

# OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES GENERADOS CONTRA LA HORMONA LUTEINIZANTE HUMANA

Bertha V Rodríguez Pendás, Ada J Machado Curbelo, Celeste Arranz Calzado, Elena Noris Rodríguez, Aimée Álvarez Álvarez y Roberto M González Suárez

Departamento de Diabetes, Instituto Nacional de Endocrinología. Hospital Comandante "Manuel Fajardo". Zapata y D, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

## ABSTRACT

Monoclonal antibodies against luteinizing hormone (LH) were produced immunizing BALB/c mice with LH isolated in the INEN. They were IgG1 class and they were purified from ascitis fluid by affinity chromatography using protein A Sepharose. The antibodies were evaluated by the isotopical method in liquid phase and two of them were selected for a sandwich ELISA, according their characterization. This system was used for LH determination in serum samples, between 0.7 and 100 mU/mL and the sensibility of 0.2 mU/mL.

Key words: glycoprotein hormones, hybridomas, immunoenzymatic assays

Biotecnología Aplicada 1997;14:101-105

## RESUMEN

Se describe la producción de anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra la hormona luteinizante (LH), a partir de la inmunización de ratones BALB/c con LH hipofisaria humana purificada en el INEN (Instituto Nacional de Endocrinología). Los anticuerpos obtenidos son de la clase IgG1 y fueron purificados a partir de líquido ascítico mediante cromatografía de afinidad con proteína A Sepharosa. Estos anticuerpos fueron evaluados por su capacidad de unión a un trazador radioactivo en fase líquida, los resultados de su caracterización permitieron emplear dos de ellos en un sistema ELISA tipo sandwich, para determinar la LH en suero con un rango entre 0,7 y 100 mU/mL y una sensibilidad de 0,2 mU/mL.

Palabras claves: hormonas glicoproteicas, hibridomas, ensayo inmunoenzimático

## Introducción

La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína secretada por el lóbulo anterior de la hipófisis que junto a la gonadotropina coriónica (CG), la hormona estimulante del tiroide (TSH) y la foliculo estimulante (FSH) constituyen una familia de polipéptidos relacionados estructuralmente. Cuentan con una subunidad común a ellas (alfa) y una subunidad (beta) responsable de la actividad biológica específica para cada una (1). La LH juega un papel importante como marcador del momento de la ovulación, en la regulación de la ovulación y en la función ovárica durante el control del ciclo menstrual (2), por lo que su medición rápida y sensible es de gran importancia en los estudios clínicos y básicos de la regulación de la fertilidad debido a la corta vida media de circulación y la variación de las concentraciones de esta hormona durante el ciclo menstrual. La determinación de LH se ha realizado tradicionalmente por radioinmunoensayo (RIA) utilizando anticuerpos policlonales (3), pero las reacciones cruzadas hacen poco precisos los resultados, por lo que recurrir a la tecnología de producción de hibridomas es una ventaja en este sentido ya que permite disponer de poblaciones homogéneas de anticuerpos los cuales por su especificidad y suministro ilimitado permiten estandarizar los ensayos realizados (4).

Además, la necesidad de métodos sencillos y rápidos para determinar el momento de la ovulación como requisito de los llamados métodos naturales de contracepción.

En este artículo se reporta el proceso de generación y caracterización de cinco hibridomas secretores de AcM anti-LH humana y la utilización de dos de ellos en un sistema de inmunoensayo.

## Materiales y Métodos

### Inmunización

Se inmunizaron ratones Balb/c por vía subcutánea en los días 0, 15 y 21 con dosis de 20 µg de LH humana aislada y purificada en el Instituto Nacional de Endocrinología (INEN) (5). Para la primera dosis el antígeno fue emulsionado con adyuvante completo de Freund; en las restantes se empleó adyuvante incompleto. Al animal con mayor título de anticuerpos se le administró una última dosis sin adyuvante por vía intravenosa los tres días antes de la fusión.

