

Obtención y empleo de anticuerpos monoclonales contra el activador tisular del plasminógeno

M. E. PÉREZ¹, L. SORELL², P. RODRÍGUEZ³, L. HERNÁNDEZ³, M. RODRÍGUEZ¹, M. AGUILAR¹ y J. GAVILONDO¹

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

² Instituto de Angiología y Cirugía Vascular, Calzada del Cerro 1551, Cerro, La Habana, Cuba

³ División de Genética de Organismos Superiores (CIGB)

Recibido en septiembre de 1989

Aprobado en diciembre de 1989

RESUMEN

Se obtuvieron los anticuerpos monoclonales (AcM) CB-tPA.1, CB-tPA.2 y CB-tPA.3, de la clase IgG1, secretados por híbridomas generados mediante la fusión del mieloma P3/x63.Ag8.653 con linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con activador tisular del plasminógeno (t-PA) natural, purificado a partir de sobrenadante de cultivos de la línea de melanoma humano BOWES.

Estos AcM reconocen en *immunodot* el t-PA natural de simple y doble cadena, y t-PA recombinante de doble cadena (*In Vitron*). Se desarrollaron sistemas ELISA tipo *sandwich*, que emplean los AcM como anticuerpos de captura y anticuerpos policlonales de conejo anti t-PA, conjugados con peroxidasa, en el revelado de la reacción. La sensibilidad de estos sistemas fue de 3 ng/ml y pueden ser empleados para la cuantificación de t-PA natural y recombinante, así como para la medida de t-PA en muestras de sangre.

SUMMARY

Stable hybridoma clones secreting the IgG1 mouse monoclonal antibodies (Mabs) CB-tPA.1, CB-tPA.2 and CB-tPA.3 were obtained from the fusion of the P3/x63.Ag8.653 myeloma with splenic lymphocytes of mice, immunized with natural tissue plasminogen activator (t-PA). The antigen was purified from the culture supernatant of the Bowes human melanoma line.

The Mabs recognize natural single and double chain t-PA, and recombinant double chain t-PA (*In Vitron*), using immunodot procedures. Combining Mabs and peroxidase-conjugated rabbit anti t-PA polyclonal antibodies we developed sandwich ELISA systems with a sensitivity of 3 ng/ml. These ELISA can be used for the quantitation of natural and recombinant t-PA in different samples, including blood.

INTRODUCCION

Se han empleado diferentes sustancias como agentes fibrinolíticos en pacientes con trombosis arterial y/o venosa. Las más usadas han sido la uroquinasa, la estreptoquinasa y el activador tisular del plasminógeno (t-PA) (Tennant 1984; Van der Wert 1984). Este último puede ser obtenido por cultivo de células de línea de melanoma humano (por ejemplo Bowes) y por vía recombinante en células de organismos superiores (Matsuo *et al.* 1983; Collen, 1984; Kruithof *et al.*, 1985).

Se ha reportado la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) contra el t-PA, para ser utilizados en procesos

de purificación y caracterización de esta molécula. Los sistemas elaborados a base de AcM para la cuantificación de t-PA son particularmente útiles en el control de los procesos de producción del t-PA natural o recombinante (Takada *et al.* 1986; Reilly *et al.* 1988).

En este artículo reportamos la obtención de AcM de ratón que reconocen t-PA de simple y doble cadena. Con AcM y anticuerpos policlonales de conejo contra t-PA hemos elaborado un sistema inmunoenzimático ELISA tipo *sandwich* con una sensibilidad de 3 ng/ml.

MATERIALES Y METODOS

Antígenos e inmunógenos

El t-PA natural se obtuvo a partir del sobrenadante de cultivo de células de melanoma humano Bowes. Una vez confluentes, las células se incubaron en medio DME (Gibco) sin suero, obteniéndose el sobrenadante que fue filtrado por 0,45 y 0,2 μ m. Se realizó una purificación en 2 pasos cromatográficos empleando secuencialmente matrices de zinc quelato y Lisina Sepharosa (Pharmacia) según el procedimiento descrito por Dova *et al.* (1986). Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. El eluato fue concentrado por ultrafiltración y se analizó su pureza en gel de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La actividad específica del t-PA se determinó según el método de Astrup y Millertz (1952). En algunos experimentos de caracterización se empleó t-PA comercial de doble cadena (*In Vitron*).

