

Determinación de la constante de afinidad para anticuerpos monoclonales mediante un método inmunoenzimático empleando la tecnología SUMA.

Ileana Blanca Baluja Conde, Carmen Acosta Bas, Adys Irene Brito Moreno, Isis Amores Sánchez, Nimia Fanego Serrat*, Julio Ventura Paz, Pedro Lucio Pérez***..**

Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales. Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Ave. 25, Cubanacán, Playa, C. Habana, Cuba. * Laboratorio de Purificaciones. Centro de Inmunoensayo. ** Laboratorio de Hepatitis. Centro de Inmunoensayo. *** Laboratorio de Pesquiasaje Neonatal. Centro de Inmunoensayo. Teléfono: (537) 208 29 29 ext 313 Fax: (537) 208 65 14. e-mail: iqmonoclo1@cie.sld.cu

Recibido: 1 de junio de 2001

Aceptado: 24 de mayo de 2002

Palabras clave: constante de afinidad, anticuerpos monoclonales, inmunoenzimático, antígeno, sigmoides, SUMA.

Key words: affinity of constant, monoclonal antibodies, immunoenzymatic, antigen, sigmoids, SUMA.

RESUMEN: Se determinó la constante de afinidad (Kaf) de seis anticuerpos monoclonales: anti β -GCH (4G1-C5); anti T4 (F8-B9); anti IgE (IgE1 e IgE2); anti HBsAg (Hep-1, 3F1-F3) con el empleo de un método inmunoenzimático adaptado para el sistema ultramicroanalítico (SUMA). Este método emplea placas de reacción de poliestireno con pocillos que requieren de volúmenes muy pequeños, tanto de muestra como de reactivos, del orden de 10 μ L y conjugados enzimáticos cuyos sustratos fluorogénicos posibilitan incrementar la sensibilidad de las mediciones. La lectura, procesamiento y almacenamiento de los resultados se realizan automáticamente en un tiempo breve. Las placas de ultramicroELISA sensibilizadas con varias concentraciones de cada antígeno se incubaron con el anticuerpo monoclonal correspondiente, con la adición posterior de conjugado anti-IgG murina/Fosfatasa Alcalina y se reveló la reacción con un sustrato fluorogénico (4-metilumbeliferilfosfato). La concentración que corresponde al 50 % de la fluorescencia en cada una de las curvas sigmoides obtenidas para cada anticuerpo se empleó para el cálculo de la Kaf según la fórmula:

$$Kaf = (n-1)/2 (n[Ab']t - [Ab]t) \quad \text{donde: } n = [Ag]t/[Ag']t.$$

Los resultados obtenidos demostraron que los seis anticuerpos monoclonales ensayados tienen una alta afinidad por sus ligandos con valores que oscilaron entre 10^8 y 10^9 L/mol. Este método es rápido, reproducible y de fácil ejecución y manipulación.

ABSTRACT: Affinity constant of six monoclonal antibodies was determined: anti β -hCG (4G1-C5), anti T4 (F8-B9), anti IgE (IgE1 and IgE2), anti HBsAg (Hep-1 and 3F1-F3) using an immunoenzymatic method adapted to ultramicroanalytical system (SUMA). UltramicroELISA plates sensitized with several concentrations of each antigen, were incubated with the corresponding monoclonal antibody. Conjugate anti-IgG murine/ Alkaline Phosphatase was added and the reaction was revealed with a fluorogenic substrate (4-methylumbelliferylphosphate). The concen-

tration that corresponds to the 50 % of fluorescence in each of the sigmoid curves obtained for each antibody, was used to calculate Kaf, according to the formula:

$$Kaf = (n-1)/2 (n[Ab']t - [Ab]t) \\ \text{where: } n = [Ag]t/[Ag']t.$$

Results showed that the six monoclonal antibodies assayed have present high affinity because their ligands oscillated between 10^8 y 10^9 L/mol. This method is quick, reproducible and it is easy to automate and develop.