### Fusión y cultivo de hibridomas

Para la hibridación se siguió esencialmente el método sugerido por Kohler en 1981 (6), empleando mieloma de ratón P3X63Ag8, 653; como agente

1. Reichert LE, Ward DN. On the isolation and characterization of the alpha and beta subunits of human pituitary follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 1974;4:655-659.

2. Daughady WH. Hormonas glicoproteicas. *Tratado de endocrinología*. Editorial Ciencia y Técnica 1987; tomo I: 88-92.

3. Landy H, Schneyer L, Randall W, Crowley W. Validation of highly specific and sensitive RIA for lutropin, follitropin and free alpha subunit in unextracted urine. *Clin Chem* 1990; 36: 340-344.

4. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256: 495-496.

5. Stockell A. Purification of human glycoprotein hormone. *Methods in Enzymology* 1975;37:380-389.

6. Kohler G. The technique of hybridoma production. In: *Immunological Methods*, Academic Press 1981; 12: 285-298.

promotor de la fusión se utilizó polietilenglicol 1 500 (BDH) y una relación mieloma-células esplénicas de 1 a 10; como cultivo de células alimentadoras se utilizaron esplenocitos provenientes de un ratón no inmunizado. Las células fundidas se sembraron en placas Costar de 96 pozos a una concentración de 100 000 células/mL de medio.

El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 17 mM de NaHCO<sub>3</sub> (Gibco), 18 mM de HEPES (Gibco), 2 mM de glutamina (Gibco) 1 mM de piruvato de sodio (Gibco), 40 µg/mL de gentamicina (Pharmachin), 0,05 mM de 2-mercaptoetanol (BDH) y 20 % de suero de ternero fetal (Gibco), en el caso del medio selectivo durante los primeros 14 días después de la fusión se adicionó hipoxantina 10 mM, aminopterina  $4 \times 10^{-7}$  M y timidina  $1,6 \times 10^{-5}$  M.

Aproximadamente a las dos semanas de cultivo se realizó el tamizaje primario de los sobrenadantes para determinar la presencia de anticuerpos anti-LH, empleando un RIA en fase líquida.

#### Clonaje y expansión de hibridomas

Los cultivos de hibridomas seleccionados para la producción se clonaron y reclonaron por el método de dilución limitante (7) y expandieron en frascos de cultivos, los cuales fueron utilizados para la recuperación de AcMs a partir de los sobrenadantes, así como para la crioconservación de las células y su inoculación a ratones.

#### Sistema de detección de anticuerpos

Para el tamizaje de la presencia de anticuerpos anti-LH en los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas o sus ascitis se utilizó un método isotópico en fase líquida a partir del cual 100 µL de las muestras fueron incubadas con 100 µL de LH marcada con I125 y 250 µL del tampón fosfato, pH 7,4 por 16 h a 4 °C. La unión antígeno-anticuerpo fue precipitada por adición de 100 µL de suero normal de ratón, 100 µL suero antitotal de ratón y 300 µL de PEG (6 000) al 15 % en solución EDTA e incubada por 1 h a temperatura ambiente, centrifugada 30 min a 2 000 g y la radioactividad del precipitado obtenida por conteos en un contador gamma LKB. Se establecieron controles de radioactividad total y de unión inespecífica, así como controles negativos (sobrenadante de cultivo de un hibridoma no relacionado) y positivo (suero de ratón utilizado en la fusión).

#### Determinación del isotipo de los AcMs

Se empleó un kit para la determinación de clases y subclases de AcM proveniente de la Amersham, con antisueros clasificadores y sobrenadantes de cultivos de los hibridomas estudiados.

#### Purificación de AcMs

Para la producción de líquido ascítico tumoral rico en AcM se inocularon 3 millones de células híbridas en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c, preinfectados 10 días antes con 0,5 mL de aceite mineral por la misma vía. El líquido ascítico colectado se distribuyó en alícuotas para su conservación a -20 °C y su posterior purificación.

