

Actividad anti-rhGM-CSF en suero humano normal

Oggero Eberhardt, Marcos; Kratje, Ricardo; Etcheverrigaray, Marina

Laboratorio de Cultivos Celulares.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. C.C 242 - S3000 ZAA Santa Fe - Santa Fe - ARGENTINA. Tel.: (0342)-457 5214. E-mail: moggero@fbc.unl.edu.ar.

RESUMEN: Se identificó la presencia de anticuerpos anti-rhGM-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos humano recombinante) en un lote de sueros de individuos normales destinado a la obtención de preparaciones farmacéuticas de inmunoglobulinas humanas. Estos anticuerpos bloquearon parcialmente ($35 \pm 2\%$; $n=3$) la interacción entre el receptor de hGM-CSF presente en células TF-1 y la citoquina radiiodada. Ensayos de competición en fase sólida entre dichos anticuerpos y un panel de anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-rhGM-CSF caracterizados previamente, permitieron establecer que las inmunoglobulinas humanas compiten con MAbs neutralizantes de la actividad biológica de la citoquina, los que reconocen los epítopes A18E21R23R24F119, R24E21N17W13, P118F119W13E14 y L61YKQGLRGLTK72, sugiriendo su capacidad neutralizante. Finalmente, se demostró que los anticuerpos humanos interactúan no sólo con la citoquina producida en bacterias sino también con su versión glicosilada, obtenida a partir de cultivos de células de mamífero.

Las características descritas de tales anticuerpos indican la probable capacidad para neutralizar la actividad biológica *in vivo* de las formulaciones recombinantes de la citoquina, siendo necesario establecer la correlación con el éxito o fracaso terapéutico del tratamiento con rhGM-CSF en individuos portadores de autoanticuerpos naturales.

Palabras claves: rhGM-CSF, inmunoglobulinas humanas, autoanticuerpos naturales, anti-GM-CSF, anticuerpos monoclonales.

SUMMARY: Anti-rhGM-CSF activity in normal human sera. Oggero Eberhardt, Marcos; Kratje, Ricardo; Etcheverrigaray, Marina. The occurrence of anti-rhGM-CSF (recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) antibodies was identified in a pool of normal sera used for the manufacture of human immunoglobulin preparations for pharmaceutical applications. These antibodies partially blocked ($35 \pm 2\%$; $n=3$) the interaction between the TF-1 cell receptor and the radiiodinated rhGM-CSF. The solid phase competition assays among these antibodies and a previously characterised panel of anti-rhGM-CSF monoclonal antibodies (MAbs) allowed us to establish that human immunoglobulins compete with MAbs that neutralise the cytokine biological activity, suggesting their neutralising activity. These MAbs recognise A18E21R23R24F119, R24E21N17W13, P118F119W13E14 and L61YKQGLRGLTK72 epitopes. Finally, it has been evidenced that the human antibodies interact with the glycosylated and non-glycosylated version of the cytokine.

The described features of these antibodies indicate their putative ability to neutralise the *in vivo* biological activity of recombinant cytokine preparations, though it is still necessary to study the possible correlation with the success or failure of the therapeutic treatment with rhGM-CSF in patients with natural autoantibodies.

Key words: rhGM-CSF, human immunoglobulins, natural autoantibodies, anti-GM-CSF, monoclonal antibodies.

Introducción

En la actualidad, los autoanticuerpos naturales (NAAbs) son considerados como anticuerpos naturalmente presentes en individuos normales cuya reactividad se manifiesta contra una variedad de antígenos propios, además de los componentes intracelulares clásicos. La presencia de autorreactividad natural fue encontrada no sólo en inmunoglobulinas de isotipo IgM, sino también en variedades isotípicas IgG e IgA (1-3). La presencia de los mismos se ha detectado en sangre de cordón umbilical y en ratones no expuestos al contacto con antígenos, lo que avala la existencia de un repertorio de regio-

nes variables seleccionadas por estructuras antigénicas presentes en el propio organismo que permanecen conservadas durante el desarrollo de la vida (4). Estas observaciones dan sustento a la teoría que establece la participación de los NAAbs como una manifestación de autorreactividad fisiológica expresada en individuos sanos, representando una respuesta normal hacia antígenos propios (5). Diferentes son los roles biológicos asignados a los NAAbs, entre ellos, la remoción de moléculas propias alteradas, células o tumores (6) así como la participación en las defensas naturales contra agentes infecciosos (7, 8). Evidencias adicionales indicarían una participación preponderante de los NAAbs

