



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

19324

107
1000
11/10/83

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA
AMERICA LATINA Y EL CARIBE
PNUD/UNESCO/ONUDI
RLA/83/003**

Contrato No. 91/008

**Proyecto: Producción masiva de anticuerpos
monoclonales: un esfuerzo compartido en
América Latina**

Segundo Año de Actividades

País: México

Informe Técnico Final

**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DEL
INSTITUTO BUTANTAN**

**"PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES (PNUD)"**

**PARTICIPANTE: BIOL. RENE HERNANDEZ VARGAS.
ORIGEN: CIIGB/UNAM MEXICO**

SAO PAULO BRASH A 7 DE DICIEMBRE DE 1990

INTRODUCCION

Los anticuerpos monoclonales, desde que aparecieron hasta hoy tienen un mercado importante dentro del campo de la biotecnología, así también las condiciones del cultivo a gran escala para hibridomas ha evolucionado constantemente, logrando obtener altos rendimientos en la producción de anticuerpo y además las condiciones de cultivo a gran escala permite obtener el producto con estricto control de pureza en el caso de uso humano, en muchos casos los reportes indican que los procesos de cultivo a gran escala pueden superar la producción en ascitis y aún más mejorar costos de producción siendo por lo tanto una alternativa bastante viable, considerando a futuro aquellos anticuerpos de tipo recombinantes como una opción más.

OBJETIVOS

A) Sistemas de cultivo.

- 1.- Cultivo estacionario en T-Flask y congelacion de celulas.
- 2.- Cultivo de hibridomas en bioreactor de fibra hueca (AMICON).
- 3.- Cultivo en suspensión de celulas encapsuladas en alginato de sodio.
- 4.- Cultivo de celulas libres en suspensión en spinner.

B) Estudios metabólicos.

- 1.- Medición de consumo de glucosa.
- 2.- Medición de producción de lactato.
- 3.- Pruebas de actividad de anticuerpo por ELISA y hemaglutinación.

C) Purificación de anticuerpo monoclonal.

- 1.- Purificación por afinidad en Sepharosa-proteína A.
- 2.- Analisis de pureza por electróforésis.

D) Sesión de seminarios:

- 1.- Generalidades de anticuerpos monoclonales (PhD. Ana María Moro-Furlani).
- 2.- Modelos de bioreactores (Dr Edgar Arias Rodriguez).
- 3.- Oxígeno disuelto (Dr Haroldo Hess)
- 4.- Cromatografía de afinidad (Miriam Nakamura)
- 5.- Anticuerpos de 2ª generación (Biol. René Hernández V.).
- 6.- Anticuerpos con actividad enzimática (Fernando Chavez)
- 7.- Medios libres de suero para hibridomas (Mara L. Zucheran)
- 8.- Control de calidad de anticuerpos Monoclonales en terapia (M. en C. Mª Tereza Alves)

MATERIAL Y METODOS

A).-Modelos de trabajo.

1.- Hibridoma con actividad anti-TSH (Tiroid stimulant hormone) y tiene importancia en el diagnóstico de hipotiroidismo congénito. Dicho hibridoma fue obtenido en el CIIGB/UNAM en Cuernavaca Morelos México.

2.-Hibridoma con actividad anti-antígeno B (Tipo sanguíneo) obtenido en el instituto en Sao Paulo Brasil.

B).-Cinética de metabolismo.

El analisis del comportamiento metabólico del hibridoma-TSH se realizó cultivando 16 T-Flask con un número igual de celulas en un volumen de 10ml de DMEM-10% SFB determinando diariamente los niveles de: pH, Glucosa, Lactato y actividad por ELISA.

-La Glucosa se determinó en todos los casos por el kit de Bioclin.

-Lactato fue determinado por un kit de Sigma (72600).

-ELISA fue hecho sensibilizando placas de pvc con 250ng/pozo de TSH (ICN) con tampon de carbonato-bicarbonato pH 9.5 y haciendo un revelado con fosfatasa alcalina.

-Los tres casos fueron establecidos espectrofotométricamente en un lector de ELISA (Multiskan de titertec) disminuyendo tiempo y reactivos.

C).-Cultivo de celulas libres en suspensión y fibra hueca.

las celulas de TSH se propagaron en un spinner de 1L con barra suspendida y pade en un volumen de 200ml de medio DMEM-10% sfb con agitacion continua de 20rpm/min.

Al mismo tiempo se monto el bioreactor de fibra hueca y se coloco DMEM sin suero por un día, con la finalidad de acondicionar el sistema, al día siguiente se retiro ese medio circulante y se inoculan las celulas (Propagadas en suspensión en spinner) en el espacio extracapilar, la velocidad de circulación del medio fue de 26.7ml/min aprox. a una temp. de 37°C. Cuando el pH aumentaba se perfundio CO₂ a travez de uno de los filtros hidrofílicos del spinner del sistema. El medio de acondicionamiento fue almacenado y se probo su esterilidad y citotoxicidad. Diariamente se obtenian muestras del espacio extracapilar (E.C.) e Intracapilar (I.C.) para medición de consumo de glucosa, producción de lactato, pH y actividad de anticuerpo solo en el espacio E.C.

D).- Encapsulación en alginato de sodio 1% (Macrocarrier).

El hibridoma anti-TSH se encapsulo en alginato de sodio (Bellco Cat 7800-300000) bajo el protocolo descrito por Bellco, se utilizo alginato de sodio 1% con: 5.5x10⁷ cel. y goteando con una jeringa en una solución de CaCl₂ 50mM-Salina y las cápsulas formadas fueron lavadas con solución salina de hanks libre de fosfatos, finalmente se cultivaron en spinner de 1L con un volumen de medio de 200ml (DMEM 10%SFB) en una atmosfera de CO₂ (5%) a 37°C diariamente se colectaron muestras para medir, pH, glucosa y lactato y los macrocarriers fueron solubilizado con EDTA 50mM en PBS para realizar conteo de celulas viables con azul tripano.

E).- Encapsulación en alginato 1.6% (Macrocarriers).

Primeramente se intento una gelación siguiendo el procedimiento de Jarvis et al (Biotechniques march-abril 1983), utilizando alginato 1.05% y lisina 0.1% pero no hubo una buena consistencia de los beads quedando totalmente desechos.

Para probar que condiciones de gelación son las mas apropiadas para mantener los beads en buen estado morfologico, se probo alginato de sodio al 1% y al 1.6% siendo gelado sin celulas en 50,100,150 y 200mM de CaCl_2

Finalmente se realizó la gelación con alginato de sodio al 1.6 con 1.2×10^7 cels. en 100mM de CaCl_2 y a una altura de goteo de 6cm de la superficie de la solución de CaCl_2 , nuevamente los beads se lavaron con solución de Hanks y finalmente cultivadas en DMEM-10%-SFB y con las demas condiciones establecidas para la encapsulacion al 1% de alginato de sodio.

F).-Cultivo en fibra hueca (Híbridoma anti-B).

En este sistema se probo un cartucho de fibra hueca de un tamaño de poro de 1000D, que es usada para diálisis renal (en el Instituto Corazón de Sao Paulo-Brasil) solo que se inicio con un extenso lavado de H_2O destilada y esteril y luego se coloco RPMI 640 por 72 hrs para estabilizarla. posteriormente se inoculo con 1.2×10^8 cels acompañado de SFB 20% en el espacio extracapilar y solo RPMI 640 circulando en el espacio intracapilar.

G).- Purificación de anticuerpo monoclonal.

1.-La purificación se llevo a cabo por una columna de sepharosa proteína A de 13 cm^2 tomando sobrenadante del cultivo en alginato al 1% (650ml) y al 1.6% (540ml) cada vez por separado y los sobrenadantes fueron filtrados por $0.22 \mu\text{m}$ y desgasados por vacio (presion negativa) los tampones usados fueron filtrados y desgasados por sonicación, inicialmente la columna se equilibra con el paso de 5 volúmenes de tris- NaCl pH 8.6, la velocidad de entrada del sobrenadante a la columna fue de 0.68ml/min (650ml) y 0.61ml/min (540ml) tomando aproximadamente 16hrs por la noche. al día siguiente en la primera purificación se realizó una primera elusión con PBS pH 7.2 enseguida se utilizó un buffer de citrato pH 5.5 luego acetato pH4.3 y finalmente glicina pH 2.3 cuando termino de salir la proteína se dio un lavado con NaCl 1M y se termino equilibrando la columna con Tris- NaCl pH 8.6. Todo esto con la finalidad de determinar en que pH el anticuerpo era eluido de la columna.

En la segunda purificación se omitió el buffer de pH 5.5 y solo se eluyó basicamente con el buffer de 4.3.

Al final de la elusión los picos fueron mezclados y se colocaron a dializar contra PBS pH 7.2 ya que las fracciones colectadas fueron amortiguadas con tris 1m con el volumen adecuado de acuerdo a una titulación hecha previamente.

b).- Los picos en ambas purificaciones fueron analizados electroforéticamente en SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras en un gel de acrilamida al 12% y de 7.5% para cada condición respectivamente. Cada gel fue hecho por duplicado y uno fue teñido por plata y otro por azul de coomassie.

c).- A la vez los picos obtenidos en la primera purificación fueron probados por actividad de anticuerpo en ELISA usando tanto TSH como antígeno y un anticuerpo conejo anti-ratón purificado (1:1000).

d).- Finalmente sólo se midió concentración de proteína por absorbancia a 280 nm. multiplicando la absorbancia por el coeficiente de extinción molar para anticuerpos (0.625).

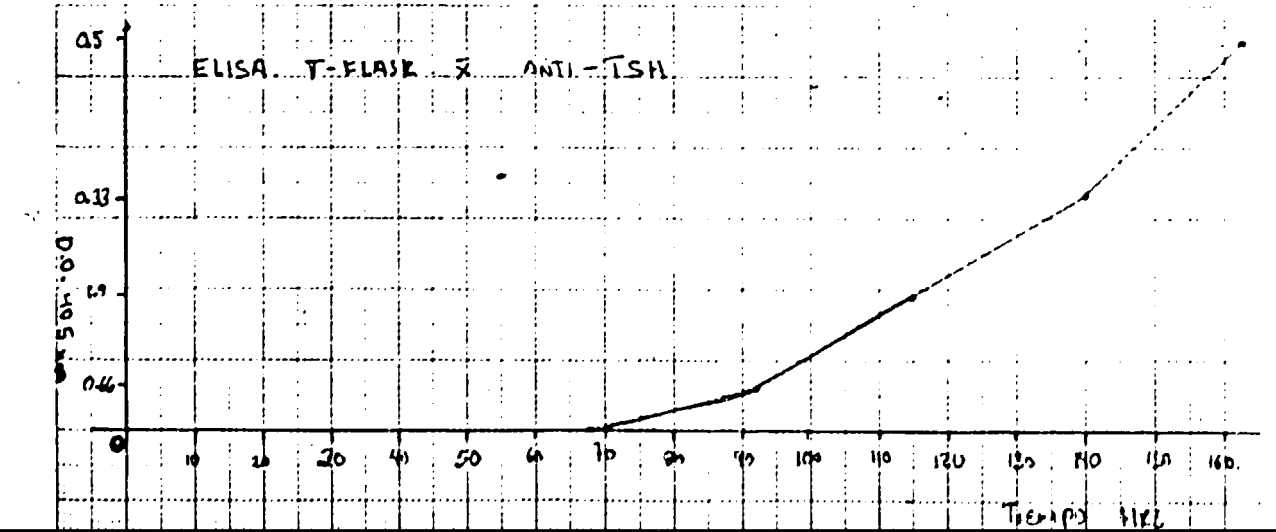
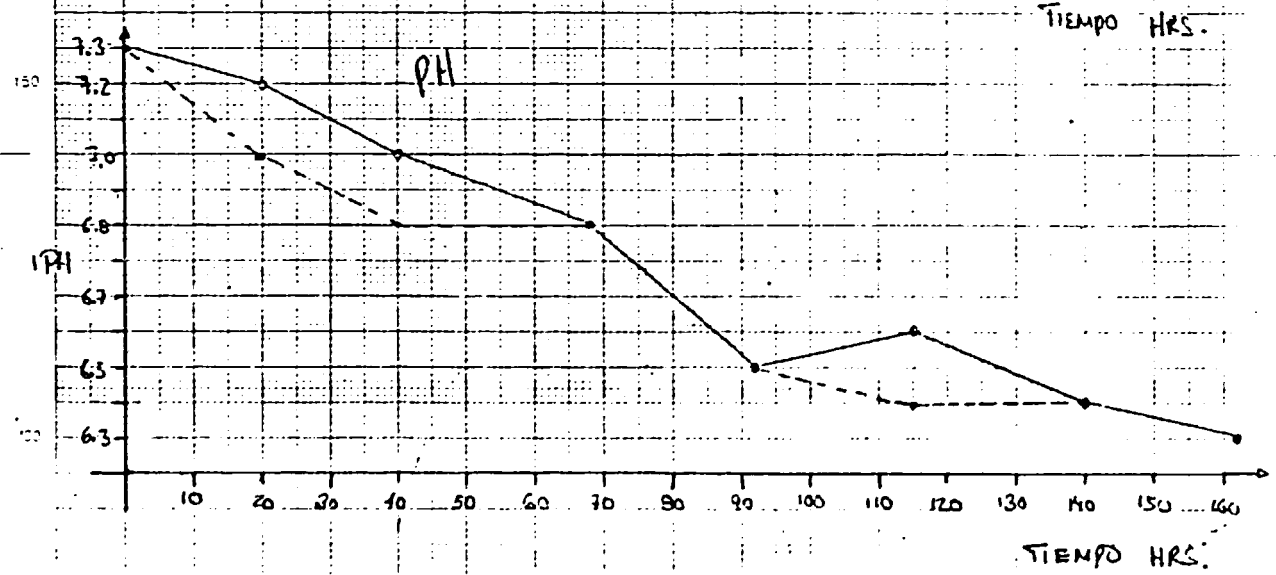
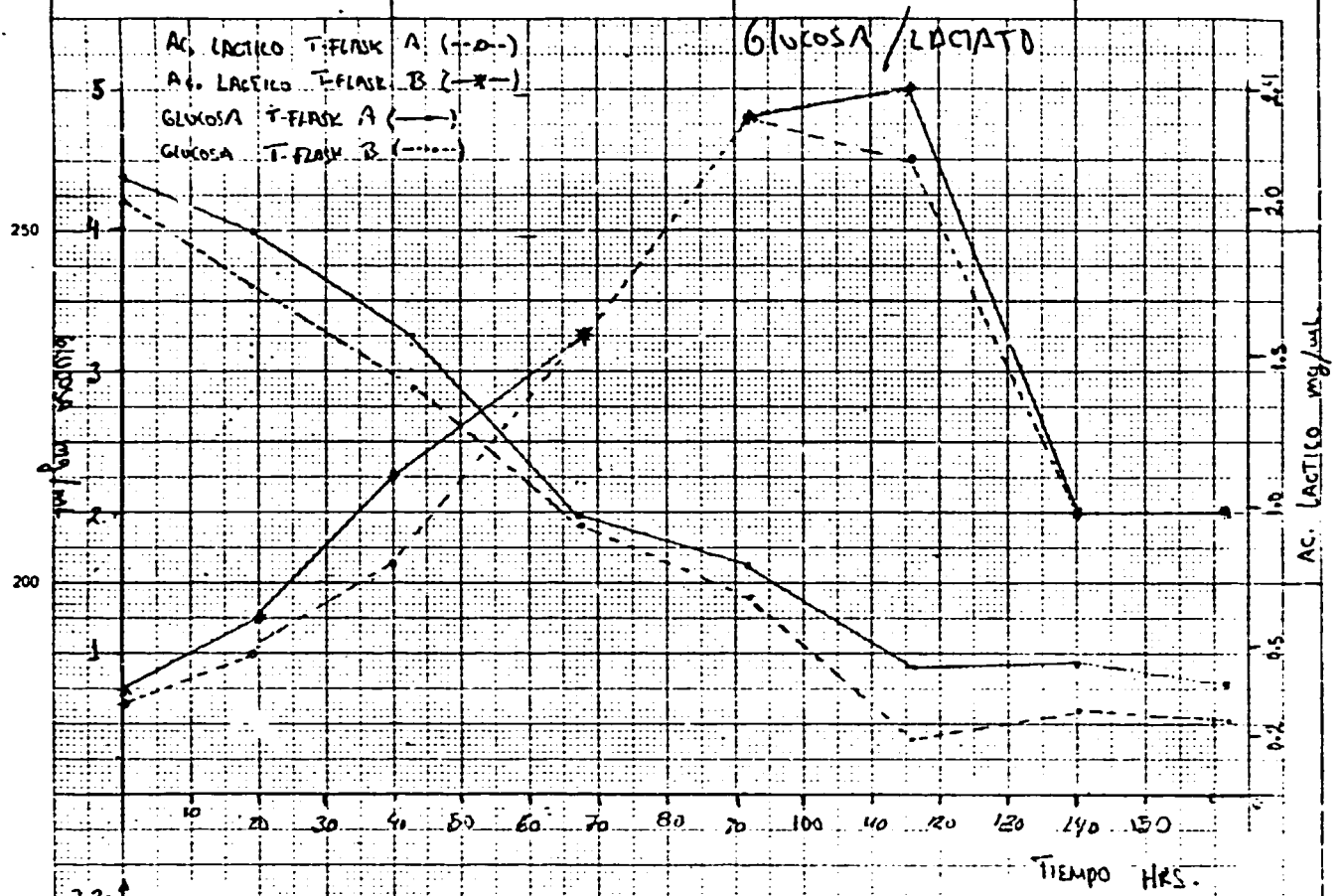
e).- También se realizó un isoelectróenfoque en el sistema de phast-sistem en un gel de gradiente de pH de 3-9 (phast-gel de farmacia).

RESULTADOS

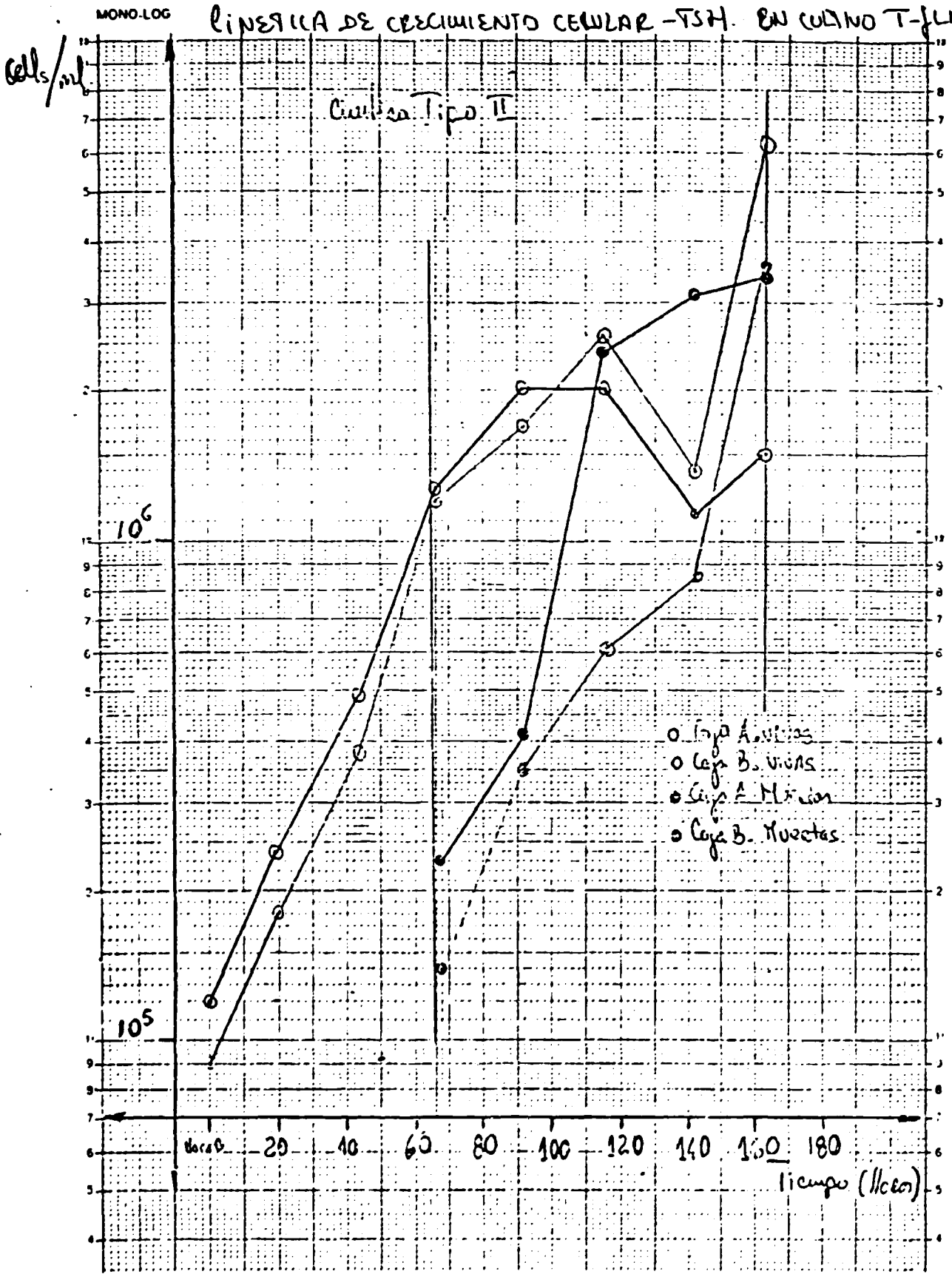
CINETICA DE OXIDACION METABOLICA EN T-FLASK *HIBRIDOMA* qali-TSH

TIEMPO HRS.	0:00	19:30	43:30	67:30	91:30	115:30	142:00	163:00
Vol T-A	9 x 10	1.8 x 10 ⁵	3.75 x 10 ⁵	6.2 x 10 ⁶ 1.4 x 10 ⁵	6.8 x 10 ⁶ 3.5 x 10 ⁵	2.6 x 10 ⁶ 0.1 x 10 ⁵	4.38 x 10 ⁶ 8.5 x 10 ⁵	1.63 x 10 ⁵ 1.35 x 10 ⁶
Vol TOTALES cls. T-B	1.2 x 10 ⁵	2.4 x 10 ⁵	4.8 x 10 ⁵	1.28 x 10 ⁶ 2.3 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁶ 4.2 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁶ 2.4 x 10 ⁶	4.13 x 10 ⁶ 3.11 x 10 ⁶	4.15 x 10 ⁶ 1.3 x 10 ⁶
PH	T-A	7.3	7.2	7.0	6.8	6.5	6.6	6.4
	T-B	7.3	7.0	6.8	6.8	6.5	6.4	6.3
LUCIFASA mg/L	T-A	4.4	4.04	3.27	1.97	1.6	0.9	0.82
	T-B	4.26	3.84	2.80	1.88	1.4	0.4	0.55
CIN T-A	0.32	0.562	0.88	1.58	2.30	2.16	1.009	0.997
ACTIVO mg/L	T-B	0.365	0.602	1.09	1.60	2.35	2.40	1.068
ELISA ABS. x	0.0	0.0	0.0	0.0	0.066	0.19	0.33	0.5

CELULAS - TSH. en cultivo T-flask



CINETICA DE CRECIMIENTO CELULAR - YSH. EN CULTIVO T-FLASK

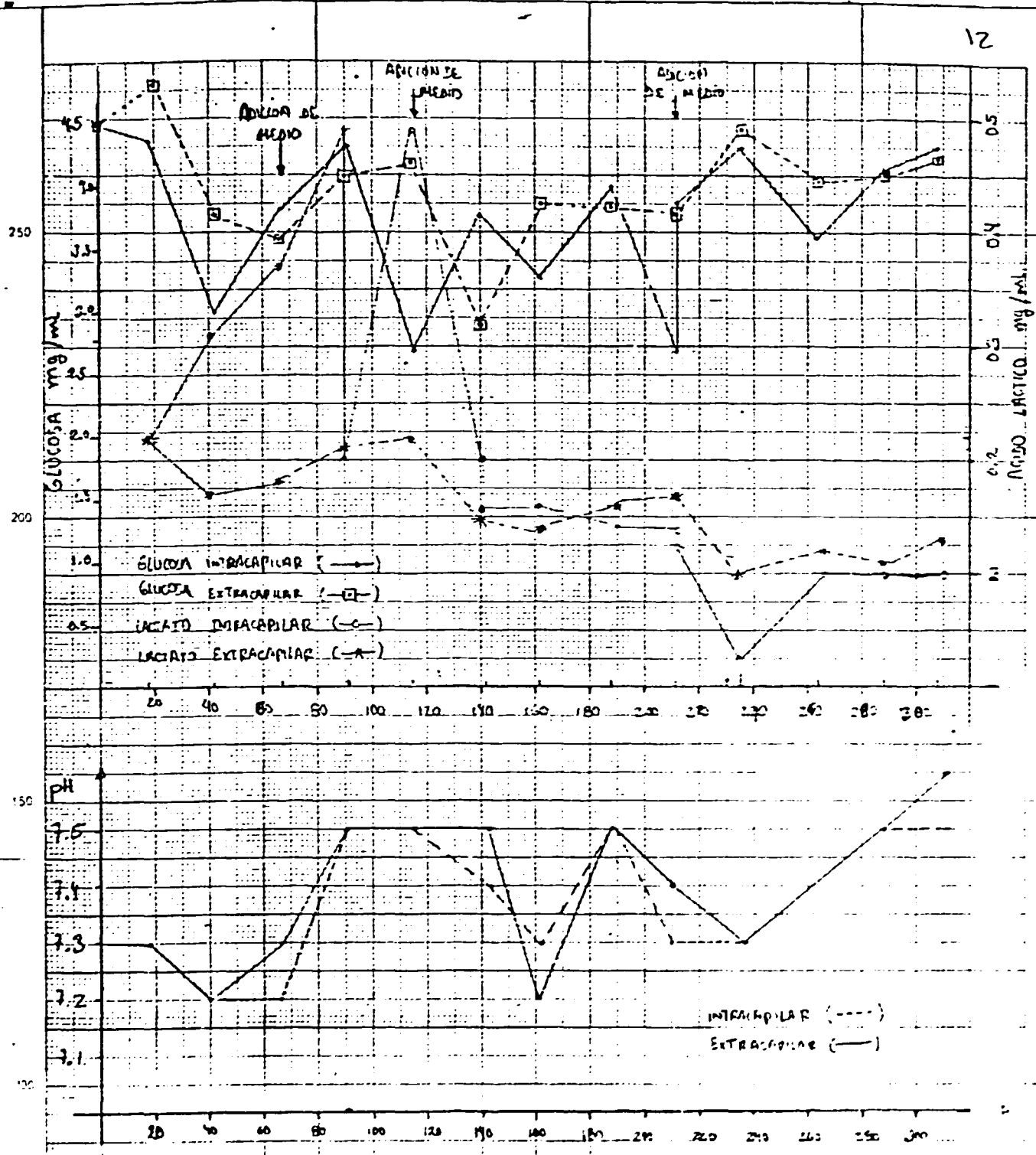


Comportamiento Metabólico de las Células T-541 en la fibra hueca (Amicon). Por 15 días, los invertidos fueron bombeados del espacio Introcáptor y Extracáptor. PH, en ningún momento del cultivo dio actividad de amilasa en ELISA.

Tiempo HRS	PH	
	I C	E C
0:00	7.3	7.3
19:30	7.3	7.3
43:30	7.2	7.2
67:30	7.2	7.3
91:30	7.5	7.5
115:30	7.5	7.5
142:00	7.4	7.5
168:00	7.3	7.2
187:30	7.5	7.5
211:00	7.3	7.4
235:00	7.3	7.3
264:00	7.5	7.5
288:00	7.5	7.6
307:00		

Glucosa mg/ml	I.C.	E.C.	Lactico mg/ml	I.C.	E.C.	CARGIOS DE MEDIO	
						Glucosa mg/ml	Lactico mg/ml
45	4.35	4.83	0.224	0.224	0.183	0.178	0.134
4.3	5.12	3.34	0.369	0.316	0.193	0.198	0.112
4.3	3.8	4.2	0.193	0.195	0.193	0.219	0.134
2.7	4.3	4.2	0.202	0.156	0.229	0.229	0.134
3.78	3.78	3.87	0.169	0.143	0.150	0.150	0.134
3.28	4.04	3.27	0.134	0.134	0.113	0.162	0.134
3.9	4.34	3.81	0.136	0.147	0.117	0.162	0.134
4.34	3.63	4.13	0.083	0.083	0.107	0.162	0.134
4.17	3.63	4.05	0.133	0.133	0.123	0.162	0.134
4.35	4.17	4.12	0.116	0.105	0.123	0.162	0.134