La purificación de los AcM a partir de fluido ascítico se realizó por cromatografía de afinidad en una columna con proteína A Sepharosa CL 4B (Pharmacia), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante para las inmunoglobulinas de ratón de las diferentes clases; la muestra se diluyó a partes iguales con tampón glicina 1,5 M, NaCl 3 M y se utilizó como solución de elución citrato de sodio 0,1 M a diferentes pH (8). La actividad de las eluciones y de la ascitis antes de purificar se realizó en un RIA en fase líquida con iguales condiciones a las ya descritas. Todas las determinaciones de proteína se hicieron por el método de Lowry (9) y como criterio de pureza se efectuó una inmunoelectroforesis en gel de agarosa al 1,25 % en tampón veronal 0,0075 M pH 8,6, utilizando un suero antitotal de ratón según lo descrito por Ouchterlony (10).

#### Desplazamiento de los AcMs. RIA en fase líquida

Con vista a evaluar el comportamiento de los anticuerpos producidos, en un sistema de radioinmunoensayo, se estudió la curva de desplazamiento del trazador por la LH nativa.

Para esto se utilizaron diluciones de cada AcM con un 20 % de unión a la LH-I125 en RIA fase líquida, añadiendo 100 µL de LH estándar con las diferentes concentraciones de dicha hormona: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 y 1,56 mU/mL, en algunos casos se aumentó el rango por encima de 50 para lograr una curva de desplazamiento del anticuerpo aceptable.

#### Especificidad

Para determinar la posible reacción cruzada de nuestros anticuerpos con las hormonas glicoproteicas estructuralmente relacionadas, se realizó un RIA en fase líquida con las mismas condiciones experimentales al descrito previamente para la detección de anticuerpo, en este caso añadiendo 100 µL de hCG, TSH y FSH a concentraciones desde 1 000 ng/mL hasta 31,2 ng/mL para los hibridomas LH12 y LH11; y hasta 1 ng/mL para el LD4, LH8 y LG7.

#### Determinación de la constante de afinidad de los AcMs

La afinidad de los AcMs fue determinada por análisis de Scatchard (11), utilizando las curvas de des-

7. Oi VT, Herzenberg LA. Immunoglobulin producing hybrid cell lines. In: Mishell BB, Shiigi SM, editores. *Selected Methods in Cellular Immunology*. Freeman, San Francisco, 1980;366-370.

8. Thijssen JH, Wood L, Kessler AC, Griesser HW, Bauer O, Bieglmaye C. Multicenter evaluation of new enzyme-linked immunoassays of follotropin and lutropin in serum or plasma. *Clin Chem* 1991;37:1257-1267.

9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-269.

10. Ouchterlony O, Nielsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir DM, editor. *Handbook of Experimental Immunology*. Ed. Blackwell Scientific Publications 1978;196.

11. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1954;51:660-672.

plazamiento en RIA en fase líquida de los anticuerpos con altas concentraciones de estándar, a partir de las cuales se calcularon los parámetros requeridos para determinar la constante de afinidad ( $K_a$ ) de cada anticuerpo.

**Aplicación de AcMs anti-LH. Ensayo inmunoenzimático**

Para el desarrollo de un micro ELISA tipo "sandwich" en la determinación de LH en muestras de suero, se recubrieron placas de cloruro de polivinilo durante 16 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda, con 100  $\mu$ L/pozo del anticuerpo policlonal 1 046 a una concentración de 5  $\mu$ g/mL en tampón bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 (12); después de lavar dos veces con Tris-Tween 20 al 0,05 % se añadió 100  $\mu$ L de LH estándar a concentraciones desde 100 hasta 0,5 mU/mL, durante 1 h a temperatura ambiente, se repitieron los lavados y se añadió 100  $\mu$ L de los AcMs LH12 a 5 y 10  $\mu$ g/mL y el LH8 a 10 y 20  $\mu$ g/mL en la misma solución de lavado con 1 % de BSA, 1 h a las mismas condiciones descritas, inmediatamente se lavó y se depositaron 100  $\mu$ L de una dilución 1/10 000 de un antisuero comercial antiIgG de ratón conjugado con peroxidasa (Amersham); después de 1 1/2 h de incubación las placas se lavaron cinco veces para añadir 200  $\mu$ L de la solución de sustrato en solución citrato fosfato. La reacción se detuvo con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5N y se leyó a 492 nm en un equipo SUMA (Sistema Ultramicroanalítico) modelo 121 (13). Como controles se emplearon sueros humanos con concentraciones de LH altas, medias y bajas determinadas por RIA.

