

Técnicas

Instituto de Hematología e Inmunología

PURIFICACIÓN DE IgG1, IgG2 E IgG3 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A PARTIR DE INTACGLOBÍN

Lic. Ada A. Arce Hernández, Lic. Julio C. Merlín Linares, Lic. Rinaldo Villaescusa Blanco, Lic. Manuel Padilla López, Lic. Yamilka González de Armas y Lic. Ana M. Guerreiro Hernández

RESUMEN

Se describe un método de purificación de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 a partir de Intacglobin mediante cromatografía de afinidad con el empleo de proteína A *Sepharose* y la aplicación de un gradiente lineal de pH. Se detectó la presencia de IgG1, IgG2 e IgG3 en las fracciones eluidas mediante doble inmunodifusión e inmunolectroforesis, utilizando sueros comerciales anti IgG, anti IgG1, anti IgG2 y anti IgG3. El procedimiento desarrollado se caracterizó por su sencillez, elevada resolución y la relativa pureza de las subclases aisladas. Se logró un rendimiento total del 53,7 %, lo que indica la eficiencia del método.

DeCS: IGG/aislamiento & purificación; CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD/métodos; SUEROS INMUNES.

En la década de los 60 se desarrollaron los primeros trabajos de clasificación de subclases de la cadena pesada de la IgG humana. *Dray* en 1960¹ detectó 3 subclases de γ globulina humana (IgG) en suero humano normal; utilizó antisueros preparados en monos y se basó en la heterogeneidad antigénica de las cadenas pesadas (H) *Grey* y *Kunkel* en 1964² trabajaron con proteínas de mieloma IgG y demostraron la presencia de 3 subgrupos bien definidos en la cadena H. Refirieron además la existencia de otras proteínas de mielomas que no clasificaban dentro de ninguna de los 3 subgrupos anteriores y

sugirieron un cuarto subgrupo. Investigaciones posteriores revelaron la existencia de 4 subclases de IgG en humanos, designadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.³⁻⁵ La molécula de IgG fue subdividida en 4 subclases, de acuerdo con las diferencias químicas y antigénicas en la porción carboxiterminal de las cadenas polipeptídicas γ y se determinaron las actividades biológicas para cada una de ellas.⁶⁻⁸

El estudio de las subclases de IgG permitió determinar su importancia en la defensa del organismo frente a agentes patógenos. Es conocido la participación de las subclases de IgG en la fisiopatogenia

de gran número de enfermedades,⁹⁻¹³ por lo que resulta importante contar con los antisueros específicos que nos permitan su estudio. Para la producción de esos inmunodiagnosticadores, con una calidad adecuada, es imprescindible un método que nos permita la obtención del antígeno, con una relativa pureza y un rendimiento adecuado, de ahí que en nuestro trabajo nos propusieramos la purificación de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 a partir de Intacglobin mediante cromatografía de afinidad con el empleo de proteína A Sepharosa.

MÉTODOS

Fuente de subclases de IgG humana: Se partió de una solución de Intacglobin (IMEFA, Cuba) con una concentración de IgG de 50 mg/mL, a la que se le determinó la concentración de las subclases de IgG mediante inmunodifusión radial simple (IDRS), para lo cual se utilizaron placas comerciales (PeliRide, CLB).¹⁴ La concentración de las subclases de IgG en la solución de Intacglobin fue: IgG1 = 29,8 mg/mL; IgG2 = 16,8 mg/mL; IgG3 = 2,20 mg/mL e IgG4 = 0mg/mL.

Fraccionamiento de las subclases de IgG: Se realizó mediante cromatografía de afinidad en proteína A Sepharosa CL 4B (Pharmacia), en una columna K9/15(0,9 x 15 cm) que contenía aproximadamente 9 mL de gel, equilibrada con una solución amortiguadora de fosfato - citrato 0,15 M, pH 7,0.¹⁵ Se aplicaron 2 mL de la muestra y se eluyeron los componentes de la mezcla mediante la aplicación de un gradiente lineal de pH de 7,0 a 3,5, a una velocidad de 20 mL/h, y se recolectaron fracciones de 2,5 mL.

