

PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IL6 UTILIZANDO TÉCNICAS DE PRECIPITAÇÃO E CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO SELETIVA

I. R. A. P. Bresolin¹; I. T. L. Bresolin²; A. Pessoa¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP – Brasil
Email: lara.bresolin@gmail.com.br

²Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP Diadema
Rua São Nicolau, 210 – CEP: 09913-030 – Diadema – SP – Brasil

RESUMO: Anticorpos monoclonais (AcMos) têm sido largamente empregados em testes imunodiagnósticos para detecção de diversas moléculas de interesse na área clínica, como hormônios, imunoglobulinas e citocinas, como a Interleucina-6 (IL6). Para que se obtenha o anticorpo no nível de pureza requerido para estas aplicações, são necessárias várias etapas de recuperação e purificação de bioprodutos (RPB). Desta forma, os objetivos deste trabalho foram a recuperação e purificação de um AcMo anti-IL6 a partir do sobrenadante de cultura celular, aliando técnicas de precipitação e cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC), visando sua posterior aplicação em kits de diagnóstico. Foi possível purificar o AcMo através de precipitação com sulfato de amônio na faixa de 20-40% de saturação, seguida de adsorção em IMAC com Zn(II) imobilizado. Os AcMos foram obtidos com pureza de 100% e fator de purificação global de 24,2 vezes, demonstrando a viabilidade do método.

PALAVRAS-CHAVE: adsorção; anticorpos monoclonais; precipitação; cromatografia.

ABSTRACT: Monoclonal antibodies (MAbs) have been widely used in immunodiagnostic tests aiming at the detection of several molecules of interest in the clinical area, such as hormones, immunoglobulins and cytokines, such as interleukin-6 (IL-6). In order to obtain the antibody in a required level of purity for these applications, several stages are necessary in the downstream processing. Thus, the objectives of this work were the recovery and purification of an anti-IL6 MAb from cell culture supernatant, combining precipitation and immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC), aiming its subsequent application in diagnostic kits. Results have shown that it was possible to purify MAbs by precipitation with ammonium sulfate at 20-40% saturation, followed by adsorption on IMAC with immobilized Zn(II). The MAbs were obtained with a purity of 100% and the overall purification factor of 24.2 times, proving the feasibility of the method.

KEYWORDS: adsorption; monoclonal antibodies; precipitation; chromatography.

1. INTRODUÇÃO

Anticorpos Monoclonais (AcMos) são imunoglobulinas (IgGs) secretadas por clones de linfócitos B normais, tumorais ou obtidos pela tecnologia de hibridomas (Köhler e Milstein, 1975), que têm sido largamente

empregados em testes imunodiagnósticos para detecção de diversas moléculas de interesse na área clínica, como hormônios, citocinas e imunoglobulinas. Uma destas citocinas é a Interleucina-6 (IL6), que desempenha um papel central no sistema imune, influenciando as respostas antígeno-específicas e as reações



inflamatórias. A elevação da produção da IL6 é um dos principais fatores envolvidos em doenças como osteoporose, câncer de próstata e processos infecciosos, sugerindo que ela influencie na regulação das respostas fisiológicas às doenças (Heinrich et al., 2003).

Os AcMos podem ser produzidos industrialmente empregando sistemas de biorreatores, porém a baixa concentração obtida na produção *in vitro* juntamente com a complexidade do meio, dificultam as etapas de recuperação e purificação (RPB). Além disso, o alto grau de pureza requerido para o AcMo para tais aplicações exige o uso de técnicas de alta seletividade (Voigt e Zintl, 1999).

Uma variedade de técnicas tem sido utilizada nas etapas de RPB para que se obtenha os AcMos nos níveis de pureza requerido para suas aplicações. A maioria destas operações unitárias em sequência alia técnicas como precipitação e cromatografia, podendo até atingir 80% do custo total do bioprocessamento (Clonis, 2006).

Dentre os métodos utilizados para a precipitação de biomoléculas destaca-se o *salting-out* com sulfato de amônio (Deutscher, 1990), cujas aplicações com AcMos são apresentadas na literatura (El-kak e Vijayalakshmi, 1991; Serpa et al., 2005 e Bresolin et al., 2010). Entretanto, visando uma maior resolução na purificação dos AcMos, técnicas cromatográficas de adsorção seletiva são frequentemente utilizadas, destacando-se ligantes tiofílicos, biomiméticos, peptídeos, aminoácidos e íons metálicos imobilizados.

A técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) se popularizou com o trabalho de Porath et al. (1975). O princípio da técnica de IMAC está baseado na afinidade que íons metálicos quelatados em uma matriz sólida apresentam por certos aminoácidos acessíveis (como a histidina) situados na superfície de uma biomolécula em solução. Devido à presença de uma região rica em histidina presente em várias classes de IgG (humana, murina, cobaia e coelho), a técnica de IMAC vem sendo utilizada para a purificação de anticorpos de

diversas fontes (Porath e Olin, 1983; Hale e Beidler, 1994; Serpa et al., 2005; Zimmerman et al., 2006; Martins et al., 2006; Platis et al., 2008; Bresolin et al., 2010).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo a purificação de AcMos anti-IL6 a partir do sobrenadante de cultura celular utilizando-se técnicas de precipitação por sulfato de amônio seguido de cromatografia de adsorção seletiva – IMAC – visando sua posterior aplicação na composição de kits de diagnóstico, avaliando parâmetros como pureza, rendimento e seletividade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Sobrenadante de Cultura Celular

O sobrenadante de cultura celular contendo AcMos IgG₁ murina anti-IL6 (100 µg/mL), produzidos pelo cultivo de hibridomas em biorreator foi fornecido pela empresa Rheabiotech Desenvolvimento, Produção e Comercialização de Produtos de Biotecnologia Ltda., com sede em Campinas/SP.

2.2. Precipitação

A precipitação dos AcMos foi realizada utilizando o método clássico com sulfato de amônio a 4°C. Todos os precipitados foram ressuspendidos e dialisados contra tampão Tris-HCl 25 mmol/L, pH 7,0, utilizando-se sacos de diálise.

2.3. Ensaios Cromatográficos (IMAC)

Os ensaios cromatográficos foram realizados em baixa pressão, utilizando coluna de vidro (10 cm de altura × 1 cm diâmetro interno) devidamente empacotada com 1,0 mL de gel de agarose (diâmetro médio de 90 µm) contendo o agente quelante ácido iminodiacético (IDA) e o íon metálico Zn(II). Foram utilizados os tampões zwitteriônicos ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) e ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES). Em todos os experimentos a corrente de saída da coluna cromatográfica foi monitorada em termos de absorbância a 280 nm.

2.4. Análise de Proteína Total

A concentração de proteína total nas amostras foi determinada por meio de absorbância a 595 nm, usando o método de Bradford (1976).

2.5. Eletroforese SDS-PAGE

As amostras proteicas obtidas nas etapas do processo de RPB foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes e não redutoras em géis de poliacrilamida, conforme Laemmli (1970). Após desnaturação, 15 µL de cada amostra foram aplicadas nos géis e estes submetidos a uma voltagem de 180 V utilizando o equipamento Mini-Protean Tetra Cell (BioRad, EUA).

2.6. Quantificação dos AcMos

A quantificação dos AcMos anti-IL6 foi feita através da intensidade de bandas da eletroforese SDS-PAGE com o auxílio do programa ImageJ.

2.7. Western Blotting

Estes ensaios foram realizados de acordo com Towbin et al. (1979) para efetuar a imunodeteção dos AcMos purificados, usando o equipamento Mini Transblotting (BioRad, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Precipitação

Realizou-se precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura celular contendo o anticorpo anti-IL6 com sulfato de amônio, mantendo-se o sobrenadante a 4°C e adicionando-se lentamente o sulfato de amônio. Foram avaliadas as seguintes faixas de saturação de sulfato de amônio: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%. Os resultados do balanço de massa em termos de proteína total e AcMos estão apresentados na Tabela 1. A Figura 1 (a e b) representa a eletroforese SDS-PAGE e o *Western blotting* respectivamente, de cada fração precipitada.

Tabela 1. Balanço de massa de proteína total e de AcMos da precipitação do sobrenadante de cultura celular com sulfato de amônio a 4°C.