INTRODUCCIÓN

En la pasada década, se incrementó el uso del concepto de afinidad de un anticuerpo por su ligando en el análisis de los fenómenos inmunológicos. Aparejado a esto se analizaron a los factores que influyen en la afinidad de los anticuerpos, particularmente la diversidad, la regulación de la respuesta humoral, la multivalencia y otras propiedades relacionadas.¹⁻³

Desde

Las primeras discusiones sobre la afinidad de los anticuerpos por sus ligandos, se le dio mayor énfasis a

a la naturaleza y significación cuantitativa de las fuerzas moleculares que involucran aspectos termodinámicos en la reacción reversible antígeno-anticuerpo. Las fuerzas que estabilizan esta unión son no covalentes y están determinadas por la naturaleza química del solvente, entre ellas se encuentran: uniones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y fuerzas de dispersión de London.^{1,2,4}

La determinación de la constante de afinidad (Kaf) se puede realizar por diferentes métodos que incluyen, el equilibrio de diálisis, la electroforesis capilar y la emisión de quenching de fluorescencia y más recientemente los ensayos inmunoenzimáticos, la resonancia y los biosensores ópticos.⁵⁻¹⁰

La ley de acción de masas provee las bases para el cálculo de la Kaf de un anticuerpo en ensayos en fase sólida, y un gran número de ecuaciones matemáticas se han desarrollado para facilitar los cálculos experimentales de la Kaf en la interacción antígeno-anticuerpo. Las más empleadas son las descritas por Scatchard (1949) y Erp y colaboradores (1991).^{11,12}

En 1987 Beatty y colaboradores desarrollaron un método para la determinación de la Kaf empleando un ensayo inmunoenzimático no competitivo, basado en la concentración de anticuerpo que corresponde al 50 % de la densidad óptica en las curvas sigmoides que son obtenidas en el inmunoensayo.¹³

En este trabajo presentamos los resultados de la aplicación de este método a un ensayo inmunoenzimático empleando la tecnología SUMA para la determinación de la Kaf a seis anticuerpos monoclonales (AcM), tres de los cuales fueron obtenidos y producidos en nuestro laboratorio (AcM FIV-hCG/4G1-C5(2), FII-HBsAg/3F1-F3(2), FII-T4/F8-B9(2)) y los restantes (AcM hep-1, anti IgE1 y anti IgE2) se obtuvieron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

MATERIALES Y METODOS

La determinación de la constante de afinidad (Kaf) se realizó median-

te una modificación del método descrito por Beatty para ser empleado en el sistema ultramicroanalítico (SUMA).¹³

Fase sólida

Las placas de ultramicroELISA fueron sensibilizadas empleando los siguientes antígenos:

- Gonadotropina coriónica humana (GCH) a cuatro concentraciones diferentes: 10; 5; 2,5 y 1,25 UI/mL para el AcM anti β -GCH.
- Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg natural) a las concentraciones de 200, 100, 50 y 25 ng/mL para los dos AcM anti HBsAg.
- Anticuerpo policlonal anti IgE a 10 μ g/mL y posteriormente se sensibilizaron las placas con el estándar de IgE a las concentraciones de 200, 100, 50 y 25 UI/mL para los monoclonales anti IgE humana.
- Tiroxina (t_4) acoplada a ovoalbúmina a cuatro concentraciones diferentes 1; 0,5; 0,25 y 0,125 ng/mL para el AcM anti- t_4 .

Anticuerpos Monoclonales

La estandarización de este método se realizó con el anticuerpo monoclonal anti β -GCH obtenido y producido en nuestro laboratorio denominado FIV-hCG/4G1-C5(2), posteriormente se emplearon dos AcM con la misma especificidad (anti HBsAg); el Hep-1 (obtenido en el CIGB) y el FI-HBsAg/3F1-F3(2) producido en el Centro de Inmunoensayo (CIE).

