

Nuestra experiencia con Anticuerpos monoclonales, algunas aplicaciones.

Carlos A. Fossati ■

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU, CONICET-UBA)
 Facultad de Farmacia y Bioquímica
 Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN-UNLP)
 Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas.

En 2004, el Dr. Cesar Milstein recibió el premio Nobel de Medicina, conjuntamente con George Köhler y Niels Jerne. El trabajo publicado por Köhler y Milstein en la revista Nature en 1975, titulado "Inmortalización de células productoras de anticuerpos de especificidad predefinida" fue el detonador de tal distinción. El descubrimiento de la forma de producir anticuerpos monoclonales es considerado como el descubrimiento inmunológico más importante del siglo XX. Junto con el desarrollo de la biología molecular y la ingeniería genética, constituyen las herramientas más importantes de la biotecnología moderna.

Cabe destacarse que la distinción otorgada a Cesar Milstein no es exclusivamente debida al trabajo citado, su trascendente trayectoria en el estudio de la genética y estructura de las inmunoglobulinas lo habían convertido a candidato Nobel varios años antes. La ingeniería de los anticuerpos monoclonales constituye, en este caso, un hito en una trayectoria notable.

¿En que consiste este gran avance? Simplemente en disecar la respuesta inmune humoral en sus componentes individuales de una manera sumamente práctica y sencilla.

La respuesta inmune humoral se puede visualizar como la formación de anticuerpos (Ac) contra un antígeno (Ag) dado por un huésped, natural

o artificialmente contactado por una sustancia extraña a su organismo, normalmente un microorganismo. Como respuesta a la posible agresión el sistema inmune reacciona, entre otras formas, produciendo anticuerpos capaces de reaccionar específicamente con ese elemento (antígeno) y colaborar con la neutralización y/o eliminación del componente extraño.

Los anticuerpos son proteínas (inmunoglobulinas), constituidas por dos cadenas pesadas iguales entre si (cadenas H), y dos cadenas livianas (cadenas L), también iguales entre sí. Las cadenas H se mantienen unidas covalentemente mediante puentes

disulfuro y generalmente, las cadenas L se unen de la misma forma cada una a una H. Tanto H como L, están conformadas en segmentos denominados dominios (Figura 1).

Las cadenas H pueden ser de diversos tipos (α , δ , γ , ϵ , μ) dando lugar a diferentes clases de inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgG, IgE e IgM, respectivamente). A su vez, las cadenas L serán λ o κ . Las distintas clases de anticuerpos poseen estructuras y propiedades funcionales especiales. Eventualmente en toda respuesta de anticuerpo se pueden generar varias clases de inmunoglobulinas, aún contra el mismo determinante antigénico. Algunas

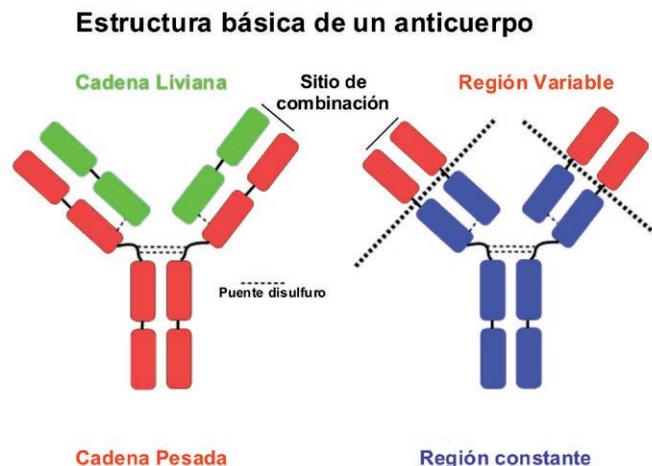
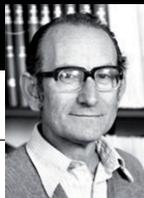


Figura 1



clases de anticuerpos se asocian en polímeros para cumplir su función. Otra peculiaridad de estas moléculas, es que poseen regiones constantes y regiones variables. La región constante recibe ese nombre porque todas las moléculas de la misma clase poseen la misma secuencia de aminoácidos. Variable significa que, aún para Ac de una misma clase, tales regiones poseen diferentes secuencias aminoácidas. Las cadenas H y L se ordenan espacialmente de manera que sus regiones variables se complementan en una superficie, denominada región de reconocimiento o paratope, que le confiere la capacidad de reconocer y unirse no covalentemente a su antígeno específico.