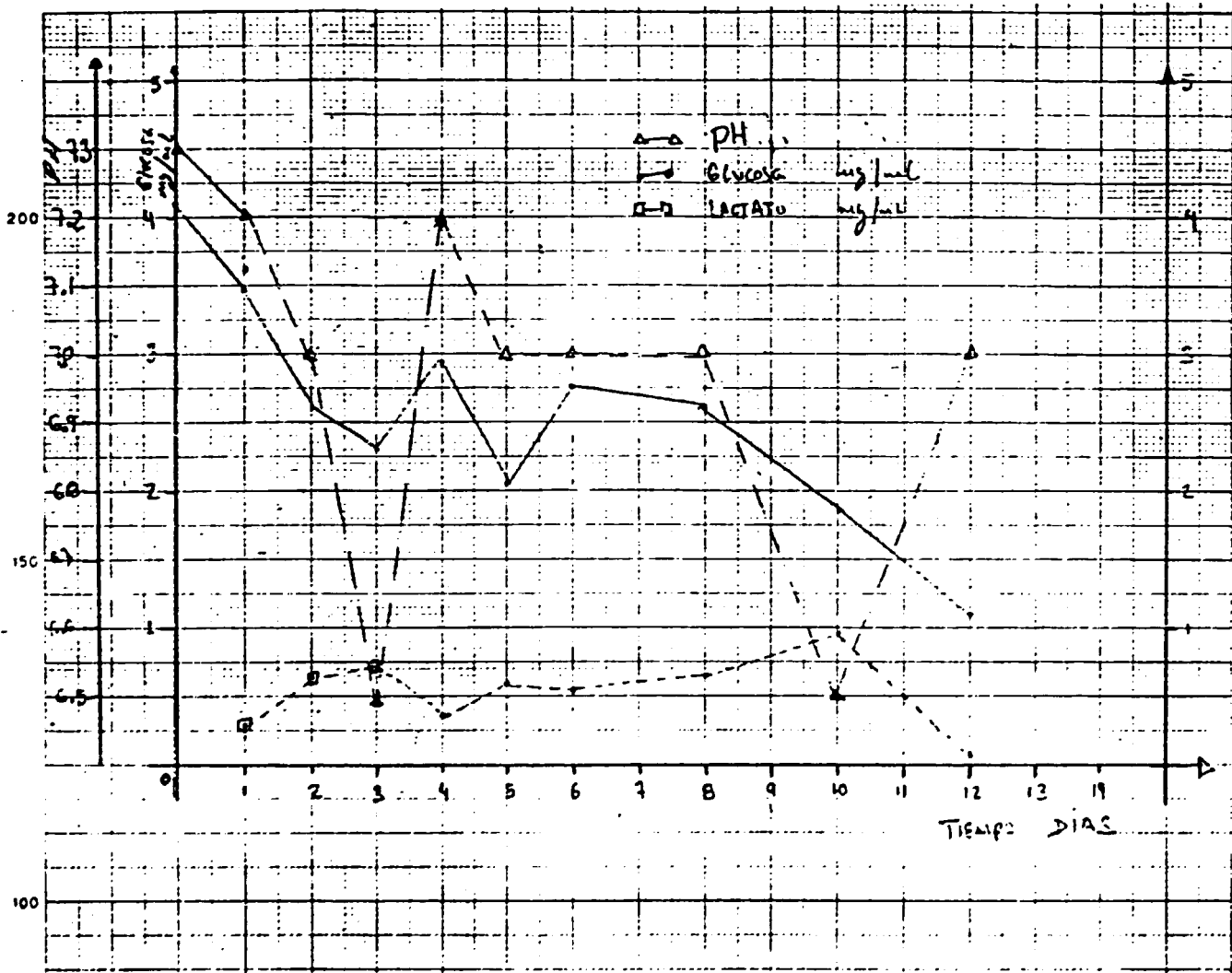




CINETICAS DE METABOLISMO DE LAS CELULAS-TSH CULTIVADAS EN LA FIBRA HOECA

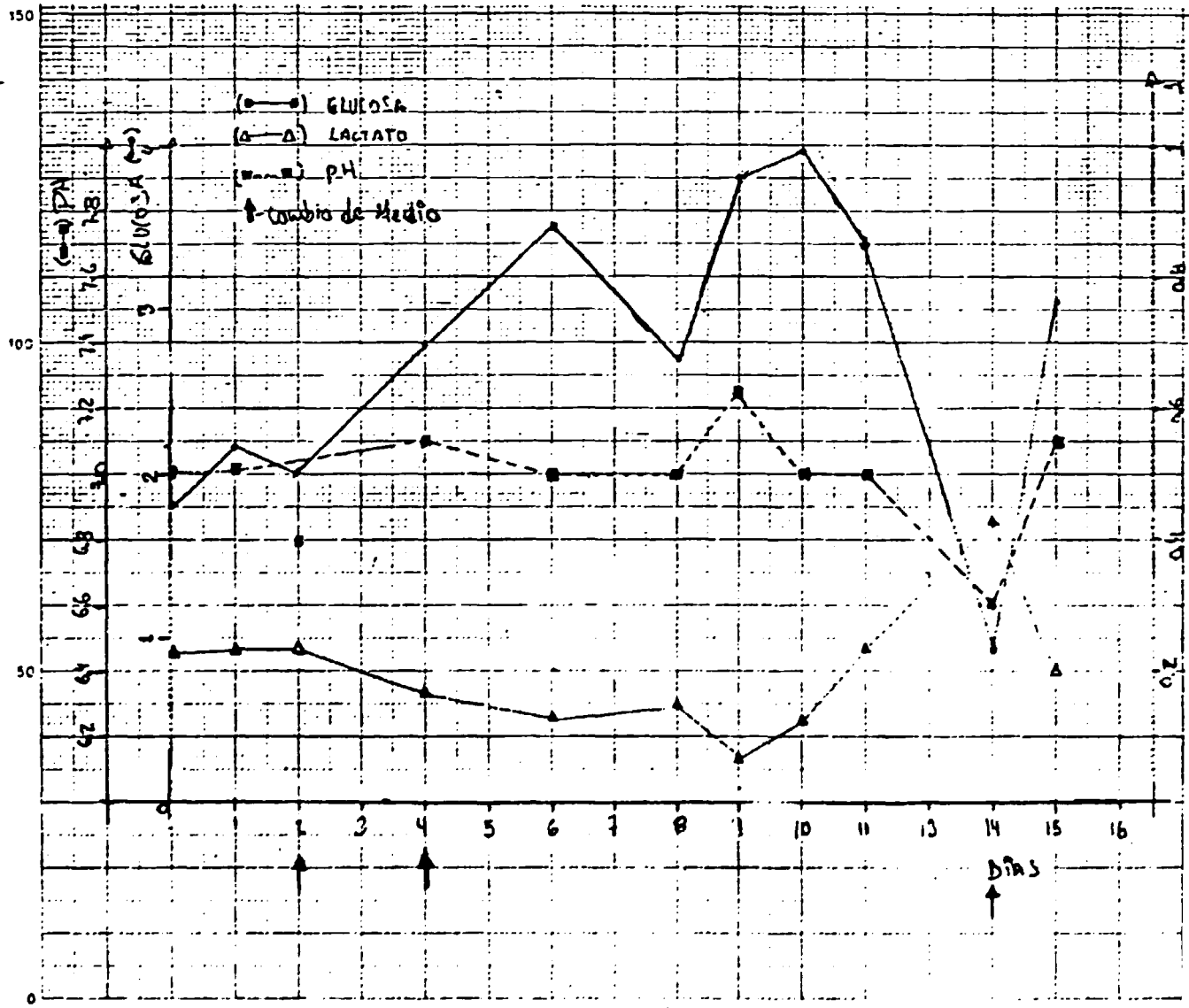
Fermentación de *Hybridoma anti-TSH* inmovilizado en Alginato de Sodio 1% y Cultivado en Spinner

DIAS/CULTIVO	0	1	2	3	4	5	6	8	10	12
PH	7.3	7.2	7.0	6.5	7.2	7.0	7.0	7.0	6.5	7.0
Glucosa mg/ml	4.1	3.46	2.64	2.32	2.95	2.07	2.73	2.68	1.84	1.15
Lactato mg/ml		0.359	0.618	0.660	0.368	0.609	0.561	0.682	0.920	0.990



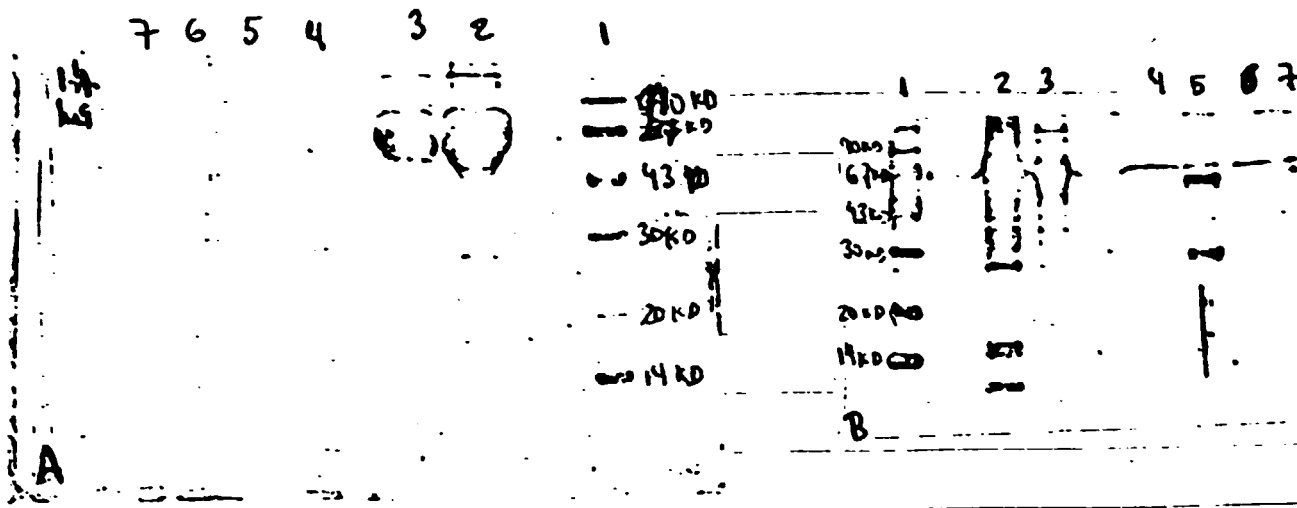
Comportamiento Metabolico de Hibridoma-T3H en Alginato de Sodio (6)

Dias de Cultivo	0	1	2	4	6	8	9	10	11	14	15
pH	7.0	7.0	6.8	7.0-7.2	7.0	7.0	7.2-7.3	7.0	7.0	6.7	7.1
Glucosa $\mu\text{g/ml}$	682	2.09	2.0	2.64	3.50	2.7	3.8	3.97	3.39	0.97	3.05
Lactato $\mu\text{g/ml}$	0.239	0.239	0.247	0.171	0.127	0.119	0.073	0.125	0.233	0.934	0.190
Cels vivos/bead	-	7.2×10^4	6.35×10^4	6×10^4	6×10^4	-	3.7×10^4	-	57×10^4	2×10^4	2.7×10^4
Muestras/bead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.5×10^4	2.75×10^4
Cambios del Medio de cultivo	-	-	200ml	150ml	-	-	-	-	-	-	200ml



ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL AC. UNII-TSH EN EL PROCESO DE PURIFICACIÓN (MUESTRA ALBINATO 1.0%).

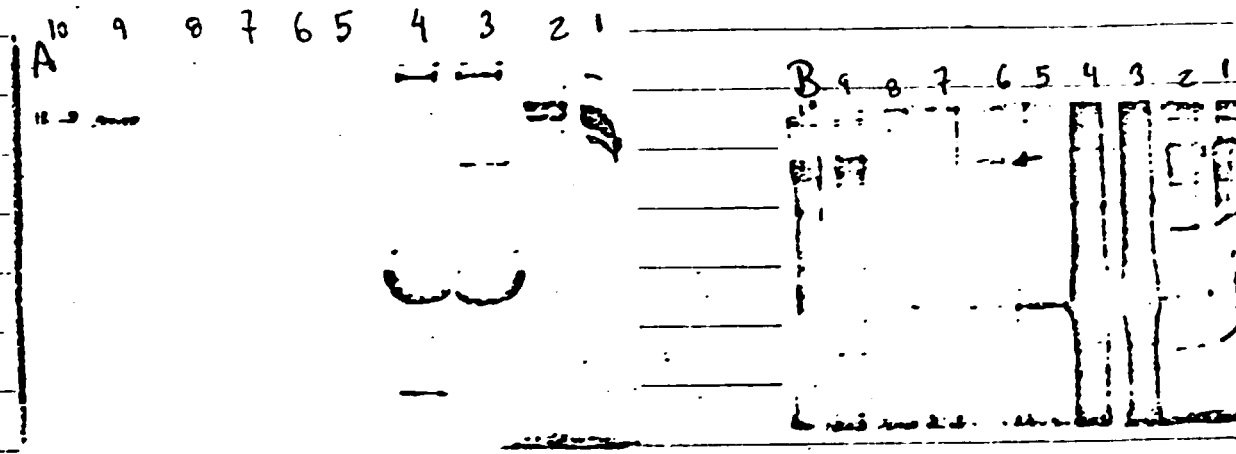
15



I- SDS-PAGE 12.5% ACRILAMIDA. CON 2-Mercaptoetanol.

- 1; M. Peso Mol.;
- 2- Sobrenadante.
- 3. flow flow.
- 4- pico I (1ª purificación)
- 5- pico II
- 6- pico III
- 7- pico IV

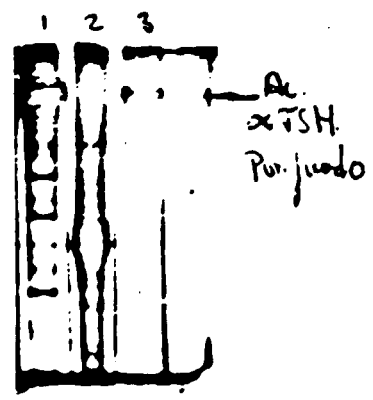
EL GEL A - Tinción Coomassie
B - Tinción c/N. de Plata



II - SDS-PAGE 7.5% ACRILAMIDA

S/2-Mercaptoetanol.

- 1,2- IgG purificada x OIT3
- 3,4- Sobrenadante aut. - PSH de alginato 1%.
- 5: flow flow
- 6- Pico I
- 7- Pico II
- 8- Pico III
- 9- IgG purificada x OIT3
- 10- IgG purificada x OIT3



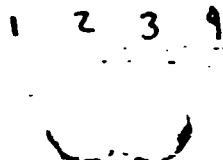
LANE	MUESTRA
1	Ac Purificado aut. OK
2	flow flow
3	Ac purificado aut.

SDS-PAGE 7.5% Acr
sin 2-Mercaptoetanol
Tinción plata

Cultivo de Hibridoma α -B en fibra hueca con poro de 1000 D.

DIAS →	0	1	4	5	7	8
PH	7.2	7.2	7.2	7.2	7.3	7.3
Glucosa mg/ml	1.8	1.6	EC. 158 EC. 115	1.73 1.19	1.79 1.75	1.64
Lactato mg/ml			EC. 0062 EC. 0027	0.098 0.091	0.007 0.007	0.007

94kd -
67kd -
43kd -
30kd -
28kd -
14kd -



Gel SDS-PAGE, 12% de Acrilamida.

en condiciones reducidas. DE LA

Purificación del Ab. Mc. anti TSH DE ALGINATO

1.6%

Heavy	CARRIL	MUESTRA
- Light	1	Patrones Peso Molecular
	2	Sobrenadante Alginato 1.6%
	3	flow thru
	4	Pico eluido PH 4.3

COMPARACION RELATIVA DE PRODUCCION DE Ac. anti-TSH

1ª Cromatografía (Alginato 1%) = Abs 0.028 $\times 0.625 = 1.75 \times 10^{-2}$ mg/ml

2ª Cromatografía (Alginato 1.6%) = Abs 0.105 $\times 0.625 = 6.5 \times 10^{-2}$ mg/ml

Muestra	Vol	Abs 280 nm.	mg/ml	mg	Vol desn
Alginato 1%	10 ml	0.028	1.75×10^{-2}	0.175	650 ml
Alginato 1.6%	20 ml	0.105	6.5×10^{-2}	0.52	210 ml

DISCUSION

I.- El cultivo estacionario en T-Flask mostro una cinética de metabolismo descrito como tipo 2 ya que el anticuerpo solo es producido cuando el cultivo esta en la parte final del crecimiento logaritmico y aumenta la actividad hasta el final del crecimiento celular sobre todo en la fase estacionaria y la fase decreciente.

