógeno 30% (Merck, Alemania) en 0.091 M tampón ácido cítrico/Na_2HPO_4 pH 5,0. La reacción se detuvo a los 15 min con 50 µL de H_2SO_4 2,5 M y la absorbancia se determinó a 492 nm en un lector de microplacas Multiskan (Flow).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se siguió el método establecido por Laemmli [12] en condiciones reductoras y no reductoras. Para preparar las muestras se utilizaron 10-20 µg de proteína en igual volumen de tampón reductor y se hirvieron durante 5 min. Se aplicó un patrón de peso molecular. Para determinar el grado de pureza de las muestras, se utilizó el programa Molecular Analyst Software versión 1.4.1 (BioRad, E.U.A.).

Resultados y Discusión

En los procedimientos empleados, el tiempo medio de elución fue de 20 min. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de proteína determinadas por el método de Lowry y el rendimiento de las tres réplicas de cada procedimiento, así como el rendimiento promedio, el cual resultó ser igual para los tres primeros procedimientos y menor para la variante 4.

Tabla 1. Resultados analíticos de cada cromatografía de los procedimientos.

Procedimiento	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Miligramos totales	Rendimiento	Rendimiento medio
PBS 1	13,6	3,06	41,67	2,1	
PBS 2	11,6	3,03	35,19	1,8	1,9
PBS 3	12	3,20	38,44	1,9	
Ac.Cit 1	9,2	3,88	35,72	1,8	
Ac.Cit 2	10,6	3,89	41,22	2,1	1,9
Ac.Cit 3	12,4	2,9	36,02	1,8	
Ac.Cit + Citrato 1	10	2,98	29,82	1,5	
Ac.Cit + Citrato 2	11	3,56	39,2	2	1,9
Ac.Cit + Citrato 3	11	4,04	44,41	2,2	
Ac.Cit + NaCl 1	11,6	2,51	29,09	1,5	
Ac.Cit + NaCl 2	10	2,89	28,89	1,4	1,5
Ac.Cit + NaCl 3	8,5	3,36	28,69	1,6	

7. Fontirrochi G, Dueñas M, Fernández ME, Fuentes P, Pérez M, Mainet D, *et al*. A mouse hybridoma cell line secreting IgG and IgM monoclonal antibodies with specificity for the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). Biotecnología Aplicada 1993;10(1):24–30.

8. Sasson A. Recombinaciones genéticas y campo de aplicación. En: Las biotecnologías desafíos y promesas. Eds. Oficina de publicaciones del Consejo de Estado, La Habana, Cuba 1994.

9. Manil L, Motte P, Pernas P, Troalen F, Bohuon C, Bellet D. Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. J Immunol Meth 1986; 90:25–37.

10. Anónimo. Monoclonal antibody purification. Separation News 1986;13(4).

11. Lowry OH, Rosembrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurements with folin-phenol reagent. J Biol 1951;193: 256–69.

12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 1970;227: 680–5.

Los tiempos totales fueron 105 min para el procedimiento 1, y entre 73 y 75 min para los procedimientos restantes, lo que equivale a una disminución de 30% aproximadamente. Esto se debe a que el tiempo requerido para equilibrar la columna se reduce a la mitad por no utilizar PBS pH 8 como tampón de equilibrio, y por eliminar el lavado con ácido cítrico 0,1 M pH 5.

En las Figuras 1 y 2, se muestra el grado de pureza obtenido a través de los diferentes procedimientos en la etapa de purificación por afinidad con la proteína A. En la Tabla 2, se muestra que el anticuerpo purificado tiene un grado de pureza > 90% y un rendimiento de AcM específico > 70% en las cuatro variantes (éstos son los principales parámetros que se afectan si uno de los procedimientos no es eficaz). El procedimiento 2 es el óptimo por el alto grado de pureza que se obtiene, porque el rendimiento es similar al de los procedimientos restantes, y porque se logra reducir el tiempo y el costo.

