

# Obtención y purificación de fragmentos de un anticuerpo monoclonal contra el antígeno carcinoembrionario, IOR-CEA

Ana Digna Avila C,\* Ramón Zamorano,\* Gilmara Pimentel\*\*

## RESUMEN

La idea de utilizar los anticuerpos monoclonales (AcMs) como portadores de otras moléculas tóxicas a las células neoplásicas, para provocar la muerte celular de forma específica ha sido utilizada por diversos grupos de investigación. Se han utilizado anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de neoplasias malignas y sus metástasis, fundamentalmente en el campo de la medicina nuclear, mediante técnicas de inmunogammagrafía. Sin embargo, en algunos casos resulta más ventajoso la utilización de los fragmentos de los anticuerpos monoclonales ya que, debido a su tamaño molecular presentan mayor aclaramiento del torrente sanguíneo con mayor acumulación en el tejido blanco y menor probabilidad de formación de inmunocomplejos. El objetivo del presente artículo consiste en la obtención de fragmentos Fab y F (ab')<sub>2</sub> a partir del anticuerpo monoclonal IOR-CEA, generado contra el antígeno carcinoembrionario. La obtención de los fragmentos Fab y F (ab')<sub>2</sub> se realizó mediante digestión enzimática con papaína y pepsina, respectivamente. Se utilizaron las enzimas acopladas a una matriz de AH-Sepharosa para facilitar la separación de las mismas de la mezcla al concluir la reacción. Los resultados fueron satisfactorios con respecto a la obtención del fragmento Fab, no siendo así para los fragmentos F (ab')<sub>2</sub>, debido a que la pepsina, una vez acoplada a la matriz, perdió su actividad enzimática. Una vez establecidas las condiciones de reacción se obtuvieron los fragmentos Fab y se purificaron mediante una cromatografía de afinidad utilizando una matriz de proteínas A-Sepharosa, con un rendimiento de un 85% y manteniéndose su actividad biológica, lo cual fue ensayado utilizando técnicas de ELISA e inmunohistoquímica en cortes de tejido. El marcaje con <sup>99m</sup>Tc fue efectivo manteniéndose la actividad biológica de los fragmentos Fab, lo que los hace ser buenos candidatos para su utilización en la detección de tumores colorrectales y sus metástasis mediante inmunogammagrafía.

**Palabras clave:** Anticuerpos monoclonales, antígeno carcinoembrionario, fragmentos, purificación, anticuerpos monoclonales contra el CEA.

## ABSTRACT

*The advent of monoclonal antibodies (MoAbs) has already made an impact on cancer diagnosis, particularly in the areas of immunoscintigraphy in order to detect malignant tumors and its metastases. Although several clinical trials of MoAbs targeted drugs, toxins or radionuclides are in course in certain circumstances it may be desirable to generate fragments of MoAbs. This report describes the preparation of Fab and F (ab')<sub>2</sub> fragments of MoAb against the carcinoembryonic antigen (IOR-CEA) by enzymatic digestion using papain and pepsin, respectively. The main aim was to obtain highly purified fragments with preserved immunological activity. Both, papain and pepsin were linked to AH-Sepharose matrix in order to improve the separation of the enzyme in the reaction mixture. Papain digestion led to the formation of Fab-IOR-CEA fragment and following Protein-A Sepharose affinity chromatography, the yield of pure fragment was 85% with immunological activity preserved tested for both ELISA and immunohistochemistry. After pepsin digestion, no formation of F (ab')<sub>2</sub> fragment was observed. The labelling of Fab-IOR-CEA with <sup>99m</sup>Tc was effective keeping its biological activity. This result indicates that this fragment may be useful for detection of tumors and metastases using immunoscintigraphy.*

**Key words:** Monoclonal antibodies, fragments, purification, carcinoembryonic antigen.

Con la aparición de la tecnología para la obtención de anticuerpos monoclonales homogéneos y específicos para un mismo determinante antigénico,<sup>1,2</sup> surgió la idea de la utilización de los mismos para el diagnóstico y tratamiento de las neoplasias, con el objetivo de disminuir las reacciones adversas producidas por los citostáticos actualmente usados.

La idea de utilizar anticuerpos como vía para provocar la muerte de células neoplásicas de forma específica fue formulada por Paul Ehrlich, quien pensó en la utilización de anticuerpos como portadores de agentes farmacológicos.<sup>3</sup> Se han utilizado anticuerpos monoclonales como portadores de toxinas, principalmente la ricina<sup>4,5</sup> para lograr la muerte de células malignas. Sin embargo, para algunos propósitos,



\* Centro de Inmunología Molecular, Cd. de La Habana, Cuba.

\*\* Instituto de Oncología y Radiobiología. Cd. de La Habana, Cuba.

resulta más ventajoso utilizar fragmentos de los anticuerpos<sup>6,7</sup> por las siguientes razones: I) pérdida del fragmento Fc para el cual hay receptores en muchas células; II) mayor aclaramiento del torrente sanguíneo que es muy importante cuando se usan unidos a radioisótopos y drogas;<sup>8</sup> III) disminución de la posibilidad de formación de inmunocomplejos.