Control de pureza: el control de pureza de los productos obtenidos se realizó mediante la doble inmunodifusión e

inmunolectroforesis.¹⁶ En ambos procedimientos se emplearon sueros anti IgG, anti IgG1, anti IgG2 y anti IgG3 (PeliRide, CLB). La concentración de las subclases purificadas se determinó por el método de Lowry.¹⁷

RESULTADOS

Mediante doble inmunodifusión e inmunolectroforesis, empleando antisueros monoespecíficos comerciales, se corroboró la presencia y especificidad de las diferentes subclases aisladas por el gradiente lineal de pH en los 3 picos obtenidos.

A partir de 100 mg de muestra aplicada se obtuvieron cantidades de: IgG3 = 4,8 mg, IgG2 = 34,6 mg, IgG1 = 14,3 mg, para un rendimiento total del 53,7 %.

DISCUSIÓN

Existen diversos métodos de purificación de las subclases de IgG que se utilizan en dependencia de la disponibilidad de reactivos y equipos de cada laboratorio.¹⁸ La selección del método debe tener en cuenta, además de los requerimientos de pureza, la necesidad de obtener elevados rendimientos durante el proceso de aislamiento.

En trabajos anteriores se ha descrito el empleo de cromatografía de intercambio iónico con DEAE celulosa mediante un procedimiento de *batch*, partiendo de sueros de mielomas de cada una de las subclases.¹⁹ Otro grupo de investigadores²⁰ que utilizan plasmas de pacientes con mieloma múltiple, emplearon el método de electroforesis en bloque en Pevicón para el aislamiento de IgG, seguido de filtración en gel en Sephadex G-200. Las proteínas de

muestras independientes de mielomas IgG1, IgG2 e IgG3 fueron purificadas mediante una combinación de precipitación con rivanol y sulfato de amonio, seguido de cromatografía en DEAE Sephadex. Otro método es aquel basado en el fraccionamiento de subclases de IgG que emplea el método de electroenfoque a partir de IgG humana normal, con resultados muy satisfactorios.²¹ En nuestro trabajo decidimos utilizar la cromatografía de afinidad con proteína A unida de forma covalente a una matriz de Sepharosa CL-4B, la cual presenta una elevada estabilidad química y mecánica.²²

Se ha demostrado que la IgG4, es un contaminante permanente de la fracción correspondiente a la IgG2, y para reducir este problema se parte, comúnmente, de una solución de IgG tratada con DEAE celulosa, la cual es deficiente en IgG4.¹⁵ Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, decidimos partir de Intacglobin, que es un preparado comercial de IgG biológicamente activo de uso intravenoso, con una concentración de IgG 5 veces superior que en el suero normal, en la que se demostró la no presencia de IgG4, mediante inmunodifusión radial simple.

Diversos investigadores han empleado la cromatografía de afinidad con Proteína A como adsorbente específico para la

purificación de subclases de IgG y han utilizado para eluir soluciones amortiguadoras con un pH específico para cada subclase de IgG, con lo cual han obtenido rendimientos totales entre el 36 y 42 %.^{23,24} Con el propósito de simplificar el método decidimos el empleo de un gradiente lineal de pH, el cual resulta más rápido y económico, y con el que se logró una buena resolución; se definieron claramente 3 picos, correspondiendo a las subclases IgG3, IgG2 e IgG1, respectivamente. Las 3 subclases eluyeron en los rangos de pH esperados, con lo que se logró un rendimiento superior con un buen nivel de pureza, superior al obtenido por otros investigadores.

Es conocida la participación de las subclases de IgG en la fisiopatogenia de un gran número de enfermedades. De ahí la importancia de contar con los antisueros específicos que nos permitan su estudio. Para la producción de estos inmunodiagnosticadores, con una calidad adecuada, es imprescindible lograr una buena purificación del antígeno que va a emplearse en las inmunizaciones. Los resultados presentados muestran la aplicación de un método de purificación de las subclases de IgG1, IgG2 e IgG3 a partir de Intacglobin, con el que se logra un buen rendimiento y con una pureza adecuada.

SUMMARY

A method for the purification of IgG1, IgG2, and IgG3 subclasses starting from Intacglobin by affinity chromatography with the use of protein A Sepharose and the application of a lineal gradient of pH is described. IgG1, IgG2 and IgG3 were detected in the eluted fractions by double immunodiffusion and immunoelectrophoresis by using anti IgG, anti IgG1, anti IgG2 and anti IgG3 commercial sera. The procedure developed was characterized by its simplicity, high resolution and the relative purity of the isolated subclasses. A total yield of 53.7 % was attained, which demonstrates the efficiency of this method.