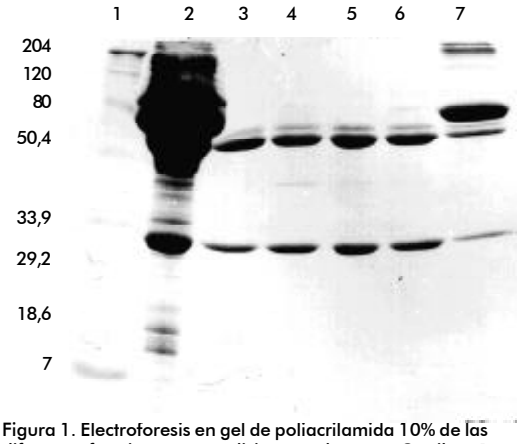

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida 10% de las diferentes fracciones en condiciones reductoras. Carrilera 1, patrón de peso molecular; 2, ascitis; 3, réplicas del procedimiento 1 (aplicación PBS pH 8); 4, réplicas del procedimiento 4 (aplicación ácido cítrico pH 5 y fuerza iónica ajustada con cloruro de sodio); 5, réplicas del procedimiento 3 (aplicación ácido cítrico pH 5 y fuerza iónica ajustada con citrato de sodio); 6, réplicas del procedimiento 2 (aplicación ácido cítrico pH 5); 7, control positivo (IgG2b purificada + BSA). A la izquierda se muestran los pesos moleculares en kD.

Recibido en octubre de 1999. Aprobado en enero del 2000.

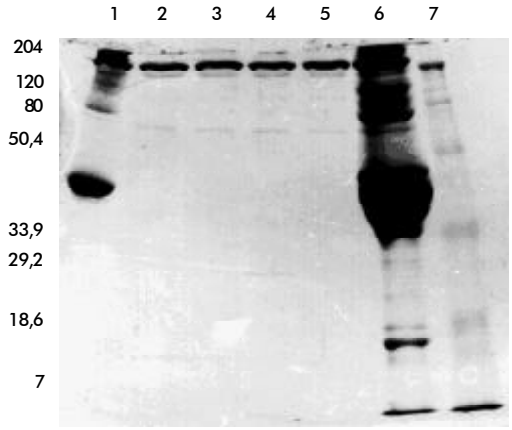

Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida 10% de las diferentes fracciones en condiciones no reductoras. Carrilera 1, Control positivo (IgG2b purificada + BSA); 2, réplicas del procedimiento 2 (aplicación ácido cítrico pH 5); 3, réplicas del procedimiento 3 (aplicación ácido cítrico pH 5 y fuerza iónica ajustada con citrato de sodio); 4, réplicas del procedimiento 4 (aplicación ácido cítrico pH 5 y fuerza iónica ajustada con cloruro de sodio); 5, réplicas del procedimiento 1 (aplicación PBS pH 8); 6, ascitis; 7, patrón de peso molecular. A la izquierda se muestran los pesos moleculares en kD.

Tabla 2. Comparación de los resultados y el costo de cada procedimiento.

Procedimiento	Grado de pureza en condiciones reductoras (%)	Grado de ureza en condiciones no reductoras (%)	Recobrado	AcM específico en el total de proteínas (%)	Gasto por insumo (USD)
1	95	100	69,62	101,4	0,2
2	95	100	61,48	90,1	0,2
3	95	100	66,77	110,4	0,4
4	96	100	60,66	107,1	0,21

Conclusiones

Se logró disminuir en 30% aproximadamente el tiempo de duración de la etapa de purificación por afinidad con la proteína A, con el empleo de ácido cítrico 0,1 M pH 5 como tampón de equilibrio. La puesta en práctica de este procedimiento permite obtener el AcM en menos tiempo con un grado de pureza elevado, un por ciento elevado de AcM específico en el total de proteínas y un rendimiento similar al del procedimiento actual.

Se comprobó que para la IgG2b, el grado de pureza del producto es independiente de la fuerza iónica entre 12-15 mS/cm en el tampón de aplicación.