Así, se han utilizado los fragmentos de anticuerpos monoclonales en la construcción de inmunotoxinas<sup>9</sup> y en la detección de tumores primarios y sus metástasis, mediante inmunogammagrafía.<sup>10-12</sup> Se han generado fragmentos de anticuerpos por ingeniería genética con retención de las propiedades de enlace al antígeno similar a la inmunoglobulina original, pero con la ventaja de su rápida penetración en el tumor y rápido aclaramiento del torrente sanguíneo. Estos estudios se han realizado en pacientes con carcinomas colorrectales metastásicos y con invasión del hígado.<sup>13</sup>

Se han realizado comparaciones entre anticuerpos monoclonales y sus diversos fragmentos marcados con<sup>125</sup>I en cuanto a la penetración en los tumores y sus aclaramientos del torrente sanguíneo.<sup>14</sup>

Los análisis autorradiográficos cuantitativos de los tumores, extraídos por cirugía, demuestran que el sFv se destruye rápidamente en la masa tumoral a los 30 minutos, después de la inyección, mientras que la IgG intacta alcanzó un grado equivalente de penetración a las 48-96 horas después de la inyección. La distribución de los F (ab') mostraron una penetración intermedia. Estos resultados demuestran la ventaja de los diferentes fragmentos con respecto a las inmunoglobulinas que les dan origen.<sup>15,16</sup>

Por otra parte, se han producido AcMs que reconocen antígenos en tumores malignos de cabeza y cuello con un nivel de acumulación de estos AcMs en los tumores que oscila entre 20-31% de incorporación/kg de peso del tumor.<sup>17</sup>

Para la preparación de fragmentos bivalentes F (ab')<sub>2</sub> se ha utilizado el método de digestión con la enzima pepsina a diferentes subclases de inmunoglobulinas de ratón.<sup>18-22</sup> La ruptura de las inmunoglobulinas para obtener fragmentos monovalentes Fab, es usualmente llevado a cabo por digestión con la enzima papaína.<sup>23-25</sup>

El objetivo del presente trabajo consistió en la obtención y purificación de fragmentos del anticuerpo monoclonal IOR-CEA, utilizando las enzimas pepsina y papaínas inmovilizadas a una matriz de AH-Sepharosa. Se establecieron las condiciones óptimas para la fragmentación, así como un sistema de evaluación de la actividad biológica de los fragmentos

Fab obtenidos por un sistema inmunoenzimático de ELISA directo, utilizando un sistema ultramicroanalítico (SUMA).

## MATERIAL Y MÉTODOS

*Anticuerpo monoclonal (AMC):* El IOR-CEA es un anticuerpo monoclonal (AcM) del tipo IgG1, secretado por un hibridoma derivado de la fusión del mieloma de ratón P3/X63-Ag8-653 con esplenocitos de ratones Balb/c inmunizados con el antígeno carcinoembrionario (CEA) purificado a partir de metástasis hepáticas de pacientes con carcinoma de colon. Este anticuerpo monoclonal identifica el CEA por RIA y ELISA.

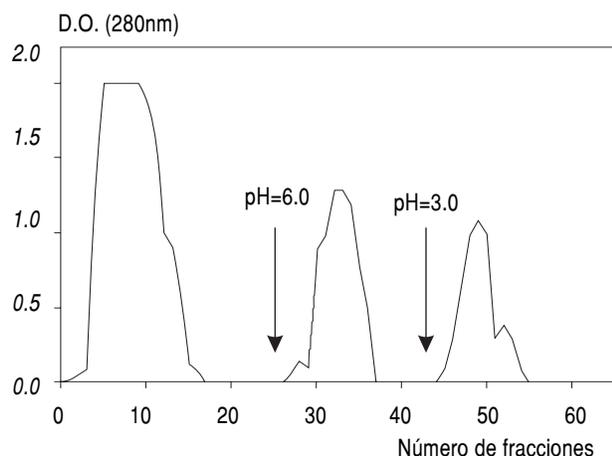
Reconoce 7/7, 12/12, 3/3 adenocarcinomas de colon de alto, medio y bajo grado de diferenciación por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). También identifica carcinomas de pulmón y adenocarcinoma de mama, estómago y vejiga entre otros. Su reactividad en tejidos normales es negativa para pulmón, testículo, vaso y tejido linfoide.<sup>26</sup>

*Purificación del AMC IOR-CEA-1:* El AcM IOR-CEA-1 fue purificado a partir del fluido ascítico obtenido por la inmunización de ratones Balb/c con células del hibridoma productor del AcM, utilizando cromatografía de afinidad con Proteína A-Sepharosa (Pharmacia) equilibrada en Glicina 1.5M, NaCl 3M, pH=8.9. Se utilizó como tampón de elución citrato de sodio 100 mM a pH=6.0.

La pureza del AcM fue verificada por electroforesis en un gel de 7% de acrilamida<sup>27</sup> utilizando el método de tinción con Azul de Comassie.

*Inmovilización de enzimas a AH-Sepharosa:* Las enzimas papaína y pepsina se acoplaron a 10 g de AH-Sepharosa utilizando glutaraldehído como agente acoplante.<sup>28</sup>

*Condiciones óptimas de fragmentación:* Para establecer las condiciones óptimas de fragmentación del IOR-CEA utilizando las enzimas acopladas a la matriz de AH-Sepharosa se utilizaron, en el caso de la pepsina, tiempos de reacción de ocho y 24 horas con 1 y 0.5 mg del IOR-CEA para cada uno y 250 µL de la pepsina inmovilizada (4 mg de la enzima) en todos los casos, a 37°C con agitación constante y manteniendo el pH = 4.5 con tampón de acetato de sodio 20 mM; en el caso de la papaína se utilizaron 80, 50 y 25 µL de la enzima inmovilizada, que corresponden a 400, 250 y 125 µg, respectivamente, con cuatro y ocho horas de tiempo de reacción y 1 mg del AcM en todos los casos a 37° C con agitación constante man-



