

## Metodología diagnóstica

Instituto Nacional de Endocrinología

### VALIDACIÓN RETROSPECTIVA DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL INMUNOGLOBULINA ANTI-GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA

Lic. Eulises Díaz Díaz,<sup>1</sup> Lic. María Celeste Arranz Calzado,<sup>2</sup> Lic. Bertha Rodríguez Pendás,<sup>2</sup> Lic. Rosa de Dios Despau,<sup>1</sup> Lic. Julio César Rodríguez García,<sup>3</sup> Lic. Aimée Álvarez Álvarez,<sup>2</sup> Lic. Gema García Dafonte<sup>2</sup> y Dr. Roberto M. González Suárez<sup>4</sup>

#### RESUMEN

Con el objetivo de verificar que el proceso de purificación del anticuerpo monoclonal (AcM) IG1 antigonadotropina coriónica humana (hCG) se mantenía operando bajo condiciones controladas que garantizaban la calidad del producto se llevó a cabo la validación retrospectiva del mismo. Se analizaron los resultados de 21 procesos cromatográficos sucesivos en protein A-Sepharose CL-4B. Se evaluaron los parámetros: recuperación, pureza y actividad inmunológica del producto. Se comprobó, según la información recopilada, que la recuperación estuvo en el rango de 90-98, 16 %, con un valor promedio 93,19 %, una desviación estándar de 2,70 y un coeficiente de variación de 2,90 %, la pureza entre 90 y 99,3 % con un valor promedio de 95,48 %, una desviación estándar de 2,47 y un coeficiente de variación de 2,59 % y la actividad inmunológica determinada por radioinmunoensayo y expresada como ng de hormona marcada unida por miligramos de anticuerpos entre 4,013 y 6,210 ng de hCG marcada unida por mg de AcM, con un valor promedio de 4,72, una desviación estándar de 0,60 y un coeficiente de variación de 12,75 %. Se concluyó que el proceso se encontraba transcurriendo bajo las condiciones diseñadas de forma reproducible, lo cual garantiza la calidad del AcM.

*Descriptores DeCS:* ANTICUERPOS MONOCLONALES/aislamiento & purificación; TEST DE ELISA; GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA DE SUBUNIDAD BETA/antagonistas & inhibidores.

<sup>1</sup> Licenciado en Bioquímica. Aspirante a Investigador.

<sup>2</sup> Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado.

<sup>3</sup> Licenciado en Biología. Aspirante a Investigador.

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias. Investigador Titular. Jefe del Programa de Metodología Diagnóstica del Instituto Nacional de Endocrinología.

La calidad de las determinaciones analíticas depende fundamentalmente de la calidad de los reactivos que se utilizan. En las técnicas inmunoquímicas, el reactivo más importante, sin lugar a duda, es el anticuerpo, el cual es el encargado de la especificidad de la determinación analítica. Se requiere que el proceso de producción de estas biomoléculas sea validado para garantizar la reproducibilidad de dicho proceso y la estabilidad de la calidad del producto.<sup>1-3</sup>

El presente trabajo constituye una validación retrospectiva del proceso de purificación del anticuerpo monoclonal (AcM) IG1 anticonadotropina coriónica humana (hCG), el cual es utilizado en un sistema ELISA doble indirecto para el diagnóstico precoz del embarazo. Aquí mostramos los resultados obtenidos de 21 procesos cromatográficos sucesivos, donde analizamos entre otros aspectos, la recuperación, la pureza y la actividad inmunológica del producto. Comprobamos que el proceso diseñado garantiza la reproducibilidad necesaria por lo que se puede concluir que el mismo permite obtener la calidad requerida para este tipo de producto biotecnológico.

Analizamos el comportamiento en el tiempo de la concentración de IgG en los líquidos ascíticos murinos (LAM), así como el porcentaje de IgG/proteínas totales de los mismos, detectamos gran variabilidad en estos parámetros. De lo anterior se desprende la necesidad de validar el proceso de producción del LAM para asegurar una calidad consistente de la materia prima para el proceso de purificación.

