

Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-tripsina humana para el diagnóstico de la fibrosis quística

Morejón-García G¹, Feal-Carballo S¹, Stable-Vernier IC², García-de la Rosa I¹, Lafita-Delfino Y¹, Castells-Martínez A¹, Quintana-Guerra JM¹, Hernández-Pérez L¹, Pupo-Infante M¹, González-Reyes EC¹.

¹ Centro de Inmunoensayo (CIE); ² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba.

Email: greilys.morejon@cie.cu; sadys.feal@cie.cu

RESUMEN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética de transmisión autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ. Su función reducida o ausente provoca infección broncopulmonar crónica, insuficiencia pancreática, malabsorción, malnutrición y otras complicaciones multisistémicas. Con este estudio se obtuvieron 13 líneas secretoras de IgG1 con alta afinidad por la tripsina catiónica humana ($3,98 \times 10^9$ - $1,4 \times 10^{10}$ L/mol). Con un ensayo UMELISA[®] tipo sándwich completado con el conjugado 4C9E11-FA se cuantificó la tripsina con una exactitud satisfactoria mediante el empleo de una curva de calibración preparada con tripsina catiónica humana que cubría el intervalo de 0-500 ng/mL, utilizado por excelencia en las pruebas comerciales disponibles hasta la fecha. Los resultados preliminares obtenidos demuestran la potencialidad de estos AcMs para la normalización de un ensayo de PN de FQ. Finalmente destacar que con el AcM 9D5H5 unido a la fase sólida y el 4C9E11 conjugado con fosfatasa alcalina se puede normalizar un ensayo UMELISA[®] tipo sándwich para el diagnóstico neonatal de la fibrosis quística en Cuba.

Palabras clave: Anticuerpos monoclonales, tripsina, fibrosis quística, diagnóstico neonatal.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética de transmisión autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ. Su función reducida o ausente provoca infección broncopulmonar crónica, insuficiencia pancreática, malabsorción, malnutrición y otras complicaciones multisistémicas. El reflujo de las enzimas pancreáticas al torrente sanguíneo incrementa los niveles de tripsina humana, principal marcador diagnóstico de la enfermedad empleado en la pesquisa neonatal (PN) mediante ensayos inmunoenzimáticos a partir de muestras de sangre seca sobre papel de filtro (SSPF). En Cuba, la FQ presenta una incidencia superior a 1:9 000 neonatos vivos, y se considera un problema de salud¹. Con la tecnología SUMA[®] y las técnicas UMELISA[®] el CIE desarrolla y produce diagnosticadores para la pesquisa de enfermedades pero no cuenta aún con un ensayo para FQ por la no disponibilidad de anticuerpos monoclonales (AcMs) contra tripsina humana.

OBJETIVO

General: Obtener AcMs específicos a tripsina humana y que puedan utilizarse en un ensayo UMELISA[®] para el diagnóstico de la FQ.

Específicos:

- Obtener AcMs específicos para tripsina humana.
- Determinar la reactividad cruzada (RC) de los AcMs frente a biomoléculas relacionadas estructural y funcionalmente con la tripsina humana.
- Evaluar los AcMs en las fases sólida y líquida del ensayo.
- Estudiar el reconocimiento de epítomos por los AcMs.
- Evaluar preliminarmente los AcMs en un ensayo UMELISA[®] tipo sándwich.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos y biológicos: Del CIE (Cuba) se obtuvieron ratones BALB/c, tripsinógeno humano, anti-IgG de ratón (obtenida en carnero) y conjugados estreptavidina-fosfatasa alcalina (FA) y anti-IgG de ratón (obtenida en carnero)-FA. SIGMA (E.U.A.) proporcionó adyuvantes completo e incompleto de Freund (ACF y AIF), medio de cultivo (DMEM/F-12) y sus suplementos HT (hipoxantina-timidina) y HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina), L-glutamina, penicilina-estreptomocina, polietilenglicol-dimetilsulfóxido (PEG-DMSO), PMSF (del inglés *phenylmethylsulfonylfluoride*), aprotinin, las moléculas de origen humano para RC α 2-macroglobulina, α 1-antitripsina y quimotripsina y los reactivos químicos para preparación de soluciones. Se emplearon preparaciones de tripsina humana de: Athens Research (E.U.A.), Abcam (Reino Unido), Sigma (E.U.A.), My Biosource (E.U.A.), Biorbyt (Reino Unido), Scripps (E.U.A.), Elastin (E.U.A.) y Calbiochem (E.U.A.). Gibco® y Calbiochem® (E.U.A.) suministraron suero fetal bovino (SFB) y sistema *Hybridoma Subtyping Kit, Mouse*, respectivamente. Panel de controles para tripsina inmunorreactiva (1, enero/2017) del Programa de Aseguramiento de la Calidad del Tamiz Neonatal procedentes del CDC (del inglés, *Center for Disease Control and Prevention*). Muestras de SSPF de neonatos fibroquísticos del Programa de Pesquisa Neonatal de Brasil.