**Figura 1A.**

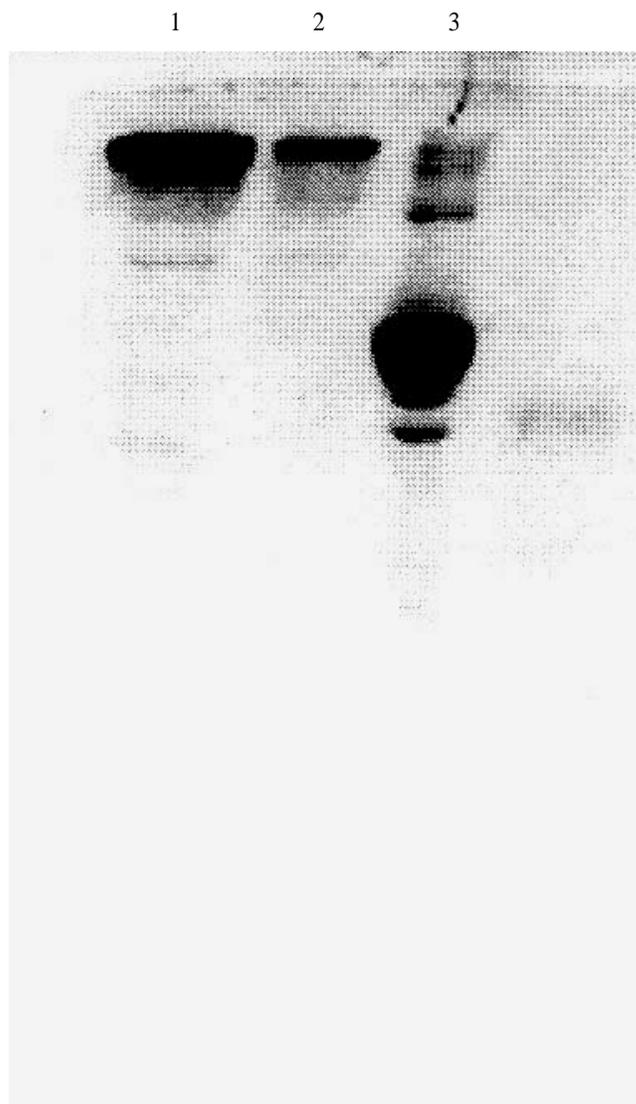
**Figura 1.** Purificación del IOR-CEA.

**A:** Cromatografía de afinidad en Proteína-A Sepharosa. El fluido ascítico rico en el IOR-CEA fue aplicado en una columna de 50 mL de Proteína-A Sepharosa equilibrada con Glicina 1.5M, NaCl 3M pH=8.9. La elución del AMC se realizó con citrato de sodio 100 mM, pH=6.0. La abscisa muestra las lecturas de densidad óptica a 280 nm y la ordenada el volumen de cada una de las fracciones.

**B:** Control de pureza del AMC purificado por SDS-PAGE.

La electroforesis se realizó con un gel de 10% de poliacrilamida y el método de tinción con azul de Coomassie R-250.

(1) IgG patrón; (2) IOR-CEA; (3) BSA.



**Figura 1B.**

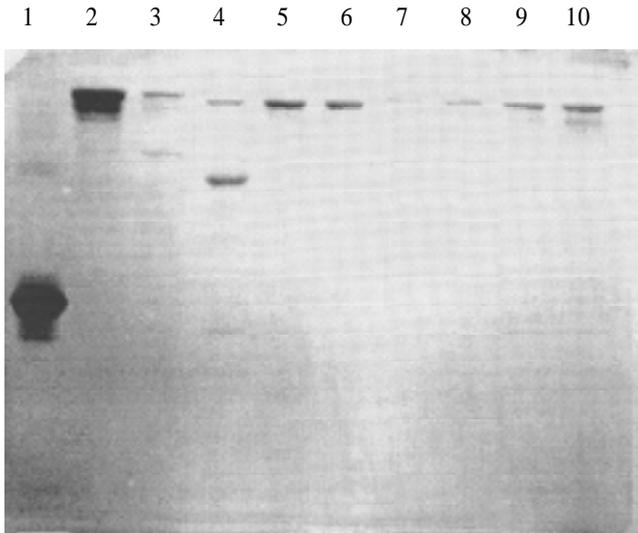
teniendo el pH = 6.2. El control de la reacción se realizó por electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE).

**Obtención de fragmentos Fab:** Los fragmentos Fab fueron preparados partiendo de una mezcla de reacción que contenía 12 mg de IOR-CEA (1.92 mg/mL) en buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM/EDTA 10 mM/DTT 1 mM pH = 6.2 y 576  $\mu\text{L}$  de papaína inmovilizada a la matriz de AH-Sepharosa, equivalente a 14.4 mg de la enzima. Se incubó a 37° C con agitación constante y al cabo de 4 horas se centrifugó a 3,000 rpm por 10 minutos; se tomó una alícuota del sobrenadante para SDS-PAGE y el resto se diluyó 1:1 (v/v) con tampón Glicina 1.5 M/NaCl 3M pH = 8.9 y se aplicó a una matriz de 3 mL de Proteína A-Sepharosa a una velocidad de 2 mL/h recogiendo fracciones de 2 mL cada una. Por último se eluyó con buffer citrato de sodio 100 mM pH = 6.0 para obtener el fragmento Fc que se produce de forma colateral en la digestión.

**Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE):** Para el análisis de las condiciones de la fragmentación, del curso de la reacción y del grado de pureza se

utilizó una electroforesis en gel de acrilamida de 12% mezclando cada una de las muestras (50 mg de proteína) con igual volumen del buffer de muestra [Tris-HCl 120 mM (pH = 6.8), SDS 4.8% (w/v), glicerol 20% (v/v)] y calentándose en baño de agua a 100°C por 3 min.<sup>19</sup> Como marcadores de peso molecular se utilizaron Albúmina de Suero Bovino (PM = 68 kDa), Ovoalbúmina (PM = 43 kDa), Inhibidor de Tripsina (PM = 23 kDa) y una Inmunoglobulina G (IgG) de ratón purificada (PM = 150 kDa).

**Inmunoelectroforesis (IEF):** Se realizó una inmunoelectroforesis en geles de agar al 2% en buffer barbitónico aplicando las muestras utilizando bromofenol azul como indicador de la corrida. Se aplicó una



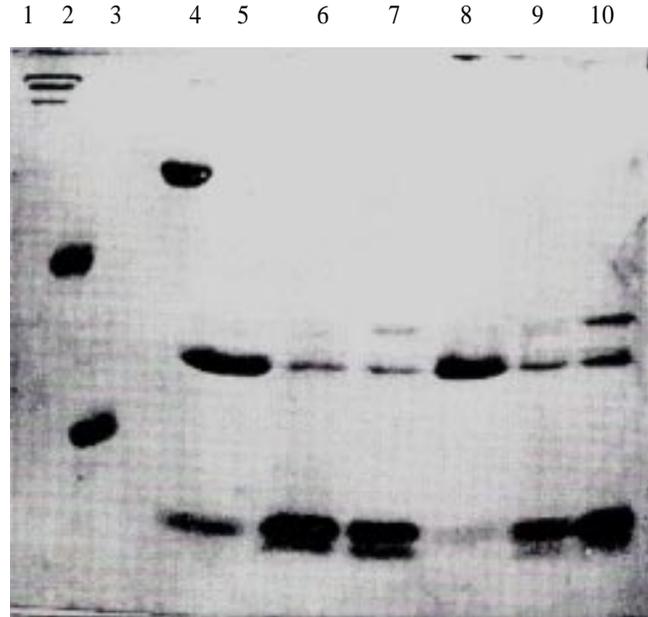
**Figura 2.** Fragmentación del IOR-CEA con pepsina inmovilizada. El estudio de las condiciones de la fragmentación con pepsina se realizó con 0.5 mg (7,8) y con 1 mg (9,10) de IOR-CEA a 8 y 24 horas. Se aplicaron 50 mg de proteína en un gel de 7% de poliacrilamida y se reveló con Azul de Comassie R250.

(1) BSA (PM = 63 kDa).  
 (2,5 y 6) IOR-CEA-1 intacto (PM = 150 kDa).  
 (3 y 4) Mezcla de reacción de IOR-CEA y pepsina libre con 8 y 24 horas de tiempo de reacción, respectivamente.  
 (7 y 8) Mezcla de reacción con 0.5 mg del IOR-CEA y 250 mL de pepsina inmovilizada con 8 y 24 horas, respectivamente.  
 (9 y 10) Mezcla de reacción con 1 mg del IOR-CEA y 250 mL de pepsina inmovilizada con 8 y 24 horas, respectivamente.

corriente de 8 mAmp y 5-7 volt/cm al cabo de una hora se aplicó en el propio gel 50 mL de anti-IgG purificada (1.7 mg/mL) dejándose en reposo durante toda la noche a 4° C. Se realizaron varios lavados con una solución de NaCl 9 g/L, se secaron los geles con papel de filtro y se tiñeron con Azul de Comassie.<sup>29</sup>

**Sistema ultramicroelisa (ELISA):** Para evaluar la actividad biológica de los fragmentos Fab obtenidos se estableció un sistema de Ultramicroelisa.<sup>30</sup>

Se recubrieron placas de PVC de ultramicroelisa de 96 pozo con 7 mg/mL de una solución del antígeno carcinoembrionario (CEA) en buffer bicarbonato 0.1 M pH = 9.6 durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda, al cabo de este tiempo se hicieron lavados con PBS/Tween 20 y se bloqueó por 1 hora a 37° C con leche descremada al 1%; se colocaron las muestras del Fab a diferentes concentraciones y como control positivo el IOR-CEA sin fragmentar; después de 1.5 horas de incubación a 37° C en cámara húmeda se reveló utilizando un conjugado anti-IgG de ratón en carnero con la enzima fosfatasa alcalina (aIgG-PA).



**Figura 3.** Fragmentación del IOR-CEA con papaína inmovilizada. El estudio de las condiciones de reacción con la enzima papaína se realizó utilizando 1 mg del IOR-CEA y 25, 50 y 80 mL de la matriz con la enzima acoplada y tiempos de reacción de 4 y 8 horas para cada uno. Se aplicaron 50 mg de proteína y se utilizó el método de tinción con Azul de Comassie-R250.

(1) IOR-CEA intacto (PM = 150 kDa).  
 (2) Ovoalbúmina (PM = 43 kDa).  
 (3) Inhibidor de tripsina (PM = 13 kDa).  
 (4) Albúmina de suero bovino, BSA (PM = 63 kDa).  
 (5 y 6) 25 mL de AH-Sepharosa con papaína acoplada a 4 y 8 horas, respectivamente.  
 (7 y 8) 50 mL de AH-Sepharosa con papaína acoplada a 4 y 8 horas, respectivamente.  
 (9 y 10) 80 mL de AH-Sepharosa con papaína acoplada a 4 y 8 horas, respectivamente.