Etapas	Proteína total (mg)	Proteína total (%)	AcMos (mg)	AcMos (%)	Pureza (%)	Fator de Purificação
Amostra inicial	23,20	100,00	1,00	100,0	4,31	1,00
0-20% de saturação	0,02	0,09	0,00	0,0	0,00	0,00
20-40% de saturação	1,77	7,63	0,52	52,0	29,37	6,81
40-60% de saturação	3,33	14,35	0,22	22,0	6,61	1,53
60-80% de saturação	7,76	33,45	0,10	10,0	2,19	0,51
80-100% de saturação	0,62	2,67	0,06	6,0	9,68	2,24
Proteínas não precipitadas	9,70	41,81	0,10	10,0	-	-

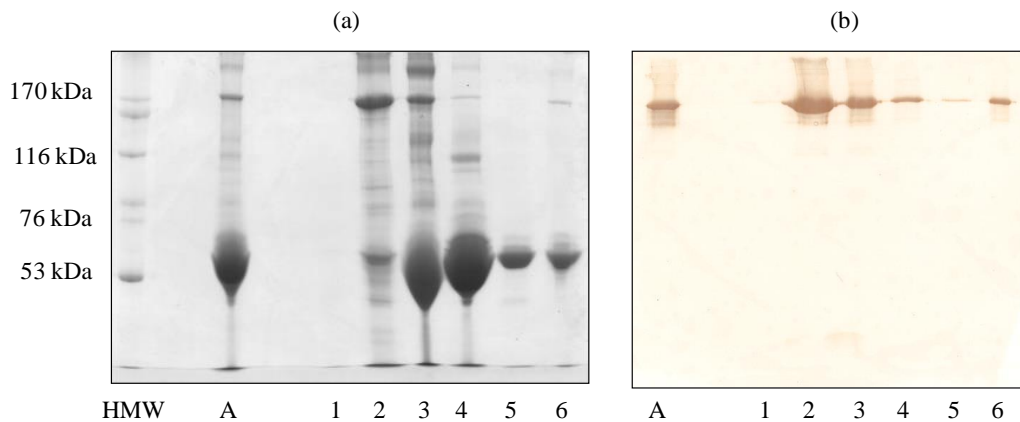


Figura 1. Precipitação com sulfato de amônio das proteínas do sobrenadante de cultura celular contendo AcMos anti-IL6 a 4°C. (a) Eletroforese SDS-PAGE. (b) *Western blotting*. (HMW) Marcador de alta massa molar. (A) Amostra antes da precipitação. (1 a 5) Frações de saturação de sulfato de amônio: 0-20%; 20-40%; 40-60%, 60-80% e 80-100%. (6) Proteínas não precipitadas.

O melhor resultado de purificação do anticorpo ocorreu na fração de 20-40% de saturação de sulfato de amônio, onde 52% dos anticorpos foram recuperados (valor obtido através da intensidade de banda da eletroforese da Figura 1-a com o auxílio do programa ImageJ). A pureza desta fração foi de 29,37% e o fator de purificação de 6,81. O *Western blotting* da Figura 1-b confirma que as bandas de proteínas em torno de 150 kDa na eletroforese são os AcMos tipo IgG₁ murina.

A literatura consultada recomenda o uso de uma faixa de saturação de 50% (El-kak e Vijayalakshmi, 1991; Serpa et al., 2005 e Bresolin et al., 2010). Entretanto, como cada tipo de anticorpo apresenta comportamento distinto quando submetido à precipitação, recomenda-se avaliar a eficiência de precipitação em faixas de saturação, como a realizada neste estudo.

3.2. Ensaios Cromatográficos (IMAC)

Realizaram-se cromatografias com sobrenadante de cultura celular contendo AcMos anti-IL6 nos sistemas tamponantes MOPS 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, 2 mmol/L de imidazol, pH 7,0 e MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, 2 mmol/L de imidazol, pH 6,0 (ambas com eluição por acréscimo de 10, 20 e 50 mmol/L de imidazol), a fim de selecionar a

condição que favorecesse a maior adsorção dos AcMos em agarose-IDA-Zn(II). A escolha do pH dos tampões foi de 7,0 para o MOPS e 6,0 para o MES porque nestes valores de pH ambos os tampões estão com carga líquida nula (zwitteriônicos), pois estão abaixo dos seus respectivos valores de pKa (MOPS 7,14 e MES 6,15), evitando assim outros tipos de interações que não sejam as ligações de coordenação entre ligante e proteínas. Para reforçar a predominância das ligações de coordenação, uma concentração de 1,0 mol/L de NaCl foi usado (Porath et al., 1975).