Inmunización

Se inmunizaron ratones BALB/c machos de 8 semanas por vía subcutánea en los días 0, 7 y 21, con dosis de 50 μ g de t-PA natural. 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) tres días antes de la fusión se les suministró una cuarta dosis *booster* de 50 μ g de t-PA en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), por la vía intraperitoneal.

Fusión y cultivo de hibridomas

Para la hibridación se empleó el mieloma P3/x63-Ag8.653. Como agente promotor de la fusión

se utilizó polietilenglicol 1450 (Sigma) y una relación mieloma/células esplénicas de 1:10. Las células fundidas se sembraron en placas Costar de 96 pozos a una concentración de 10^6 células/ml de medio. El medio de cultivo selectivo fue RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero de ternero neonato descomplementado (Cuba-Vet), 18 mM de Hepes (Flow), 17 mM de NaHCO₃ (Gibco), 2 mM de L-Glutamina (Gibco), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco), 0,05 mM de 2-mercaptoetanol (BDH), 40 μ g/ml de gentamicina (Pharmachin), 3% de sobrenadante de células endoteliales humanas (HECS; Astaldi 1983), y la mezcla preeleborada HAT (Sigma). Los cultivos secretores de anticuerpos específicos se clonaron y reclonaron por dilución limitante.

Selección de híbridos secretores de anticuerpos específicos

Se recubrieron placas de poliestireno (Dinatech) con 5 μ g/ml de t-PA natural en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante toda la noche a 4°C (100 μ l por pozo). Las placas se bloquearon con 2 % de leche descremada en SSTF durante hora, a 37°C y se añadieron 100 μ l de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas a cada pozo. Después de 3 horas a 37°C las placas se lavaron con SSTF-Tween 20 y se incubaron una hora con una solución de IgG de carnero anti-IgG de ratón, conjugada a Peroxidasa (Sigma), diluida 1:1000 en la misma solución de bloqueo. Después de varios lavados, la reacción fue revelada con 100 μ l por pozo de ortofenilendiamina al 0,04 % en tampón citrato pH 5,0, conteniendo 0,04 % (v/v) de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 %. La reacción se detuvo con 50 μ l de H₂SO₄ 2,5 M y se procedió a determinar la absorbancia a 492 nm en un lector microELISA (Multiskan Titerkek).

Se consideraron positivas las muestras que dieron valores al menos cuatro veces superiores a los del promedio de los controles negativos (sobrenadantes de hibridomas secretores de AcM no relacionados).

Determinación del isotipo del AcM

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

Purificación de AcM

La purificación de los AcM se realizó a partir de fluido ascítico obtenido después de la inoculación de tres 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, se 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.

Ensayos de competencia

El análisis de reconocimiento de epitopes por los diferentes AcM se realizó mediante un ELISA por competencia (Marcovina *et al.*, 1984), recubriendo placas de poliestireno con t-PA natural a una concentración de 2,5 µg/ml, toda la noche a 4°C. Luego de bloquear las placas se añadieron los anticuerpos monoclonales, solos o combinados a concentraciones tales en las que se alcanzaban condiciones de saturación. Se incubaron por una hora y el ELISA se desarrolló como fue descrito anteriormente. En estas condiciones, se obtienen valores superiores de absorbancia para la mezcla de los AcM con relación con cada uno por separado, solo si los AcM puestos a competir reconocen sitios diferentes en la molécula de t-PA.

Inmunodot

Se aplicaron 10 µl de distintas concentraciones de t-PA natural de doble y simple cadena y de t-PA recombinante de doble cadena a la nitrocelulosa. Los sitios libres fueron bloqueados con SSTF y 5% de leche descremada durante 2 horas a 37°C. Se añadió el AcM a una concentración de 20 µg/ml en SSTF y 1% de leche descremada y se mantuvo en agitación constante 2 horas, a 37°C. Después de lavada la nitrocelulosa, se aplicó un anticuerpo anti IgG de ratón biotinilado (Amersham) diluido 1:300, durante una hora a temperatura ambiente. La nitrocelulosa fue lavada nuevamente y se incubó con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Amersham) diluido 1:200 durante 1 hora, a temperatura ambiente. Después de un lavado extenso se añadió 4 cloro 1 naftol diluido en metanol y tampón tris-salino, como sustrato insoluble.