Los valores de fluorescencia se midieron en un equipo SUMA en un rango de longitud de onda de 420-529 nm.

**Inmunohistoquímica (IHQ):** Se evaluó la actividad biológica del IOR-CEA y sus fragmentos Fab por inmunohistoquímica en cortes de tejidos de adenocarcinomas de colon utilizando como sistema de detección el complejo avidina/biotina peroxidasa (DAKO-PATS).<sup>26,31</sup>

**Marcaje con <sup>99m</sup>Tc:** Una solución del fragmento Fab-IOR-CEA (1 mg/mL, 400 µL), previamente ajustada a pH 4.5-5.0 con HCl 0.1M, fue marcado con <sup>99m</sup>Tc, utilizando SnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (100 mL, 0.06 mg/mL en HCl 0.01 M) y 10 mCi de <sup>99m</sup>Tc en solución salina.

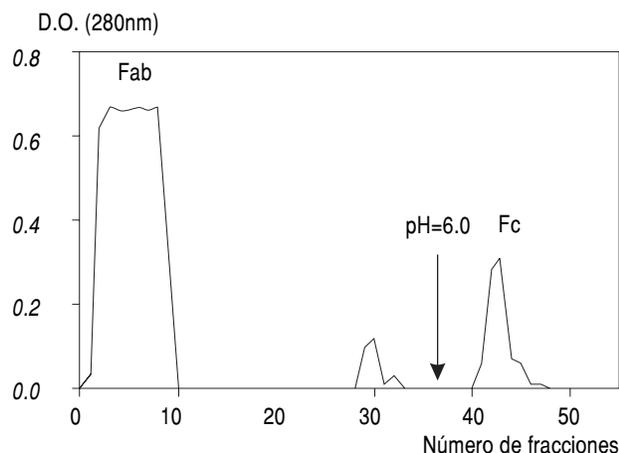


Figura 4A.

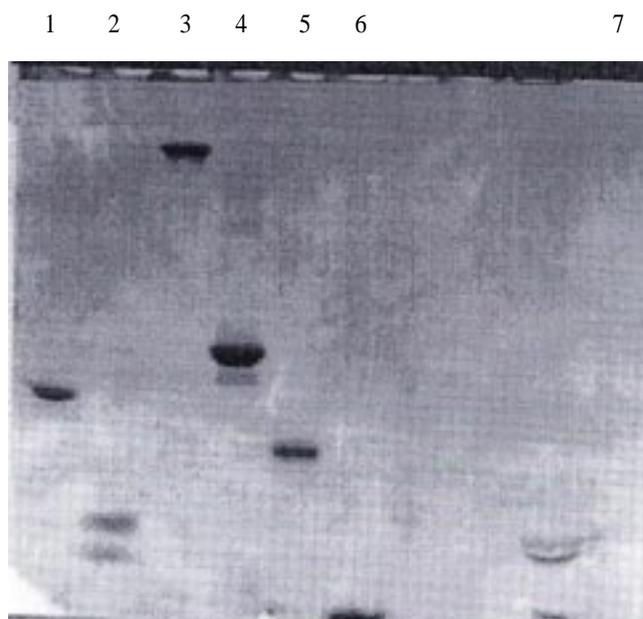


Figura 4B.

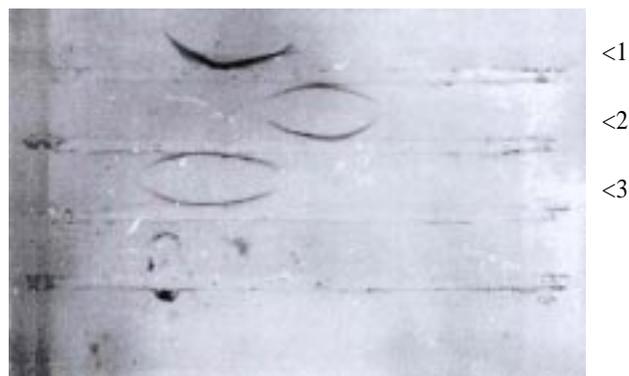
**Figura 4. Purificación del fragmento Fab.**

**A:** Cromatografía de afinidad con Proteína-A Sepharosa. La mezcla de reacción se aplicó a una columna de 3 mL de Proteína-A Sepharosa utilizando buffer Glicina 1.5 M/NaCl 3M pH = 8.9. Y la elución se realizó con buffer citrato 100 mM a pH = 6.0. La abscisa indica las lecturas a densidad óptica a 280 nm y la ordenada corresponde al número de fracciones.

**B:** Control de pureza por SDS-PAGE:

La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida de 12% utilizando el método de tinción con Azul de Comassie R-250.

- (1) Fragmento Fab purificado sin condiciones de reducción (PM = 50 kDa).
- (2) Fragmento Fc en condiciones de reducción (PM = 25 kDa).
- (3) IOR-CEA intacto (PM = 150 kDa).
- (4) Albúmina de suero bovino, BSA (PM = 63 kDa).
- (5) Ovoalbúmina (PM = 43 kDa).
- (6) Inhibidor de tripsina (PM = 13 kDa).
- (7) Fragmento Fab purificado en condiciones de reducción (PM = 25 kDa).



**Figura 5. Control de pureza de los fragmentos por inmunoelectroforesis.**  
**A:** La inmunoelectroforesis se realizó en gels de agar al 2%, con una corriente de 8 mA y 5-7 volt/cm. Al transcurrir 1 hora se aplicaron 50 mL de la algG de 1.7 mg/mL. Los gels se secaron y se tiñeron utilizando azul de Comassie.

