

OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE INMUNOREACTIVIDAD POR EL MÉTODO DE CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD EN CAPA FINA PARA ANTICUERPOS MONOCLONALES MARCADOS CON TECNECIO-99m

Ramos B. bramos@ipen.gob.pe; Robles A. arobles@ipen.gob.pe

Planta de Producción de Radioisótopos (PPR) – IPEN / Lima, Perú

ABSTRACT

The labelling monoclonal antibodies with Tc 99m, must conserve their capacity to be united selectively to another molecule. For it use the method of affinity thin layer chromatography (ATLC) to determine the percentage of specific union or immunoreactivity fraction, the same one that did not give good results, for that reason is decided to optimize this technique being varied the times of fixation of antigen CEA with the stationary phase to 20 seconds and 30 minutes.

The first obtained results, are that the optimal time of contact of the antigen with the stationary phase for the test of immunoreactivity by ATLC is of 30 minutes, as much for the positive controls as for the negative controls. The percentage of union specifics obtained reaches greater values of 75 % and the percentage of non specific union reaches smaller values of 25 % result that confirms to us that the noticeable antibody conserves its immunoreactivity properties.

Key words:
Monoclonal antibody, Immunoreactivity, ATCL, Tc 99m.

RESUMEN

Los anticuerpos monoclonales marcados con Tc 99m, deben de conservar su capacidad de unirse selectivamente a otra molécula. Para ello se empleo el método de cromatografía de afinidad en capa fina (CACF) para determinar el porcentaje de unión específica o fracción inmunoreactiva, la misma que no dio buenos resultados, por ello se decide optimizar dicha técnica variando los tiempos de fijación del antígeno CEA con la fase estacionaria a 20 segundos y 30 minutos. Los primeros resultados obtenidos, son que el tiempo óptimo de contacto del antígeno con la fase

estacionaria para el ensayo de inmunoreactividad por CACF es de 30 minutos, tanto para los controles positivos como para los controles negativos. El porcentaje de unión específica obtenido alcanza valores mayores de 75 % y el porcentaje de unión inespecífica alcanza valores menores de 25 % resultado que nos confirma que el anticuerpo marcado conserva sus propiedades inmunoreactivas.

Palabras clave: anticuerpo monoclonal, inmunoreactividad, CCFA, Tc 99m.

1 INTRODUCCIÓN

El Perú, participa en el proyecto ARCAL LII, donde se vienen desarrollando, radiofármacos basados en anticuerpos monoclonales. Uno de los ensayos determinantes que nos permite conocer la no alteración de la inmunoreactividad del anticuerpo monoclonal, por la marcación directa con Tecnecio 99m, es el ensayo de inmunoreactividad. Este ensayo, puede realizarse mediante diversas técnicas como son: cromatografía de afinidad en capa fina, Inmunofluorescencia, inmunoensayo enzimático (ELISA) y células tumorales. En nuestro país, el método de elección por su rapidez, economía y no necesitar de gran infraestructura es el método de cromatografía de afinidad en capa fina. Sin embargo, los resultados al aplicar la técnica no fueron los esperados⁽¹⁾.

La inmunoreactividad es la capacidad de reconocimiento específico que posee un antígeno por su anticuerpo, esta capacidad puede evaluarse mediante: inmunoreactividad relativa y fracción de inmunoreactividad. Se elige trabajar con la fracción de inmunoreactividad ya que cuantifica la capacidad de unión exclusivamente de las moléculas marcadas, y da una medida absoluta de la inmunoreactividad. La técnica escogida es

cromatografía de afinidad (CACF) por ser rápida, económica y simple de aplicar. Esta cromatografía de afinidad se basa en la adsorción de exceso del Antígeno puro sobre un soporte como ITLC SG, y luego aplicando una muestra del anti-CEA marcado. La corrida cromatográfica se desarrolla en un solvente que permita separar el complejo Antígeno-anticuerpo del anticuerpo libre. Finalmente se mide la radioactividad de las fracciones y se calcula la fracción inmunoreactiva en porcentaje.

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de la Planta de Producción de Radioisótopos del Centro Nuclear de Huarangal del IPEN en Puente Piedra.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y equipo

Kit AntiCEA (producido en-PPR-IPEN); CEA lote BA273001, laboratorios SCRIPPS con contenido de proteína 1,74 mg/mL, y CEA \geq 95%, donados por OIEA. Suero fetal bovino 30 % laboratorio Calbiochem lote B41403, buffer fosfato salino en etanol al 4 %, 10 nm; tecnecio 99m; buffer fosfato salino pH = 7,4; seroalbúmina humana al 5 % en salina; agua destilada, papel ITLC 1x10 cm marcado a los 2 cm y a los 3 cm desde la base, activadas a 110°C x 30 minutos, cámaras cromatográficas de vidrio, guantes, estufa, tubos eppendorf, caja conservadora, tips, micropipetas: 0-10 μ L; 0-200 μ L; 0-1000 μ L, contador automático gamma, estufa.