Obtención y marcaje de anticuerpos policlonales

Para la obtención de anticuerpos policlonales anti t-PA se inocularon conejos New Zeland White de 3 kg de peso por vía subcutánea con un total de cuatro dosis de 200 µg del antígeno natural, a intervalos de 15 días. En la primera dosis el antígeno se emulsionó en adyuvante completo de Freund y en las restantes en adyuvante incompleto. Los anticuerpos fueron purificados por cromatografía de afinidad en Proteína A Sepharosa a partir del suero

de los animales. Para algunos experimentos, los anticuerpos se acoplaron a peroxidasa de rábano picante (Sigma) de acuerdo con el método de Nakane y Kawao (1974).

Sistema ELISA para la cuantificación de t-PA

Para este ensayo se emplearon los AcM CB-tPA.1 y CB-tPA.2, o una mezcla de ambos, como anticuerpos de captura, a una concentración de 10 µg/ml en tampón bicarbonato, pH 9,6. Se recubrieron las placas de poliestireno con 100 µl por pozo durante toda la noche a temperatura ambiente, se lavó una vez y se bloqueó con SSTF y 2 % de leche descremada a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó una vez y se añadieron las muestras de sobrenadante de cultivo de células Bowes y de soluciones de tPA natural purificado y comercial (*In Vitron*) de concentración conocida, incubando, 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó repetidamente, y a continuación se añadió a cada pozo 100 µl del anticuerpo policlonal anti-tPA conjugado a peroxidasa, durante una hora a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo, la reacción se reveló añadiendo ortofenilendiamina al 0,04 % en tampón citrato-fosfato pH 5,0, conteniendo 0,04 % (v/v) de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 %.

Como referencia se desarrolló un sistema totalmente policlonal.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el chequeo del t-PA natural purificado mediante SDS-PAGE se evidenció que el 95 % correspondía a t-PA de doble cadena (33 000 - 34 000 kDa) y el resto a t-PA de simple cadena (67 000 kDa) (figura 1). La actividad específica se estimó en 300 000 UI/mg de proteína.

A partir de dos experimentos de fusión se seleccionaron tres cultivos de hibridomas que después de tres clonaciones consecutivas mantuvieron características de crecimiento y secreción de inmunoglobulinas específicas adecuadas. Los clones y sus AcM se denominaron CB-tPA.1, CB-tPA.2 y CB-tPA.3. La inmunodifusión radial con antiseros específicos demostró que los tres AcM son del tipo IgG1.

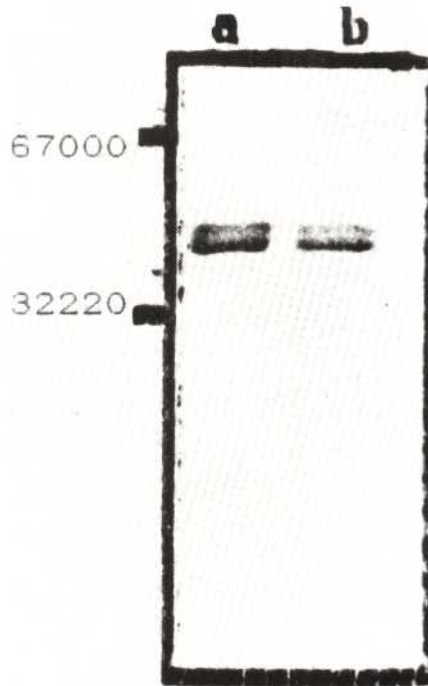


FIG. 1. SDS-PAGE de los resultados de la purificación de t-PA a partir del sobrenadante de cultivo de la línea Bowes: a) patrón comercial (In Vitron) de doble cadena, b) t-PA natural purificado por zinc-quelato y lisina Sepharosa. A la izquierda aparecen los pesos moleculares de marcadores de electroforesis (en dalton).

La cromatografía de afinidad con proteína A Sepharosa resultó un método rápido y eficiente para la purificación, tanto del AcM como para los anticuerpos policlonales anti t-PA, lográndose purezas superiores al 90% (SDS-PAGE).

La figura 2 muestra los resultados del *immunodot*, que demostró que el AcM CB-tPA.1 reconoce tanto al t-PA natural de doble y simple cadena como al t-PA recombinante de doble cadena comercial, con una sensibilidad aproximada entre 50 y 100 ng de t-PA. Los otros dos AcM tuvieron un comportamiento similar (resultados no mostrados).

