

Artículos originales completos

Cuantificación de interferón alfa 2b humano recombinante mediante anticuerpos monoclonales

S. CRUZ,¹ C. DUARTE,¹ E. FERRÁ,² G. FONTIRROCHE,² J. VÁZQUEZ,¹ L. MARTÍNEZ,¹ N. ARTEAGA,² E. PÉREZ,³ y J. GAVILONDO¹

¹ División de Hibridomas y Modelos Animales, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Circunvalación Norte, Camagüey, Cuba

³ Planta Piloto (CIGB)

Recibido en junio de 1989

Aprobado en noviembre de 1989

RESUMEN

Se obtuvieron hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (AcM) contra el IFN alfa-2 humano recombinante (rh α IFN) mediante la hibridación de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados y el mieloma P3/x63.Ag8.653. En el tamizaje de las células secretoras de anticuerpos específicos se emplearon sistemas microELISA, con el antígeno unido directamente a la fase sólida, o mediante otro AcM anti rh α IFN. Se seleccionaron nueve clones de hibridomas específicos para rh α IFN, de los cuales se escogió el secretor del AcM denominado CB-IFNA2.4 para los experimentos de desarrollo de un sistema ELISA tipo *sandwich*.

Empleando el AcM CB-IFNA2.3 como anticuerpo de captura y el CB-IFNA2.4 conjugado con peroxidasa, se construyó un sistema ELISA *sandwich* capaz de detectar 1 ng de antígeno por mililitro. Se realizó un estudio de optimización de los diferentes pasos del ELISA y del reconocimiento del antígeno, cuando este es sometido a distintos tratamientos desnaturalizantes. Este sistema se ha empleado exitosamente en el seguimiento del proceso de producción y purificación del rh α IFN. En experimentos preliminares con ratas inoculadas con esta molécula, se demostró que este ELISA puede detectar su presencia en suero.

SUMMARY

Monoclonal antibodies (MAbs) against the recombinant human alpha 2 interferon (rh α IFN)

were developed through the fusion of splenic lymphocytes of mice immunized with the recombinant antigen, and the P3/x63.Ag8.653 myeloma. In the screening of hybrids secreting specific antibodies we used mainly a microELISA system where the antigen was coated directly to the plates, or *sandwiched* between a precharacterized MAb, and the supernatant samples. In this way, nine hybridoma clones specific for rh α IFN were selected, and the one secreting the MAb denominated CB-IFNA2.4 was evaluated for the development of a *sandwich* type ELISA system.

Using the CB-IFNA2.3 MAb as capture antibody and the horseradish peroxidase-conjugated CB-IFNA2.4, we were able to construct an ELISA system that detects 1 ng of rh α IFN/ml. The different steps of such an ELISA were optimized, and the recognition of the antigen was studied after different denaturing treatments. This system has been successfully used in the follow-up of the production and purification processes of the recombinant antigen. In preliminary experiments, this ELISA was able to detect the presence of rh α IFN in the blood of injected rats.

INTRODUCCION

El desarrollo de las técnicas de ingeniería genética ha permitido la producción de los interferones (Goeddel *et al.*, 1981; Maeda *et al.*, 1980 y Nagata *et al.*, 1980) en cantidad y calidad

adecuadas para su empleo en ensayos clínicos. En el mundo en general y en nuestro país en particular, cada vez es más creciente el empleo de los interferones $\alpha 2$ recombinantes en el tratamiento de enfermedades virales y tumorales (Falcoff, 1986 y Scott *et al.*, 1982).

El incremento en la producción del interferón alfa 2b humano recombinante ($\text{r}\alpha\text{IFN}$) en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, ha hecho necesario el desarrollo de procedimientos rápidos y eficientes para la purificación (Duarte *et al.*, 1987) y el control analítico de las diferentes etapas del proceso. En este trabajo se describe la generación de nuevos AcM específicos para el $\text{r}\alpha\text{IFN}$ y el desarrollo de un sistema inmunoenzimático tipo ELISA capaz de cuantificar eficazmente esta molécula en muestras de diferentes etapas del proceso de su producción. Se realizó también una evaluación del ELISA en la detección del antígeno en sangre de animales inoculados.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno

El interferón recombinante humano alfa 2b ($\text{r}\alpha\text{IFN}$) (Silva *et al.*, 1988), fue suministrado con un elevado grado de pureza por la Planta Piloto del CIGB.