También se utilizaron los anticuerpos anti IgE humana (IgE1 e IgE2) obtenidos en el CIGB y el AcM anti- t_4 (FII-T4/F8-B9(2)) producido en el CIE.

Se utilizaron diluciones seriadas de cada anticuerpo monoclonal que oscilaron desde 32 hasta 0,0391 μ g/mL.

Conjugado

Se utilizó un conjugado de anticuerpos IgG de carnero anti-IgG (total) de ratón purificados por afinidad y conjugados a la enzima fosfatasa alcalina, producido en el Laboratorio de Purificaciones del CIE.

Procedimiento del ensayo

Se realizó en placas de ultramicroELISA, con un volumen de reacción de 10 μ L. La dilución de los antígenos se realizó en disolución carbonato-hidrogenocarbonato de sodio 0,2 mol/L pH 9,6 y se incubaron las placas sensibilizadas 18 h a 4 °C para GCH y t_4 y a temperatura ambiente para el HBsAg.

En el caso de la evaluación de los anticuerpos anti IgE se empleó un ensayo de captura del antígeno (IgE humana); sensibilizando las placas con anticuerpo policlonal anti IgE a 10 μ g/mL en disolución carbonato-hidrogenocarbonato 0,2 mol/L pH 9,6 durante 18 h a 37 °C y posteriormente se adicionó el estándar de IgE a las concentraciones anteriormente mencionadas.

Posterior a la incubación del recubrimiento se realizó el lavado de las placas empleando el lavador de la Serie MAS 301 ajustado a un ciclo de lavado con la disolución salina-fosfato de sodio 0,01 mol/L; pH 7,2. Las diluciones de los anticuerpos en evaluación se realizó con la disolución salina-fosfato de sodio 30 min. antes de ser aplicada en la placa de reacción. Una vez aplicada las diluciones de los anticuerpos, las placas fueron incubadas durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda; posterior a la incubación se realizaron 4 ciclos de lavado con disolución tris-HCL 0,5 mol/L pH 8,0; para eliminar los componentes no fijados.

La dilución del conjugado empleada para los AcM anti IgE fue de 1:000 (0,17 μ g/mL), para los anticuerpos producidos en nuestro centro fue de 1:5000 (0,2 μ g/mL) y 1:2000 (0,5 μ g/mL) para el anticuerpo monoclonal Hep-1. La incubación del conjugado se realizó en cámara húmeda durante 1 h a 37 °C y el lavado de las placas se realizó según el procedimiento descrito en la etapa anterior. El sustrato fluorogénico empleado para el revelado de la reacción fue el 4-metilumbeliferilfosfato y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente.

La lectura de los valores de fluorescencia se realizaron en el lec-

tor PR-421 de la Serie SUMA utilizando el programa fotómetro.

El ensayo se realizó durante tres días consecutivos empleando tres réplicas y se determinó la Kaf según la formulación realizada por Beatty.¹³ La media de los valores de fluorescencia obtenidos se representaron en un eje de coordenadas en función del logaritmo de la concentración de anticuerpo para obtener una serie de curvas sigmoides.

La determinación de la Kaf se realizó a partir de la concentración

de anticuerpo correspondiente al 50 % de fluorescencia y se relacionó cada una de las curvas con la obtenida a la mayor concentración de antígeno. Para el cálculo se empleó la fórmula siguiente:

$$Kaf = (n-1)/2(n[Ab']t-[Ab]t)$$

donde: $n = [Ag]t/[Ag']t$

$[Ab]t$ = Concentración total de anticuerpo que corresponde al 50 % de fluorescencia en la curva con la mayor concentración de antígeno de recubrimiento.

$[Ab']t$ = Concentración total

de anticuerpo que corresponde al 50 % de fluorescencia en la curva que se compara.