Cualquiera sea el antígeno (organismo entero o componentes del mismo), es potencialmente capaz de despertar una respuesta que genera Ac contra diferentes regiones del mismo, denominadas determinantes antigénicos o epitopos.

Los anticuerpos son generados por células linfoides de tipo B que, esti-

muladas por un antígeno, proliferan y se diferencian a células productoras de anticuerpos (plasmocitos), las que constituyen verdaderas fabricas que producen y secretan esas inmunoglobulinas, las que podrán circular libremente por el plasma y distribuirse en los líquidos intersticiales del organismo (Figura 2).

De esta forma el suero del animal infectado o inmunizado (antisuero) es heterogéneo desde el punto de vista inmunológico, ya que contiene una mezcla de anticuerpos específicos para diferentes epitopos, correspondientes a distintas clases de inmunoglobulinas. La composición inmunológica del suero es variable en el tiempo y de animal a animal, obviamente imposible de reproducir y por ende, limitada al tiempo de sobrevivencia del huésped.

La genialidad del descubrimiento de Milstein, fue encontrar una manera sencilla y rápida de producir células inmortales capaces de fabricar Ac contra un antígeno particular.

Su técnica consiste básicamente en fusionar el linfocito productor de Ac con una célula capaz de dividirse de manera continua "in vitro" y de

producir el anticuerpo expresado por el linfocito. Las células inmortales son células de mieloma (células tumorales de estirpe B) que se dividen permanentemente y que por su origen poseen la maquinaria productora y secretora de Ac.

Metodológicamente el ensayo es muy simple: se homogeneiza el bazo de un animal estimulado con un Ag de interés, se mezcla en proporciones adecuadas con las células de mieloma, se incuba unos minutos con un agente fusionante (PEG o polietilenglicol, por ejemplo), se lavan las células y se cultivan en un medio adecuado (Figura 2).

Las células de mieloma fueron originalmente seleccionadas para que no puedan dividirse en el medio de cultivo selectivo, medio en el cual las células híbridas ("hibridomas", producto de la fusión de un linfocito con una célula mielomatosa), sí pueden crecer. En estas condiciones, después de unos días toda célula en crecimiento es un hibridoma ya que los linfocitos no fusionados mueren en unos pocos días. Posteriormente, sólo se requiere examinar la presencia de Ac de interés en el sobrenadante de cultivo y asegurarse, mediante un procedimiento de clonado, que toda la población de células derive de un hibridoma único. Estos hibridomas pueden ser congelados y mantenidos indefinidamente en condiciones criogénicas adecuadas. Cada uno de ellos queda listo para ser descongelado y crecido cuando se necesite. El Anticuerpo Monoclonal (AcM) puede ser purificado a partir de sobrenadantes de cultivos de pequeña o gran escala, del líquido ascítico de animales inoculados con el hibridoma (el que por su carácter tumoral crecerá en el huésped fabricando anticuerpos), o de otras formas de acuerdo a las necesidades.

Las propiedades y características de los anticuerpos monoclonales son, como consecuencia, muy diferentes a las de los sueros policlonales. El anticuerpo monoclonal es homogéneo (es una sola especie molecular), será siempre igual, corresponderá a una sola especificidad (reconocerá sólo a un epitope) y podrá producirse indefinidamente.

