

Purificación de Inmunoglobulina-G humana y anti-Inmunoglobulina-G Humana de cabra

Jáuregui M. J. M. Betancourt L. M. Arbeláez R. L. F.
Grupo de Investigación en Biomoléculas.
Universidad de Pamplona
Email: luifer@unipamplona.edu.co

Recibido 28 Agosto de 2006

Aceptado 27 Octubre 2006

ABSTRACT

The immunoglobulin-G are used intravenously in different pathologies like: Guillan Barre, Kawasaki, spontaneous abortion, measles, smallpox, Varicella and AIDS. The immunoglobulin-G is used in human beings and it is very important to have a high degree of purity avoiding any contamination since this is going to be used as therapy. Two methods of purification were studied for both human immunoglobulin-G and anti-immunoglobulin-G from the she-goat. This work demonstrates the purification by the precipitation method; this is the method of choice in order to obtain a maximum amount of protein from both the human immunoglobulin-G as well as from the she-goat's anti-immunoglobulin-G.

A high purity of 96% was approached by this method facilitating the use of these products found in our country (Colombia, South America) as a national product with a lower price than found internationally. This benefits both the patient who needs this therapy as well as the investigative groups that research with anti-bodies and the diagnostic companies that use immunoglobulin-G and anti-immunoglobulin-G in the production of Elisa and Western Blott Kits.

KEY WORDS

Ammonium sulphate, Immunoglobulin, Affinity Chromotagrophy, SDS-PAGE, Precipitation.

RESUMEN

La inmunoglobulina-G es usada de forma intravenosa en el tratamiento de diferentes patologías como lo son Guillan Barré, Kawasaki, abortos espontáneos, sarampión, viruela, varicela y sida; teniendo en cuenta lo anterior, es de vital importancia tener un alto grado de pureza que facilite su uso como medicamento.

En este estudio se compararon dos métodos de purificación tanto para Inmunoglobulina-G humana como para la anti-inmunoglobulina-G humana de cabra. Se demostró que la precipitación es el método que se debe elegir para obtener una máxima cantidad de proteína tanto para la inmunoglobulina-G humana como para la anti-inmunoglobulina-G humana de cabra. Se demostró que por este método se alcanza una pureza aproximada del 96 %, lo que facilitará el uso de estas proteínas en nuestro

país como un producto nacional, con costos por debajo de los precios internacionales, tanto para los pacientes que lo necesitan, como para los grupos de investigación que las utilizan y compañías de diagnóstico que emplean inmunoglobulina-G y anti-inmunoglobulina-G en la producción de estuches de Elisa y Western Blott.

PALABRAS CLAVES

Amonio Sulfato, Inmunoglobulina-G, cromatografía de afinidad, SDS-PAGE, precipitación.

INTRODUCCIÓN

Las inmunoglobulinas (Igs), son moléculas producidas por las células terminales en la diferenciación de las células B conocidas como células del plasma (HALABY, et al, 1999). Las Igs tienen un papel importante en la inmunidad humoral, existen 5 clases: Inmunoglobulina-G (IgG), inmunoglobulina-A (IgA), inmunoglobulina-D (IgD), inmunoglobulina-E (IgE) y la inmunoglobulina-M (IgM) (ARCE A AND GUERREIRO, 2001). La más abundante de las cinco es la IgG (85%), con un peso molecular de 150 kDa (SANDIN, et al, 2004), está presente en el suero y en secreciones externas y son expresadas en la membrana de las células B (HALABY, et al, 1999).

Las Igs son una parte crucial de nuestro sistema de defensa inmunológica, sus estructuras han sido estudiadas en cuanto a su flexibilidad individual en estudios tomográficos para la IgG. Estas Igs tienen 3 fragmentos que son referidos como "subunidades", las cuales son dos fragmentos de brazos idénticos de unión al antígeno (Fab) y el otro conocido como (Fc). Los brazos del Fab son conectados con el vástago Fc por bisagras, las cuales están compuestas por uniones o puentes disulfuros (SANDIN, et al, 2004). Las Igs son utilizadas a nivel terapéutico, investigativo, industrial y diagnóstico (SONDERMANN AND OOSTHUIZEN, 2002), de ahí la importancia de obtener las Igs aisladas de las demás proteínas plasmáticas con una pureza superior al 95%.