**Resultados y Discusión**

A partir de la técnica de fusión se obtuvieron hibridomas en el 87 % de los pozos, los cuales se clonaron y reclonaron y dieron lugar a cinco clones estables que se denominaron LH11, LH12, LG7, LH8 y LD4.

El estudio de isotipo con antisueros específicos demostró que los cinco AcMs son del tipo IgG1, kappa.

Con la cromatografía de afinidad en una columna de proteína A inmovilizada en Sepharosa, se obtuvieron preparaciones con un elevado grado de pureza, se comprobó el resultado por la inmunoelectroforesis, donde se enfrentaron los anticuerpos purificados a un suero antitotal de ratón; se observó una sola línea de precipitación.

La Figura 1 muestra un ejemplo representativo del patrón de elución a diferentes pH del tampón citrato, en este caso para el hibridoma LH12. Como se sabe, los contaminantes eluyen en el tampón glicina, mientras que las inmunoglobulinas lo hacen en

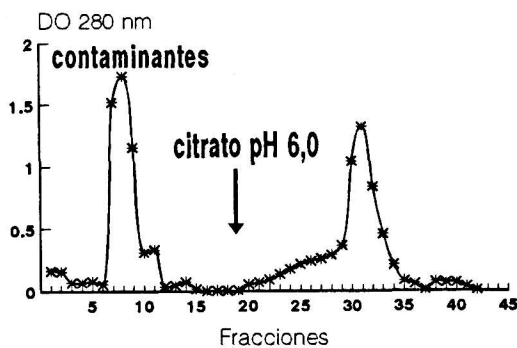


Figura 1. Purificación representativa de un anticuerpo monoclonal anti-LH (AcM LH12), por columna de afinidad.

el tampón citrato a pH entre 6 y 3 acorde a la subclase de anticuerpo.

Al medir la actividad anti-LH frente al trazador (LH-Iodo125) en fase líquida, sólo se encontró en la fracción que eluyó con el tampón citrato a pH 6 para los clones LH12, LH11, LD4 y LH8 y a pH 5 para el LG7.

En todos los casos, las muestras procesadas eran capaces de atrapar entre un 20 y un 30 % de la cantidad del trazador añadido, aproximadamente 10 000 cpm (conteos por minutos) en dependencia de la concentración del anticuerpo y de su afinidad.

En relación con las curvas de desplazamiento de los AcMs obtenidos, puede observarse en la Figura 2 que las concentraciones de LH capaces de desplazar de un 20 a un 80 % del trazador añadido se encontraba en el rango de 50-1 000 mU/mL, excepto para el LG7.

Este desplazamiento de poca sensibilidad con respecto a los antisueros policlonales, es propio de los anticuerpos monoclonales en este tipo de ensayo en fase líquida y se explica además porque la afinidad por el antígeno de los mismos es frecuentemente inferior a la de los antisueros convencionales, compuestos estos últimos por varios isotipos de inmunoglobulinas con diferentes afinidades y anti-

12. Castellanos E. Montaje y validación clínica de un método inmunoenzimático para cuantificar hormona luteinizante. TTR de Inmunología 1994.

13. González RR, Robaina R, Rodríguez ME, Blanca S. An enzyme immunoassay for determining total thyrosine in human serum using an ultramicroanalytical system. Clin Chem Acta 1991;197:159-170.