en la regulación de la respuesta inmune. El hallazgo de que los NAAbs interaccionan con moléculas biológicamente activas, tales como citoquinas (9, 10) o sus receptores, establece la posibilidad de que los NAAbs circulantes participen en su transporte, incrementen su permanencia en circulación (disminuyendo su depuración sanguínea) y modulen su actividad funcional. Asimismo, cumplirían un papel fundamental en el transporte y presentación de antígenos para la estimulación de células T (11). Además, los NAAbs han demostrado su potencial terapéutico sobre una variedad de enfermedades autoinmunes. La terapia con gammaglobulina intravenosa, en la que se ha verificado la presencia de NAAbs, ha demostrado eficacia en el tratamiento de enfermedades tales como Púrpura Trombocitopénica Idiopática, Dermatomiositis, Tiroiditis de Hashimoto, Hemofilia, Miastenia Gravis y Polimiositis, entre otras (12).

De esta manera, los NAAbs reaccionan con una variedad de mediadores (citoquinas, hormonas, factores de coagulación, etc.) y sus receptores, constituyendo un sistema homeostático general que regularía cambios rápidos en la concentración de mensajeros y moléculas biológicamente activas (13).

Durante los últimos años, se han incrementado las evidencias que demuestran la presencia de anticuerpos anti-citoquinas en pacientes con desórdenes inflamatorios, pacientes con enfermedades de naturaleza autoinmune, pacientes tratados terapéuticamente con citoquinas recombinantes e incluso en suero de individuos normales o preparaciones farmacéuticas de inmunoglobulinas humanas. Se ha verificado la existencia de tales anticuerpos en individuos tratados con IL-2, IFN- γ , GM-CSF y G-CSF (14, 15). Por otro lado, anticuerpos anti-IFNs han sido reportados en pacientes con diversos desórdenes autoinmunes o enfermedades virales (16,17), anticuerpos anti-IL-1 α , anti-IL-6, anti-IL-10 y anti-TNF- α en pacientes con desórdenes inmunoinflamatorios (3,18-20) y anticuerpos anti-GM-CSF en individuos con patologías de naturaleza autoinmune (21). También fueron detectados autoanticuerpos naturales en individuos normales o en preparaciones farmacéuticas de inmunoglobulinas humanas destinadas a uso terapéutico, reportándose la presencia de autoanticuerpos con especificidad hacia diferentes citoquinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α y GM-CSF (3, 10, 15, 20, 22-24).

Teniendo en cuenta el creciente auge del uso terapéutico de proteínas recombinantes, surge la necesidad de evaluar sus efectos potencialmente tóxicos o nocivos sobre la salud humana, así como la posibilidad de ser neutralizadas por anticuerpos anti-citoquinas inducidos durante el tratamiento o naturalmente presentes, por el hecho de que todas, aún las formas glicosiladas, sólo son similares a las producidas en forma natural. En este trabajo analizamos la existencia de anticuerpos anti-hGM-CSF en sueros de individuos normales y en un lote de sueros destinados a la producción de preparaciones farmacéuticas de inmunoglobulinas humanas de uso terapéutico. Se evaluó además, la habilidad de los autoanticuerpos naturales para inhibir la interacción de rhGM-CSF con el sitio de unión a su receptor y se analizó la capacidad de los mismos para interaccionar con la molécula de rhGM-CSF glicosilada con el fin de evaluar el efecto de la glicosilación en la interacción. Finalmente, se describió mediante el empleo de un panel de MAbs anti-rhGM-CSF la especificidad de los autoanticuerpos, con el fin de predecir la eficacia del empleo terapéutico de esta citoquina recombinante en individuos portadores de tales anticuerpos.