RESULTADOS Y DISCUSION

La concentración de antígeno y anticuerpo fueron las adecuadas ya que a las mismas se obtuvieron sigmoides bien definidas como puede observarse en las figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Los resultados obtenidos para cada anticuerpo, demuestran la reproducibilidad de este método.

Fig. 1 Constante de Afinidad AcM Anti - β GCH (FIV-hCG/4G1-C5(2)).

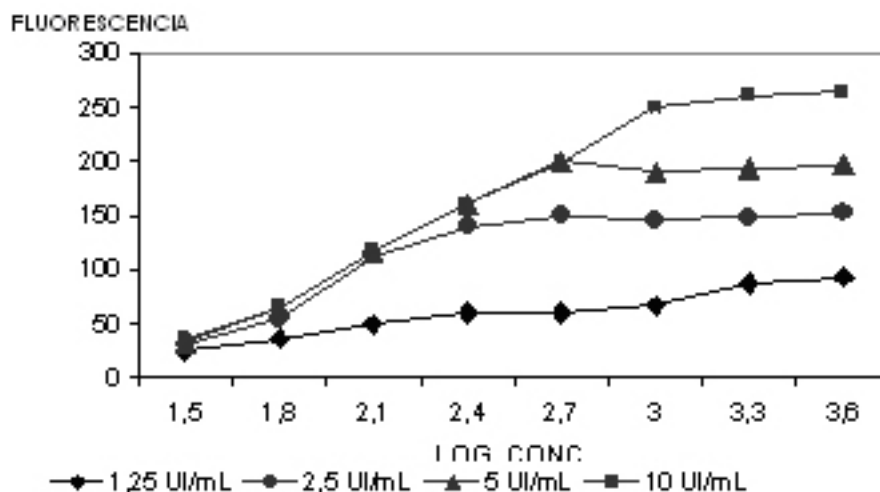


Fig. 2. Constante de Afinidad AcM anti HBsAg (Hep-1).

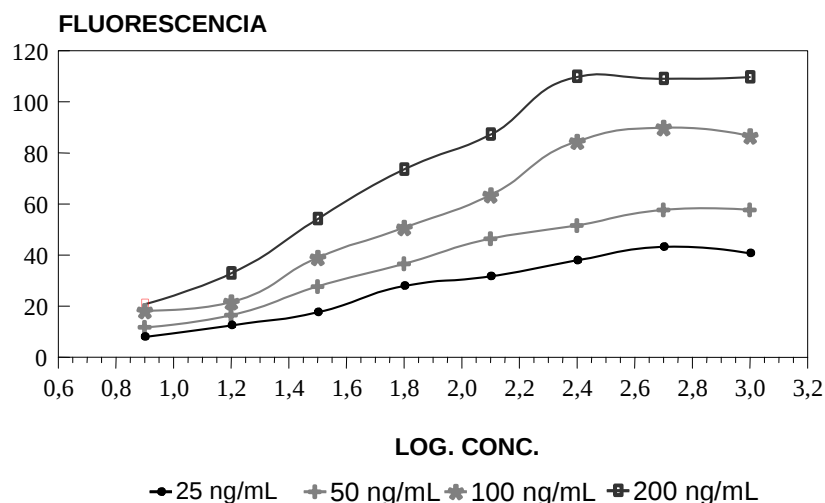


Fig. 3. Constante de Afinidad AcM Anti HBsAg (FII-HBsAg/3F1-F3(2)).