Anticuerpos monoclonales

Los AcM de ratón CB-IFNA2.2 y CB-IFNA2.3 son dos IgG1 que reconocen el $\text{r}\alpha\text{IFN}$ (Duarte *et al.*, 1987). El CB-IFNA2.2 tiene una alta afinidad por el antígeno cuando éste se encuentra adsorbido a fases sólidas. El CB-IFNA2.3 une eficientemente el $\text{r}\alpha\text{IFN}$ cuando este se encuentra en solución y tiene actividad neutralizante de su efecto biológico.

Inmunización, fusión y clonación de hibridomas

Se inmunizaron ratones BALB/c, tal como se describió anteriormente (Duarte *et al.*, 1987) y las

células esplénicas fueron hibridadas con el mieloma de la línea P3/X63-Ag8-653 según Gavilondo *et al.* (1987). La clonación y reclonación de los hibridomas de interés se realizaron en agar-medio.

Tamizaje para anticuerpos anti $\text{r}\alpha\text{IFN}$

Para la identificación de anticuerpos anti $\text{r}\alpha\text{IFN}$ en los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas se empleó un sistema inmunoenzimático tipo ELISA indirecto, con el antígeno fijado a placas de poliestireno (Duarte *et al.*, 1987). Se consideraron como positivos los cultivos de hibridomas cuyos sobrenadantes exhibieron valores de absorbancia tres o más veces superiores que el control negativo (sobrenadante de un hibridoma no relacionado), en varios ensayos consecutivos.

Las muestras se ensayaron también por el mismo método contra antígenos diferentes al $\text{r}\alpha\text{IFN}$, para verificar la especificidad de los anticuerpos.

Ensayo de competencia por determinantes antigénicos

Para la identificación de los hibridomas que secretaban anticuerpos capaces de competir con el AcM CB-IFNA2.2 por el antígeno unido al AcM CB-IFNA2.3, se recubrieron placas de poliestireno durante 12 horas a 4°C con 100 μl /pozo de una solución de 10 μg de CB-IFNA2.3/ml. Los pozos se bloquearon con BSA al 1 % en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), por 1 hora a 37°C, y luego de incubarse por 2 horas a 37°C con 100 μl /pozo de una solución que contenía 100 ng/ml de $\text{r}\alpha\text{IFN}$ en SSTF, se añadió una mezcla de 50 μl de sobrenadante del hibridoma en cuestión y 50 μl de diferentes diluciones de CB-IFNA2.2 conjugado con peroxidasa. La reacción fue revelada utilizando como sustrato colorimétrico la ortofenilendiamina. Se identificaron aquellos anticuerpos que inhibían la unión del CB-IFNA2.2 al $\text{r}\alpha\text{IFN}$ en más del 80 %.

Determinación de isotipo de inmunoglobulinas

La clase y subclase de los AcM se determinó según Ouchterlony y Nielsson (1978).

Purificación de anticuerpos monoclonales

Los AcM utilizados en este estudio fueron purificados a partir de fluido ascítico de ratón mediante cromatografía de afinidad con Proteína A Sepharosa (Farmacia), según recomendaciones del fabricante (Anónimo, 1986).

Conjugación de anticuerpos

Para la elaboración de conjugados AcM-enzima se utilizó el método de oxidación con peryodato de sodio (Nakane *et al.*, 1974) y peroxidasa de rábano picante (Sigma).

Desarrollo del sistema inmunoenzimático tipo ELISA para la cuantificación del rhaIFN

Se emplearon el CB-IFNA2.3 como AcM de captura y el nuevo AcM obtenido en este trabajo conjugado con peroxidasa, para la conformación de un sistema ELISA tipo *sandwich* en placas de poliestireno. El funcionamiento de este sistema se optimizó para diferentes condiciones de recubrimiento, bloqueo, aplicación de muestras y conjugado. El análisis estadístico para la comparación de los resultados obtenidos en cada una de las condiciones ensayadas, se realizó mediante un test "t" para series pareadas.