Materiales y Métodos

Preparación de [125 I]rhGM-CSF

La marcación de rhGM-CSF no glicosilado (producido en *E. coli*) se llevó a cabo empleando el método de la cloramina-T, introducida por Hunter y Greenwood (25). Brevemente, 1 mCi de Na[125 I] diluido en solución de fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,5 fue adicionado a 4 μ g de la citoquina. Posteriormente se agregaron 0,2 μ g de cloramina T y la mezcla se homogeneizó suavemente durante 5 min. Se repitió el paso anterior agregando nuevamente 0,2 μ g de cloramina T e incubando durante otros 5 min. Finalmente, la reacción se inhibió agregando 50 μ g de metabisulfito de sodio. La citoquina marcada radiactivamente fue separada del Na[125 I] libre no reaccionante mediante cromatografía de exclusión molecular empleando Sephadex G-75 (Amersham Biosciences, Suecia). De esta manera, se obtuvo un trazador con una actividad específica de 10 μ Ci. μ g $^{-1}$, cuya calidad, desde el punto de vista de la conservación de su reactividad inmunológica, fue confirmada

mediante un ensayo de titulación frente a un suero de conejo anti-rhGM-CSF.

Detección de anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF en suero de individuos normales

Se investigó la presencia de anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF en un panel de sueros obtenido a partir de 60 individuos sanos de edades comprendidas entre 18 y 24 años junto con dos lotes de sueros preparados a partir de la combinación de sueros de donantes sanos. Un lote correspondió a la mezcla de sueros de 4.000 donantes sanos (Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba) y el otro correspondió a la mezcla de alícuotas idénticas de los sueros de los 60 individuos antes mencionados (lotes A y B, respectivamente). El criterio de selección de los sueros que conforman el lote A y el lote B es el mismo, es decir, cumplen con los requisitos establecidos en los bancos de donación de sangre. Empleando el método de unión de radioligando (RBA), una alícuota de 100 μ l de cada muestra de suero se incubó con 100 μ l de [¹²⁵I]rhGM-CSF con una actividad aparente de 5.000 cpm. Los tubos fueron homogeneizados por agitación e incubados durante 16 horas a una temperatura de 4°C. Al día siguiente, se agregaron 100 μ l de suero trivalente (anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM) de conejo anti-inmunoglobulinas humanas (Biocientífica S.A., Argentina). Los tubos se incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se precipitaron los inmunocomplejos con polietilenglicol 8.000 (Sigma, EE.UU.) al 10% (P/V). Los tubos se incubaron durante 1 hora a 4°C y luego los tubos fueron centrifugados durante 15 min. a 15.000 rpm y a 4°C en una centrifuga Eppendorf (modelo 5403, rotor 16F24-11, Hamburgo, Alemania). Finalmente, el sobrenadante fue eliminado por aspiración y la radiactividad del precipitado fue determinada en un contador para radiación de tipo γ (Triathler Multilabel Tester 425-004, Hidex, Turku, Finland).

Detección de anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF en lotes de inmunoglobulinas purificadas y concentradas

A partir de ambos lotes de sueros, se purificó la fracción de gammaglobulinas mediante fraccionamiento salino con sulfato de amonio al 33% (V/V) de saturación. El producto de la precipitación salina fue dializado contra solución salina de fosfatos

10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 y concentrado mediante ultrafiltración, empleando cartuchos filtrantes para microcentrifuga *Ultrafree MC* (Millipore, EE.UU.). La reactividad de las inmunoglobulinas parcialmente purificadas frente a rhGM-CSF fue evaluada mediante la técnica indicada para la detección de anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF en suero de individuos normales.

Inmunoprecipitación de rhGM-CSF por acción de las inmunoglobulinas humanas en presencia de proteína A