2.2 Marcación del anticuerpo monoclonal

El polvo liofilizado de anti-CEA se marcó con 5 mCi de pertecnetato de sodio, en un volumen máximo de 5 mL y se deja reaccionar por 30 minutos. La pureza radioquímica se determinó según metodología (1).

2.3 Procedimiento para la fracción inmunoreactiva

- ♦ Se prepara soporte (tiras de ITLC), tanto para control positivo, como para control negativo y por duplicado de la siguiente manera:

Control positivo

- ♦ Se colocan 200 μ L de antígeno CEA a una concentración de 10 ug/mL, sobre la tira de ITLC en la marca de 3 cm.
- ♦ Dejar impregnar por tiempo t: $t_1= 20$ segundos; $t_2= 30$ minutos.
- ♦ Recubrir las tiras impregnadas de antígeno, con una solución de Seroalbúmina humana 5 % en salina y dejar por 2 minutos.
- ♦ Enjuagar las tiras, sumergiéndolas en un tubo conteniendo agua destilada, retirar utilizando una pinza y secar en estufa a 37°C.
- ♦ Una vez secas las tiras, colocar 10 μ L del anticuerpo marcado sobre la marca de 2 cm de la tira cromatográfica preparada.
- ♦ La corrida cromatográfica, se desarrolla en buffer fosfato salino 10 mM en etanol al 4%. hasta 9 cm desde la base.
- ♦ Secar las tiras, cortar por la mitad y contar en un contador gamma.
- ♦ Realizar el control por duplicado para cada tiempo de fijación.

Control negativo

- ♦ Se colocan 200 μ L de Suero fetal Bovino a una concentración de (10 ug proteína/ 1mL), sobre la tira de ITLC en la marca de 3 cm.
- ♦ Dejar impregnar por tiempo t: $t_1= 20$ segundos; $t_2= 30$ minutos.
- ♦ Recubrir las tiras impregnadas de suero fetal bovino, con una solución de Seroalbúmina humana 5 % en salina y dejar por 2 minutos.
- ♦ Enjuagar las tiras, sumergiéndolas en un tubo conteniendo agua destilada, retirar utilizando una pinza y secar en estufa a 37°C.
- ♦ Una vez secas las tiras, colocar 10 μ L del anticuerpo marcado sobre la marca de 2 cm de la tira cromatográfica preparada.
- ♦ La corrida cromatográfica, se desarrolla en buffer fosfato salino 10 mM en etanol al 4%. hasta 9 cm desde la base.
- ♦ Secar las tiras, cortar por la mitad y contar en un contador gamma.
- ♦ Realizar el control por duplicado para cada tiempo de fijación
- ♦ La relación molar antígeno: anticuerpo se debe ser de 100:1. Para evitar la migración del anticuerpo en la cromatografía y dar resultados incorrectos.
- ♦ Cabe mencionar que durante todo el ensayo se trabajó en condiciones tales

que no se rompe la cadena de frío para la manipulación de antígeno.

2.4 % Fracción inmunoreactiva

La fracción inmunorreactiva (% FI) se determina utilizando la fórmula:

$$\% FI = (O/T)100 - \% UI$$

O: Actividad en el origen de la tira antígeno positivo.

T : Actividad total aplicada en la tira antígeno positivo.

%UI: Unión inespecífica: (Actividad en el origen/ Actividad Total)x 100, de la tira antígeno negativo.

3 RESULTADOS OBTENIDOS

Se obtuvo los siguientes resultados para un tiempo de fijación t = 20 segundos (tabla 1) y tiempo de fijación t = 30 minutos (tabla 2).

Tabla 1. Tiempo de Fijación 20 segundos.

ENSAYO	UNION INESPECÍFICA (%UI)	FRACCIÓN INMUNOREACTIV A (%FI)
1	4,82 ± 0,2	27,20 ± 1,32
2	4,22 ± 0,15	29,38 ± 1,23

Tabla 2. Tiempo de Fijación 30 minutos.

ENSAYO	UNION INESPECÍFICA (%UI)	FRACCIÓN INMUNOREACTIV A (%FI)
1	24,17 ± 1,3	82,67 ± 1,9
2	12,34 ± 1,01	73,97 ± 2,1

La Pureza radioquímica obtenida en los ensayos fueron mayores a 90 %.

Tabla 3. Pureza Radioquímica.

ENSAYO	PUREZA RADIOQUIMICA (%)
1	95,75 ± 0,38
2	95,66 ± 2,4

Las siguientes gráficas muestran los resultados para tiempo de contacto t=20 segundos, Grafico N°1 y t=30 minutos, Gráfico N°2. El gráfico N°3 nos muestra la comparación de los resultados para los tiempos de contacto ensayados.

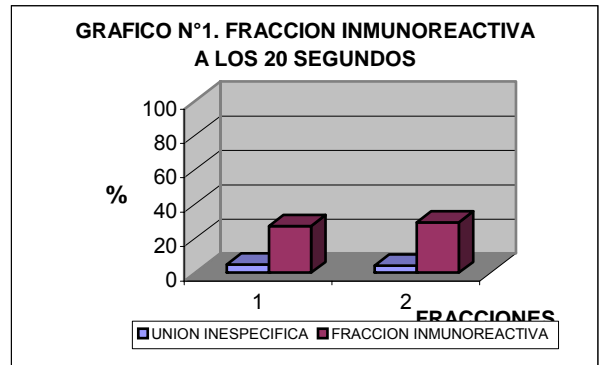


Gráfico 1. Tiempo de Fijación 20 segundos.