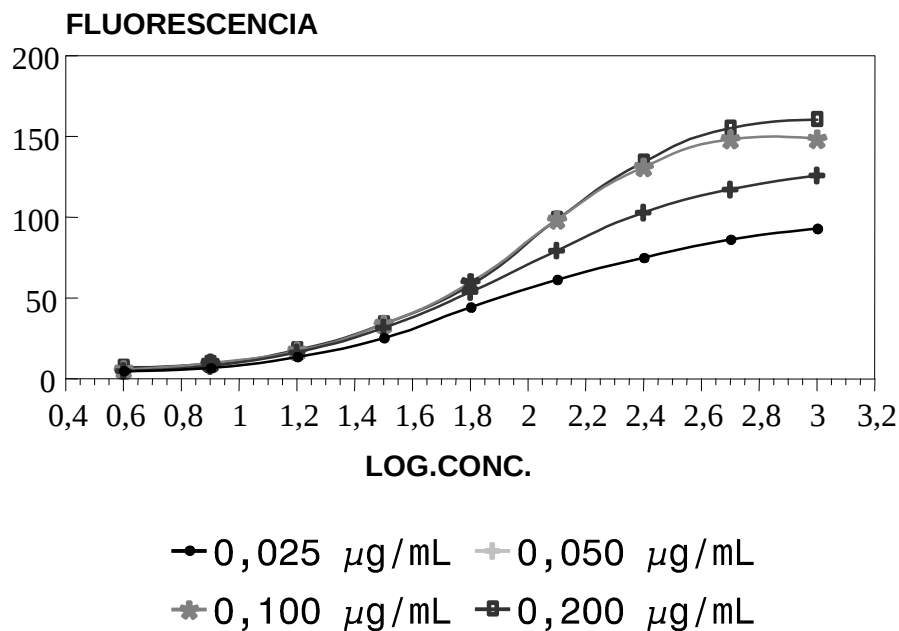


Fig. 4. Constante de Afinidad AcM Anti IgE (IgE1).

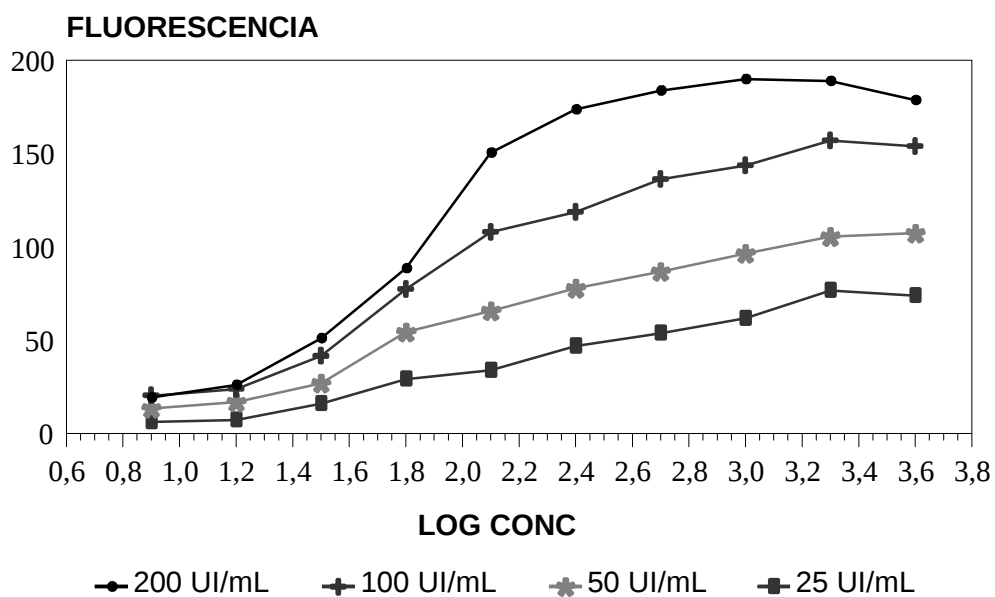


Fig. 5. Constante de Afinidad AcM anti IgE (IgE2).