Se desarrolló un ensayo de inmunoprecipitación (IPP) de la citoquina por acción de las inmunoglobulinas humanas, parcialmente purificadas por precipitación salina, en presencia de proteína A-Sepharosa (Amersham Biosciences). En 3 tubos cónicos de 1,5 ml se agregaron: 700 μ l de medio de cultivo D-MEM (Gibco B.R.L., EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Bioser, Argentina) al 10%, 100 μ l de una solución 5 μ g.ml⁻¹ de rhGM-CSF no glicosilado y 200 μ l de la solución de inmunoprecipitación que contenía NaCl 150 mM, Tris 10 mM, Tween 20 (Sigma) 0,5% (V/V), dodecilsulfato de sodio (SDS; Sigma) 0,1% (P/V), EDTA 10 mg.ml⁻¹ (pH 7,5). Posteriormente, 20 μ l de inmunoglobulinas purificadas por precipitación salina a partir del lote de sueros A fue agregado a uno de los tubos, 5 μ l de suero hiperinmune de conejo anti-rhGM-CSF a otro tubo y 5 μ l de suero basal de conejo (inmunoglobulinas de especificidad irrelevante) al tubo restante. Finalmente se adicionaron 30 μ l de solución de proteína A-Sepharosa al 50% (V/V) a todos los tubos. Los tubos fueron incubados durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, el inmunocomplejo formado y ligado a proteína A fue separado de la citoquina libre por centrifugación durante 1 min. a 10.000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el precipitado lavado con solución IPP. Finalmente, la resina fue tratada con 50 μ l *buffer* de muestra para electroforesis en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol y hervida durante 5 min. en baño de agua. Luego de centrifugar cada tubo, el sobrenadante fue sometido a SDS-PAGE y posterior electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. La presencia de rhGM-CSF fue detectada empleando un MAb anti-rhGM-CSF (Laboratorio de Cultivos Celulares, Argentina) y anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con fosfatasa alcalina (BioRad, EE.UU.). La interacción fue revelada mediante reactivos quimioluminiscentes.

Inhibición de la interacción de [¹²⁵I]rhGM-CSF con el receptor presente en células TF-1

Se analizó la capacidad de las inmunoglobulinas humanas para inhibir la interacción de la citoquina radiyodada con el receptor de hGM-CSF presente en la línea celular TF-1 (ATCC CRL-2003), derivada de una eritroleucemia humana y cuya proliferación depende de la presencia de dicha citoquina. En tubos cónicos de 1,5 ml se adicionó alternativamente 100 µl de rhGM-CSF 50 µg.ml⁻¹, 100 µl de MAb anti-rhGM-CSF (M7E10) neutralizante de la actividad biológica de la citoquina (20 µg.ml⁻¹), 100 µl de inmunoglobulinas humanas anti-rhGM-CSF parcialmente purificadas a partir del lote A o a partir del lote B (20 mg.ml⁻¹). Posteriormente, se agregó a cada tubo 100 µl de [¹²⁵I]rhGM-CSF con una actividad aparente de 8.000 cpm. Los tubos fueron incubados durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, 100 µl de una suspensión de células TF-1 fue adicionada a cada tubo (3.10⁶ cél.) e incubados a 37°C durante 3 horas. Luego de la incubación, los tubos fueron enfriados a 4°C y la incubación celular fue lentamente dispensada sobre tubos cónicos de 1,5 ml que contenían 500 µl de SFB frío a punto de congelación. Los tubos fueron centrifugados a 10.000 rpm a 4°C durante 5 min. y la radiactividad del paquete celular fue leída en contador de pozo.

Inhibición competitiva de la interacción de [¹²⁵I]rhGM-CSF con un panel de MABs anti-rhGM-CSF en presencia de las inmunoglobulinas humanas

Una alícuota de 50 µl de inmunoglobulinas humanas parcialmente purificadas por precipitación salina (20 mg.ml⁻¹) fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente con 50 µl de [¹²⁵I]rhGM-CSF (10.000 cpm). Posteriormente, la mezcla fue transferida a microplacas de poliestireno (Falcon, EE.UU.) previamente sensibilizadas con diferentes MABs anti-rhGM-CSF (Laboratorio de Cultivos Celulares, Argentina). La placa fue incubada durante 2 horas a 37°C, midiéndose finalmente la radioactividad unida a la fase sólida en contador de pozo.

Evaluación de la capacidad de interacción de las inmunoglobulinas humanas con rhGM-CSF no glicosilado y glicosilado

Se llevó a cabo un radioinmunoensayo en fase líquida, incubando 50 µl de rhGM-CSF no glicosilado (Schering Plough, Argentina) o glicosilado (Labora-

torio de Cultivos Celulares, Argentina). Se ensayaron diluciones sucesivas de las citoquinas desde 1 µg.ml⁻¹ hasta 1.10⁻⁶ µg.ml⁻¹. A cada tubo se adicionaron 30 µl de solución de las inmunoglobulinas humanas anti-rhGM-CSF parcialmente purificadas por precipitación salina, incubándose durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se agregaron 100 µl de [¹²⁵I]rhGM-CSF (5.000 cpm). Los tubos fueron incubados durante 2 horas a 37°C. Las restantes etapas fueron desarrolladas siguiendo esencialmente la metodología indicada para la detección de anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF en suero de individuos normales.