Las IgG altamente purificadas son actualmente utilizadas en el tratamiento de patologías y síndromes como: Guillan Barré que es una Polineuropatía Inflamatoria Aguda Idiopática, que puede aparecer luego de una infección pero muy

frecuentemente ningún factor predisponente se ha identificado, como terapia se ha utilizado la plasmaféresis la cual es efectiva si se realiza precozmente.

La administración Intravenosa de IgG purificada ha demostrado ser muy efectiva, hoy en día es utilizada en hospitales y clínicas de forma rutinaria. (ABD-ALLAH, et al, 1997; MORRIS AND RYLANCE 1994; REES 1993, ØSTENSEN et al 2006).

A la Hepatitis se le han determinado al menos 5 agentes infecciosos distintos, denominados A, B, C, D y E (SHEARER et al, 1999). El cuadro clínico que producen estas variantes es similar, pero la evolución, complicaciones y propiedades antigénicas de cada agente son diferentes, la más estudiada para el uso de tratamiento con IgG es la hepatitis A que es una infección sistémica que compromete fundamentalmente al hígado, este se inflama y deja de funcionar correctamente. (WINOKUR AND STAPLETON 1992).

La enfermedad de Kawasaki también conocida como síndrome del nodo linfático muco-cutáneo de la infancia, ocurre principalmente en niños menores de 5 años de edad, es una enfermedad epidémica y endémica a nivel mundial siendo un problema particular en el Japón. La causa es desconocida aunque se ha sugerido una etiología infecciosa, el adecuado diagnóstico y tratamiento inmediato son esenciales en la obtención de resultados positivos. El tratamiento con aspirina e IgG intravenosa han sido y son la elección, ya que se ha demostrado que muy pocos pacientes han fallado en responder a este tratamiento. (DAJANI, et al, 1993, SUNDEL

1993, HARBOE AND INGILD 1983, ØSTENSEN et al 2006).

Aunque los abortos espontáneos y las pérdidas fetales se les han identificado múltiples causas, entre estas la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (anticoagulante lúpico y anticardiolipina) en la madre, la administración de IgG Intravenosa durante el embarazo han hecho que estas mujeres puedan tener embarazos exitosos (FRANCOIS, et al, 1988, VÁZQUEZ 2006).

En muchas otras patologías se han utilizado las IgG exitosamente en las cuales se pueden nombrar el sarampión, la viruela, la varicela y el Sida (VIH). (PENNINGTON, 1990, STEELE AND STRATMANN 2006).

Las IgG así como la anti-IgG son comúnmente utilizadas en el diagnóstico de diversas patologías y los estuches producidos a nivel mundial para el diagnóstico están basados en el método ELISA que requiere de IgG y anti-IgG. En este proyecto de la Universidad de Pamplona se han producido la IgG y anti-IgG de alta pureza, lo que nos permitirá a nivel nacional la producción de muchos de estos productos que de momento son comprados en el exterior a altos costos inhibiendo el tratamiento terapéutico y el estudio de nuestra población en diversas patologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Sulfato de amonio (SA), acetato de sodio (NaAc), carbonato di-sodio (CS), Cloruro de Sodio (NaCl) y Sephacryl S-200 (Riedel de Haën), bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (Sigma Fine chemicals) Hidroximetil-aminometano (Tris) ácido acético (AC) (Fluka), Di-Hidrógeno fosfato de sodio (Merck), ácido clorhídrico (HCl) (FabroQuim), acrilamida, bisacrilamida, glicina, dodecil sulfato de sodio (SDS), azul de bromofenol, persulfato de amonio (PSA) y TEMED (BioRad). Todos estos reactivos fueron de la mas alta calidad existentes en el mercado internacional.