## MÉTODOS

### PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL

El proceso de purificación del AcM a partir de líquido ascítico consta de 2 etapas:

una cromatografía de afinidad en *protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia)* y una diálisis posterior en PBS para estabilizar el pH y la fuerza iónica del producto purificado.<sup>4-6</sup> Utilizamos un sistema de purificación convencional de baja presión (*Pharmacia-LKB*).

Descongelamos lo más rápidamente posible, en un baño de agua potable a temperatura ambiente, el lote de LAM seleccionado, mantenido a -20°C hasta ese momento. Medimos el volumen y lo centrifugamos a 1 000 r.p.m durante 10 min en centrífuga Eppendorf. El resto del LAM se volvió a guardar en congelación.

Diluimos el sobrenadante 1:2 con el tampón glicina 1,5 mol/L, cloruro de sodio 3 mol/L, pH 8,9 (MERCK), homogeneizamos todo con un agitador y lo aplicamos a la columna de *Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia)* a un flujo de 30 mL/h. Utilizamos una matriz de 1 mL con capacidad para unir 7 mg de IgG, que había sido previamente equilibrado con este tampón. Esperamos a que pasara todo el volumen de LAM y continuamos pasando tampón glicina-cloruro de sodio, pH 8,9 hasta que la densidad óptica a 280nm (DO 280 nm) llegara a la línea base del cromatograma. Posteriormente, aplicamos tampón citrato 0,1 mol/L pH 6,0 (AnalaR) para eluir las inmunoglobulinas endógenas del isotipo IgG1 que son contaminantes del AcM de interés, cuando la DO 280 nm volvió a disminuir hasta la línea base aplicamos el tampón citrato en 0,1 mol/L pH 5,0 con el cual eluyen las IgG2a, isotipo este del AcM IG1 anti-hCG<sup>5</sup> y recogimos fracciones de 2 mL/tubo. Posteriormente, recolectamos las fracciones que contenían el anticuerpo de interés y las dializamos contra PBS pH 7,2 (todos los reactivos utilizados eran de la MERCK) a 4 EC durante toda la noche. Posteriormente, le determinamos la concentración de proteínas

por el método de Lowry,<sup>7</sup> la concentración de IgG por ELISA<sup>8,9</sup> y la actividad inmunológica por RIA.<sup>10</sup>

Lavamos la columna con tampón citrato 0,1 mol/pH 3,0 para eluir todo contaminante que pudiera haber quedado unido a la matriz, posteriormente, la reequilibramos con tampón glicina-cloruro de sodio pH 8,9 para una nueva purificación.

## MÉTODOS ANALÍTICOS

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para determinar la concentración de proteínas totales utilizamos el método de Lowry,<sup>7</sup> que fue estandarizado bajo las condiciones universalmente utilizadas. Empleamos como patrón, una solución acuosa de sero albúmina bovina (Fracción V, *Boehringer Mannheim GmbH*) en un rango de 20 a 100 Fg de proteína por tubo. La concentración es directamente proporcional a la intensidad del color que toma la solución proteica al reaccionar con el reactivo de Folin (Fluka), el cual es medido a 660 nm en un espectrofotómetro (*Pharmacia-LKB*).

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINA

Para determinar la concentración de IgG utilizamos un método ELISA *sandwich*<sup>8,9</sup> estandarizado y validado en nuestra institución, que permite cuantificar en un rango de 31,25 a 500ng/mL. El sistema utiliza un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón, producido en carnero y purificado por inmunofinidad como recubrimiento y un conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa de rábano picante, cuya dilución de trabajo es

de 1/25 000. La intensidad del color obtenido es directamente proporcional a la concentración de IgG en la muestra a analizar, el que es medido a 492 nm en un equipo SUMA.

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOLÓGICA

Para determinar la actividad inmunológica estandarizamos y validamos un método de radioinmunoanálisis (RIA).<sup>10</sup> Para ello enfrentamos diluciones del AcM a una dilución de hCG marcada con I<sup>125</sup>, de alrededor de 10 000 c.p.m, permitimos que se alcanzara el equilibrio químico y se formara el complejo antígeno-anticuerpo, que fue precipitado por el método del segundo anticuerpo y la radiactividad del precipitado fue medido en un contador de radiaciones gamma (LKB), así pudimos establecer la capacidad de unión del AcM.

### PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Determinamos la concentración de proteínas totales, la concentración de IgG, así como la cantidad de las mismas al tener en cuenta el volumen inicial y final. A través de estos parámetros pudimos establecer la recuperación, como el porcentaje de la relación de la cantidad IgG final entre la cantidad inicial y la pureza del producto, como el porcentaje de la relación de la cantidad de IgG final entre la cantidad total final de proteínas. Calculamos la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Determinamos la actividad inmunológica del producto por RIA,<sup>10</sup> y la capacidad de unión del producto final de

forma cuantitativa como los ng de hCG marcada, unida por mg de AcM, según la siguiente ecuación matemática:

$$= \text{cpm} / (\text{mg AcM}) \times 2 \text{dpm} / (1 \text{cpm}) \times \mu\text{FCi} / (2,22 \cdot 10^6 \text{dpm}) \times 1 / (\text{A.Esp}) \times 10^3 \text{ ng} / (1 \mu\text{g})$$

donde:

cpm= conteos por minuto del precipitado  
dpm= desintegraciones por minutos.

A.Esp= Actividad Específica de la hCG marcada con  $I^{125}$ , expresada como  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  hCG.  
 $\mu\text{Ci}$ = microCuri

Estos parámetros nos permitieron monitorear el proceso en el tiempo y verificar que había estado operando bajo control.

## RESULTADOS

El perfil cromatográfico típico de este proceso lo mostramos en la figura 1, el primer pico corresponde a las proteínas presentes en el LAM que no interaccionan con la matriz de *Protein A-Sepharose* CL-4B. El segundo pico que eluye a pH 6,0 corresponde a las IgG1 endógenas del ratón donde se produjo el LAM. El tercer pico corresponde al AcM IG1 anti-hCG, el cual eluye a pH 5,0 con el que eluyen las IgG2a, isotipo correspondiente a este AcM. El tercer pico corresponde a las proteínas que interaccionan con una mayor fortaleza con la matriz, entre ellas, las IgG2b y las IgG3 endógenas del ratón donde se produjo el LAM, por lo que se requiere una elución más drástica con tampón citrato pH 3,0

Establecimos los aspectos cuantitativos por los métodos analíticos y los procesamos matemáticamente. La figura 2 muestra cómo se comportó el parámetro recuperación a lo largo de los 21 lotes sucesivos; los valores se hallaban en el rango de 90 a 98,16 % con un valor promedio

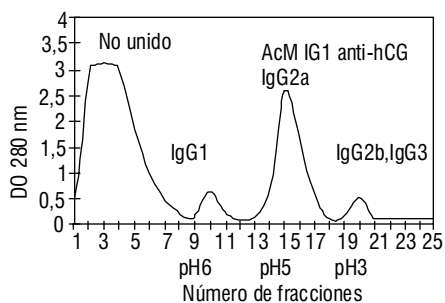


FIG. 1. Perfil cromatográfico del AcM IG1 anti-hCG en *Protein A-Sepharose* CL-4B.

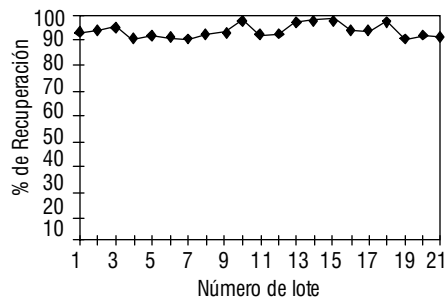


FIG. 2. Comportamiento del porcentaje de recuperación del AcM IG1 anti-hCG en 21 procesos cromatográficos sucesivos.

de 93,19 %, una desviación estándar de 2,70 y un coeficiente de variación de 2,9 %.

La pureza lograda puede observarse en la figura 3, la cual se encontró en el rango de 90 a 99,3 % con un valor promedio de 95,48 %, una desviación estándar de 2,47 y un coeficiente de variación de 2,59 %.