Subject headings: IGG/isolation&purification; CHROMATOGRAPHY, AFFINITY/methods; IMMUNE SERA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dray S. Three globulins in normal human serum revealed by monkey precipitin. *Science* 1960;132:1313-4.
2. Grey HH, Kunkel HG. H-chain subgroup of myeloma proteins and normal 7S globulin. *J Exp Med* 1964;120:253-66.
3. Terry WD, Fahey JL. Subclasses of human γ -globulin based on differences in the heavy polypeptide chains. *Science* 1964;146:400-1.
4. Gergely J. Structural studies of immunoglobulins. *Immunochemistry* 1967;4:101-4.
5. World Health Organization. Report 1966;t35:953. WHO Technical Series.
6. Ishizaka T, Ishizaka K, Salmon S, Fudenberg, H. Biologic activities of aggregated γ -globulin. VIII. Aggregated immunoglobulins of different classes. *J Immunol* 1967;99:82-91.
7. Morell A, Terry WD, Waldmann T. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J Clin Invest* 1970;49:673-80.
8. Spiegelberg HL, Fishking BC, Grey HM. Catabolism of human γ G- immunoglobulin of different heavy chain subclasses. I. Catabolism of γ G-myeloma proteins in man. *J Clin Invest* 1969;47:2323-30.
9. Hanson LA, Soderstrom R, Avanzini A, Bengtsson U, Bjorkander J, Soderstrom T. Immunoglobulin subclass deficiency. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:S17-S21.
10. Hanson LA, Soderstrom R, Nilssen DE, Theman K, Bjorkander J, Soderstrom T. IgG subclass deficiency with or without IgA deficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61:S70-7.
11. Morell A. Clinical relevance of IgG subclass deficiencies. *Ann Biol Clin* 1994;52:49-52.
12. Loizou S, Cofiner C, Weetman AP. Immunoglobulin class and IgG subclass distribution of anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and associated disorders. *Clin Exp Immunol* 1992;90:434-9.
13. Hedo C, Akenova Y, Okpala I, Salimom L. Serum immunoglobulin (G, A and M) classes and IgG subclasses in sickle cell anaemia. *APMIS* 1993;101:353.
14. Mancini G, Carbonara AD, Hermans JF. A single radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins. Peeters H (ed). *Int Prot Biol Fluids 11th Colloqu. Bruges. Oxford: Pergamon, 1964:370-3.*
15. Hudson L, Hay FC. *Practical immunology.* Oxford: Blackwell Scientific, 1976:87-90.
16. Stites DP, Channing RPP. Métodos de laboratorio clínico para la detección de antígenos y anticuerpos. En: Stites DP, ETR AI, eds. *Inmunología básica y clínica. 7ma. ed. México, DF: El Manual Moderno, 1993:244-5.*
17. Lowry CH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin henol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-8.
18. Stites DP, Channing RPP. Métodos de laboratorio clínico para la detección de antígenos y anticuerpos. En: Stites DP, ETR AI eds. *Inmunología básica y clínica. 7ma ed. México DF: El Manual Moderno, 1993:284-7.*
19. Himmelhoch SR. Chromatography of proteins on ion exchange adsorbents. *Meth Enzymol* 1971;22:273-9.
20. Baici A, Knopf M, Fehr K. Cleavage of the four human IgG subclasses with Cathepsin G. *Sacand J Immunol* 1982;16:487-98.
21. Howard A, Virella G. The separation of pooled human IgG into fractions by isoelectric focusing and their electrophoretic and immunological properties. *Proc XVII Coll Prot Biol Fluids. Bruges, 1969:449-52.*
22. *Handbook in affinity chromatography. Principles and methods.* Pharmacia fine chemicals, Uppsala, Sweden, 1988;48-5.
23. Hjelm H, Hjelm K, Sjoquist J. Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS Lett* 1972;28:73-6.
24. Patrick CC, Virella G. Isolation of normal human IgG. Identical molecular weight for normal and monoclonal gamma-3 chains. *Immunochemistry* 1978;15:137-9.

Recibido: 18 de octubre del 2000. Aprobado: 13 de noviembre del 2000.

Lic. Ada A. Arce Hernández. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: (537)578268. Fax: (537) 338979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu