

Obtención y producción de un anticuerpo monoclonal específico a la gonadotropina coriónica humana y su aplicación en el ultramicroelisa

Ileana Blanca Baluja Conde, Adys Brito Moreno, Carmen Acosta Bas, Isis Amores Sánchez, Virginia Soto Álvarez* y Alicia Luberta Lugo.**

Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, *Dpto. de Bioterio, Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Avenida 25, Cubanacán, Playa, **Laboratorio BETERA, Banco de Sangre de Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 30 de junio de 1999. Aceptado: 16 de marzo del 2000.

Palabras clave: anticuerpos monoclonales, hibridoma, UMELISA, gonadotropina coriónica humana, Proteína A-SEPHAROSA CL-4B.
Key words: monoclonal antibody, hybridoma, UMELISA, human chorionic gonadotropin, Protein A-SEPHAROSE CL-4B.

RESUMEN. La gonadotropina coriónica humana (GCH) es una glicoproteína compleja producida por la placenta después de la implantación del huevo fertilizado en la pared uterina. La molécula de GCH está formada por dos subunidades unidas no covalentemente: la subunidad alfa (α) y la beta (β); la primera presenta una secuencia aminoacídica muy similar a las de las hormonas luteinizante, foliculo estimulante y estimulante de la tiroides, por lo que la especificidad antigénica de esta hormona reside en la subunidad β . Los linfocitos B del ratón BALB/C, inmunizado con gonadotropina coriónica (cadena β), se fusionaron con células de mieloma de ratón P3/X63-Ag8 para obtener un hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales, el cual fue seleccionado para estudios posteriores. Se realizó el ensayo de la reactividad cruzada para las hormonas peptídicas: luteinizante, foliculo estimulante y estimulante de la tiroides y se comprobó que el AcM FIV-GHC/4G1-C5 (IgG1) fue específico para la gonadotropina coriónica humana y no reaccionó frente al resto de las hormonas. El líquido ascítico proveniente de este hibridoma fue purificado por proteína A Sepharosa CL-4B para obtener la fracción activa IgG1. El anticuerpo monoclonal purificado se utilizó para recubrir placas de UltramicroELISA en el UMELISA hCG, lo que garantizó una buena sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo, para la detección y determinación de GCH en orina y suero, respectivamente. La introducción en la producción de este monoclonal garantiza la calidad de este juego diagnóstico y además, representa un ahorro de divisas.

ABSTRACT. Human Chorionic Gonadotropin (hCG) is a glycoprotein hormone and is normally produced by trophoblastic tissue and is thought to act on the corpus luteum as a stimulator of steroid synthesis necessary for the maintenance of early pregnancy. hCG is composed of two nonidentical subunits (α and β) that are either free or bound to each other in a noncovalent way. The α -subunit is structurally identical with the α -subunit of other glycoprotein hormones—lutropin, follitropin, and thyrotropin—. The β -subunit, which is specific for each of the glycoprotein hormones, confers biological activity and specificity. Spleen cells from BALB/C mice immunized with human chorionic gonadotropin (β subunit hCG) were fused with mouse myeloma cells (P3/X63-Ag8) and one hybridoma, secreting monoclonal antibodies, was selected for further studies. In a cross-check test against peptide hormones: human luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and thyroid stimulating hormone (TSH) established that monoclonal antibody (FIV-HCG/4G1-C5) reacted positively only against hCG. Ascitic fluid from this hybridoma was purified by affinity chromatography on Protein A-SEPHAROSE CL-4B column to isolate the IgG1 active fraction. The purified monoclonal antibody was used for coating Ultramicroelisa plates, guaranteeing good sensitivity, specificity and reproducibility of the assay for the detection and quantitative determination of hCG in urine and serum respectively. The introduction of this monoclonal antibody in the production process guarantees the quality of this diagnosis and also eliminates the need to import this reagent from other countries.

INTRODUCCION

La gonadotropina coriónica humana (GCH) es una glicoproteína compleja producida por la placenta después de la implantación del huevo fertilizado en la pared uterina. La molécula de GCH está formada por dos subunidades unidas no covalentemente: la subunidad alfa (α) y la beta (β); la primera presenta una secuencia aminoacídica muy similar a las de las hormonas luteinizante, foliculo estimulante y estimulante de la tiroides, por lo que la especificidad antigénica de esta hormona reside en la subunidad β .¹⁻³

La GCH está presente a bajas concentraciones en la circulación materna entre los días 7 y 10 después de la concepción y luego se incrementa continuamente hasta alcanzar un valor máximo entre las 7 y 12 semanas después de la última menstruación.⁴ Su detección en orina es un método simple para un diagnóstico temprano de embarazo, amenaza de aborto y embarazo ectópico.⁵

La determinación cuantitativa de la GCH en suero se utiliza como marcador bioquímico para determinar el riesgo de portar un feto con síndrome de Down (trisomía 21) en el segundo trimestre del embarazo.^{6,9} Desde 1987, cuando fue descrita por Bogart,¹⁰ varios investigadores han combinado la determinación de GCH con la de alfa-fetoproteína (AFP) y la edad materna en pesqui-sajes prenatales de esa y otras trisomías.¹¹⁻¹⁴

El UMELISA hCG es un ensayo ultramicroanalítico que se emplea para la detección y determinación de la gonadotropina coriónica humana en orina y suero humano respectivamente, y utiliza como fase sólida una placa de UltramicroELISA (10 μ L por pocillo) revestida con anticuerpos monoclonales anti β -GCH.

En este trabajo se presentan los resultados de la obtención y producción de un anticuerpo monoclonal murino anti β -GCH; el cual puede adsorberse directamente a la fase sólida sin tener que recubrir previamente con anti IgG de ratón, como era necesario con el monoclonal anteriormente utilizado; además por su mayor afinidad produce una fluorescencia superior en el inmunoensayo y se obtiene una mejor estabilidad de las placas sensibilizadas con este monoclonal. Su introducción garantiza de forma estable y homogénea la producción nacional de juegos diagnósticos para la detección de embarazo y para los programas de evaluación de síndrome de Down, que además de utilizarse en Cuba se exportan a diversos países donde se han instalado laboratorios con la tecnología SUMA.

Los objetivos del trabajo fueron la obtención, caracterización y producción de un anticuerpo monoclonal anti β -GCH específico y su aplicación en el UltramicroELISA para la detección precoz de embarazo y su empleo en el programa nacional de evaluación de la trisomía 21.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de los hibridomas secretadores de anticuerpos monoclonales anti β -GCH

Ratones BALB/C de seis a ocho semanas, se inmunizaron con 50 μ g de gonadotropina coriónica humana (cadena β) en coadyuvante completo de Freund por vía subcutánea. Se realizaron tres reinmunizaciones con igual dosis en incompleto por vía intraperitoneal y se valoró la respuesta inmunológica mediante un UltramicroELISA de tipo indirecto. A los animales con mayor título, se les administró una dosis de refuerzo con 50 μ g de GCH en disolución salina tres días antes de proceder a la fusión celular.

Las células esplénicas del ratón inmunizado se fusionaron con células de mieloma P3/X63-Ag8 según el método descrito por Kohler y Milstein.¹⁵ Ambos tipos de células se mezclaron en una proporción 10:1 mediante centrifugación y se añadió 1 mL de polietilenglicol (PEG) 1 500

gota a gota durante un minuto, como agente fusionante. Las células recién fundidas se centrifugaron a 146g en medio de lavado (medio de cultivo IMDM con suplemento de penicilina 200 UI/mL y estreptomina 200 μ g/mL y el botón celular se resuspendió suavemente en medio de cultivo selectivo HAT (medio IMDM con suero fetal bovino al 10%, con suplemento de hipoxantina 10^{-4} mol/L, aminopterina 10^{-5} mol/L, timidina $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L y células alimentadoras). Se sembró un promedio de $1 \cdot 10^5$ células fundidas por pozo en volúmenes de 200 μ L en placas de microtitulación de 96 pozos y se incubó a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ durante diez días. Al cabo de ese tiempo, se comenzaron los ensayos para la detección de anticuerpos específicos mediante el empleo de un UltramicroELISA y se procedió a clonar y reclonar por el método de dilución limitante los híbridos que resultaron positivos, para garantizar el carácter monoclonal de las inmunoglobulinas producidas.¹⁶ Aquellas clonas positivas se expandieron *in vitro* y se congelaron en suero fetal bovino al 90 % y dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %.

Identificación de las clases y subclases de inmunoglobulinas

Se realizó mediante el método de inmunodifusión doble o de Ouchterlony en gel de agarosa con sueros anti-subclases de inmunoglobulinas específicas en conejo (CALBIO-CHEM).¹⁷

Purificación de los anticuerpos monoclonales

Ratones BALB/C se estimularon previamente con 0,5 mL de coadyuvante incompleto de Freund y luego de un periodo de tres a cinco días se procedió a su inoculación con las células secretoras de anticuerpos a razón de $2 \cdot 10^6$ células/ratón. A los diez días se colectó el líquido ascítico rico en anticuerpos y se centrifugó a 12 070g a 4 °C. Se purificó por Proteína A-SEPHAROSA CL-4B (Pharmacia) y la fracción activa IgG1 se dializó con disolución salina fosfato de sodio 0,01 mol/L pH 7,2 y se almacenaron alícuotas a -70 °C.

Utilización del anticuerpo monoclonal en el recubrimiento del UMELISA-hCG

El recubrimiento se realizó en placas de poliestireno en concentraciones que oscilaron entre 5 y 15 μ g/mL del anticuerpo purificado. Se

emplearon tres disoluciones reguladoras de recubrimiento: disolución salina-fosfato de sodio 0,01 mol/L pH 7,2; disolución carbonato-hidrógeno-carbonato de sodio 0,2 mol/L pH 9,6 y disolución tris-HCL 0,05 mol/L pH 8,0 y la incubación se realizó en dos variantes: 4 h a 37 °C y 18 h a 4 °C.

Se utilizó un conjugado de anticuerpos de carnero anti cadenas α purificados por afinidad y conjugados a la enzima fosfatasa alcalina.

El conjugado se probó a diferentes diluciones (1:10 000, 1:12 000, 1:14 000, 1:16 000), para seleccionar aquella donde la señal del estándar de $400 \cdot 10^{-3}$ UI/mL oscilara entre 110-130 unidades de fluorescencia (UF).

Se realizaron las pruebas de exceso de recubrimiento, para el 80 y el 60 % de las concentraciones probadas.

Una vez seleccionada la concentración óptima, se estudió la estabilidad de las placas de forma acelerada, mediante su almacenamiento a 37 °C durante siete días. La actividad se midió por el porcentaje de recuperación de la fluorescencia del estándar $400 \cdot 10^{-3}$ UI/mL en las placas almacenadas a 37 °C respecto a las mantenidas a 4 °C.

Prueba de especificidad

Se evaluó la presencia de reactividad cruzada con las hormonas luteinizante, foliculo estimulante y estimulante de la tiroides; a través de ensayos con preparaciones de elevadas concentraciones (hasta 1 μ g/mL) de cada hormona en placas recubiertas con 12 μ g/mL del anticuerpo en tris-HCL 0,05 mol/L, pH 8,0 e incubadas 18 h a 4 °C.

Como comprobación, se realizó la prueba de especificidad con un anticuerpo monoclonal anti β -GCH (Instituto de Endocrinología, Ciudad de La Habana).

Determinación de la constante de afinidad

La determinación de la constante de afinidad se realizó mediante una modificación del método descrito por Beatty para ser empleado en el sistema ultramicroanalítico.¹⁸

Las placas de Ultramicroelisa fueron sensibilizadas a cuatro concentraciones de GCH: 10; 5; 2,5 y 1,25 UI/mL y se utilizaron diluciones seriadas del anticuerpo monoclonal que oscilaron desde 8 hasta 0,007 mg/mL. Para la evaluación se realizaron tres ensayos consecutivos (tres placas por ensayo) y se determinó la Kaf según la formulación de Beatty.¹⁸ Los valores de fluorescencia obtenidos se representaron en un eje de coor-

denadas en función del logaritmo de la concentración de anticuerpo para obtener una familia de curvas sigmoideas.

La determinación de la K_{af} se realizó a partir de la concentración de anticuerpo correspondiente al 50 % de fluorescencia y se relacionó cada una de las curvas con la obtenida a la mayor concentración de antígeno. Para el cálculo se empleó la fórmula siguiente:

$$K_{af} = \frac{(n-1)}{2(n[Ab']_t - [Ab]_t)}$$

donde:

$$n = [Ag]_t / [Ag']_t$$

$[Ab]_t$, Concentración total de anticuerpo que corresponde al 50 % de fluorescencia en la curva con la mayor concentración de antígeno de recubrimiento.

$[Ab']_t$, Concentración total de anticuerpo que corresponde al 50 % de fluorescencia en la curva que se compara.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los hibridomas se sembraron en cinco placas de microtitulación de 96 pozos y, al cabo de los 10 a 12 d posteriores a la fusión celular, se probaron los sobrenadantes para valorar la producción de anticuerpos anti β -GCH y resultaron positivos dos hibridomas designados como 4G1 y 5D4. Las células secretoras de anticuerpos se clonaron y reclonaron tres veces para garantizar el carácter monoclonal de las inmunoglobulinas producidas. Estas inmunoglobulinas se caracterizaron por el método de inmunodifusión doble en gel de agarosa y se comprobó que los anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma 4G1 pertenecían a la subclase IgG1 mientras que los del 5D4 eran del tipo IgM. Se continuaron los estudios con el híbrido 4G1, ya que los anticuerpos de la clase IgM no deben ser empleados en ensayos fluorimétricos debido al elevado fondo que presentan como consecuencia de las interacciones inespecíficas. Se ha comprobado que las placas sensibilizadas con anticuerpos de este tipo son menos estables que las sensibilizadas con anticuerpos monoclonales de la subclase IgG1.

La producción de anticuerpos monoclonales anti β -GCH procedentes del hibridoma FIV-GCH/4G1 (clon C5 y D2) se realizó *in vivo* mediante el empleo de ratones BALB/C y el líquido ascítico se purificó por Proteína A-SEPHAROSA CL-4B (Pharmacia). La especificidad de los anticuerpos monoclonales purifica-

dos frente a las hormonas hipofisarias luteinizante, folículo estimulante y estimulante de la tiroides, se evaluó mediante un ensayo ultramicroanalítico. Los anticuerpos evaluados no presentaron reactividad cruzada con el resto de las hormonas por lo que resultaron muy específicos para la GCH (Fig. 1). Esta especificidad puede ser explicada suponiendo que ambos anticuerpos estén dirigidos contra epítomos localizados en el extremo carboxilo terminal de la cadena β de la GCH, ya que es la única región que no es similar a la cadena β de la hormona luteinizante.¹⁹

Las concentraciones de antígeno y anticuerpo empleadas en la determinación de la constante de afinidad fueron las adecuadas, ya que con

ellas, se obtuvieron curvas sigmoideas bien definidas (Fig. 2).

El valor de la constante de afinidad del anticuerpo monoclonal fue de $(1,96 \pm 0,46) \cdot 10^9$ L/mol, lo cual permite afirmar que presenta una elevada afinidad de unión a la GCH.²⁰

Debido a las características del hibridoma 4G1, a la gran especificidad y afinidad de unión del anticuerpo monoclonal producido y a su fácil adsorción a la fase sólida (placas de poliestireno para Ultramicro-ELISA), propiedad que le confiere una mayor estabilidad a las placas sensibilizadas, se seleccionó este anticuerpo monoclonal para ser empleado en el recubrimiento de las placas del juego diagnóstico UMELISA hCG (Fig.3).