Muestras de Suero

Se realizó una toma de muestra de sangre en

ser humano bajo los siguientes criterios:

Consentimiento informado y por escrito del paciente, siguiendo los artículos 15 y 16 del decreto 08430 de 1993, explicando la naturaleza de la investigación y la posibilidad de retirarse de la misma en el momento que así el paciente lo desee.

Las pruebas de sangre de los animales fueron tomadas por un médico veterinario y manejadas de acuerdo a la normatividad vigente en nuestra sociedad; bajo procedimiento totalmente protocolizado.

Inmunización con IgG-humana

Se inmunizo una Cabra de 25 Kg, la cantidad del inmunógeno utilizado fue de 5 mg total de IgG purificada, y el volumen aplicado fue de 1.904 μl (0,87 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), la mezcla del inmunógeno y el adyuvante incompleto de Freund's fue inyectado por vía intramuscular cada 8 días, tres veces. La muestra de sangre se recolecto en una bolsa sin anticoagulante y sin inhibidor de proteasas. El suero se obtuvo por centrifugación de la sangre a 2500 r.p.m./10 minutos a +4°C, en una Centrifuga KR25i Jouan de mediana velocidad, el suero fue decantado y conservado a -20°C hasta su utilización.

Precipitación con sulfato de amonio

La precipitación del suero se realizo a +4°C, Igual volumen de suero y SA al 27% (ED HARLOW, et al 1988), fueron mezclados adicionando lentamente el SA al suero bajo constante agitación durante 3 horas. Luego este fue puesto en reposo de 2 - 4°C por 18 horas, la mezcla fue centrifugada a 6000 r.p.m./15 minutos, el precipitado fue lavado con 3 x 8 ml de SA al 27% y se centrifugo a 6000 r.p.m./15 minutos en la misma Centrifuga. El precipitado se redisolvió en 94 ml de agua tipo 3, dializado contra agua tipo 3, (4 x 200 ml) y contra 70mM NaAc pH 5,5 (4 x 120 ml). La muestra dializada se centrifugo a 6000 r.p.m./15 minutos, el pH del sobrenadante se ajusto a 8,5 con una solución que contenía 0.2M NaHCO_3 y 1.0M Na_2CO_3 .

Cromatografía de afinidad

La cromatografía se realizo para suero

precipitado con amonio sulfato y suero sin precipitar.

Una columna de 5 x 0,25 cm de Proteína A (Biorad) fue equilibrada con 50 ml de buffer 100 mM de NaHCO_3 pH 8,5, a una rata de flujo de 6 ml/minutos, 10 ml de la solución proteica se aplicaron a la columna, luego se lavó aproximadamente con 75 ml de buffer 100mM NaHCO_3 pH 8,5 a una rata de flujo de 0,6 ml/minutos, hasta que la absorbancia $A_{280} \leq 0.01$. La IgG fue eluida con 25 ml de buffer 100mM de NaAc pH 4,5 a una rata de flujo de 0,6 ml/minutos, se colectaron fracciones de 1,5 ml en tubos que contenían 100 μl de 1M Tris pH 8,8 para neutralizar la muestra ácida. La muestra fue concentrada utilizando una celda de Amicon con filtro de celulosa regenerada de 10 KDa, la absorbancia A_{280} fue determinada y se utilizó el coeficiente de absorción $(e^{1\%})_{1\text{cm}} = 1,35$ para determinar su concentración (LAYNE, 1957. PETERSON 1983).

Cromatografía de Exclusión

Una columna de 120 cm x 0,5 cm (BioRad), que contenía Sephacryl S-200 fue equilibrada con 200 ml de 5mM NaH_2PO_4 , 100mM NaCl pH 7,3 a una rata de flujo de 0,5 ml/minutos. 4 ml de la muestra fueron aplicados a la misma velocidad y la muestra eluida con el mismo buffer a la misma velocidad y colectada en fracciones de 14 ml en cada tubo.

Electroforesis SDS-PAGE

Se elaboró un gel denaturante de electroforesis al 10% de acuerdo al método de (LAEMMLI, 1970), 5 μg de proteína se mezclaron en relación 1:1 (vol/vol) con buffer de carga SDS. Las proteínas fueron teñidas con azul brillante de Coomassie.