Os resultados do balanço de massa das cromatografias estão apresentados na Tabela 2, bem como o perfil cromatográfico e eletroforético estão apresentados na Figura 2. De acordo com a eletroforese da Figura 2-b, observa-se que em tampão MES foi possível obter o anticorpo com menos contaminantes nas Eluições E1 e E2 quando comparado com o tampão MOPS da Figura 2-a.

Serpa et al. (2005) e Bresolin et al. (2010) avaliaram a técnica de IMAC em membranas de afinidade para purificar um AcMo IgG₁ utilizando Zn(II) quelatado em IDA e em ácido aspártico carboxi-metilado (CM-Asp). Ambos autores utilizaram apenas o sistema tamponante Tris-HCl, porém em uma baixa força iônica (ausência de NaCl).

Tabela 2. Balanços de massa de proteína total das cromatografias em agarose-IDA-Zn(II) em tampão MOPS 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, 2 mmol/L de imidazol, pH 7,0 e MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, 2 mmol/L de imidazol, pH 6,0, com alimentação de sobrenadante de cultura celular contendo AcMos anti-IL6.

Etapas	Tampão MOPS		Tampão MES	
	Proteína total (mg)	Proteína total (%)	Proteína total (mg)	Proteína total (%)
Amostra inicial	2,23	100,00	2,33	100,00
Lavagem	1,86	83,41	2,19	93,99
Eluição 1	0,25	11,21	0,13	5,58
Eluição 2	0,07	3,14	0,04	1,72
Eluição 3	0,02	0,89	0,02	0,85
Regeneração	0,00	0,00	0,00	0,00
Recuperação	2,20	98,65	2,38	102,14
Proteínas adsorvidas	0,34	15,24	0,19	8,15

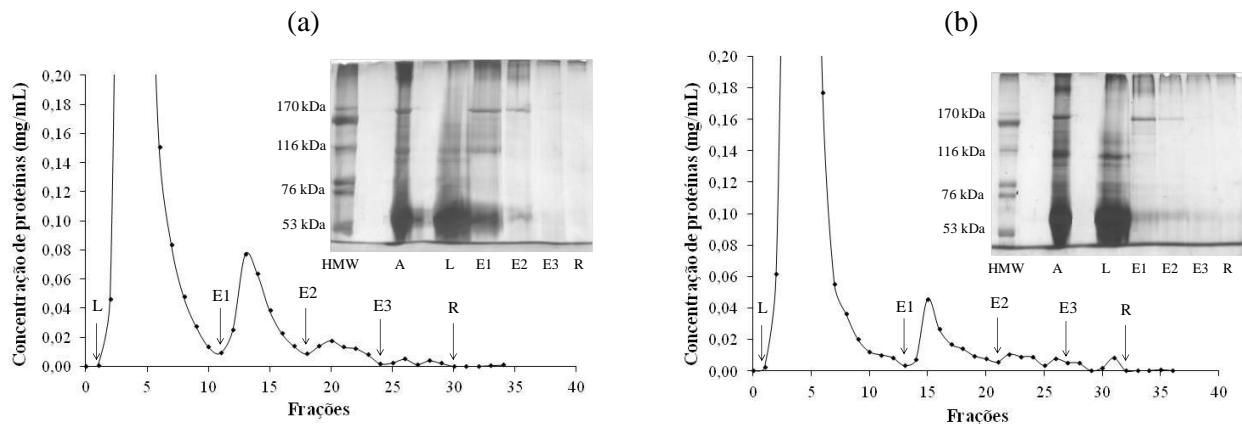


Figura 2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de AcMos anti-IL6 de sobrenadante de cultura celular em agarose-IDA Zn(II) nos tampões: (a) MOPS 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 7,0. (b) MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,0. Volume do leito: 1,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Volume alimentado na coluna cromatográfica: 1,0 mL. Frações coletadas: 1,0 mL. Eletroforeses

SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não redutoras em gel de poliácridamida de 7,5%. (HMW) Marcador de alta massa molecular. (A) Alimentação. (L) Lavagem. (E1) Eluição com 10 mmol/L de imidazol no tampão de equilíbrio. (E2) Eluição com 20 mmol/L de imidazol no tampão de equilíbrio. (E3) Eluição com 50 mmol/L de imidazol no tampão de equilíbrio. (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 6,5.

