Biotecnología aplicada, Vol. 7, No. 1, 94-100 (1990)

Anticuerpos monoclonales de ratón contra la proteína *gag* 24 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo I (VIH-1)

C. A. DUARTE,[1] A. CAMPAL,[2] E. CARPIO,[1] T. DÍAZ,[1] E. DE LA GUARDIA,[3] L. MOREJÓN,[3] M. JONDAL[4] y J. GAVILONDO[1]

[1] División de Hibridomas y Modelos Animales, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

[2] Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Camagüey, Cuba

[3] Laboratorio Nacional de Diagnóstico de SIDA, La Habana, Cuba

[4] Departamento de Inmunología, Instituto Karolinska, P.O. Box S-10401, Estocolmo, Suecia

Recibido en septiembre de 1989
Aprobado en noviembre de 1989

RESUMEN

El desarrollo de sistemas que permiten la cuantificación de la proteína *gag* 24 del VIH-1 puede ser de importancia en el pronóstico de la evolución de pacientes con SIDA, y en el monitoreo de la producción de antígeno natural y recombinante. En este trabajo se reporta la generación de un panel de anticuerpos monoclonales (AcM), a través de la fusión de esplenocitos de ratones inmunizados con el antígeno recombinante y el mieloma SP2/0/Ag14. Se han caracterizado cinco AcM provenientes de clones secretores estables. La especificidad de los anticuerpos por la *gag* 24 fue confirmada por ELISA, inmunofluorescencia indirecta y Western Blot. Uno de los cinco AcM reconoce, además, la cepa SBL6669 del VIH-2 en ELISA. Finalmente se demostró que el suero de un individuo infectado con VIH-1 inhibe la unión de AcM 197 a la *gag* 24 adsorbida a placas de poliestireno.

SUMMARY

The development of systems that allow the measurement of the *gag* 24 protein of HIV-1 can be important for prognostic studies in AIDS patients, as well as in the monitoring of the production of natural and recombinant antigen. We have generated a panel of anti *gag* 24 monoclonal antibodies (Mabs), through the fusion of splenic lymphocytes of mice immunized with the recombinant antigen and the SP2/O/Ag14 myeloma. Mabs from five stable clones were purified and characterized. The specificity of antibodies for HIV1 *gag* 24 was confirmed by ELISA, indirect immunofluorescence and Western Blot analysis; one of these antibodies recognized also the SBL6669 strain of the HIV-2. Finally, we have demonstrated that it is possible to block the binding of Mab 197 to *gag* 24 using a HIV-1 positive human serum.

INTRODUCCION

Las proteínas que conforman la cápside del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son producidas en forma de un precursor de 55 kDa, utilizando la maquinaria biosintética de la célula infectada. Esta molécula es luego específicamente escindida para dar lugar a las proteínas p15, p18 y p24 (Veronese, 1988).

La p24 (*gag* 24) es mayoritaria y constituye la envoltura más íntima del ARN viral (Ratner *et al.*, 1988; Wain-Hobson *et al.*, 1985; Sánchez-Pescador *et al.*, 1985; Muesing *et al.*, 1985). Es posible detectar tempranamente anticuerpos contra esta proteína en la sangre de los individuos infectados con el virus. Los niveles de estos anticuerpos tienden a disminuir hacia los estadios finales de la enfermedad (Goudsmit, 1986;

Copyright © 1990, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud. Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

Goudsmit, 1987; Ghrayeb, 1986; Lange *et al.*, 1986), conjuntamente con una elevación de los niveles de antígeno circulante. Esto hace posible que a la cuantificación de estos parámetros se le atribuya cierto valor pronóstico (Homsy, 1986; Mathiesen, 1988).

No está aclarado aún cuál es la función de los anticuerpos contra p24 y si estos confieren algún tipo de protección al individuo. Aunque no deben ejercer un efecto neutralizante sobre el proceso infectivo del virus, se postula que pueden contribuir, a través de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), con la destrucción de las células infectadas que expresen estos antígenos en su superficie (Ikuta *et al.*, 1989).

Varios autores han reportado la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen la *gag* 24. Estos AcM han sido empleados en la detección del antígeno libre o inmunocomplejos circulantes, en histopatología, y en estudios de reactividad cruzada para retrovirus relacionados (McHugh, 1988; Veronese, 1985; Tenner-Rácz, 1987).