Anti-IgG-humana en Cabra

Para realizar la purificación de la anti-IgG-humana en Cabra se aplicó el método antes mencionado (Precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión y electroforesis).

Técnica inmunoprecipitación

A 50 ml de solución salina al 0,85% se le adicionaron 1,5 gramos de agarosa y se calentó hasta su total disolución, la solución fue aplicada por capilaridad en placas de 7 por 2,1 cm a temperatura ambiente hasta su total gelación. Se le hicieron 5 perforaciones, una en el centro donde se aplicó la anti-IgG y las cuatro perforaciones restantes alrededor de este centro, donde se colocaron muestras de antígenos. Las placas fueron incubadas a 2 – 5°C durante 24-48 horas.

RESULTADOS

Los perfiles de elusión de las IgGs precipitada y sin precipitar de la columna de proteína A son comparados en la Figura # 1, el pico 1 demuestra la proteína que tanto en la preparación precipitada con SA como en la preparación sin precipitar, pasan sin ser retenidas en la columna, el pico # 2 corresponde a la IgG precipitada con SA y el pico # 3 corresponde a la IgG no precipitada y aplicada a la columna de proteína A en forma de suero. (El cromatograma para la purificación de la anti-IgG, dio el mismo resultado), la solución proteica colectada fue analizada electroforéticamente como se demuestra en la figura 2, carril 1 para la IgG humana de suero sin precipitar y el carril 2 IgG precipitada con SA, en ambas preparaciones se visualizan contaminantes de alto peso molecular “polímeros de IgG”. En la cromatografía de exclusión se obtuvo solo un pico como se demuestra en la figura # 3, motivo por el cual se analizaron electroforéticamente todos los tubos que contenían proteína, para identificar con precisión la posición de los contaminantes identificados en la figura 2 carril 1 y 2. Las fracciones con contaminantes en particular “polímeros” fueron identificadas en los primeros tubos y excluidos, el resto es colectado y de nuevo analizadas electroforéticamente, sus resultados se visualizan en la figura # 4, el carril 1 corresponde a la IgG sin precipitar, mientras que el carril # 2 es la IgG precipitada con SA, en la figura se indican tanto las cadenas pesadas como livianas.

Tanto la IgG purificada por precipitación como la IgG sin precipitar fueron identificadas por

inmunoprecipitación como se demuestra en la figura 5a y 5c respectivamente, además, se demuestra que la anti-IgG de cabra, forma precipitado con suero humano como control figura 5b.

DISCUSIÓN

Si bien el perfil cromatografico para la IgG de suero humano sin y precipitado con SA muestra una clara superposición, en la aplicación de la muestra (Figura # 1 pico # 1), así como en el lavado y elución de la misma (Figura # 1 picos # 2,3), se ven claras diferencias en los métodos utilizados que puede ser de importancia para la determinación de cual utilizar, por ejemplo el pico # 2 es mucho mas grande que el # 3 clara indicación que el suero no precipitado (Figura # 1 pico # 2) contiene sustancias que inhiben la unión de la IgG a la columna de proteína A, dando como resultado menores cantidades de IgG en la preparación final. Además se muestra en la figura # 2 que la IgG no precipitada (Figura # 2 carril # 1) contiene mayores contaminantes de alto peso molecular (polímeros), comparado con la IgG precipitada (Figura # 2 carril # 2), esto continua reduciendo la cantidad de IgG en la preparación sin precipitar.

Cabe resaltar que ambas preparaciones tienen una alta pureza y que reaccionan de igual forma con la anti-IgG humana de cabra como se demostró, donde tanto la IgG precipitada como la no precipitada y el suero humano forman complejos IgG-anti-IgG (Figura # 5, 5a, 5b, 5c). Queda demostrado en la figura # 2 que la cromatografía de afinidad per se, no es suficiente en la purificación de la IgG, máxime cuando dicha proteína se utiliza terapéuticamente en humanos. La cromatografía de exclusión se torna indispensable para la eliminación de los polímeros o moléculas de alto peso molecular identificados en la figura # 2. Estos polímeros fueron identificados en las primeras fracciones de la cromatografía de exclusión y excluidos los demás analizados de forma electroforética como se demuestra en la figura # 4 al compararla con la figura # 2. Queda comprobado mas allá de cualquier duda que ambos métodos dan como resultado una IgG de alta pureza. Alusivo a un