Estos parámetros coinciden con los valores reportados para este tipo de cromatografía de afinidad y son aún más válidos si se tiene en cuenta la manipulación a la que se somete el AcM por el bajo nivel

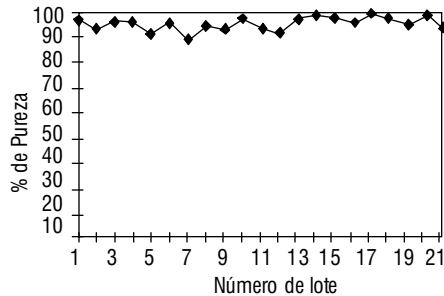


FIG.3. Comportamiento del porcentaje de pureza del AcM IG1 anti-hCG en 21 procesos cromatográficos sucesivos.

de automatización con que cuenta nuestra institución para esta tarea.

La actividad inmunológica del producto aparece en la figura 4 donde se observa que los valores de actividad inmunológica se mueven en el rango de 4,013 a 6,210ng de hCG marcada unida por mg de AcM, con un valor promedio de 4,72, una desviación estándar de 0,60 y un coeficiente de variación de 12,75 %, el cual es menor de 15 % que es el valor aceptado para la reproducibilidad de los métodos inmunoquímicos mediante los cuales este parámetro fue estimado.

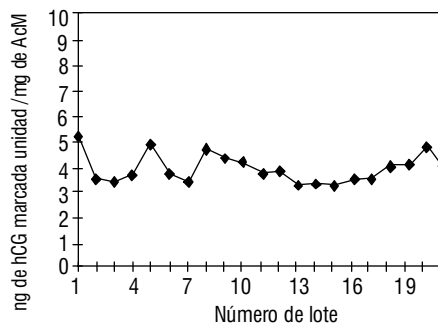


FIG.4. Comportamiento de la actividad inmunológica del AcM IG1 anti-hCG purificado en 21 procesos cromatográficos sucesivos.

Producto del procesamiento de los datos disponibles detectamos que si bien el proceso de purificación como tal transcurre bajo condiciones reproducibles, no es así durante la producción del LAM. En la figura 5 expresamos la concentración de IgG de los 21 LAM que fueron objeto de purificación. Se puede observar que hay una variabilidad muy grande en este parámetro entre un lote y otro, se mueven en el rango de 1 a 5,6 mg/mL, con un valor promedio de 2,37 mg/mL, que si bien está entre los valores normalmente reportados para la concentración de IgG de los LAM (1-10mg/mL), posee una gran variabilidad de un lote a otro lo que se deduce por la desviación estándar que es igual a 1,40, con un coeficiente de variación de 59,35 %.

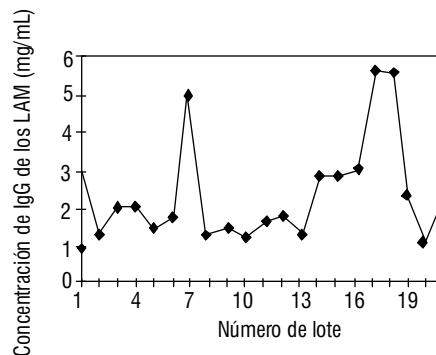


FIG.5. Concentración de IgG de los líquidos ascíticos murinos utilizados como materia prima para la purificación del AcM IG1 anti-hCG.

El parámetro porcentaje de IgG/proteína total de los LAM también varía mucho (fig. 6). Se movió en el rango de 4,4 a 12,17 %, con un valor promedio de 7,91 %. No obstante de encontrarse en el rango de valores reportados, su desviación estándar es de 3,04 y su coeficiente de variación de 38,53 %. Esta variabilidad es un indicador que apunta a que el proceso no opera bajo

condiciones reproducibles, de ahí la necesidad de establecer las condiciones para llevar a cabo la validación del proceso de producción del LAM, para garantizar una materia prima más homogénea, con la mayor calidad posible.

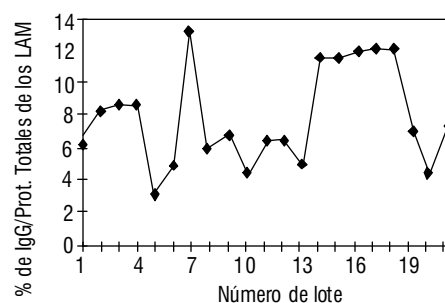


FIG. 6. Porcentaje de IgG/proteínas totales de los líquidos ascíticos murinos utilizados como materia prima para la purificación de los AcM IG1 anti-hCG.