- (1) IOR-CEA intacto.
- (2) Fragmento Fc obtenido en la digestión.
- (3) Fragmento Fab.

El tiempo de incubación para el marcaje fue de 15 minutos. El control de pureza se realizó mediante cromatografía de papel (FN-4) en un sistema etilenglicol-H<sub>2</sub>O (1:10) y la inmunoreactividad mediante inmunohistoquímica en cortes de tejidos.<sup>32-34</sup>

## RESULTADOS

**Purificación del AMC IOR-CEA-1:** La purificación de 37 mL de fluido ascítico enriquecido con el IOR-CEA dio como resultado la obtención de 48 mg totales de dicho anticuerpo monoclonal purificado con una actividad biológica de 19 mg/mL por IHQ. Se muestra el perfil obtenido de la cromatografía (Figura 1a) así como el control de pureza por SDS-PAGE (Figura 1b).

**Inmovilización de enzimas a AH-Sepharosa:** Con el acoplamiento de las enzimas pepsina y papaína a la matriz de AH-Sepharosa se obtuvieron matrices con 16 mg de pepsina/mL de gel para un 94% de acoplamiento y 5 mg de papaína/mL de gel para un 85% de acoplamiento.

**Condiciones de fragmentación:** Los resultados obtenidos demuestran que en el caso de la matriz con pepsina inmovilizada no se logró obtener los fragmentos F (ab)<sub>2</sub> del IOR-CEA (Figura 2) aun a las 24 horas de incubación, pues en SDS-PAGE sólo se observa la banda correspondiente al AMC sin fragmentar. Sin embargo, se demuestra que la pepsina sin unir a la matriz logró la ruptura del anticuerpo monoclonal a 8 y 24 horas de tiempo de reacción.

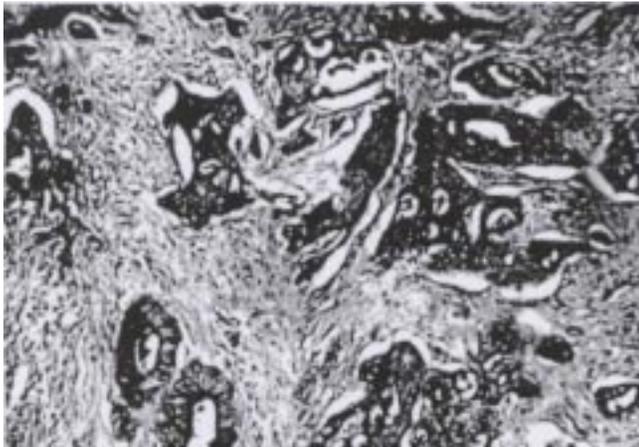


Figura 6A.

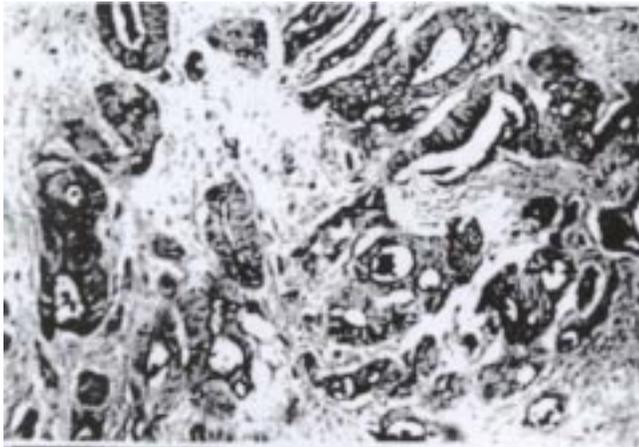
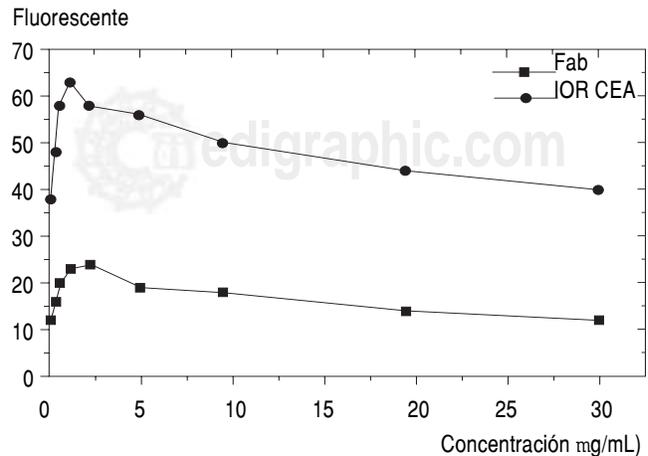


Figura 6B.



Figura 6C.

**Figura 6.** Inmunorreactividad por inmunohistoquímica. Se utilizaron cortes de tejido de un adenocarcinoma de colon. El marcaje del IOR-CEA (a), Fab-IOR-CEA (b) y <sup>99m</sup>Tc-Fab-IOR-CEA (c) está localizado predominantemente en el citoplasma de las células malignas.



**Figura 7.** Actividad biológica del Fab-IOR-CEA por un sistema ultrami-croanalítico (SUMA). Se utilizó en placas de 96 pozos el antígeno CEA a una concentración de 7 mg/mL en buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 0.1M pH = 9.6 como antígeno de recubrimiento durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron tres lavados con PBS/Tween-20 y bloqueo con leche descremada al 1% durante 1 hora. Se aplicaron diferentes concentraciones de IOR-CEA (---) y Fab-IOR-CEA (■-■-■) durante 1.5 h a 37 °C en cámara húmeda. El revelado se realizó con un conjugado anti-IgG de ratón en carnero con fosfatasa alcalina, midiéndose los valores de fluorescencia en un rango de 420-529 nm en un equipo SUMA. La ordenada expresa los valores de fluorescencia y la abscisa a concentración de las muestras expresada en mg/mL.