En este trabajo describimos la obtención y caracterización de un panel de cinco AcM contra la *gag* 24 recombinante (*gag* 24r). Estos anticuerpos tienen una utilidad potencial en estudios clínicos y experimentales relacionados con los VIH.

MATERIALES Y METODOS

Inmunógeno

Para la inmunización empleamos la *gag* 24r, producida por la División de Vacunas y Medios de Diagnóstico del CIGB, con más del 90% de pureza.

Obtención de los AcM

Inmunización. Se inmunizaron ratones BALB/c machos de 8 semanas, por vía subcutánea en los días 0, 15 y 21 con dosis de 50 μg de *gag* 24r. Para la primera dosis, el antígeno fue emulsionado con adyuvante completo de Freund (Gibco); para las dosis restantes se empleó adyuvante incompleto. A los animales con mayor título (ver más adelante) se les suministró tres días antes de la fusión una cuarta dosis *booster* de 50 μg de *gag* 24 en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), por la vía intraperitoneal.

Fusión y pesquisaje. Los linfocitos esplénicos se fundieron con la línea de mieloma SP2/O/Ag14 en proporción 10:1; la fusión, cultivo y seguimiento de los híbridos se realizó de acuerdo con el protocolo establecido en nuestro laboratorio, descrito en trabajos anteriores (Duarte *et al.*, 1987).

A partir de la tercera semana de cultivo se pesquisaron los sobrenadantes para anticuerpos específicos contra *gag* 24, empleando un ELISA indirecto. Se recubrieron placas de poliestireno (Dinatech) con 5 μg/ml de *gag* 24r en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante toda la noche a 4°C (100 μl por pozo). Luego se añadieron 100 μl de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas a cada pozo. Después de 2 horas a 37°C, las placas se lavaron con SSTF-Tween y se incubaron una hora con una solución de Igs de conejo anti-IgG de ratón, conjugada a peroxidasa (Dakopatts), diluida 1:1000 en SSTF conteniendo 1% BSA y 0,05% Tween 20. Después de varios lavados, la reacción fue revelada con 100 μl por pozo de ortofenilendiamina al 0,04% en tampón citrato pH 5,5, conteniendo 5 μl de una solución de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción se detuvo a los 20 minutos con H_2SO_4 2,5 M y se procedió a determinar la absorbancia a 492 nm en un lector microELISA (Multiskan Titertek). Las muestras fueron consideradas como positivas cuando los valores de densidad óptica eran, al menos, tres veces superiores al control negativo.

Posteriormente, las muestras positivas fueron analizadas en un ELISA utilizando placas comerciales de lisados virales de VIH-1 (Organon). Los híbridos establemente secretores de anticuerpos que reconocían tanto a la *gag* 24r como a los lisados virales, fueron clonados y reclonados por dilución limitante.

Purificación de AcM

La purificación de AcM se realizó a partir de fluido ascítico, obtenido luego de la inoculación de 3 millones de células híbridas en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c preinyectados 10 días antes con aceite mineral por la misma vía. El ascitis colectada por punción repetida se centrifugó a 500 x g, "delipidizó" con cloroformo 1:1 y se dializó contra SSTF. Para la purificación se empleó la cromatografía de afinidad en proteína A Sepharosa CL 4B (Pharmacia) siguiéndose el protocolo sugerido por el fabricante (Anónimo, 1987). El grado de pureza se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE, Laemmli, 1970) y la concentración proteica según el método de Lowry (1951).

Determinación del isotipo del AcM

Se empleó la técnica de inmunodifusión radial doble de Ouchterlony y Nielsson (1978), con antisueros clasificadores (ICN-Immunobiologicals) y sobrenadantes de cultivos de hibridomas concentrados diez veces.

Reconocimiento de VIH-2

La existencia de reactividad cruzada con VIH-2 fue estudiada mediante ELISA con placas recubiertas con lisados virales de VIH-2 (aislamiento SBL6669), gentilmente donadas por la doctora Gunnel Biberfeld, del Departamento de Inmunología del Laboratorio de Bacteriología Estatal de Estocolmo, Suecia. El procedimiento seguido fue similar al descrito para el pesquisaje de los sobrenadantes.