Depois de selecionada a melhor condição cromatográfica para adsorção dos AcMos anti-IL6, realizou-se nova cromatografia nestas condições com alimentação de amostra pré-purificada por

precipitação com sulfato de amônio (fração com saturação de 20-40% de sulfato de amônio), cujos resultados estão apresentados na Tabela 3 e Figura 3.

Tabela 3. Balanço de massa de proteína total e AcMos da cromatografia em agarose-IDA-Zn(II) em tampão MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, 2 mmol/L de imidazol, pH 6,0, com alimentação de amostra pré-purificada por precipitação em sulfato de amônio.

Etapas	Proteína total (mg)	Proteína total (%)	AcMos (mg)	AcMos (%)	Pureza (%)	Fator de Purificação
Amostra inicial	1,73	100,00	0,40	100,0	23,12	1,00
Lavagem	1,34	77,46	0,00	0,0	0,00	0,00
Eluição 1	0,24	13,87	0,25	62,5	104,16	4,50
Eluição 2	0,08	4,62	0,08	20,0	100,00	4,32
Eluição 3	0,04	2,31	0,04	10,0	100,00	4,32
Regeneração	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
Recuperação	1,70	98,26	0,37	92,5	-	-
Proteínas adsorvidas	0,36	20,81	0,37	92,5	-	-

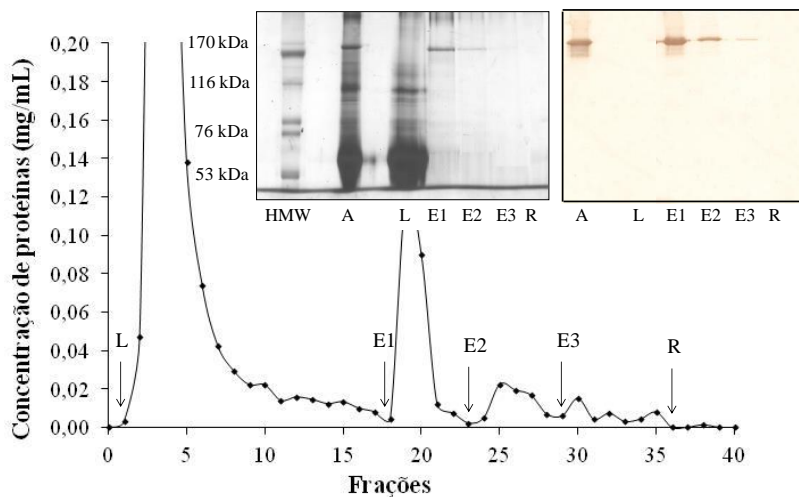


Figura 3. Cromatograma, eletroforese e *Western blotting* da adsorção de AcMos anti-IL6 pré-purificados por precipitação com sulfato de amônio (20-40% de saturação) em agarose-IDA-Zn(II) no tampão MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,0. Volume do leito: 1,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Volume alimentado na coluna cromatográfica: 1,0 mL. Frações coletadas: 1,0 mL. Eletroforese SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não redutoras em gel de poliácridamida de 7,5%. (HMW) Marcador de alta massa molecular. (A) Alimentação. (L) Lavagem. (E1) Eluição com 10 mmol/L de imidazol no tampão de equilíbrio. (E2) Eluição com 20 mmol/L de imidazol no tampão de equilíbrio. (E3) Eluição com 50 mmol/L de imidazol no tampão de equilíbrio. (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L, pH 6,5.



Observa-se na Tabela 3 que foi possível recuperar os AcMos puros nas etapas de eluição, com fator de purificação maior que 4,0. A maior recuperação de AcMos foi na etapa de eluição 1 (com 10 mmol/L de imidazol) em que detectou-se 62,5% dos AcMos alimentados na coluna cromatográfica (valores obtidos por intensidade de banda da eletroforese da Figura 3 com auxílio do programa ImageJ).

O valor de pureza obtido superiores a 100% para os AcMos na etapa de eluição (Tabela 3) pode ser explicado pela sensibilidade do método de Bradford (1976), que subestima a concentração de IgG₁ nestas frações, uma vez que elas estão com grau de pureza elevado. O método de Bradford apresenta grande variação de resposta, dependendo da proteína dosada, sendo que apresenta uma maior sensibilidade para albumina (Hammond e Kruger, 1988).