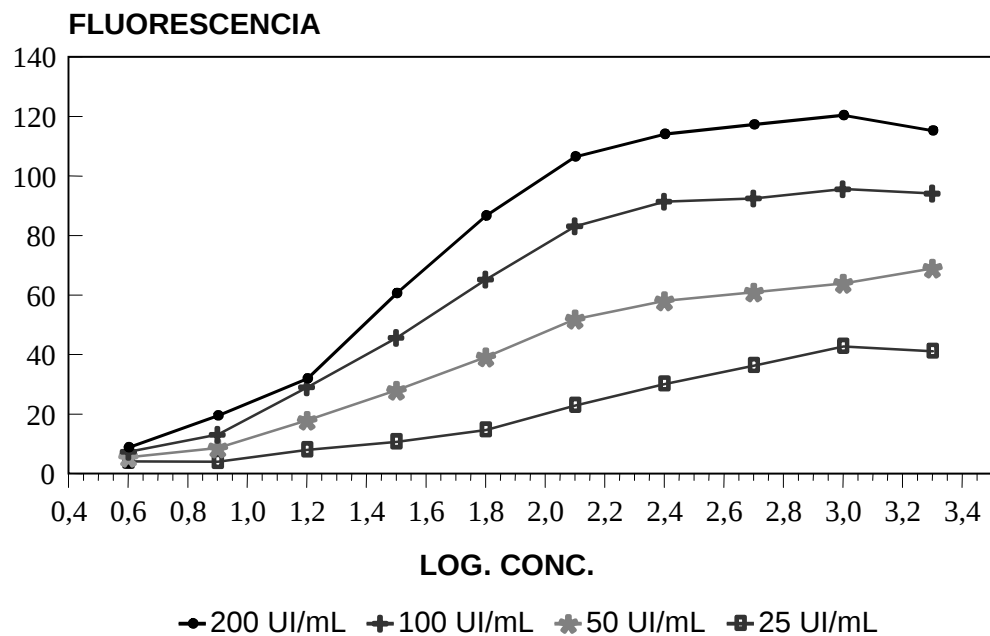
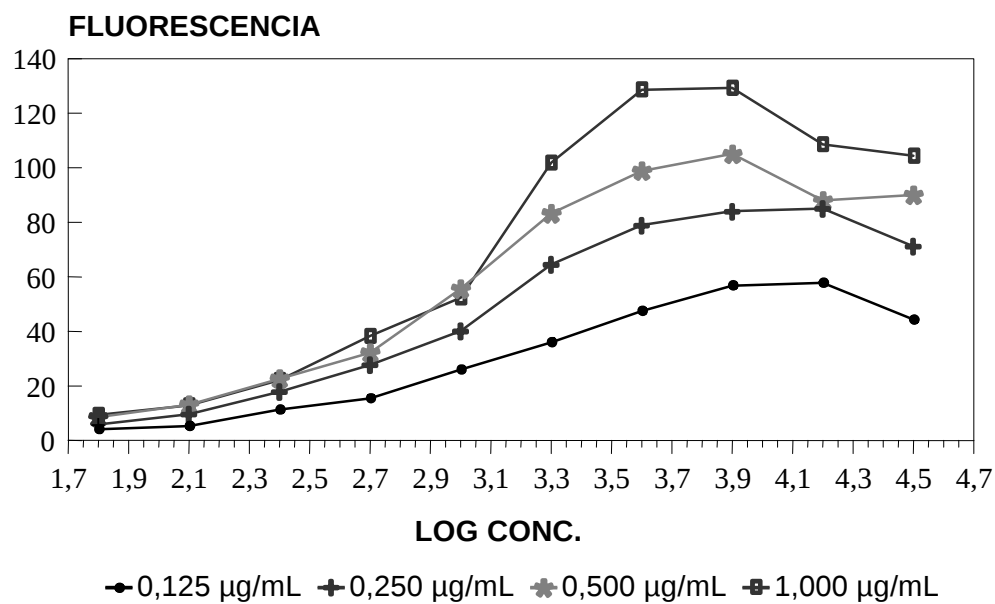


Fig. 6. Constante de Afinidad AcM Anti T4 (FII-T4/F8-B9(2)).