Con la matriz de papaína inmovilizada se obtuvieron los fragmentos Fab (Figura 3) en todas las condiciones probadas, por lo que se escogió como tiempo de reacción cuatro horas, así como 25 mL de matriz (125 mg de la enzima) por cada mg de anticuerpo monoclonal. En la figura 3 se observan las bandas correspondientes a los fragmentos Fab (PM = 50 kDa) en una electroforesis en un gel de acrilamida de 12% en condiciones de reducción.

**Purificación de los fragmentos Fab:** La mezcla de reacción fue aplicada en una columna de Proteína A-Sepharosa, para separar los fragmentos Fab que no se unen a la matriz y eluyen en el volumen de aplicación de la mezcla. Una vez efectuados los lavados se eluye el fragmento Fc que quedó retenido en la matriz (Figura 4). El perfil cromatográfico muestra un pico en el volumen de aplicación correspondiente a los fragmentos Fab del IOR-CEA y un segundo pico que eluye con citrato de sodio pH = 6.0 correspondiente al fragmento Fc. De esta forma se obtienen 8.7 mg de Fab-IOR-CEA para un rendimiento de 87.1%.

Al material excluido de Proteína-A Sepharosa (Fab), así como el obtenido de la elución con buffer citrato a pH = 6 (Fc) se le hizo una inmunoelectrofo-

resis teniendo como control el IOR-CEA sin fragmentar (Figura 5a). Con los arcos de precipitación obtenidos se observa la migración hacia el ánodo del fragmento Fc, del Fab y el IOR-CEA hacia el cátodo no obteniéndose impurezas detectables.

Igualmente se realizó electroforesis en gel de acrilamida en la cual se observa una banda única para los fragmentos Fab y Fc obtenidos una vez realizada la purificación de los mismos (Figura 5b).

La determinación de la actividad biológica del fragmento Fab por IHQ dio como resultado un marcaje específico en los tejidos que expresan el antígeno CEA, pero con una intensidad menor con respecto a la del anticuerpo monoclonal intacto. El marcaje del fragmento Fab con el isótopo radiactivo  $^{99m}\text{Tc}$  dio una actividad de 2 mCi/mg y un rendimiento de  $95\% \pm 3\%$  manteniéndose su capacidad de reconocimiento del antígeno en cortes de tejido con respecto al Fab sin marcar (Figura 6).

En el ensayo de ELISA se observa el mismo fenómeno que en IHQ (Figura 7), el Fab presenta menor reconocimiento por el antígeno que el IOR-CEA sin fragmentar lo que se demuestra porque a las mismas concentraciones de ambos, los valores de fluorescencia obtenidos son menores.

## DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que el acoplamiento de la enzima pepsina con la matriz de AH-Sepharosa no fue efectivo, ya que no se logró en ninguna de las condiciones probadas obtener los fragmentos  $F(ab)_2$ . Según la electroforesis (Figura 2) se observa que con la pepsina libre se obtienen fragmentos del IOR-CEA, no ocurriendo lo mismo cuando se une a la matriz, lo que indica que en el acoplamiento de la pepsina a la AH-Sepharosa se compromete el centro activo de la enzima lo que provoca que ésta se inactive. La unión de la papaína a la matriz de AH-Sepharosa fue efectiva, obteniéndose el fragmento Fab con un tiempo de reacción de cuatro horas y un rendimiento de 87%. Con la purificación del Fab, utilizando Proteína-A Sepharosa se obtiene el fragmento inmunolectroforéticamente puro. La actividad biológica del Fab disminuye con respecto a la del anticuerpo monoclonal intacto, lo cual es lógico por ser un fragmento monovalente. Esto hace que sea capaz de reconocer al antígeno en cortes de tejidos en IHQ, pero su intensidad de marcaje es menor. Por la misma razón, los valores de fluorescencia obtenidos en el ELISA son menores para el Fab con respecto al IOR-CEA intacto.

El marcaje con  $^{99m}\text{Tc}$  fue efectivo, ya que el Fab-IOR-CEA no perdió su capacidad de reconocimiento