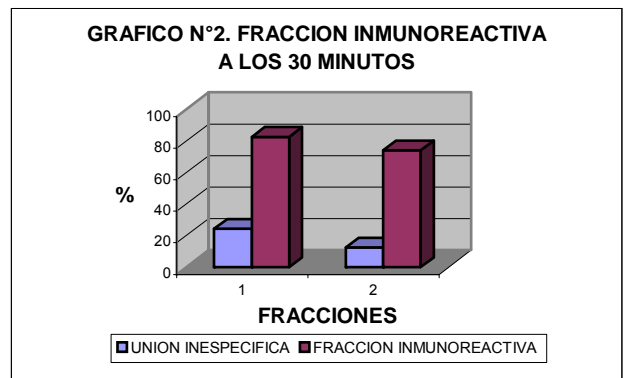


Gráfico 2. Tiempo de Fijación 30 minutos.

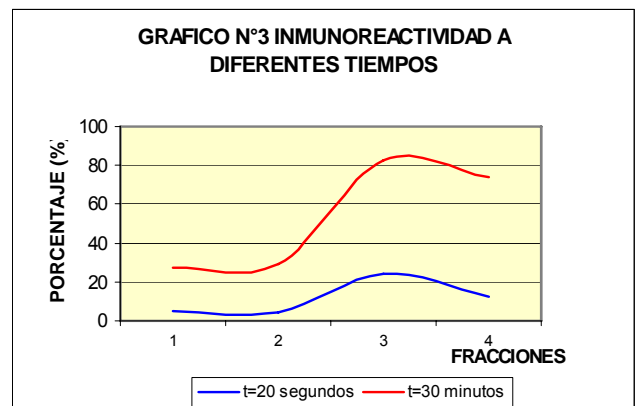


Gráfico 3. Comparación de Inmunoreactividad a Diferentes Tiempos de Fijación.

4 DISCUSIÓN

La fracción inmunoreactiva obtenido en las tiras de antígeno positivo, a un tiempo de contacto de 20 segundos, varía de 25 a 29 %, la unión inespecífica varía de 4,2 a 4,9 %. La fracción inmunoreactiva obtenido en las tiras de antígeno positivo, a un tiempo de contacto de 30 minutos, varía de 73% a 82 %, la unión inespecífica varia de 12 a 24 %.

En el gráfico 1 se aprecia claramente, que la unión del complejo antígeno-anticuerpo, es menor. En el gráfico 2 se observa, que la unión del complejo antígeno-anticuerpo marcado, es mayor para ese tiempo de fijación de 30 minutos.

En el gráfico 3 se aprecia la unión del complejo antígeno-anticuerpo, en los dos diferentes tiempos de fijación ensayados, se aprecia nuevamente que el tiempo de fijación de 30 minutos es el que da mayor % de U.E. Para los ensayos realizados, la pureza radioquímica siempre fue mayor del 95 %.

5 CONCLUSIONES

- ◆ Siguiendo el método descrito en la ref. (1) con un tiempo de fijación de 20 segundos los resultados han sido bajos, 22 a 27 % de Fracción inmunoreactiva.
- ◆ Optimizando el método descrito, con la variación de mayor tiempo de fijación del antígeno al soporte cromatográfico, de 30 minutos, se ha logrado un % entre 75 a 80 de Fracción inmunoreactiva.

- ◆ Queda pendiente analizar ensayos a diferentes tiempos para establecer el tiempo óptimo de fijación.

6 REFERENCIAS

- [1]. OIEA-IPEN. ARCAL LII (RLA/2/010) Curso Regional de capacitación sobre preparación y control de calidad de Radiofármacos basados en anticuerpos monoclonales, protocolo modelo proyecto. Febrero 2002. p. 22-23.
- [2]. Zamora PO, Ksass AS, Cardillo CR, Lambert P, Budd MJ, Rodhes BA. Affinity thin layer Chromatography test of the Immunereactive Fraction of Radiolabeled Antibodies. *RhoMed*, Albuquerque, NM, USA. 16(18) 1994. p. 306-311.
- [3]. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Editors. *Inmunología Celular y molecular*: Madrid: Mc Graw-Hill; 2002.
- [4]. Florentino S, Gutierrez MF, Rueda N, Rodríguez J. *La inmunología en el diagnóstico clínico*. Bogota: Ed. CEJA; 1994.

Agradecimientos:

Al OIEA por facilitar los materiales y reactivos que ayudaron a realizar este trabajo dentro del marco de actividades del Proyecto Regional ARCAL LII. También un reconocimiento especial a la Dra. Guillermina Ferro por facilitar la información para llevar a buen termino el presente trabajo.