## DISCUSIÓN

La validación retrospectiva del proceso de purificación del AcM "IG1" anti-hCG demostró que había transcurrido de una forma reproducible dentro de los parámetros de calidad requeridos para este tipo de

proceso y se lograba un producto altamente purificado con una adecuada actividad biológica, características estas que aseguran su utilización en el sistema de diagnóstico precoz del embarazo en el cual se emplea este AcM. Logramos la constancia de la calidad de los AcM purificados gracias a un correcto diseño del proceso de purificación y a un conjunto de medidas de aseguramiento de la calidad que habían sido previamente tomadas: la estandarización del proceso cromatográfico, el desarrollo y establecimiento de un sistema de recogida de los datos obtenidos del proceso de purificación, el desarrollo de los procedimientos normalizados de operaciones (PNO) y la estandarización y validación de los métodos analíticos utilizados. Todos ellos en conjunto, garantizaron la eficacia y reproducibilidad del proceso.

Detectamos variaciones en la calidad de los LAM empleados como materia prima para purificar los AcM, de ahí la necesidad de establecer un sistema de aseguramiento de la calidad para la etapa de producción de los LAM que controle y regule todas las actividades necesarias para su producción y garantice una materia prima de la mayor calidad posible.

## SUMMARY

With the aim of verifying that the process of purification of IG1 antihuman chronic gonadotropin (hcG) monoclonal antibody (MCA) was kept in operation under controlled conditions that guaranteed the quality of the product, a retrospective validation of this antibody was performed. The results of 21 successive chromatographic processes in protein A-Sepharose CL-4B were analyzed. The following parameters were evaluated: recuperation, purity and immunological activity of the product. According to the information obtained, it was proved that recuperation ranged between 90 and 98.16 % with an average value of 93.19 %, a standard deviation of 2.70, and a variation coefficient of 2.90 %. Purity oscillated from 90 to 99.3 % with an average value of 95.48 %, a standard deviation of 2.47 and a variation coefficient of 2.59 %. The immunological activity was determined by radioimmunoassay and expressed as ng of marked hormone bound by mg of antibodies between 4.013 and 6,210 ng of marked hCG bound by mg of MCA, with an average value of 4.72, a standard deviation of

0.60, and a variation coefficient of 12.75 %. It was concluded that the process was going on under the conditions designed in a reproducible way, which assures the quality of the MCA.

*Subject headings:* ANTIBODIES, MONOCLONAL/isolation & purification; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY; CHORIONIC GONADOTROPIN, BETA SUBUNIT, HUMAN/antagonist & inhibitors.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buenas Prácticas de Producción de Productos Farmacéuticos [proyecto]. Ginebra:OMS, 1992.
2. Normas Cubanas de Buenas Prácticas de Laboratorio. NC. 26-212. La Habana, Cuba: CEDMED, 1992.
3. Normas Cubanas de Buenas Prácticas de Producción. NC. 26-211. La Habana, Cuba: CEDMED, 1992.
4. Affinity chromatography. Affinity Chromatography. Principles and methods. Pharmacia LKB biotechnology. Uppsala: Ljungforetagen AB, 1988:48-52.
5. The use of protein A-Sepharose to purify murino IgG monoclonal antibodies. Specific Monoclonal Antibody Purification Techniques. Separation News. Pharmacia Laboratory Separation Division. Uppsala: Offsetcenter AB, 1986;13.5.
6. Harlow De, Lane David. Storing and Purifying antibodies. Antibodies a laboratory manual. Stockholm: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988:283-319.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1978;193:265-9.
8. Tijssen P. Quantitative enzyme immunoassay techniques. Practice and theory of enzyme immunoassays. Amsterdam: Elsevier Science, 1993:329-44.
9. Harlow DE, Lane D. Immunoassays. Two-antibodies sandwich immunoassay. Antibodies a laboratory manual. Stockholm: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988:578-83.
10. Abraham GE. Handbook of radioimmunoassay. Clinical and Biochemical analysis. New York: Marcel Dekker, 1977:5.

Recibido: 14 de octubre de 1997. Aprobado: 13 de noviembre de 1997.

Lic. *Eulises Díaz Díaz*. Instituto Nacional de Endocrinología, Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.