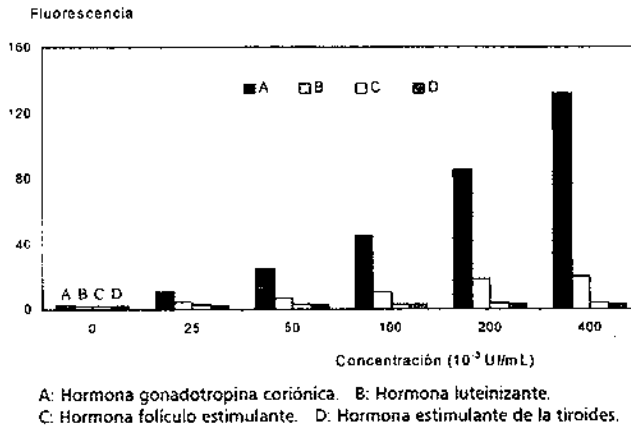


Fig. 1. Especificidad del anticuerpo monoclonal anti β -GCH (4G1-C5) frente a las hormonas hipofisarias.

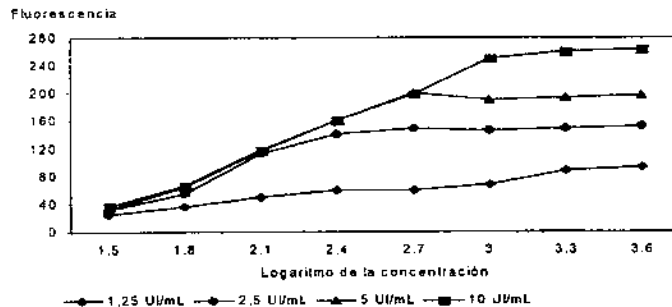


Fig. 2. Constante de afinidad del anticuerpo monoclonal anti β -GCH [FIV-GCH/4G1-C2(2)].

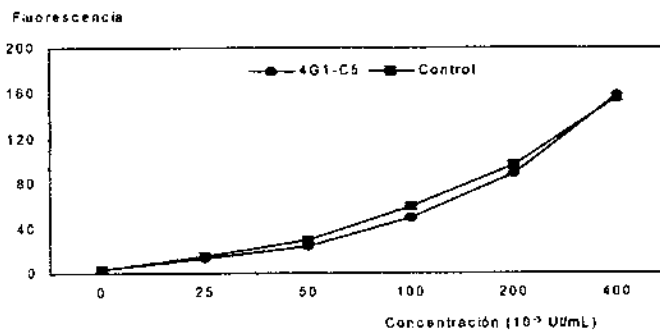


Fig. 3. Comparación de las curvas obtenidas con el anticuerpo monoclonal 4G1-C5 y el anterior.

La disolución reguladora de recubrimiento escogida fue TRIS-HCl 0,05 mol/L, pH 8,0, ya que con ella se obtuvo una señal de fluorescencia adecuada en comparación con las otras disoluciones empleadas. El tiempo de incubación establecido para el recubrimiento fue de 18 h a 4 °C, con lo que se garantizó una mejor estabilidad de las placas.

En general, hubo una buena respuesta en las condiciones estudiadas, que garantizaron una buena diferenciación de las muestras positivas y negativas, con una señal de fluorescencia por encima de 110 unidades para la concentración del estándar de $400 \cdot 10^{-3}$ UI/mL. La concentración de recubrimiento seleccionada fue 12 μ g/mL. En la prueba de exceso para los anticuerpos de recubrimiento se obtuvo una recuperación de la señal, para el estándar de $400 \cdot 10^{-3}$ UI/mL, de un 99,2 y 92,8 % para el 80 y 60 % de la concentración de recubrimiento, lo cual indica que a ella hay suficiente anticuerpo monoclonal en la fase sólida para garantizar que no haya subvaloración de los resultados. En la prueba de estabilidad acelerada de las placas presensibilizadas se observó un 80,1 % de conservación de la señal de fluorescencia en las almacenadas a 37 °C durante una semana, al compararlas con las mantenidas a 4 °C, resultados comparables a los obtenidos con otros sistemas de UltramicroELISA.

La recuperación de la señal de las placas conservadas durante doce meses a 4 °C fue del 100 %.