La repetibilidad y reproducibilidad del método se evaluaron mediante el cálculo de los coeficientes de variación inter e intraensayo, para un total de 20 experimentos en cada caso, utilizando muestras con diferentes grados de pureza provenientes del proceso de producción del rhaIFN en la Planta Piloto de nuestra institución.

Reconocimiento del antígeno luego de tratamientos desnaturalizantes

Se valoró el reconocimiento del antígeno por los AcM, después de ser sometido este a los siguientes tratamientos:

Diferentes pH. Se diluyó el antígeno en tampón citrato 10 mM (pH 2 y 4), tampón tris 10 mM (pH 9 y 11) y SSTF (pH 7,4). En otro ensayo se incubó el anticuerpo de recubrimiento con las mismas soluciones para observar el efecto directo sobre este.

Diferentes molaridades de β mercaptoetanol (β ME). Se ensayaron concentraciones de 22,93; 45,8 y 91,7 mM, y calor (1 hora a 60°C), simultáneamente o por separado.

Diferentes concentraciones de dodecil sulfato de sodio (SDS). Se evaluaron concentraciones de 0,1; 0,01; 0,001 y 0,0001 %.

Los estudios de pH y efecto del SDS se hicieron directamente en el sistema ELISA. Para estimar la acción del β ME y/o calor sobre la afinidad de cada uno de los AcM por separado, se empleó la técnica de *dot-blots*; para esto último se aplicó directamente el rhaIFN tratado a la nitrocelulosa y se comparó entonces el reconocimiento obtenido, con una curva patrón del antígeno intacto, revelándose la reacción con el sistema de anticuerpos anti-ratón

biotinilados/estreptavidina-peroxidasa (Amersham), según las instrucciones del fabricante.

Cuantificación del rhaIFN en suero de ratas tratadas con rhaIFN

Para evaluar la efectividad del sistema ELISA para la determinación de la presencia de rhaIFN en la sangre de animales de experimentación, se anestesiaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de peso corporal entre 258 y 260 g, con pentobarbital sódico (40 mg/kg peso) y se inocularon con 156 μ g de rhaIFN empleando para ello la vena caudal. Se tomaron muestras de sangre por el plexo venoso retroorbital a los 5, 30, 60 y 120 minutos luego de la administración del rhaIFN. El suero se evaluó a diferentes diluciones (1:2; 1:5; 1:10 y 1:20, en SSTF-leche descremada al 0,5 %), utilizando como control negativo la sangre de los mismos animales, antes de la anestesia.

RESULTADOS

Selección del AcM CB-IFNA2.4

Del tamizaje inicial se seleccionaron 8 cultivos de hibridomas secretores de anticuerpos específicos para el rhaIFN, y con altos valores de densidad óptica ($>0,7$) en el ELISA indirecto con el antígeno. La tabla 1 muestra los resultados del estudio de competencia de los sobrenadantes de cultivos de hibridomas con el CB-IFNA2.2 conjugado con peroxidasa, para el antígeno. Como se observa, solo los hibridomas 400, 93, 238 y 255 secretaban anticuerpos capaces de interferir el reconocimiento del AcM conjugado, cayendo los niveles de absorbancia hasta valores similares a los obtenidos cuando se emplea el propio CB-IFNA2.2 no conjugado (control positivo de inhibición).

Por las características de los anticuerpos producidos y su estabilidad en cultivo, los estudios se continuaron con el hibridoma 400, el cual fue clonado y reclonado. El AcM tipo IgG1 secretado por el clon 400/254/153 se denominó CB-IFNA2.4. Este clon fue inoculado a

Tabla 1
RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE COMPETENCIA DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE
HIBRIDOMAS CON EL AcM CB-IFNA2.2 CONJUGADO

Diluciones del CB-IFNA2.2-peroxidasa			
Cultivo de hibridomas	1:000	1:2000	1:3000
43	0,62	0,26	0,15
61	0,71	0,318	0,152
69	0,85	0,40	0,20
76	0,61	0,31	0,17
93	0,23	0,18	0,26
238	0,39	0,07	0,16
255	0,206	0,12	0,08
370	0,837	0,372	0,20
400	0,14	0,08	0,07
Control +	0,16	0,13	0,094
Control -	0,90	0,628	0,414

Nota: Los valores incluidos en la tabla representan la densidad óptica a 492 nm.
 Control (+) = CB-IFNA2.2 sin conjugar; control (-) = AcM no relacionado.

ratones y el fluido ascítico se purificó mediante cromatografía de afinidad por Proteína A Sepharosa, obteniéndose niveles de 2 mg de AcM por ml de ascitis.