Inmunofluorescencia indirecta

El ensayo se efectuó en células CEM infectadas con VIH-1 (LAV1), previamente fijadas a placas con acetona-metanol. Las muestras se incubaron con 20 μl de sobrenadante de cultivo durante 1 hora a 37°C. Luego de tres lavados de 5 minutos se adicionaron 20 μl de Ig de conejo anti IgG de ratón, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 30 minutos a 37°C; se volvió a lavar tres veces y las células fueron teñidas con azul de Evans y observadas en un microscopio de fluorescencia.

Western Blot

Se utilizaron tiras preparadas en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico de SIDA de La Habana a partir de lisados de VIH-1 (LAV 1) transferidos a nitrocelulosa luego de SDS-PAGE y bloqueadas con SSTF conteniendo 10% de leche descremada. Las tiras se incubaron durante 1 hora a 37°C con los anticuerpos purificados y luego de tres lavados se añadió una solución de Ig de conejo anti IgG de ratón-peroxidasa, 1 hora a temperatura ambiente. Las tiras se lavaron y revelaron utilizando la diaminobencidina como cromógeno.

Ensayo de competencia de AcMs con sueros

Se incubaron pozos recubiertos con *gag* 24r (1 μg/ml) con sueros humanos positivos y negativos diluidos 10, 30 y 90 veces, durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadieron 100 μl de los diferentes AcMs por espacio de 1 hora a temperatura ambiente. Como revelador se utilizó Ig de carnero anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa. El resto de la técnica se desarrolló tal y como se ha descrito para otros ELISA en este trabajo. Se calculó en cada caso el porcentaje de inhibición, $I = X/M \times 100$, donde "M" es el valor de la absorbancia para cada AcM sin incubación previa con suero y "X" es el valor de absorbancia obtenido para el mismo anticuerpo previamente incubado con suero.

RESULTADOS Y DISCUSION

De la fusión de un bazo se obtuvieron un total de 820 pozos con híbridos viables, de los cuales 110 (13%) secretaban anticuerpos específicos contra la *gag* 24r, según resultados del pesquisaje inicial. Este alto porcentaje confirma la alta inmunogenicidad de esta proteína en ratones (Kusk *et al.*, 1988).

Luego de sucesivas clonaciones se seleccionaron cinco clones de hibridomas con secreción estable de AcM, para su caracterización posterior. En la tabla 1 se resume su reconocimiento en ensayos de inmunofluorescencia indirecta sobre células infectadas, ELISA con antígeno natural (VIH-1 y VIH-2), y la subclase de inmunoglobulina. Cuatro de los AcM pertenecen a la subclase IgG1 y el quinto es una IgG2a.

Todos los AcM estudiados reconocen determinantes antigénicos, presentes tanto en la preparación recombinante utilizada como inmunógeno, como en la *gag* 24 nativa del virus. Estos sitios se encuentran, además, presentes en dos de los aislamientos del VIH-1: LAV1 y HTLV-IIIB, lo que indica que debe tratarse de sitios conservados dentro de esta proteína.

Uno de los cinco AcM mostró reactividad cruzada con lisados del VIH-2 en ELISA, lo cual ha sido reportado para otros AcM contra *gag* 24 (Minassian *et al.*, 1988; Niedrig *et al.*, 1988). Esto es explicable, ya que ambos virus presentan un elevado número de residuos conservados en las proteínas que componen la cápside. El grado de homología para estas proteínas entre el VIH-2 y el VIH-1 es variable, llegando a ser hasta del 90% para algunos aislamientos de VIH-1 en EE.UU. y Africa, y de 58% para los aislamientos europeos (Guyader *et al.*, 1987).

Todos los AcM reconocieron con diferente intensidad a la proteína en células infectadas. Esta característica los hace susceptibles de ser empleados en estudios citopatológicos e histopatológicos.

Tabla 1
CARACTERISTICAS INMUNOQUIMICAS DE LOS AcM

AcM	Subclase	Reactividad		
		IFI VIH-1	ELISA	
			VIH-1 (*)	VIH-2
706	IgG1	P	+ +	–
234	IgG1	P	+	–
626	IgG1	P	+ +	–
439	IgG1	P	+	–
197	IgG2a	P	+ +	+

IFI = inmunofluorescencia indirecta;
+ + = reacción fuertemente positiva en ELISA (>0,5);
+ = reacción positiva en ELISA (>0,3 y <0,5);
– = reacción negativa en ELISA (<0,2);
P = fluorescencia positiva;
* = lisado viral (Organon).