Nuestra experiencia en la producción y caracterización de anticuerpos

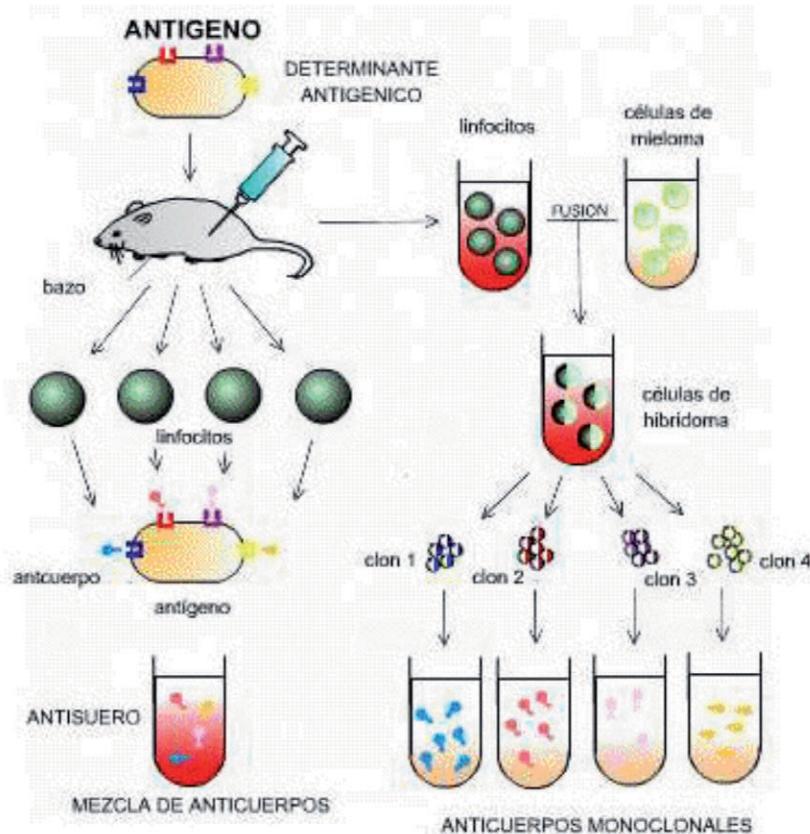


Figura 2

monoclonales se inició a fines de los años 70 en Inglaterra y se estableció en el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, a principios de los 80. Muy poco después comenzamos con la formación de un grupo de trabajo (LISIN), en la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

Iniciamos nuestros trabajos produciendo AcM contra un hapteno en la línea de los trabajos pioneros del Dr. R.A. Margni, quien estaba interesado en establecer los patrones de glicosilación de los anticuerpos asimétricos o coprecipitantes, inicialmente descritos por él. Mediante la producción de diversos anticuerpos anti-DNP (AcM 112D5, 112B, etc), pudimos demostrar que cada hibridoma es capaz de producir simultáneamente anticuerpos normal y asimétricamente glicosilados. También identificamos los residuos oligosacáridicos ubicados en las distintas regiones de estos anticuerpos. Finalmente, demostramos que esos oligosacáridos eran los responsables directos del comportamiento particular de los anticuerpos coprecipitantes (AcM 194/2, 194/5, 194/6 y 194/12). En esta línea además del Dr. Margni, participaron principalmente las Dras, Laura Morelli, Irina Mathov, Lilian Plotkin y Juliana Leoni, del IDEHU.

En otra serie de trabajos, con los Dres Margni, Carbonetto, Malchiodi, Zwir-

ner y Chiaramonte, entre profesionales de otros laboratorios, desarrollamos AcM contra antígenos de *Trypanosoma cruzi*, que resultaron útiles para el desarrollo de diferentes métodos de diagnóstico (alguno de ellos llegó a una etapa industrial). También identificamos mediante el uso del AcM CAK20.12, a un antígeno de 150 kDa presente en la membrana del parásito y que se deposita en músculo estriado, en la capa muscular lisa del músculo cardíaco, en la capa muscular estriada del esófago y en el músculo liso del colon, órganos blanco de la afección crónica.

En el IDEHU, nuestro grupo se ha dedicado principalmente, pero no únicamente, al estudio de la Brucelosis. En este tema, desarrollamos AcMs para la identificación y caracterización de antígenos de utilidad para el desarrollo de métodos de diagnóstico, estudios de la inmunopatogenia de la infección por *Brucella*, y para el desarrollo de vacunas acelulares contra esta bacteria. Como resultado de estos trabajos, fuimos capaces desarrollar diferentes sistemas de diagnóstico tanto para brucelosis humana como de otras especies animales, tales como bovinos, ovinos, caninos. En este terreno, generamos anticuerpos monoclonales que nos permitieron obtener extractos proteicos libres de LPS (antígeno CP). Con este reactivo, desarrollamos ensayos de ELISA logrando una gran especificidad

y sensibilidad para el diagnóstico de la Brucelosis (Figura 3).