punto de vista económico, es necesario utilizar la precipitación para obtener la máxima cantidad de IgG posible máxime cuando la IgG es una de las proteínas mas resistentes a la desnaturalización. Solo puede ser conveniente el uso del método sin precipitación en casos de investigación donde se requiere un mínimo de desnaturalización. Con este estudio y la purificación de la IgG del suero humano como la producción y purificación de anti-IgG humana en cabra, abrimos al mercado nacional una enorme posibilidad, de utilizar la IgG purificada en las patologías que lo requieren a nivel nacional así como a los grupos de investigación la posibilidad de conseguir las IgG para sus antígenos de una forma más económica y rápida.

De igual manera la producción de la anti-IgG, que son de uso en el mercado diagnóstico para la producción de estuches de Elisa, Western Blott, los cuales son utilizados para la determinación de patologías que aun no se diagnostican en nuestro país, como la determinación de los factores de coagulación y fibrinólisis, estos producen deficiencias y mutaciones que dan origen a problemas cardiovasculares, primera causa de muerte a nivel mundial.

CONCLUSIONES

Se hace necesario para esta clase de procedimientos la precipitación con SA ya que nos permite procesar grandes volúmenes de muestra, además de que nos permite la concentración de IgG.

Es indispensable hacer uso de la cromatografía de exclusión para asegurar altos estándares de pureza de los productos (monómeros de IgG).

Este método demuestra además que la purificación de Igs y anti-IgG se puede hacer con el mismo método.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue aprobado y auspiciado económicamente por la vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Pamplona agradecemos la colaboración del Doctor Freddy Solano Ortega.

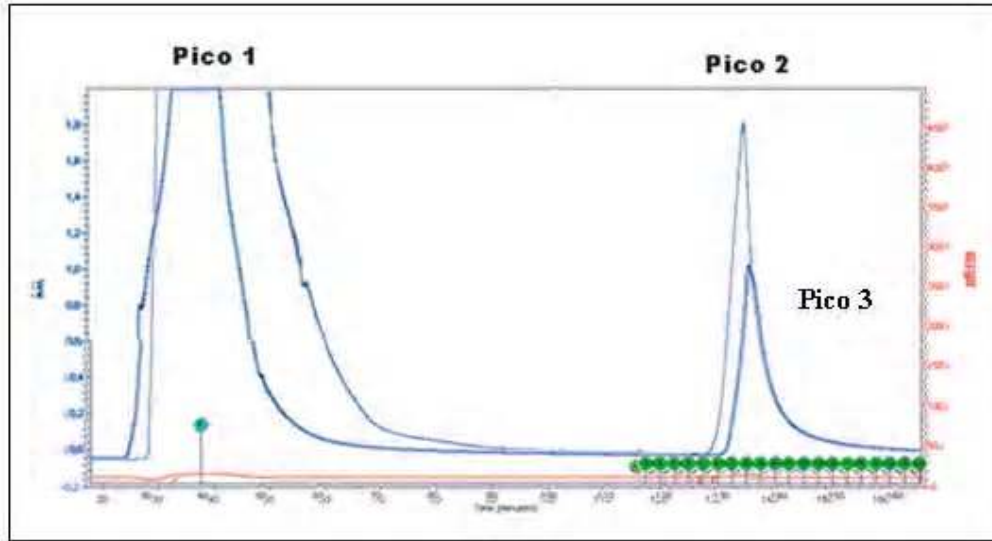


Figura 1. Superposición de los cromatógramas de purificación por afinidad del suero humano precipitado con SA y sin precipitar