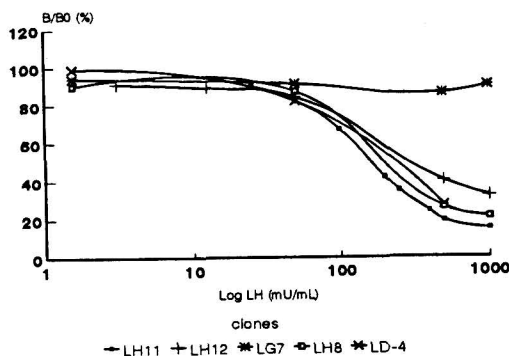


Figura 2. Curvas de desplazamiento de los cinco anticuerpos monoclonales anti-LH por radioinmunoensayo.

cuerpos contra varios de los determinantes del antígeno de interés; esto hace que los anticuerpos policlonales exhiban una cierta homogeneidad de comportamiento en diferentes técnicas inmunológicas (14). Los resultados de la especificidad de los anticuerpos obtenidos, en relación con el resto de las hormonas glicoproteicas por presentar gran homología en su cadena alfa con la LH, pueden apreciarse en las Figuras 3-6.

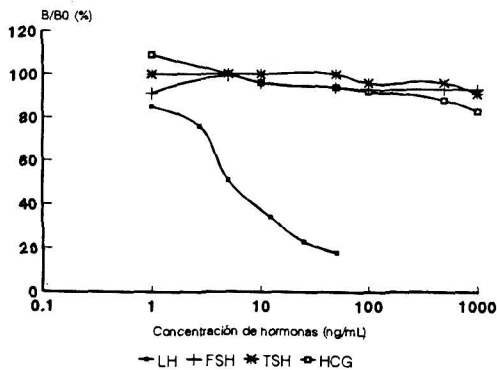


Figura 3. Estudio de especificidad del anticuerpo monoclonal LH8.

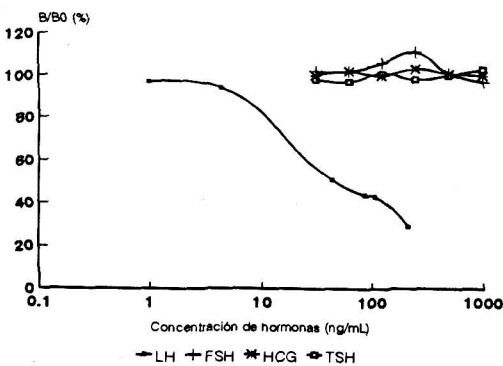


Figura 4. Estudio de especificidad del anticuerpo monoclonal LH12.

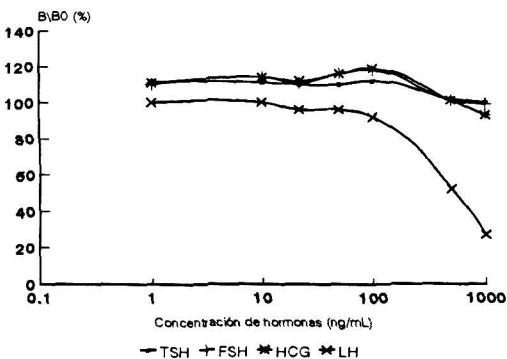


Figura 5. Estudio de especificidad del anticuerpo monoclonal LH11.

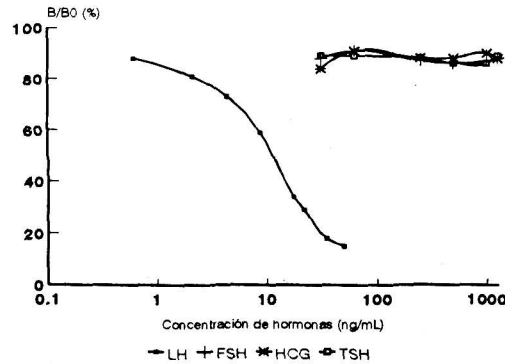


Figura 6. Estudio de especificidad del anticuerpo monoclonal LD4.