Equipamiento y accesorios: Lavador automático de placas MW-2001, lector de placas PR-521, ponchador y juego de reactivos y placas UMELISA® (Tecnosuma Internacional S.A., Cuba).

Inmunización de ratones BALB/c: Se aplicaron tres esquemas de inmunización con diferentes concentraciones de tripsinógeno humano (50-100 μ g/ratón). La primera inmunización vía subcutánea en ACF y el resto intraperitoneal en AIF con intervalos de siete y 21 días. Se evaluó la respuesta inmune mediante un UMELISA® indirecto y se aplicó una dosis final de refuerzo.

Sensibilización de placas para ensayo UMELISA® indirecto: Se recubrieron placas con 15 μ L/pozo de tripsina catiónica humana a 2 μ g/mL en PBS (del inglés *phosphate buffered saline solution*), estabilizada con 0,5 mmol/L del inhibidor PMSF. Las placas se incubaron en cámara

húmeda por 4 h a temperatura ambiente (TA, 20-25°C). Luego se aspiró la disolución de recubrimiento y se lavó con 28 µL por pocillo de PBS-Tween® 20. Se añadieron 15 µL por pozo de disolución de bloqueo (BSA 14,5 µmol/L, sacarosa 0,15 mol/L, Tween® 20 0,45 mmol/L) y se incubó 1 h a TA. Se aspiró la disolución de bloqueo y se secaron las placas por 2 h a 37 °C. Finalmente las placas, junto con una bolsa de sílice gel como desecante, se guardaron en una bandeja de cloruro de polivinilo sellada herméticamente con papel de aluminio y se almacenaron entre 2-8 °C.

Ensayo UMELISA® indirecto para la evaluación de anticuerpos anti-tripsina humana: Las muestras (suero de ratón, sobrenadante de cultivo, ascitis, AcM purificado) se añadieron por duplicado a las placas (10 µL/pozo). La incubación en cámara húmeda fue de 2 h a 37 °C. Las muestras se aspiraron y se lavaron cuatro veces las placas con disolución de lavado ((HOCH₂)₃CNH₂-HCl 0,37 mmol/L, NaCl 3,76 mol/L, NaN₃ 0,769 mol/L, Tween-20 1,1 mmol/L, pH 7,8), a razón de 28-30 µL/pozo, en el lavador. Seguidamente se adicionaron 10 µL/pozo de conjugado anti-IgG de ratón-FA y se incubaron las placas por 1 h a 37°C en cámara húmeda. Se repitió el lavado, se aplicaron 10 µL/pozo del sustrato 4-metilumbeliferil fosfato (5 mmol/L) y las placas se incubaron durante 30 min a TA en cámara húmeda para el revelado de la reacción. Finalmente, se detectó la señal de fluorescencia con el lector de placas.

Generación y producción de AcMs: Se aplicó la tecnología del hibridoma con algunas modificaciones. Los esplenocitos se mezclaron con células de mieloma murino (P3/X63-Ag8) en proporción 10:1 en presencia de PEG-DMSO. Los híbridos que crecieron en el medio selectivo HAT con 10% de SFB (v/v) se evaluaron para la presencia de anticuerpos específicos mediante los ensayos UMELISA® descritos anteriormente. Los cultivos con señales de fluorescencia superiores a 150 unidades se clonaron repetidamente mediante dilución limitante y fueron ensayados con el sistema *Hybridoma Subisotyping Kit, Mouse* para clasificar las inmunoglobulinas. La producción *in vitro* e *in vivo* de los AcMs y la purificación a partir de ascitis se realizó según Acosta y colaboradores².

Caracterización de los AcMs: Para determinar la constante de afinidad se procedió según Acosta y colaboradores². Con el UMELISA[®] indirecto anteriormente descrito se evaluaron 11 diluciones dobles seriadas para cada anticuerpo en placas recubiertas con cuatro concentraciones del antígeno.

Se evaluaron sustancias con homología estructural o funcional que pueden interferir en el reconocimiento de la tripsina humana² en las muestras de sangre de los neonatos. Se evaluaron los AcMs mediante un ensayo indirecto con placas recubiertas con las sustancias homólogas en las mismas condiciones descritas para la tripsina catiónica humana.

El reconocimiento de epítomos de la tripsina se realizó mediante un ensayo de competencia descrito por Stable³.

Ensayo de reconocimiento de diferentes preparaciones de tripsina en solución: Según el procedimiento planteado por Acosta y colaboradores² se recubrieron placas con los AcMs a la concentración óptima de trabajo (8-10 µg/mL). Se prepararon curvas en el intervalo de 125-1000 ng/mL con tripsina catiónica, aniónica y tripsinógeno humanos de distintas casas comerciales, algunas de ellas presentaban diferentes niveles de degradación. Los puntos de las curvas se añadieron por duplicado a las placas (10 µL/pozo) seguido de incubación por 1 h a TA. Las muestras se aspiraron y se lavaron cuatro veces las placas con disolución de lavado. Se añadió el AcM 3H9 conjugado a biotina [AcM que reconoce un epítomo lineal⁴ y que no inhibe a ninguno de los AcMs en estudio (datos no mostrados)]. Las placas se incubaron 30 min a TA y se lavaron cuatro veces. Se adicionó el conjugado estreptavidina-FA y se incubó por 30 min a TA. Se repitió el lavado de las placas y se procedió a aplicar sustrato y leer la fluorescencia según lo descrito anteriormente.