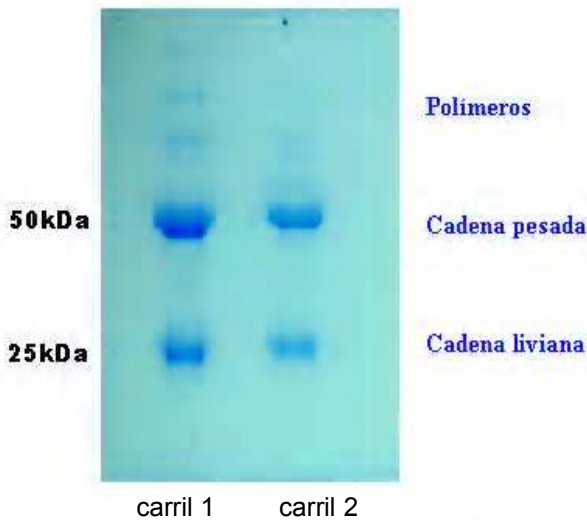


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE 10% de IgG humana. Carril 1: IgG humana de suero sin precipitar. Carril 2: IgG humana de suero precipitado. Después de la cromatografía de afinidad

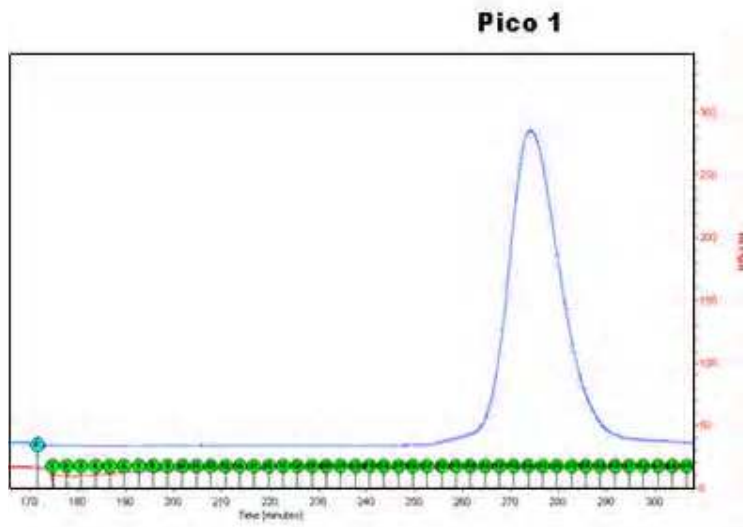


Figura 3. Perfil cromatográfico de la IgG, en una columna de Sephacryl S-200.

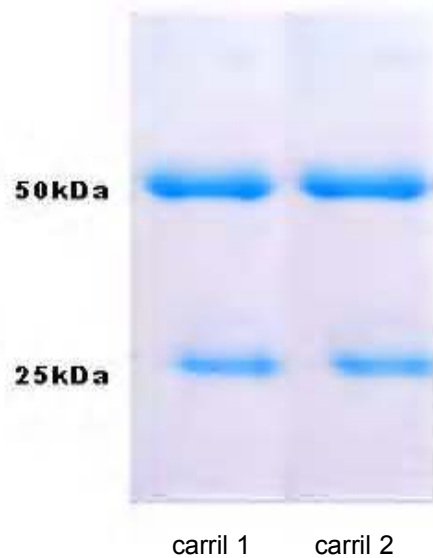


Figura 4 Electroforesis SDS-PAGE 10%. Carril 1 IgG humana sin precipitar y carril 2 IgG humana precipitada. Después de la cromatografía de exclusión.