Esta mejora se debe a que el diagnóstico serológico tradicional de la infección, se realiza con métodos basados en la detección de anticuerpos contra el LPS de brucelas lisas los que, además de no detectar infecciones por brucelas rugosas, dan reactividad cruzada con otras bacterias, dan lugar a falsos negativos en algunas etapas, pueden mostrar títulos positivos en personas sanas expuestas, etc. El ELISA con CP nos permitió, además, la detección con alta sensibilidad y especificidad de infección activa en numerosos pacientes en los que los métodos convencionales no permitían un diagnóstico certero. Así mismo, el ensayo mostró ser muy efectivo en el diagnóstico de brucelosis en caninos.

También obtuvimos un AcM que permitió aislar y caracterizar una proteína de 18 kDa, más tarde identificada como lumazina sintetasa (BLS), que pudo emplearse en diagnóstico y otros estudios básicos y aplicados. Ese descubrimiento, fue la base para el desarrollo de distintos tipos de inmunógenos vacunales, incluyendo proteínas recombinantes multiméricas (partículas tipo virus), proteínas quiméricas e inmunógenos a DNA, que han mostrado ser protectoras contra la infección brucelar tanto en modelos experimentales como aplicados a campo. En particular, la proteína quimérica entre BLS y una porción de OMP31, cuya capacidad antigénica relevante habíamos podido establecer previamente, permitió desarrollar una vacuna que mostró ser efectiva en un ensayo a campo realizado con ovejas.

En la Universidad de La Plata, nos dedicamos a producir y caracterizar anticuerpos monoclonales destinados al estudio de reacciones de hipersensibilidad y alergia (especialmente a leche de vaca), y de intolerancias al gluten (enfermedad Celíaca), así como al estudio de enfermedades lisosomales. En todos estos casos, empleamos diversos AcMs para el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico y aplicación a estudios de la inmunopatogenia de estas afecciones (Figura 4).

Brevemente, obtuvimos AcM con los que desarrollamos sistemas de diagnóstico de alergia a leche de vaca con los que colaboramos en trabajos de extensión con diversos hospitales e

Brucelosis

Diagnóstico

ANTIGENOS CARATERIZADOS

Proteínas citoplasmáticas totales - CP
Proteína citoplasmática 18 kD - BLS
Proteína citoplasmática 24 kD - BRRF
Proteína de membrana 31 kD - OMP31

VACUNAS

Proteínas recombinantes

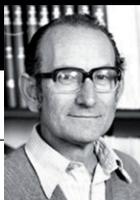
Péptidos sintéticos

Vacunas a DNA

Vacunas a vectores vivos

Partículas tipo virus

Figura 3



**Aplicaciones en nuestros laboratorios
LISIN - Cátedra de Inmunología
Facultad de Ciencias Exactas -(UNLP)**

**Estudios de intolerancias
Alimentarias**

Alergia a leche de vaca

Enfermedad Celíaca

Inmunidad de mucosas

Enfermedad de Fabry

**Desarrollo de
Métodos de diagnóstico**

**Caracterización, Identificación
y Purificación de componentes
Biológicos**

Estudios Básicos

**Trabajos de extensión
universitaria**

Servicios

muestra intolerancia a la soja después de un tiempo de tratamiento sustitutivo. En este terreno y en colaboración con otros grupos especializados en ingeniería genética y modelado molecular, se ha logrado identificar epitopes de reactividad cruzada entre estos componentes.

En el estudio de la intolerancia al gluten, los ensayos realizados en nuestro laboratorio nos han permitido desarrollar métodos de alta sensibilidad y especificidad para la detección de proteínas de gluten en alimentos destinados a enfermos Celíacos. Como se sabe, el único tratamiento disponible para esta enfermedad es evitar la ingestión de proteínas de gluten, por ello el aseguramiento de libre de TACC (Trigo, Avena, Cebada, Centeno), en alimentos para estos enfermos es esencial. Nuestros métodos han sido aceptados por los organismos de control y certificación de alimentos aptos para Celíacos y han sido transferidos a diversas reparticiones nacionales y provinciales para su libre empleo. Además, hemos derivado otros AcM que permitieron desarrollar eficientes sistemas para el diagnóstico de la enfermedad.