El estudio de especificidad realizado con las hormonas hipofisarias FSH, hCG y TSH a concentraciones 100 veces superior al rango de trabajo de las curvas de calibración de la LH utilizada y además del rango fisiológico y patológico en las que estas hormonas se encuentran en el suero humano, no desplazó la unión de los anticuerpos monoclonales a la LH marcada en ninguna de éstas, lo cual significa que no se encontró reacción cruzada con estas hormonas. Con estos resultados podemos afirmar, además, que los AcMs estudiados reconocen la subunidad beta de la LH y que en ningún caso reaccionan con la subunidad alfa.

Los anticuerpos monoclonales LH11, LH12, LH8 y LD4 mostraron un valor de  $k_a$  de  $1,3 \times 10^9$ ,  $2,1 \times 10^{10}$ ,  $2,5 \times 10^{10}$  y  $1,2 \times 10^9 M^{-1}$ , respectivamente, lo cual es aceptable para este tipo de anticuerpos (15); estos resultados son similares a los encontrados con otros AcMs contra la LH (16) y otras hormonas glicoproteicas, reportados por otros autores (17, 18).

En la Figura 7 se observa que la gráfica de Scatchard fue lineal dentro de los límites del error experimental, lo que constituye otro argumento a favor de la monoclonalidad de estos anticuerpos, unido a los resultados de la purificación.

Sin embargo para el LG7 no fue posible el estudio de la especificidad, ni el cálculo de su constante

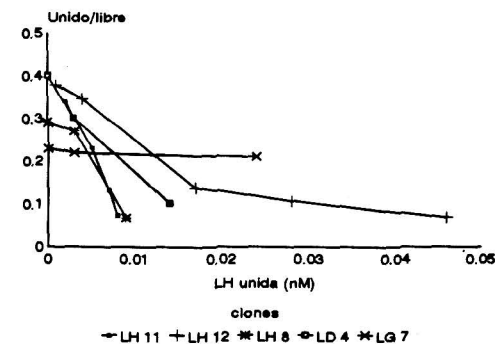


Figura 7. Ploteo de Scatchard para determinar la constante de afinidad de los anticuerpos monoclonales.

14. Gavilondo J. Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales. *Interferón y Biotecnología* 1987; 4: 1-16.

15. Little J. The immune system. Production and characterization of antibody. *Immunoassay International* 1995; 6: 4-17.

16. Laurence MD. Monoclonal antibodies to lutropin: are our immunoassays too specific? *Clin Chem* 1991; 37: 311-312.

17. Gribnau TC. Affinity of monoclonal antibodies. Interpretation of the positive cooperative nature of anti-hCG/hG interaction. *J Immunol Methods* 1991; 140:235-241.

18. Heyningen V. A simple method for ranking the affinities of monoclonal antibodies. *Methods in Enzymology* 1986; 121:472-479.

de afinidad mediante el análisis de Scatchard debido a que no se pudo lograr una curva de desplazamiento útil, aun a concentraciones elevadas de la hormona fría. En trabajos posteriores, este híbrido será sometido a un análisis más profundo con vista a su posible aplicación en sistemas inmunoenzimáticos y además realizaremos el estudio de focalización isoelectrónica de todos los anticuerpos obtenidos, lo cual constituye otro criterio fuerte a favor de la monoclonalidad de un anticuerpo (19) al aparecer éstos en un gel de isoelectrofoque como un conjunto discreto de tres a cinco bandas que forman una agrupación en una zona específica de pH.

Las primeras aplicaciones de los inmunoensayos para la determinación de LH fue mediante el empleo de métodos isotópicos, los cuales, mediante el perfeccionamiento de la calidad y disponibilidad de los antisueros fueron ganando cada vez más en especificidad y sensibilidad (15, 20).

Sin embargo el uso de isótopos posee varios problemas como su corta vida media, equipamiento complejo para su lectura y lo que es más importante aún el daño potencial que puede ocasionar al personal que labora con él.

Aquí presentamos el desarrollo de un nuevo método enzimático tipo "sandwich" que utiliza un anticuerpo policlonal como recubrimiento y un AcM (LH8 y LH12) como segundo anticuerpo, seleccionados estos últimos por sus resultados de  $k_a$  y especificidad.