Las características de reconocimiento de estos AcM sugerían su potencial utilidad en el desarrollo de sistemas inmunoenzimáticos para cuantificación del t-PA

natural y recombinante. Los ensayos de competencia mostraron que el AcM CB-tPA.1 reconoce un epítipo diferente al reconocido por el CB-tPA.2 y CB-tPA.3, y que estos, a su vez, reconocen el mismo epítipo o al menos epítipos que se solapan. Se decidió combinar los AcM CB-tPA.1 y CB-tPA.2 y policlonales en la construcción de sistemas ELISA tipo *sandwich*.

Se prestó especial atención a la sensibilidad, tiempo de ensayo y consumo de reactivos. Como se observa en la figura 3, con los diferentes sistemas evaluados se alcanza una sensibilidad en el orden de los 3 ng/ml. En caso de emplearse como anticuerpos de captura una mezcla de los AcM CB-tPA.1 y CB-tPA.2, se logra una sensibilidad superior a cuando se emplean

solos, y muy similar a la del sistema totalmente policlonal. Este resultado se explica tomando en consideración que estos AcM reconocen al t-PA por sitios diferentes, y por lo tanto, en estas condiciones ocurre una más eficiente unión de esta molécula por anticuerpos fijados a la superficie sólida.

del t-PA. En algunos de estos trabajos, la sensibilidad del método llega a 1 ng/ml y menos de t-PA (Bergsdorf, *et al.*, 1983; Holvoet *et al.* 1985), pero el tiempo de incubación con las muestras es de 18 horas, considerablemente mayor al empleado por nosotros (2 horas). Con nuestro sistema se alcanza la sensibilidad necesaria para la

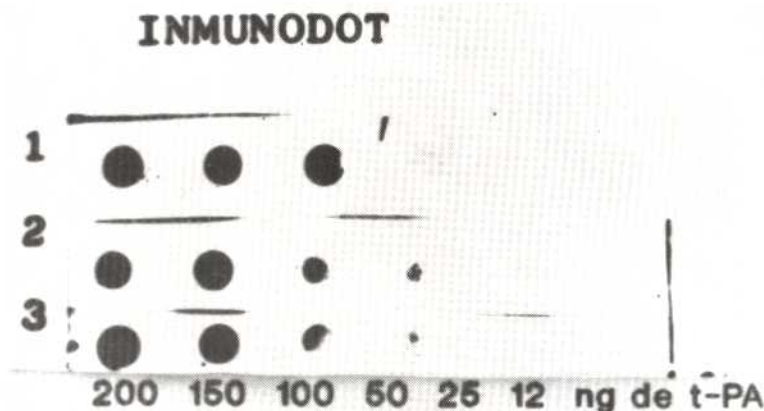


FIG. 2. Inmunodot con el AcM CB-t-PA.1 que demuestra el reconocimiento de: 1) t-PA de doble cadena (In Vitron), 2) t-PA de doble cadena (Bowes), 3) t-PA de simple cadena (Bowes).

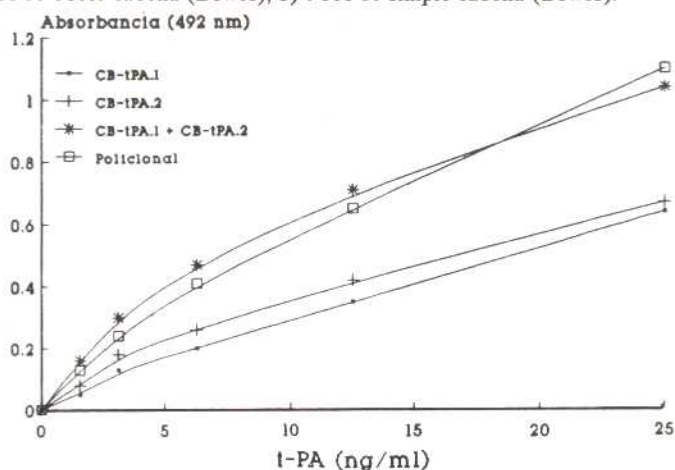


FIG. 3. Sistemas ELISA *sandwich* empleando diferentes anticuerpos en el recubrimiento (ver leyenda insertada). En todos los casos se emplearon para el revelado anticuerpos policlonales de conejo anti-TPA, conjugados con peroxidasa.

Se han reportado sistemas ELISA con anticuerpos policlonales y monoclonales, solos o combinados, para la cuantificación

cuantificación del t-PA, a partir de sobrenadantes de cultivos de células de melanoma de Bowes y del que puede

obtenerse por vía recombinante en células de organismos superiores, por lo que consideramos que por el significativo ahorro de tiempo logrado, es más ventajoso mantener las condiciones que hemos empleado aquí. Este sistema puede ser usado, además, para la cuantificación de tPA en sangre, cuyos valores reportados oscilan alrededor de los 5 ng/ml (Bergsdorf *et al.*, 1983; Amiral *et al.*, 1988), lo que es de particular utilidad para ensayos en pacientes que reciben tratamiento trombolítico con t-PA.