Sistema ELISA para la cuantificación del antígeno

Se estableció experimentalmente un conjunto de condiciones básicas para el desarrollo del sistema ELISA *sandwich* para la cuantificación de $\text{rh}\alpha\text{IFN}$:

1. El recubrimiento con el AcM CB-IFNA2.3 se fijó en 5 $\mu\text{g/ml}$ durante 3 horas a 37°C (figura 1).

2. Se obvió el bloqueo, al encontrarse que los niveles de fondo (absorbancia debida a uniones inespecíficas del CB-IFNA2.4) y la sensibilidad, se mantuvieron a niveles aceptables sin este paso.

3. La incubación con las muestras de antígeno se acortó hasta 30 minutos, al obtenerse en estas condiciones curvas de máxima sensibilidad y no encontrarse diferencias significativas con los otros tiempos de incubación.

4. El tiempo y la temperatura de aplicación del conjugado se fijaron en 15 minutos a 37°C, por encontrarse una similitud de respuestas en todas las condiciones estudiadas (figura 2).

En estas condiciones, el rango útil de detección de $\text{rh}\alpha\text{IFN}$ en la curva patrón se encuentra entre 1 y 30 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayos calculados para muestras del proceso de producción del antígeno recombinante fueron 5,5 % y 6 % respectivamente, encontrándose en el rango permitido para los sistemas inmunoenzimáticos.

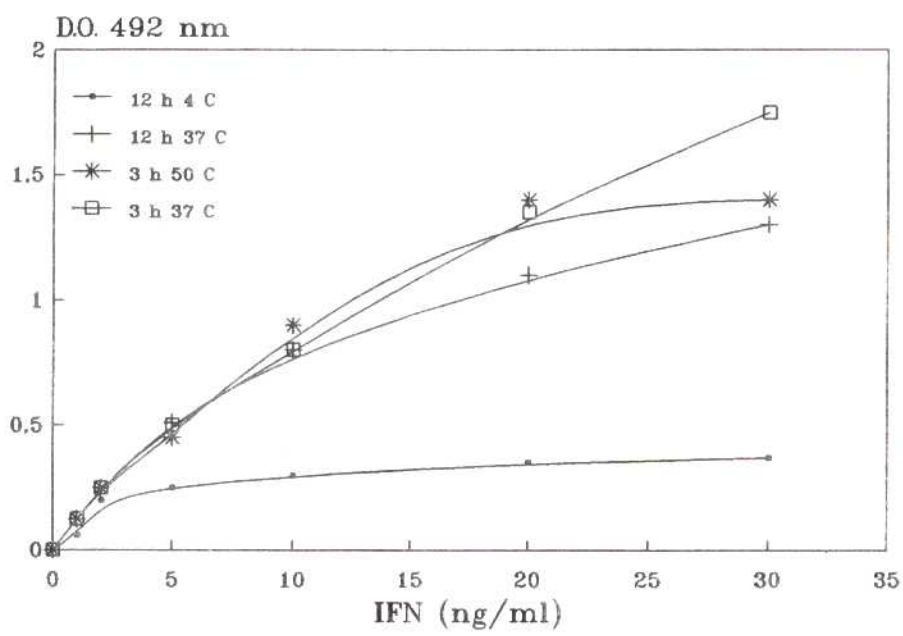


FIG. 1. Optimización del sistema ELISA para cuantificar $\text{rh}\alpha\text{IFN}$. Ensayos de recubrimiento con el AcM CB-IFNA2.3 (5 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos y temperaturas.