A análise de *Western blotting* da Figura 3 confirma que as bandas de proteínas em torno de 150 kDa na eletroforese são os AcMos tipo IgG₁ murina.

Considerando-se que na pré-purificação por precipitação e na cromatografia obteve-se 52% e 62,5% de recuperação de AcMos respectivamente, foi possível uma recuperação global de apenas 32,5% de AcMos, porém estes foram recuperados 100% puros. O fator de purificação global incluindo as etapas de precipitação e cromatografia foi de 24,17 vezes, sendo este valor calculado através da razão entre a pureza da amostra eluída na cromatografia e a amostra do sobrenadante de cultura celular antes da etapa de precipitação.

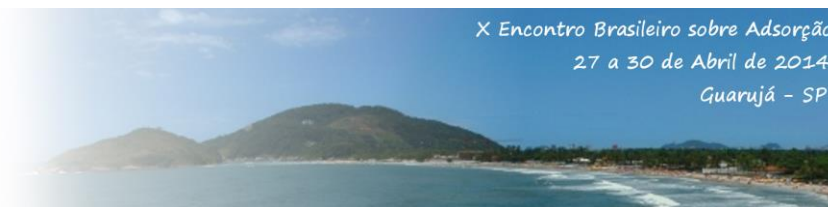
Após etapa de precipitação a 50% de saturação e cromatografia IMAC em condição tamponante distinta, Serpa et al. (2005) e Bresolin et al. (2010) obtiveram fatores de purificação mais elevados, porém uma menor pureza foi observada após a etapa cromatográfica quando comparada aos dados experimentais do presente trabalho.

4. CONCLUSÕES

Foi possível purificar o anticorpo anti-IL6 de sobrenadante de cultura celular através de precipitação com sulfato de amônio e adsorção em cromatografia de IMAC com sistema tamponante, MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, imidazol 2 mmol/L, pH 6,0 com o íon metálico Zn(II) imobilizado. Obteve-se recuperação global de 32,5% dos AcMos com pureza de 100% e fator de purificação global de 24,17 vezes.

5. REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRESOLIN, I.T.L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; AUGUSTO, E.F.P.; VIJAYALAKSHMI, M.A.; BUENO, S.M.A. Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as a technique for IgG₁ monoclonal antibodies purification: The effect of chelating ligand and support. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 160, p. 2148-2165, 2010.
- CLONIS, Y.D. Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop. *J. Chromatogr. A*, v. 1101, p. 1-24, 2006.
- DEUTSCHER, M.P. *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 1990.
- EL-KAK, A.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Study of the separation of mouse monoclonal antibodies by pseudobioaffinity chromatography using matrix-linked histidine and histamine. *J. Chromatogr.*, v. 570, p. 29-41, 1991.
- HALE, J.E.; BEIDLER, D.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity



chromatography. *Anal. Biochem.*, p. 222, v. 29-33, 1994.

HAMMOND, J.B.W.; KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantitation. *In Methods in Molecular Biology*, vol. 3, Walker, J., Humana Press, New Jersey, p. 25-32, 1988

HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H.M.; MULLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.*, v. 15, p. 1-20, 2003.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, p. 495-497, 1975.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

MARTINS, S.; KARMALI, A.; ANDRADE, J.; SERRALHEIRO, M. Immobilized metal affinity chromatography of monoclonal immunoglobulin M against mutant amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biotechnol.*, v. 33, p. 103-113, 2006.

PLATIS, D.; DROSSARD J.; FISCHER, R.; MA, J.K.-C.; LABROU, N.E. New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants. *J. Chromatogr. A*, v. 1211, p. 80-89, 2008.

PORATH, J.; CARLSSON, J; OLSSON, I.; BELFRAGE G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, v. 258, p. 598-599, 1975.

PORATH, J.; OLIN B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, v. 22, p. 1621-1630, 1983.

SERPA, G.; AUGUSTO, E.F.P.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; RIBEIRO, M.B.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G₁ monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B*, v. 816, p. 259-268, 2005.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VOIGT, A.; ZINTL, F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *J. Biotechnol.*, v. 68, p. 213-226, 1999.

ZIMMERMAN, T.; FRÈRE, C.P.; SATZGER, M.; RABA, M.; WEISBACH, M.; DÖHN, K.; POPP, A.; DONZEAU, M. Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments. *J. Immunol. Methods*, v. 314, p. 67-73, 2006.