BIBLIOGRAFIA

1. Pierce J. and Parsons T. Glycoprotein hormones: Structure and Function [Review]. *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 465, 1981.
2. Macri J., Kasturi R., Krantz D., Cook E., Moore N., Young J., Romero K. and

- Larsen J. Maternal serum Down Syndrome screening: Free β -protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *Am. Journal Obstet. Gynecol.*, 163, 1248, 1990.
3. Cole L., Wang Y., Elliot M., Chambers J., Chambers S. and Schwartz P. Urinary Human Chorionic Gonadotropin Free β -Subunit and β -Core Fragment: A New Marker of Gynecological Cancers. *Cancer Research*, 48, 1356, 1988.
4. Birken S., Armstrong E., Kolks M., Cole L., Agosto G., Krichevsky A., Vaitukaitis J. and Canfield R. Structure of the Human Chorionic Gonadotropin β -subunit Fragment from Pregnancy Urine. *Endocrinology*, 123, 572, 1988.
5. Armstrong E., Ehrlich P., Birken S., Schlatterer J., Siris E., Hembree W. and Canfield R. Use of a highly sensitive immunoradiometric assay for detection of human chorionic gonadotropin in urine of normal, nonpregnant and pregnant individuals. *Journal Clin. Endocrinol. Met.*, 59, 867, 1984.
6. Norgaard-Pedersen B., Larsen S., Arends J., Svenstrup B. and Tabor A. Maternal serum markers in screening for Down syndrome. *Clin. Genet.*, 37, 35, 1990.
7. Muller F. and Boue A. A single chorionic gonadotropin assay for maternal serum screening for Down's syndrome. *Prenat. Diagn.*, 10, 389, 1990.
8. Suchy S. and Yeager M. Down syndrome screening in women under 35 with maternal serum hCG. *Obstet. Gynecol.*, 76, 20, 1990.
9. Bartels I., Thiele M. and Bogart M. Maternal serum hCG and SP1 in pregnancies with fetal aneuploidy. *Am. Journal Med. Genet.*, 37, 261, 1990.
10. Bogart M., Pandian M. and Jones O. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat. Diagn.*, 7, 623, 1987.
11. Fisher R., Suppnock C. and Peabody C. Maternal serum chorionic gonadotropin, unconjugated estriol and alpha-fetoprotein in Down syndrome

- pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.*, 45, A259, 1989.
12. Arab H., Siegel-Bartelt J., Wang P. and Doran T. Maternal serum β chorionic gonadotropin combined with maternal serum alpha-fetoprotein appears superior for prenatal screening for Down syndrome than either test alone. *Am. Journal Hum. Genet.*, 45, A896, 1989.
13. Heyl P., Miller W. and Canick J. Maternal serum screening for aneuploid pregnancy by alpha-fetoprotein, hCG, unconjugated estriol. *Obstet. Gynecol.*, 77, 63, 1990.
14. MacDonald M., Wagner R. and Slotnick N. Sensitivity and specificity of screening for Down syndrome with alpha-fetoprotein, hCG, unconjugated estriol and maternal age. *Am. Journal Hum. Genet.*, 77, 1025, 1991.
15. Kohler G. and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature*, 256, 495, 1975.
16. Collier H. and Colier B. Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality. *Hybridoma*, 2, 91, 1983.
17. Ouchterlony O. Antigen-Antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. et Microbiol. Scandinav.*, 32, 231, 1953.
18. Beatty J., Beatty B. and Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 100, 173, 1987.
19. Krichevsky A., Armstrong E., Schlatterer J., Birken S., O'Connor J. and Bikel K. Preparation and characterization of antibodies to the urinary fragment of the Human Chorionic Gonadotropin β -Subunit. *Endocrinology*, 123, 584, 1988.
20. Erp R., Gribnau T., Sommeren A. and Bloemers H. Affinity of monoclonal antibodies. Interpretation of the positive cooperative nature of anti-hCG/hCG interactions. *Journal of Immunological Methods*, 140, 235, 1991.