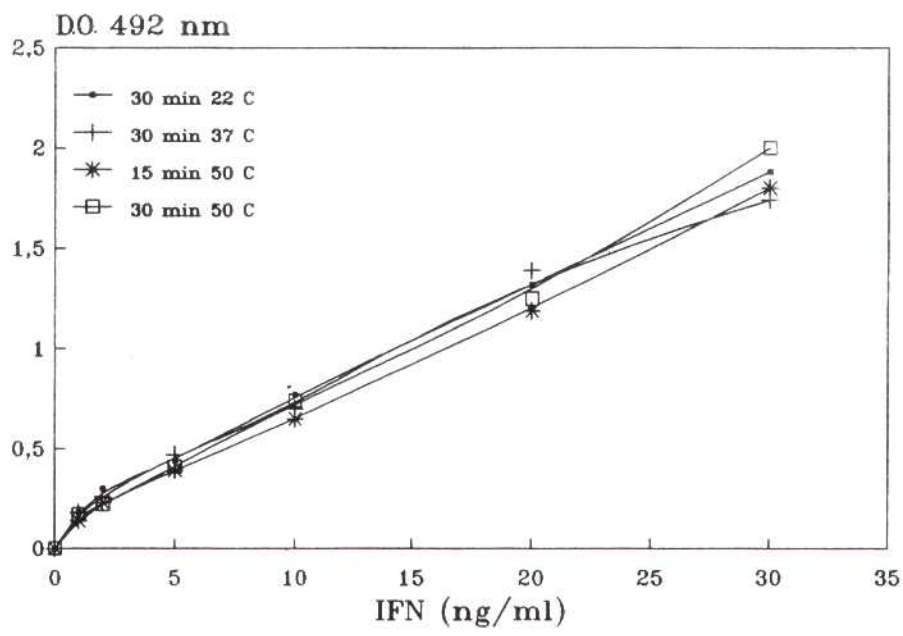


FIG. 2. Optimización del sistema ELISA para cuantificar $\text{rh}\alpha\text{IFN}$. Ensayos de aplicación del AcM CB-IFBA2.4 (1:4000) a diferentes tiempos y temperaturas.

Características del reconocimiento de los AcM sobre el antígeno sometido a diferentes tratamientos

En la figura 3 se comprueba que el antígeno no es detectado por el sistema ELISA cuando este ha sido previamente tratado a pH ácidos y básicos extremos. Por otro lado, si el AcM CB-IFNA2.3 adsorbido se somete previamente a estas soluciones, se comprueba que su capacidad de unión del $\text{rh}\alpha\text{IFN}$ intacto se afecta

exclusivamente a pH ácidos y permanece invariable a pH alcalinos.

El reconocimiento del antígeno por el sistema ELISA también es afectado significativamente por la presencia de SDS en la muestra, hasta niveles de 0,001 % (figura 4). Si el $\text{rh}\alpha\text{IFN}$ se somete a molaridades crecientes de βME y altas temperaturas para ser acoplado luego a nitrocelulosa, los AcM CB-IFNA2.3 y CB-IFNA2.4 pierden progresivamente la capacidad de identificar esta molécula. Ambos tratamientos por separado no afectan su detección por estos AcM.

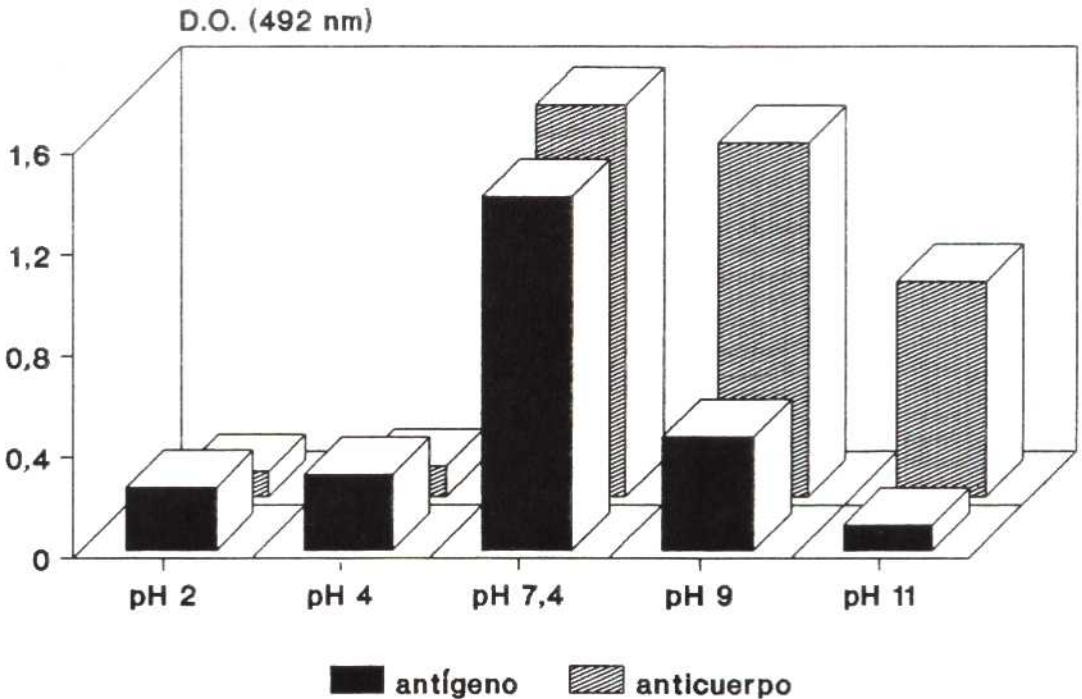


FIG. 3. Evaluación del comportamiento del sistema ELISA luego del tratamiento del antígeno o el AcM de recubrimiento a diferentes pH (ver detalles en *Materiales y Métodos*).

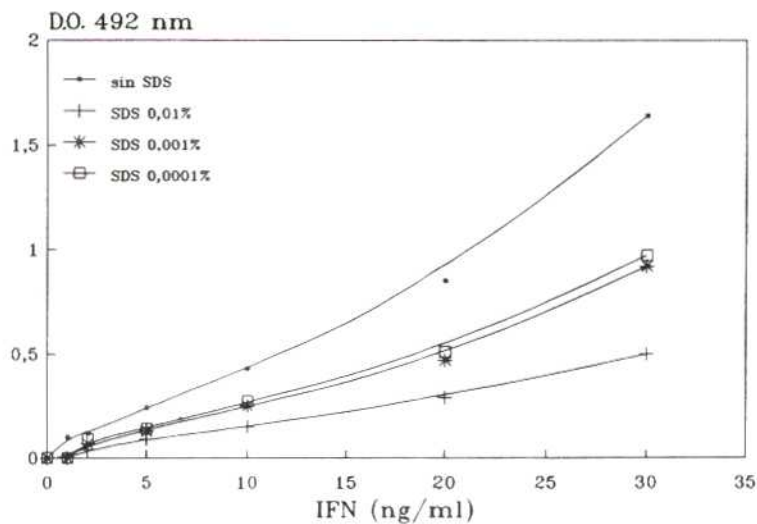


FIG. 4. Evaluación del comportamiento del sistema ELISA ante muestras del antígeno conteniendo diferentes concentraciones de SDS.

Cuantificación de rhIFNa2 en sueros de ratas

Mediante el sistema ELISA fue posible detectar la presencia de rh α IFN en la sangre de las ratas a las cuales este les fue

administrado por vía endovenosa. Se encontró un aclaramiento progresivo del rh α IFN, con el tiempo, después de su inyección e importantes diferencias en los valores para los distintos animales (figura 5).

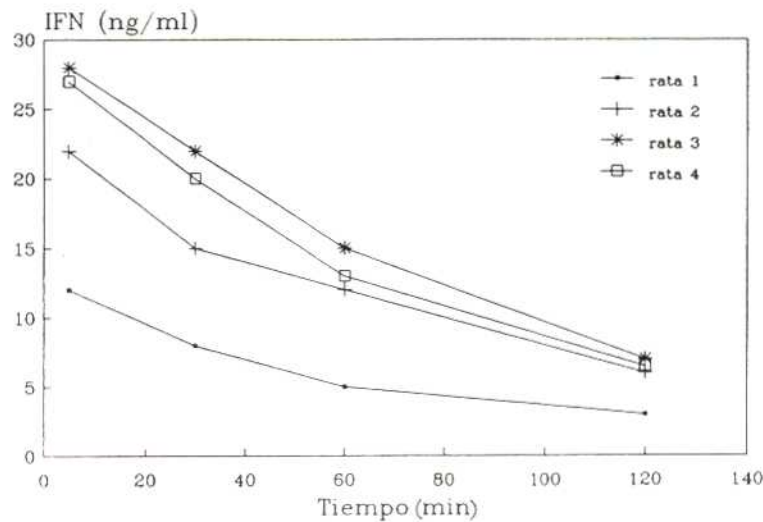


FIG. 5. Funcionamiento del sistema ELISA en la determinación de la cinética de aclaramiento de los niveles circulantes de rh α IFN en ratas inoculadas.