En la tabla I se muestra los resultados de la Kaf promedio, obtenida en cada uno de los tres ensayos consecutivos correspondientes a cada anticuerpo monoclonal. Estos resultados permiten

afirmar que los anticuerpos monoclonales ensayados presentan una alta afinidad de unión a su ligando, ya que está reportado que valores de Kaf que oscilen entre 10^8 y 10^{10} L/M son de anticuerpos

que presentan una alta afinidad y valores entre 10^{11} y 10^{14} son anticuerpos de muy alta afinidad de unión a su ligando.^{7,8,10,14}

Tabla I. Valores de la Kaf de los AcM ensayados por ultramicroELISA.

Anticuerpos Monoclonales (AcM)	FIV-hCG/4G1-C5(2)	Anti-HBsAg (Hep-1)	FII-HBsAg/3F1-F3(2)	Anti-IgE (IgE1)	Anti-IgE (IgE2)	FII-T4/F8-B9(2)
Constante de Afinidad (Kaf)	$1.96 \pm 0.46 \times 10^9$ L/M	$4.33 \pm 0.88 \times 10^9$ L/M	$1.70 \pm 0.13 \times 10^8$ L/M	$1.99 \pm 0.76 \times 10^9$ L/M	$2.80 \pm 0.41 \times 10^9$ L/M	$1.66 \pm 0.32 \times 10^8$ L/M

El valor de Kaf obtenido por nuestro ensayo para el AcM Hep-1 fue corroborado por un ensayo similar realizado en el CIGB donde se obtuvo una Kaf de $3,5 \times 10^9$ L/M por lo que podemos afirmar que el ensayo adaptado por nosotros presenta similares resultados que los obtenidos por MICROELISA.

Los resultados satisfactorios preliminares obtenidos en la fase de ajuste y validación por el Laboratorio de Hepatitis del CIE para el empleo del monoclonal FI-HBsAg/3F1-F3(2) en el estuche diagnóstico UMELISA HBsAg se explican en parte por el valor de la Kaf de este anticuerpo.

El monoclonal anti β -GCH ya se utiliza en el estuche diagnóstico UMELISA hCG (Reg. N° D9501-01).

Los anticuerpos anti IgE se emplean en el estuche UMELISA IgE que se encuentra en fase de registro. La constante de afinidad ha sido medida por diferentes métodos incluyendo resonancia, radioinmunoensayos competitivos y mediante ensayos inmunoenzimáticos competitivos,^{7,15-17} los cuales utilizan la relación de antígeno libre con la interacción antígeno-anticuerpo en la fase soluble, pero estos métodos son más costosos y de mayor tiempo de duración.

El método empleado tiene como principio la Ley de Acción de Masas y presenta las características de ser rápido, tener bajo costo, fácil ejecución y automatización por lo que puede aplicarse en una amplia gama de inmunoensayos.¹⁸

Lo referido anteriormente unido a la disponibilidad de la tecnología SUMA en todas las provincias del país facilita la utilización de este método para el cálculo de la Kaf en los diferentes laboratorios productores de anticuerpos monoclonales, contribuyendo a una caracterización más completa de los anticuerpos monoclonales producidos en estas instituciones.

BIBLIOGRAFIA

1. Glaser R. Affinity in solution of antigen-antibody complexes. **Analytical Biochemistry**, **213**, 152-161, 1993.
2. Morton T., Myszkowski D. and Chaiken I. Binding constants. **Analytical Biochemistry**, **227**, 176-185, 1995.
3. Nieba L., Krebber A. and Pluckthun A. Competition BIACORE for measuring true affinities: Large differences from values determined from binding kinetics. **Analytical Biochemistry**, **234**, 155-165, 1996.
4. Litman, G. Immunoglobulins. Plenum Publishing Corporation, 1978.
5. Zhou C., Xu L., Jiang M. and Zhen Y. A monoclonal antibody directed against an enediyne antitumor antibiotic and its preliminary application. **Yao Xue Xue Bao**, **32**, 28-32, 1997.
6. Hefta L., Neumaier M. and Shively J. Kinetic and affinity constants of epitope specific anti-carcinoembryonic antigen (CEA) monoclonal antibodies

for CEA and engineered CEA domain constructs. **Immunotechnology**, **4**, 49-57, 1998.