Los cinco anticuerpos ensayados por Western Blot reconocieron de forma específica las bandas correspondientes a la p24 y su proteína precursora p55 en lisados de LAV1 (figura 1). De este resultado es posible inferir que los epitopes reconocidos por estos anticuerpos no son de naturaleza discontinua, pues no se pierden con el tratamiento desnaturalizante que recibe la muestra durante la técnica de Western Blot. Adicionalmente, el hecho de que los AcM reconozcan también la proteína precursora sostiene la idea de que la conformación de estos epitopes está dictada exclusivamente por la secuencia de los aminoácidos que lo integran.

En la figura 2 se muestra cómo la unión de los AcM fue bloqueada en mayor o menor grado por el suero de un individuo seropositivo, con valores máximos de 70 y 45% para los AcM 706 y 197, respectivamente. Lo expuesto indica que estos dos AcM reconocen epitopes que son antigénicos en humanos, y pudieran ser empleados como base para la elaboración de un sistema competitivo para la detección de anticuerpos específicos contra la *gag* 24 en el suero de pacientes.

Respecto al comportamiento de los AcM restantes, es difícil llegar a una explicación definitiva sobre la base de los experimentos conducidos con solo un suero. No obstante, puede pensarse que existan regiones en la proteína que constituyen epitopes para células B de ratón y no para las humanas. Ello ha sido demostrado anteriormente para AcM de ratón por otros autores (Baetselier *et al.*, 1989).

Actualmente trabajamos en la determinación exacta de los epitopes reconocidos por todos los AcM obtenidos, empleando péptidos sintéticos (manuscrito en preparación). Ello permitirá ampliar los conocimientos básicos existentes acerca de la relación entre estructura y antigenicidad de esta proteína.

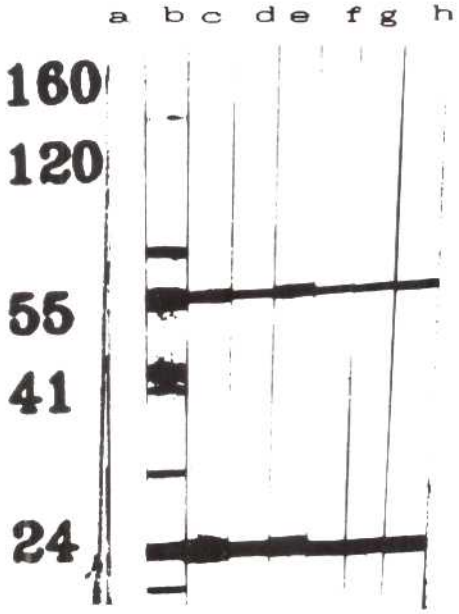

FIG. 1. Western Blot con AcM en lisados de VIH-1 (LAV1): a) suero negativo de ratón; b) suero humano positivo; c) AcM 626; d) AcM 706; e) AcM 197; f) AcM 439; g) AcM 234; h) suero positivo de ratón.