Figura 4

instituciones para diagnóstico en niños. Otros permitieron la caracterización de nuevos alérgenos de este alimento y también, demostrar la presencia de componentes de reactividad cruzada

entre leche bovina y leche de soja. Esto es particularmente importante puesto que la leche de soja es el sustituto más habitual de la leche bovina para chicos hipersensibles, los que con frecuencia

Principales Integrantes de los grupos de estudios

**IDEHU (CONICET-UBA)
Inmunogenética, Hptal Clínicas**

- Dr. Guillermo H. Giambartolomei
- Dr. Pablo C. Baldi
- Dr. Alejandro Velikovskiy
- Dra. Juliana Cassataro
- Dra. María V Delpino
- Dra. Karina Pasquevich
- Dra. Astrid Zwerdling
- Lic. Mariana Ferrero
- Dr. Moisés Spitz+

**Hospital Muñiz
Dr. Jorge Wallach**

**Instituto Leloir
- Dr Fernando A Goldbaum**

**UNICEN
- Dra. Silvia Estein
- Dr Raúl Bowden+**

**UNSAM
- Dr. Rodolfo Ugalde+
- Dr. Diego Comerci**

**Facultad Veterinaria UBA
Dra Magda Wanke**

**INTA Balcarce
Dr. Fernando Paolicchi**

LISIN - UNLP

- Dr. Fernando G Chirido
- Dr. Guillermo H. Docena
- Dr. Martín Rumbo
- Dra. Paula Rozenfeld

■ BIBLIOGRAFÍA

- I. Mathov, L. Plotkin, L. Squiquera, C.A. Fossati, R.A. Margni, J. Leoni. N-glycanase treatment of F(ab')₂ derived from asymmetric murine IgG3 mab determines the acquisition of precipitating activity. *Molecular Immunology* 1995;32:1123-1130.
- C. H. Carbonetto, E. L. Malchiodi, M. Chiamonte, E. D. de Isola, C. A. Fossati, R. A. Margni. Isolation of a *Trypanosoma cruzi* Antigen by Affinity Chromatography with a Monoclonal Antibody. Preliminary Evaluation of its Possible Applications in Serological Test. *Clinical and Experimental Immunology* 1990;82:93-96.
- "A lytic Monoclonal Antibody to *Trypanosoma cruzi* Bloodstream Trypomastigotes Which Recognizes an Epitope Expressed in Tissues Affected in Chagas' Disease". N.W. Zwirner, E.L. Malchiodi, M. Chiamonte, C.A. Fossati. *Infection and Immunity* 62, 2483-2489 (1994) pISSN: 0019-9567.
- Cremaschi G, Zwirner N.W, Gorelik G, Malchiodi E.L, Chiamonte M.G, Fossati C.A, Sterin Borda L. Modulation of cardiac physiology by an anti-*Trypanosoma cruzi* monoclonal antibody after interaction with myocardium. *FASEB Journal*, 1995;9:1482-1488.
- Graciela Cremaschi, Marisa M. Fernández, Gabriela Gorelik, Juan C. Goin, Carlos A. Fossati, Norberto W. Zwirner and Emilio L. Malchiodi. Modulatory effects on myocardial physiology induced by an anti-*Trypanosoma cruzi* monoclonal antibody involve recognition of major antigenic epitopes from α_1 -adrenergic and M2-muscarinic cholinergic receptors without requiring receptor cross-linking. *Journal of Neuroimmunology*. 2004;153:99-107.
- P. C. Baldi, M. M. Wanke, M. E. Loza, C. A. Fossati. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis". *Veterinary Microbiology* 1994;41:127-134.
- Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Velikovsky CA, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun*. 2005;73:8079-88.
- Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Velikovsky CA, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH, Goldbaum FA. A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine*. 2007;25:4437-46.
- Curciarello R, Lareu JF, Fossati CA, Doena GH, Petrucelli S. Immunochemical characterization of Glycine max L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1559-65.
- V.V. Doña, C. A. Fossati, F. G. Chirido. Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis. *Eur. Food Res. Technol*. 2008:591-602.



ad549



INSTITUTO LELOIR
FUNDACIÓN

CON TU AYUDA PODEMOS RESOLVERLO

Colaborá desde tu lugar con la Fundación Instituto Leloir para que investiguemos el cáncer, el Alzheimer, el dengue y el infarto, entre otras enfermedades. Sumate ahora con tu donación mensual de \$12 o más con tu tarjeta de crédito, para que juntos lleguemos a resolver problemas que nos afectan a todos. Ayudanos a que la ciencia argentina siga avanzando.

DONÁ
DESDE
\$12
X MES

www.leloir.org.ar
o al (011) 5238-7505