Por otro lado el crecimiento mostro un consumo de glucosa junto con un aumento en los niveles de lactato y una disminución del pH hasta encontrar insuficiente cantidad de glucosa y sobre todo niveles tóxicos de lactato y pH ácido.

II.- La fibra hueca de Amicón que se cultivo con híbridoma-TSH se observó por 15 días por muchos cambios, ya que mostro un bajo consumo de glucosa y en consecuencia bajos niveles de lactato, lo cual indicó la carencia de una buena actividad metabólica de vida a muerte celular. El comportamiento oscilatorio de glucosa y lactato parece que fue debido a los cambios de medio intracapilar que disminuyo la toxicidad del sistema. Esto fue comprobado cuando al probar el medio con que se acondicionó la fibra hueca las celulas morian sin haber aumentado su densidad en T-Flask (30 ml). Además el ELISA efectuado no mostró actividad del sobrenadante del espacio extracapilar.

III.- Alginato de Sodio 1%.

La encapsulación del híbridoma-TSH en alginato de sodio 1% y gelificado en 50 mM de CaCl_2 fue muy suave y frágil, provocando que los beads se rompieran con facilidad por las fuerzas de corte generadas por la agitación. Así, el sobrenadante se encontró con una elevada cantidad de celulas libres en suspensión y por lo tanto rompiendo con todo el esquema de cultivo y además al parecer esa condición sólo favorece el crecimiento y viabilidad de las celulas libres ya que las encapsuladas murieron entre el 8º y 12º día.

IV.- Alginato de Sodio 1.6%.

Después de definir morfológicamente que concentración de alginato (1 y 1.6%) era mejor gelificado en diferentes condiciones de CaCl_2 (50, 100, 150 mM) encontrando la relación 1.6% y 100 mM como la de mejor apariencia morfológica.

Al formar beads de alginato de sodio 1.6% en 100 mM de CaCl_2 con híbridoma-TSH las celulas empezaron a formar clonas a los pocos días dentro del bead de alginato, la buena consistencia del bead llevó a tener un cultivo más estable hasta 15 días de cultivo, siendo en los días 11 a 14 que por alguna razón las celulas salieron del bead o el gel se rompia y las celulas empezaron a crecer en el medio sobrenadante llevando al cultivo a ser finalizado.

La producción de anticuerpo en este caso sólo fue cuantificado al momento de la purificación la cual fue de hasta cerca de 3 ordenes de magnitud mejor que en alginato 1%.

V.- Fibra hueca (Tamaño del poro 1000 daltons).

En este caso se utilizó una fibra común en el tratamiento de diálisis renal. Básicamente el formato es igual que para Amicón con la diferencia del tamaño de poro, lo cual como se esperaba no fue suficiente para mantener un adecuado crecimiento celular y por ende cambios metabólicos (consumo de glucosa y producción de lactato). Por tal motivo al 8º día de no observar cambio alguno se decidió parar el cultivo.

VI.- Cromatografía.

En la realización de la cromatografía número 1 (alginato 1%) se encontró que el anticuerpo se eluyó a pH 4.3, este pH es específico para romper la afinidad de la proteína A por el anticuerpo IgG 2a. Por otro lado la concentración de anticuerpo en la primera cromatografía fue bien baja debido a que el pH de 5.5 eluyó inespecíficamente parte del anticuerpo diluyéndolo drásticamente, además de que el sobrenadante provino de un cultivo con baja productividad (ver perfil cromatográfico).

En la 2ª purificación se mejoró la recuperación de anticuerpo hasta 3 veces más que la primera. Debido a que sólo se eluyó a pH 4.3 que provenía de un cultivo que funcionó mejor (alginato 1.6%). La pureza de ambas purificaciones se definió por electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras. Encontrando sólo ligeros residuos de albúmina contaminante y sólo una banda de anticuerpo.

Por otra parte se encontró un pI entre 7.5-8.5.

CONCLUSION.

I.- De los sistemas de cultivos probados, específicamente de la fibra hueca y alginato de sodio, se encontró que en los cultivos de fibra hueca implica un sistema poco controlable en los parámetros metabólicos y de producción así como también el precio de cartuchos desechables aumenta el costo del sistema.

Mientras que el proceso de alginato de sodio es un sistema más versátil, ya que puede tener diversos pasos de escalamiento desde pequeños spinners a grandes volúmenes o hasta fermentadores aerados tipo belco, siendo el proceso mucho más controlable y predecible que en la fibra hueca.

II.- La medición de procesos metabólicos fue agilizada en gran parte por el uso de un lector de ELISA (multiskan) el cual lee una gran cantidad de muestras en pocos minutos.

La medición de actividad por ELISA, fue un poco mala en parte tal vez por la baja cantidad de anticuerpo producido por el híbrido ya que en el proceso de purificación no se obtuvo una gran cantidad de anticuerpo y por otro lado el laboratorio no logró tener un conjugado que mantuviera niveles bajos de Back Ground, mientras que cuando se probó un conjugado del cual se tenía un poco para el ELISA del T-Flask dio buen resultado, ya que este había sido previamente probado pero desafortunadamente se terminó.

III.- Las dos purificaciones realizadas mostraron una alta eficiencia. La

el anticuerpo a partir del medio de cultivo sin concentrar. Por otro lado la capacidad de unión de las diferentes subclases de IgG a proteína A, definió el pico de elusión como una IgG 2a, cabe mencionar que el haber utilizado un sistema automatizado (FPLC) agilizó mucho el proceso.

Además el anticuerpo anti-TSH sólo mostró una banda en condiciones no reductoras y 2 en condiciones reductoras lo cual es índice de que el híbrido parece estar bien clonado. Por otro lado, sólo se obtuvo una mínima cantidad residual de albúmina como único contaminante. También se encontró un pI entre 7.5-8.5.