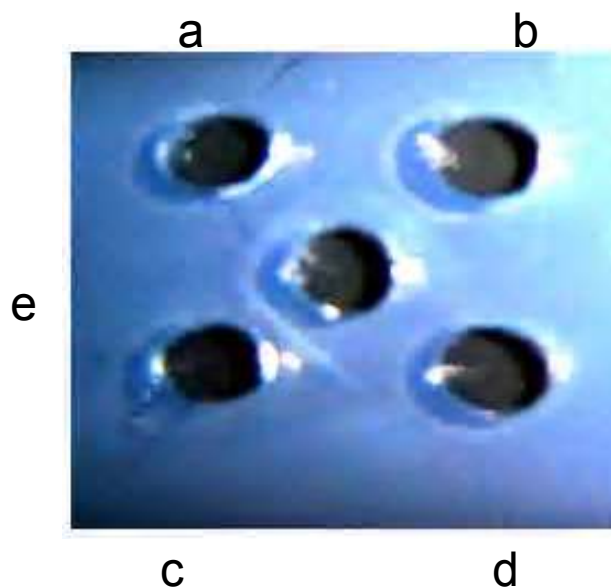


Figura 5. Análisis de inmunoprecipitación de la IgG y anti IgG purificadas a) IgG purificada sin precipitar b) suero humano (control positivo), c) IgG purificada por precipitación con SA, d) solución salina 0.85% (control negativo), e) anti-IgG purificada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd-Allah SA, Jansen PW, Ashwal S, Perkin RM (1997) Intravenous immunoglobulin as therapy for Guillain-Barré syndrome Journal Child Neurology Vol 12: 376-380.

Arce A, y Guerreiro A (2001) Purificación de IgG1, IgG2 e IgG3 Mediante cromatografía de afinidad a partir de intactoglobin Revista Cubana Hematología Inmunología Hemoterapia Vol 17: 138-141.

Dajani AS, Taubert KA, Gerber MA, Shulman ST, Ferrieri P, Freed M, Takahashi M, Bierman FZ, Karchmer AW, Wilson W (1993) Kawasaki Circulation Vol 5: 1776-80.

Francois A, Freund M, Daffos F, Remy P, Aiach M, Jacquot C (1998) Annals of Internal Medicine Vol 109: 993-4.

Halaby DM, Poupon A, Mornon JP (1999) The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Engineering* Vol 12: 563-571.

Harboe NMG and Ingild A (1983) Immunization, Isolation of Immunoglobulins and antibody titre determination, *Scandinavian Journal Immunology* Vol 17: 345,-351.

Harlow Ed and David Lane (1988) *Antibodies a laboratory manual*, cold spring Harbor laboratory Capit 8 pag 298-314-318.

Laemmli UK (1970) cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* Vol 227: 680-685.

Layne E (1957) spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, *Methods Enzymology* Vol 3: 447-454.

Morris K, Rylance G (1994) Guillain-Barré syndrome after measles, mumps and rubella vaccine. *Lancet* Vol 343: 60.

Østensen M, Khamashta M, Lockshin M, Parke A, Brucato A (2006) Anti-inflammatory and immunosuppressive drugs and reproduction, *Arthritis Research and Therapy* Vol 8: 209

Pennington JE (1990) Newer uses of intravenous immunoglobulins as anti-infective agents. *Antimicrob Agents Chemother* Vol 34: 1463-6.

Peterson GL (1983) Determination of total protein, *Methods Enzymology* Vol 91: 95-119.

Rees J (1993) Guillain Barré syndrome the latest on treatment. *Brazilian Journal Hospital Med* Vol 50: 226-9.

Sandin S, Ofverstedt LG, Wikstrom CH, Wrangé O, Skoglund U (2004) Structure and Flexibility of Individual Immunoglobulin G Molecules in solution *Structure*, Elsevier Science Vol 12: 409-415.

Shearer M, Dark R, Chodosh J, Kennedy R (1999) Comparison and Characterization of Immunoglobulin G subclasses among Primate species *Clinical and diagnostic Laboratory Immunology* Vol 6: 953 - 958.

Steele L.S. Stratmann H (2006) Counseling lesbian patients about getting pregnant, *Canadian Family Physician* Vol 52: 605 - 611.

Sondermann P and Oosthuizen V (2002) Biochemical immunology group colloquium organized University Heriot Watt Edinburgh Vol 8: 10.

Sundel RP (1993) Gamma globulin re-treatment in Kawasaki disease *Journal of Pediatrics* Vol 123: 657-9.

Vázquez P JA (2006) Human Immunodeficiency Virus type I in seronegative infants born to HIV I infected mothers *Virology Journal* Vol 3: 52.

Winokur PL, Stapleton JT (1992) Immunoglobulin prophylaxis for hepatitis A *Clinical Infectious Diseases* Vol 14: 580-586.