Las curvas de los AcMs LH8 y LH12 utilizados a diferentes concentraciones resultaron en sentido general muy semejantes entre sí aunque se escogieron para trabajar las concentraciones de 20 y 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  respectivamente por presentar mejor desplazamiento. Al realizar la comparación entre los distintos anticuerpos observamos que si bien las diferencias no son muy notorias, el AcM LH8 mostró cierta superioridad en la discriminación entre los valores más bajos de estándar de LH (Figura 8). Estos anticuerpos fueron capaces de detectar la LH en un rango entre 0,7 y 100 mU/mL y una sensibilidad de 0,2 mU/mL.

Los niveles de sensibilidad alcanzados en este sistema son superiores a los del RIA reportado por nuestro laboratorio (21); por otro lado esta sensi-

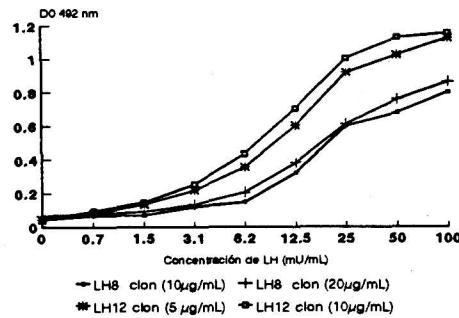


Figura 8. Sistema inmunoenzimático utilizando el anticuerpo monoclonal LH8 y LH12.

bilidad es superior a otros ELISAs reportados recientemente (22) el cual es desde el punto de vista metodológico muy semejante a nuestro ensayo.

Esta sensibilidad excede a la requerida para realizar las determinaciones séricas de LH, por lo que consideramos que este ensayo podría ser adaptado al estudio de las concentraciones urinarias de la misma (23), lo cual permitiría hacer menos costoso el proceso de toma de muestra y lograr que ésta sea menos agresiva para el paciente, sobre todo si tenemos en cuenta que los niveles de estas hormonas exhiben un patrón cíclico y que su estudio generalmente requiere la toma de sangre a intervalos frecuentes, principalmente cuando estas determinaciones están encaminadas al estudio de la pareja infértil o al control de la fertilidad (24).

El conocimiento de que la declinación del pico de LH, que ocurre tras la ovulación, demora 24 h más en la orina respecto a los niveles séricos, constituye otro aspecto a favor de las determinaciones urinarias de LH (25). Además, debido a que las concentraciones séricas de la hormona son también afectadas por su metabolismo y por la velocidad de su aclaramiento renal, su determinación en la orina es importante para la total comprensión de la fisiología de la LH (26).

Las líneas de híbridos obtenidas mostraron cumplir con los requisitos de especificidad deseada para su potencial utilidad junto a un anticuerpo policlonal en el desarrollo de un sistema inmunoenzimático rápido y sencillo.

19. Vázquez AM et al. Anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de diferenciación de las células tímicas presentes en las células tumorales de pacientes con linfomas T cutáneos. *Interferón y Biotecnología* 1986;3: 229-237.

20. Jaakkola T. Editorial Biological to immunological ration. Reevaluation of a concept. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:1496-1505.

21. Andino NA. Radioinmunoensayo de LH y FSH. Valores normales en una muestra de la población cubana masculina sana. *Rev Cub Obstet Ginecol* 1980;6:319-324.

22. Chen KW. Applications of monoclonal antibodies to human FSH and LH hormone in ELISA. *Biotecnol and App Biochem* 1989;11:83-88.

23. Kathleen M. Enzyme immunoassay method for total alpha gonadotropin in human urine samples. *Endocrinology* 1992;57:1241-1253.

24. Okamura T. Urinary surge of human luteinizing hormone in fertile women. *Ins J Gynaecol Obstet* 1990; 32:145-152.

25. Conson GM, Ghazi D, Kemmann E. Home urinary luteinizing hormone immunoassay clinical applications. *Fertil Steril* 1990;53:235-241.

26. Berga SL, Yen SC. Opioidergic regulation of LH pulsatility in woman with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1989;30:77-84.