Evaluación de los AcMs en un ensayo UMELISA[®] tipo sándwich: Se diseñó un ensayo UMELISA[®] tipo sándwich para tripsina humana con placas recubiertas con 8 ug/mL del AcM 9D5H5 y el 4C9E11 conjugado a FA (4C9E11-FA) para el revelado. A partir de una curva de calibración preparada con tripsina catiónica humana (Athens Research, E.U.A.) en el intervalo de 0-500 ng/mL y estabilizada con el inhibidor aprotinin, se cuantificaron controles de SSPF del CDC y muestras positivas de neonatos fibroquísticos caracterizadas por biología molecular.

RESULTADOS

Se obtuvieron 13 líneas secretoras de IgG1 con alta afinidad por la tripsina catiónica humana ($3,98 \times 10^9$ - $1,4 \times 10^{10}$ L/mol). Los AcMs reconocieron tripsina catiónica, aniónica y tripsinógeno humanos presentados en solución, formas biológicas existentes en las muestras de neonatos. No reconocieron a la tripsina altamente degradada, lo que sugiere que están dirigidos contra epítomos conformacionales.

Los AcMs 2H4D8, 9D5H5, 4C9C9 y las familias 6A7 y 7B10 se inhibieron entre sí en más de un 90 %, lo que indica que reconocen epítomos relacionados espacialmente. El AcM 4C9E11, además de unirse a un epítomo diferente al del resto de los anticuerpos, fue el único que presentó una ligera RC frente a las sustancias interferentes, lo que limita su uso potencial a anticuerpo detector, siempre y cuando se emplee un anticuerpo específico para captura. El resto de los AcMs no tuvieron RC y pudieran utilizarse en fase sólida y para detección.

Como el AcM 9D5H5 fue el que mejor reconoció las preparaciones de tripsina humana en solución, se utilizó en la fase sólida de un ensayo UMELISA® tipo sándwich completado con el conjugado 4C9E11-FA. Los resultados mostrados en la tabla I demuestran que dicho ensayo cuantificó la tripsina con una exactitud satisfactoria mediante el empleo de una curva de calibración preparada con tripsina catiónica humana que cubría el intervalo de 0-500 ng/mL, utilizado por excelencia en las pruebas comerciales disponibles hasta la fecha⁵. Con dichos calibradores se evaluaron los controles de SSPF con valores conocidos procedentes del CDC y muestras positivas de neonatos confirmadas por biología molecular. Los resultados preliminares obtenidos demuestran la potencialidad de estos AcMs para la normalización de un ensayo de PN de FQ.

Tabla. Cuantificación de muestras de sangre seca sobre papel de filtro

Código de muestra	Concentración obtenida (ng/mL)	Concentración esperada (ng/mL)	Exactitud relativa (%)
BDH374	214,9	-	-
SLB 5113	93,2	-	-
PAR 28436	212,2	-	-
JFF 2598	213,1	-	-
CPS 11129	288	-	-
DRV 1340	346,2	-	-
CDC A1609	18,36	15,1	21,6
CDC B1609	55,87	65,1	-14,2
CDC C1609	134,47	138,2	-2,7
CDC D1609	268,35	231,1	16,1

Valor de corte: > 70 ng/mL para el 99,5 percentilo de la distribución.

CONCLUSIONES

Con el AcM 9D5H5 unido a la fase sólida y el 4C9E11 conjugado con fosfatasa alcalina se puede normalizar un ensayo UMELISA[®] tipo sándwich para el diagnóstico neonatal de la fibrosis quística en Cuba.

RECOMENDACIONES

Continuar con los estudios de evaluación y normalización del ensayo UMELISA[®] para el diagnóstico de la FQ.

BIBLIOGRAFÍA

1. González JA, Abreu G y Rodríguez F. Reseña histórica de la fibrosis quística y su estudio y tratamiento en Cuba. *Rev Cubana Pediatr* 2014;8 6(4):535-40.
2. Acosta C, Baluja I, Brito A, Rodríguez M, Melchor A, Hernández L et al. Monoclonal antibody against human trypsin: production, characterization, and use for diagnosis. *Hybrid Hybridomics* 2002; 21(6):487-90.
3. Stable I. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra la tripsina humana [tesis]. Universidad de la Habana;2016.
4. Acosta C, Baluja IB, Brito AI, Rodríguez MR, Melchor A, Hernández L y Frómeta A. Specific monoclonal antibody against human trypsin. *Hybrid Hybridomics* 2004; 21(4):307-10.
5. Sarles J, Giorgi R, Berthézène P, Munck A, Cheillan D, Dagorn J et al. Neonatal screening for cystic fibrosis: comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. *J Cystic Fibros* 2014; 13:384–90.