por el antígeno en cortes de tejidos por IHQ, lo que lo hace útil para su aplicación en inmunogammagrafía en la detección de tumores y metástasis en pacientes con sospechas clínicas de carcinomas o adenocarcinomas de colon.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.
2. Gavilondo CJ. Anticuerpos monoclonales. Producción y aplicaciones. *Rev Cub Inv Biom* 1984; 3, 98-111.
3. Ehrlich P. Collected studies of immunology. Vol II, New York: John Wiley, 1906: 442-447.
4. Thorpe PE, Edwards DC, Davies AJS, Ross WCJ. Monoclonal antibody-toxin conjugates: aiming the magic bullets. In: J. Fabre and A. Mc Michael (eds). *Monoclonal antibodies in clinical medicine*. London: Academic Press, 1982: 168-190.
5. Vitteta ES, Uhr WJ. Immunotoxins. *Am Rev Immunol* 1985; 3: 197-212.
6. Buchegger F, Mach JP, Leomard P, Carrel S. Selective tumor localization of radiolabeled anti-human melanoma monoclonal antibody fragment demonstrated in the nude mouse model. *Cancer* 1986; 58(3): 655-662.
7. Larson SM. Radiolabelled monoclonal anti-tumor antibodies in diagnosis and therapy. *J Nucl Med* 1985; 26 (5): 530.
8. Burchiel SW, Burke D, Breslow K. Biodistribution of radiolabeled antibodies and their fragments: An immunopharmacologic approach to in vivo tumor imaging. *Proc SW Pharm Assoc* 1982; 25: 405-408.
9. Masuho Y, Kishida K, Saito M, Umemoto M, Hara T. Importance of antigen valency and the nature of the cross-linking bond in Ricin A-chain conjugates with antibody. *J Biochem* 1982; 91: 1583-1591.
10. Rhodes BA, Zamora PO, Newell KD, Valdez E. Technetium-99m labeling of murine monoclonal antibody fragments. *J Nucl Med* 1986; 27 (5): 685-693.
11. Morrison RT, Lyster DM, Alcorn L. Radioimmunoimaging with  $^{99m}\text{Tc}$  monoclonal antibodies: Clinical studies. *Int J Nucl Med Biol* 1984; 11: 184-188.
12. Le Doussal JM, Gruaz-Guyon A, Martín M, Gautherot E, Delaage M, Barbit. Targeting of Indium-111-labeled bivalent human melanoma mediated by biospecific monoclonal antibody conjugates: imaging of tumors hosted in nude mice. *Cancer Res* 1990; 50: 3445-3452.
13. Larson SM, El-Shirbiny AM, Divgi RCh, Sgouros G, Finn RD, Tschmelitsh J, Picon A, Whitlow M, Scholm J, Zhang J, Cohen AM. Single chain antigen binding protein (sFvCC49): First studies in colorectal carcinoma metastatic to liver. *Cancer Supplement* 1997; 80 (12): 2458-2468.
14. Maillat T, Roche AC, Therain F, Monsigny M. Time course localization of immunoglobulin M monoclonal antibody and its fragments in leukemic tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 1985; 19: 177.
15. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M et al. Microautoradiographic analysis of the normal organ distribution of radioiodinated single-chain sFv and other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1993; 53: 3776-83.
16. Beale D, Van Dort T. A comparison of the proteolytic fragmentation of immunoglobulin M from several different mammalian species. *Comp Biochem Physiol* 1982; 71B: 475.
17. Van Gog FB, Visser WMG, Stroomeer WGJ, Roos JC, Snow GB, van Dongen GAMS. High dose Rhenium-186-labelling of

- monoclonal antibodies for clinical application: Pitfalls and solutions. *Cancer Supplement* 1997; 80 (12): 2360-2370.
18. Lamoyi E, Nisonoff A. Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses. *J Immunol Methods* 1983; 56: 235-243.
  19. Pascual DW, Clem LW. Low temperature pepsin proteolysis. An effective procedure for mouse IgM F(ab')<sub>2</sub> fragment production. *J Immunol Methods* 1992; 146: 249-255.
  20. Lin LC, Putman FW. Cold pepsin digestion. A novel method to produce the Fv fragment from human immunoglobulin M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 2649.
  21. Matthew WD, Reichardt LF. Development and application of an efficient procedure for converting mouse IgM into small, active fragments. *J Immunol Methods* 1982; 50: 239.
  22. Killian JJ, Hotgrewe EM. Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin G. *Clin Chem* 1983; 29 (11): 1982-1984.
  23. Lamoyi E. Preparation of proteolytic fragments of IgG. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, Inc. 1986; Vol. 121.
  24. Mage MG. Preparation of Fab fragments from IgGs of different animal species. *Meth Enzimol* 1980; 70: 142-150.
  25. Goding JW. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J Immunol Methods* 1978; 20: 241-253.
  26. Tormo BR, Gavilondo JV, Domínguez C, Freyre M, Rodríguez T, Biberfeld P. CEA in colonic adenocarcinomas and precancerous lesions. An immunohistochemical study with a novel monoclonal antibody. *Acta Path Microb Immunol Scand* 1989; 97: 1073-1080.
  27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
  28. Hjerten S, Zha M. Micropreparative version of high performance electrophoresis. The electrophoretic counterpart of narrow-bore high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1985; 327: 157-164.
  29. Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Chapter 19. In: *Handbook of experimental immunology*. 3rd ed. Vol 1. London: Blackwell Scientific Publications, 1978.
  30. Horn A, Fernandez-Yero JL, Schulse M. Ultramicroelisa for alpha-feto protein with the chamber analytical technique. *J Clin Chem Clin Biochem* 1981; 19: 702-705.
  31. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
  32. Rhodes BA, Zamora PO, Newell KD, Valdez EF. Technetium-99m labeling of monoclonal antibodies fragments. *J Nucl Med* 1986; 27: 685-693.
  33. Schwarz A, Steinstrasser A. A novel approach to Tc-<sup>99m</sup> labeled monoclonal antibodies (abstract). *J Nucl Med* 1987; 28: 721.
  34. Pak KY, Nedelman MA, Stewart R. A rapid and efficient method for labeling IgG antibodies with <sup>99m</sup>Tc and comparison to Fab' antibody fragments. *J Nucl Med* 1989; 30: 493.

Dirección para correspondencia:

**Ana Digna Avila Cabrera**  
Instituto Nacional de Oncología y  
Radiobiología  
Calle 29 entre E y F, Vedado,  
Ciudad de La Habana, Cuba  
Tel: 55 2586.  
E-mail: uninor@infomed.sld.cu  
Fax: 537-55 25 87; 537-66 22 27

Fecha de recepción: 24/08/99.  
Fecha de aceptación: 22/03/00.