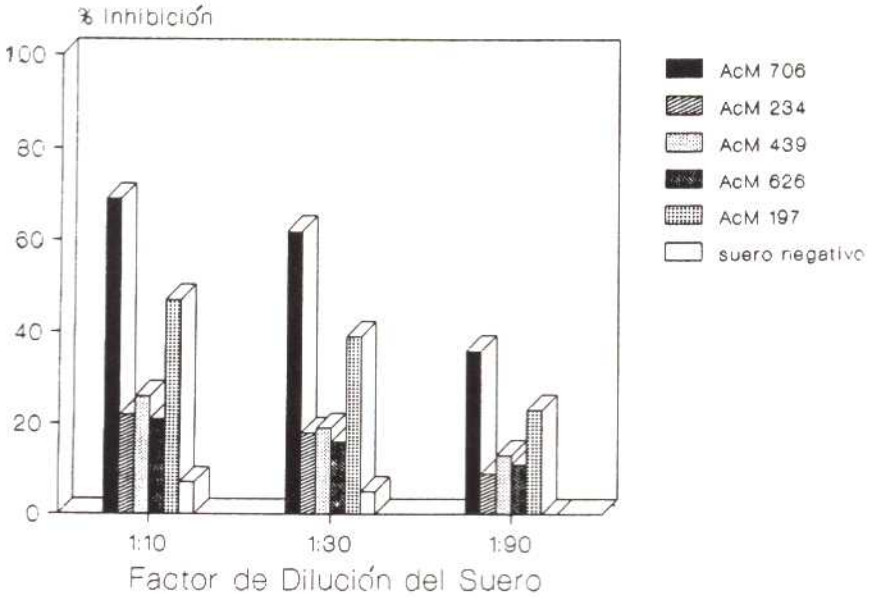

FIG. 2. Ensayo de bloqueo de los AcM por sueros humanos. Las barras correspondientes a los AcM representan la inhibición de la unión de estos a la *gag* 24r, causada por el suero de un paciente seropositivo al VIH-1. Las barras correspondientes a "suero negativo" representan el promedio de inhibición de la unión de los diferentes AcM, causado por un suero no portador de anticuerpos contra la *gag* 24.

REFERENCIAS

ANONIMO (1987). *The use of protein A Sepharose to purify IgG monoclonal antibodies.* Separation News 13.5.

BAETSELIER, P. DE; R. DE LEYS; C. WANTERS y VAN H. HEUVERSWYN (1989). *Monoclonal antibodies raised to recombinant HIV-1 gag proteins can identify immunodominant B cell epitope in AIDS patients.* Libro de resúmenes de la V Conferencia Internacional de SIDA, Montreal, 1989. Resumen TCP. **149**: 591.

CHAKRABARTI, L.; M. GUYADER; M. ALIZON; M. D. DANIEL; R. C. DESROSIERS, P. TIOLLAIS y P. SONIGO (1987). *Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses.* Nature **328**: 543-457.

DUARTE, C. A.; M. E. FERNANDEZ DE COSSIO; G. SIERRA; E. PENTON; A. AGRAZ; G. FURRAZOLA y A. AGUILERA (1987). *Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón recombinante alfa 2. Su empleo en la purificación y detección del antígeno.* Interferón y Biotecnología **4**(3): 221-232.

FRANCHINI, G.; C. GURGO; H. G. GUO; R. C. GALLO; E. COLLALTI; K. A. FARGNOLI; L. F. HALL; F. WONG-STAAL y M. S. REITZ (1987). *Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses.* Nature **328**: 539-542.

GHRAYEB, J.; I. KATO; S. McKINNEY; J. J. HUANG, P. K. CHANDA; D. D. HO; M. G. SARNGADHARAN; T. W. CHANG y N. T. CHANG (1986). *Human T-Cell lymphotrophic virus type III (HTLVIII) core antigens: synthesis in* E. coli *and immunoreactivity with human sera.* DNA **5**(2): 93-99.

GOUDSMIT, J.; F. DE WOLF; D. A. PAUL; L. G. EPSTEIN; J. M. A. LANGE; W. J. KRONE; H. SPEELMAN; E. CH. WOLTERS; J. VAN DEN NOORDAA; J. M. OLESKE y R. A. COUTINHO (1986). *Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection.* Lancet **ii**: 177-180.

GOUDSMIT, J. y D. A. PAUL (1987). *Circulation of HIV antigen in blood, according to stage of infection, risk group, age and geographic origin.* Epidem. Inf. **99**: 701-710.

GUYADER, M.; M. EMERMAN; P. SONIGO; F. CLAVEL; L. MONTAGNIER y M. ALIZON (1987). *Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2.* Nature **326**: 662-669.

HOMSY, J.; G. A. THOMPSON-HONNEBIER; C. CHEN-MAYER y J. A. LEVY (1988). *Detection of human immunodeficiency virus (HIV) in serum and body fluids by sequential competition ELISA.* Journal of Virological Methods **19**: 43-56.

IKUTA, K.; C. MORITA; S. MIYAKE; T. ITO; M. OKABAYASHI; K. SANO; M. NAKAI; K. HIRAI y S. KATO (1989). *Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) gag antigens on the surface of a cell line persistently infected with HIV-1 that highly expressed HIV-1 antigens.* Virology **170**: 408-417.

LAEMMLI, N. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly by bacteriophage T4.* Nature **227**: 680-685.

LANGE, J. M. A.; D. A. PAUL; H. G. HUISMAN; F. DE WOLF; J. VAN DEN BERG; R. A. COUTINHO; S. A. DANNER; J. VAN DEN NOORDAA y J. GOUDSMIT (1986). *Persistent antigenemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS.* British Medical Journal **293**: 1459-1462.