DISCUSION

Nuestro grupo había reportado anteriormente la construcción de un sistema ELISA *sandwich* para la cuantificación de IFN α (Duarte *et al.*, 1987). Este sistema empleaba como anticuerpo de captura el AcM CB-IFNA2.3 y el AcM CB-IFNA2.2 conjugado en el revelado. Los niveles de sensibilidad alcanzados con esta combinación fueron insuficientes (en el orden de las 10^4 UI/ml, equivalentes a 100 ng/ml) para su aplicación en evaluaciones precisas de los pasos del proceso de producción del antígeno recombinante y aún más para estudios en pacientes. En comparaciones realizadas con otros AcM pudo evidenciarse que las limitaciones del sistema se debían al AcM CB-IFNA2.2 que, como ya adelantamos, reconoce aparentemente un epítipo de la molécula poco expuesto cuando esta no está adsorbida a la fase sólida.

En esta nueva fusión se tamizó de manera directa para nuevos AcM que: a) no compitieran con el CB-IFNA2.3, y b) exhibieran altos valores de reconocimiento del $\rho\alpha$ IFN previamente unido por el AcM mencionado. De todos los clones obtenidos, el secretor del AcM CB-IFNA2.4 demostró ser el de mejores características.

Con el objetivo de explotar lo más posible las características de los AcM CB-IFNA2.3 y CB-IFNA2.4 para la construcción de un sistema ELISA, se evaluaron las condiciones de recubrimiento y revelado, así como los parámetros de aplicación y características de la muestra. Las condiciones óptimas obtenidas fueron: a) 3 horas a 37°C y 5 μ g/ml en el recubrimiento; b) aplicación de la muestra sin bloqueo previo, por 30 minutos a 37°C;

c) aplicación del conjugado por 15 minutos, a 37°C. En estas condiciones, el ensayo es muy repetible y reproducible, como lo demuestran los bajos coeficientes de variación obtenidos en los estudios de muestras provenientes del proceso de producción y purificación del antígeno en nuestro centro. Con placas prerrecubiertas, el tiempo del ensayo no pasa de 1 hora, lo que también es una ventaja.

Como en algunas etapas del proceso de producción es necesario evaluar muestras en presencia de SDS, se estudiaron los niveles permisibles de este reactivo en el ensayo, observándose que cantidades superiores a 0,001 % de SDS en las muestras afectan los valores de densidad óptica, produciendo una subvaloración de la cantidad real de $\rho\alpha$ IFN.

Por otro lado, la incubación del $\rho\alpha$ IFN en pH ácidos y básicos extremos provocó una pérdida de su reconocimiento en el sistema, como ocurre usualmente en las interacciones antígeno-anticuerpo. En virtud de que los α IFNs son estables a pH ácidos (Stewart, 1979) se estimó que este efecto podía tener su base en alteraciones producidas en los anticuerpos. En ensayos complementarios en los que sólo la fase sólida activa fue sometida al efecto del pH, se detectó una afectación a pH ácidos extremos, y no a pH alcalinos. De estas evidencias podemos inferir que: a) la exposición por un tiempo prolongado a pH ácidos no solo puede afectar la interacción antígeno-anticuerpo, sino que daña irreversiblemente la estructura de los sitios de enlace del anticuerpo, y b) sólo los pH básicos dañan la estructura antigénica.

Se conoce que el efecto biológico del α IFN depende de la conservación de los puentes disulfuro (Barasoain *et al.*, 1989; Lydon *et al.*, 1985; Morehead *et al.*, 1984; Wetzel *et al.*, 1983), muy relacionados con