REFERENCIAS

- ASTALDI, G.C. (1983). "Use of human endothelial cell culture supernatant as growth factor for hybridomas". In: *Meth. Enzymology*, Vol. XCII, eds. J. Langone, H. Vunakis, Academic Press, pp. 39-46.
- ASTRUP, T. y S. MILLERTZ (1952). *The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity*. Arch. Biochem. Biophys. 40: 346-351.
- AMIRAL, J.; V. PLASSART; M. GROSLEY; F. MIMILLA; F. CONTANT y A.M. GUYADER (1988). *Measurement of tPA and tPA-PAI-1 complexes by ELISA using monoclonal antibodies: Clinical relevance*. Thrombosis Research, Suppl. VIII: 99-113.
- BERGSDORF, N.; T. NILSSON y P. WALLEN (1983). *An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease*. Throm. Haemostasis 50: 740-744.
- COLLEN, D.; E.J. TOPOL; A.J. TIEFENBRUNN; H.K. GOLD; M.L. WEISFELDT; B.E. SOBEL; R.C. LEINBACH; J.A. BRINKER; P.A. LUDBROOK; I. YASUDA; B.H. BULKLEY; A.K. ROBINSON; A.M. HUTTER; W.R. BELL; J.J. SPADARO; B.A. KHAW y E.B. GROSSBARD (1984). *Thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator: A prospective, randomized, placebo-controlled trial*. Circulation 70: 1012-1017.
- DOVA, I.; S. JACALPOUR; S. SOUTHWICK; W. NEWSOME; P. BROWNE y J.H. ROBINSON (1986). *Large scale rapid purification of recombinant tissue-type plasminogen activator*. FEBS 209: 3-17.
- HOLVOET, P.; H. CLEEMPUT y D. COLLEN (1985). *Assay of human tissue-type plasminogen activator with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies to t-PA*. Thrombosis Haemostasis 54: 684-687.
- MARCOVINA, S.; L. CREMONESI; P.J. PRICE y J.S. McDUGAL (1984). *Production and immunochemical study of monoclonal antibodies directed against human low density lipoprotein*. Develop. Biol. Standard 57: 399-407.
- MATSUO, O.; T. SAKAI; C. MATSUO; Y. NISHIDA; K. AKAZAWA y H. MIHARA (1983). *Production of plasminogen activator in a melanoma cell line*. Acta Physiol. Latinoam. 33: 305-313.
- NAKANE, P. A. y A. KAWAOI (1974). *Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugation*. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084-1091.
- OUCHTERLONY, O.Y. y L.A. NIELSSON (1978). *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Handbook of Experimental Immunology*, p. 196, Ed. D.M. Weir, Blackwell Scientific Publications.
- REILLY, T.; M. SANDRA; K. FLINT; B.G. McHUGH; K.M. KILBACH-VOLCHECK y P.B. TIMMERMANS (1988). *Characterization of a panel of monoclonal antibodies against human tissue-type plasminogen activator*. Hybridoma 7: 177-183.
- TAKADA, A.; K. SHIZUME; T. OZAWA; S. TAKAHASHI y Y. TAKADA (1986). *Characterization of various antibodies against tissue plasminogen activator using highly sensitive enzyme immunoassay*. Thrombosis Research, 42: 63-72.
- TENNANT, S.N.; J. DIXON; T.C. VENABLE; H.L. PAGE; A.B. KAISER; R. FREDERICKSEN; L. TACOQUE; P. KAPLAN; N.S. BABU; E.E. ANDERSON; E. ANDERSON; E. WOOTEN; H.S. JENNINGS; J. BREINING y W.B. CAMPBELL (1984). *Intracoronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction: Comparison of the efficacy of urokinase with streptokinase*. Circulation 69: 756-761.
- VANDERWERF, F.; P.A. LUDBROOK; S.R. BERGMAN; A.J. TIEFENBRUNN; K.A.A. FOX; H. DEGEEST; M. VERSTRAETE y D. COLLEN (1984). *Coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in patients with evolving myocardial infarction*. N. Eng. J. Med., 310: 609-614.