LOWRY, D. H.; N. J. ROSEMBROUGH; A. L. FARR y R. J. RANDAL (1951). *Protein measurements with the folin-phenol reagent.* J. Biol. Chem. **193**: 265-269.

MACHUGH, T. M.; D. P. STITES; M. P. BUSH; J. F. KROWKA; R. B. STRICKER y H. HOLLANDER (1988). *Relation of circulating levels of Human Immunodeficiency Virus (HIV) antigen, antibody to p24, and HIV-containing immune complexes in HIV-infected patients.* The Journal of Infectious Diseases. **158**(5): 1088-1091.

MINASSIAN, A. A.; V. S. KALYANARAMAN; R. C. GALLO y M. POPOVIC (1988). *Monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus (HIV) type 2 core proteins: Cross-reactivity with HIV Type I and Simian Immunodeficiency Virus.* Proc. Nat. Acad. Sci, USA. **85**: 6939-6943.

MUESING, M. A.; D. H. SMITH; C. D. CABRADILLA; C. V. BENTON; L. A. LASKY y D. J. CAPON (1985). *Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus.* Nature **313**: 450-458.

NIEDRIG, M.; J. P. RABANUS; J. L. AGE STEHR; H. R. GERDERBLOM y G. PAULI (1988). *Monoclonal antibodies directed against Human Immunodeficiency Virus (HIV) gag proteins with specificity for conserved epitopes in HIV1, HIV2, and SIV.* J. Gen. Virol. **69**: 2109-2114.

OUCHTERLONY, O. y L. A. NILSSON (1973). "Immunodiffusion and immunoelectrophoresis". In: *Handbook of Experiemntal Immunology.* Vol. 1, 3ra. edicion. Eds. D. M. Weir, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, p. 19.1.

RATNER, L.; W. HASELTINE; R. PARTARCA; K. J. LIVAK; B. STARCICH; S. F. JOSEPHS; E. R. DORAN; J. A RAFALSKI; E. A. WHITEHORN; K. BAUMESTIER; L. IVANOFF; S. R. PETTEWAY; M. L. PEARSON; J. A. LAUTENBERGER; T. S. PAPAS; J. GHRAYEB; N. T. CHANG; R. C. GALLO y F. WONG-STAAL (1985). *Complete nucleotide sequence of the AIDs virus, HTLVIII.* Nature **313**: 277-284.

SANCHEZ-PESCADOR, R.; M. D. POWER; T. J. BARR; K. S. STEIMER; M. M. STEMPIEN; S. L. BROWN-SHIMER; W. W. GEE; A. RENARD; A. RANDOLPH; J. A. LEVY; D. DINA y P. A. LUCIW (1985). *Nucleotide sequence and expression of an AIDS associated retrovirus (ARV2).* Science **227**: 484-492.

TENNER-RÁCZ, K.; P. RÁCZ; M. DIETRICH, P. KERN; G. JANOSSY; F. D. VERONESE; D. KLATZMANN; J. C. GLUCKMAN y M. POPOVIC (1987). *Monoclonal antibodies to Human Immunodeficiency Virus: their relation to the patterns of lymph nodes changes in persistent generalized lymphadenopathy and AIDS.* AIDS **1**(2): 95-104.

VERONESE, F. D.; M. G. SARNGADHARAN; R. RAHMAN; P. D. MARKHAM; M. POPOVIC; A. J. BODNER y R. C. GALLO (1985). *Monoclonal antibodies specific for p24 the major core protein of HTLVIII.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **82**: 5199-5202.

VERONESE, F. D.; T. D. COPELAND; S. OROSZLAN; R. C. GALLO y M. G. SARNGADHARAN (1988). *Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24.* Journal of Virology **62**(3): 795-801.

WAIN-HOBSON, S.; P. SONIGO; O. DANOS; S. COLE y M. ALIZON (1985). *Nucleotide sequence of AIDS virus.* Cell **40**: 9-17.

WITTECK, A. E.; M. A. PHELAN; M. A. WELLS; L. K. VUJCIC; J. A. EPSTEIN; H. C. LANE y G. V. QUINNAN (1987). *Detection of human immunodeficiency virus core protein in plasma by enzyme immunoassay.* Annals of Internal Medicine **107**(3): 286-292.