7. Englebienne P. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. **Analyst**, **123**, 1599-603, 1998.
8. Chiem N. and Harrison D. Monoclonal antibody binding affinity determined by microchip-based capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, **19**, 3040-4, 1998.
9. Ricoux R, Chazaud B, Tresca JP, Pontet M. Quality control of coated antibodies: new, rapid determination of binding affinity. **Clin Chem Lab Med**, **38**, 239-43, 2000.
10. Novo C., Domingos A. and Karmali A. Purification and characterization of monoclonal antibodies against the free alpha-subunit of human chorionic gonadotrophin. **Mol Biotechnol**, **17**, 119-28, 2001.
11. Scatchard G. The attraction of proteins to small molecules and ions. **Ann NY Acad Sci**, **51**, 660, 1949.
12. Erp R., Gribnau T., Sommeren A. and Bloemers H. Affinity of monoclonal antibodies. Interpretation of the positive cooperative nature of anti-hCG / hCG interactions. **J Immunol Meth**, **140**, 235, 1991.
13. Beatty J., Beatty G. and Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-

- competitive enzyme immunoassay. **J Immunol Meth**, **100**, 173-179, 1987.
14. Beatty J., Beatty G., Vlahos W. And Hill A. Method of analysis of non-competitive enzyme immunoassays for antibody quantification. **J Immunol Meth**, **100**, 161-172, 1987.
15. Steward M. and Steensgaard J. Antibody affinity: thermodynamic aspects and biological significance. CRC press, Boca Ratón, FL, 1983.
16. Steward M. And Lew, A. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. **J Immunol Meth**, **78**, 173-190, 1985.
17. Friguet B., Chaffote A., Djauadi-Ohanian L. and Goldberg M. Measurement of the true affinity constants in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. **J Immunol Meth**, **77**, 305, 1985.
18. Waldmann A. Monoclonal antibodies to progesterone: characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk. **Hybridoma**, **18**, 289-96, 1999.



“R-tester” es un grupo radicado en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC) que le brinda servicios especializados en protección contra la corrosión con el fin de elevar la durabilidad, confiabilidad y tiempo de vida útil de todo tipo de materiales metálicos y no metálicos, recubrimientos protectores, equipos, accesorios y otros, que serán utilizados en instalaciones construidas en Cuba. Además de prestar asesoramiento técnico y dar certificación de calidad de los productos.

La fortaleza de “R-tester” es su personal altamente calificado y la experiencia acumulada durante más de 30 años de investigaciones y de estudios constantes para caracterizar el comportamiento corrosivo de materiales y diagnosticar su durabilidad en nuestras condiciones climáticas. Son los creadores del “**Mapa de la Agresividad Corrosiva de la Atmósfera de Cuba**”

“R-tester” oferta servicios especializados en:

- Evaluación y caracterización de la agresividad corrosiva de la atmósfera.
- Pronósticos del comportamiento corrosivo de materiales, instalaciones, piezas, artículos constructivos y otros.
- Ensayos acelerados en cámaras.
- Selección de materiales óptimos resistentes a la corrosión en el ambiente de Cuba.
- Asesoría técnica y consultoría especializada.
- Ensayos mediante técnicas electroquímicas de avanzada seguras y rápidas.
- Evaluación y certificación de materiales metálicos y polímeros.
- Evaluación de la calidad del aire para la obtención de licencia ambiental.

En la realización de los servicios se utilizan normas y metodologías cubanas e internacionales así como procedimientos especiales desarrollados por el grupo.



Centro Nacional de investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