Resultados y Discusión

Detección de anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF en suero de individuos normales

Se analizaron los sueros procedentes de 60 individuos normales y dos lotes de sueros obtenidos de la contribución de diferentes donantes sanos. El promedio de la unión porcentual específica del trazador al ensayar cada muestra y su desviación estándar (n=3) fueron graficados en un eje de ordenadas en función de cada muestra indicada en el eje de abscisas (Fig. 1). Se determinó el promedio de la unión porcentual específica del trazador (B%) en todas las muestras analizadas (n=62) y su desviación estándar. La existencia de anticuerpos específicos se consideró positiva en aquella muestra cuya unión porcentual superó el promedio calculado a partir de la unión porcentual específica del trazador en cada una de las muestras ensayadas (8,8 % más dos desviaciones estándar (10,8 %)). Este valor de corte fue similar al establecido por Gallay *et al.* en 1991 (22), quienes investigaron la presencia de anticuerpos naturales anti-IL-1β y anti-IL-1α en plasma humano normal mediante el método empleado en este trabajo.

En la Fig. 1 se observa que solamente el lote de sueros A mostró reactividad anti-rhGM-CSF. El valor promedio de la unión porcentual del trazador del lote A superó 1,8 veces al correspondiente valor de la media calculada a partir de la totalidad de las muestras. El lote B fue considerado no reactivo frente a [¹²⁵I]rhGM-CSF.

A partir del lote de sueros considerado positivo (lote A) y del lote de sueros sin reactividad detectable

anti-rhGM-CSF (lote B), las inmunoglobulinas totales fueron parcialmente purificadas por precipitación salina con sulfato de amonio. Posteriormente fueron concentradas por ultrafiltración hasta una concentración de 30 mg.ml⁻¹. El objeto de esta etapa fue confirmar la presencia de anticuerpos anti-rhGM-CSF en el lote A, incrementando la concentración de los mismos para posteriores experimentos y, asimismo, analizar si el lote de sueros B, considerado negativo, presentaba una concentración de anticuerpos anti-citoquina inferior al límite de detección del ensayo que impidiese, por consiguiente, su detección. Teniendo en cuenta que la concentración sérica de inmunoglobulinas humanas es de aproximadamente 10-12 mg.ml⁻¹, los procesos de purificación y concentración incrementaron 3 veces la concentración de las mismas. Sin embargo, sólo se observó incremento de la radioactividad precipitada en presencia de las inmunoglobulinas purificadas a partir del lote A de

sueros (Tabla 1). Evidentemente, el aumento de la concentración de los anticuerpos anti-rhGM-CSF fue responsable de la mayor señal radioactiva observada permitiendo, además, confirmar la ausencia de anticuerpos específicos en el lote B. Mediante estos experimentos se confirmó la presencia de actividad anti-rhGM-CSF en suero humano normal, correspondiéndose con trabajos previos que describieron la existencia de los mismos en preparaciones farmacéuticas de inmunoglobulinas humanas destinadas al uso terapéutico (24) o incluso en trabajos donde se estableció su presencia en suero humano normal empleando técnicas como ELISA o *Western Blot*. Estas últimas técnicas han sido utilizadas frecuentemente para la detección de los anticuerpos anti-citoquinas. Sin embargo, existen evidencias que indican que tales resultados deben acompañarse de controles rigurosos e incubaciones previas de las muestras para adsorber anticuerpos inespecíficos, de manera de obtener resultados confiables (26, 27).

Figura 1: Detección de anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF en suero de individuos normales. Muestras séricas de individuos normales (n=60) y dos lotes de sueros normales fueron analizados por triplicado mediante técnica de RBA empleando [¹²⁵I]rhGM-CSF. La radioactividad precipitada por cada muestra fue expresada como porcentaje (B %) de la radioactividad total agregada a cada tubo. El promedio de B % de cada muestra y su desviación estándar fueron graficados en el eje de ordenadas en función de cada muestra mostrada en el eje de abscisas. La línea central constituye el valor promedio de B % calculado a partir de todos los sueros analizados. Las líneas de puntos establecen los límites de confianza del valor promedio del ensayo, teniendo en cuenta la desviación estándar.

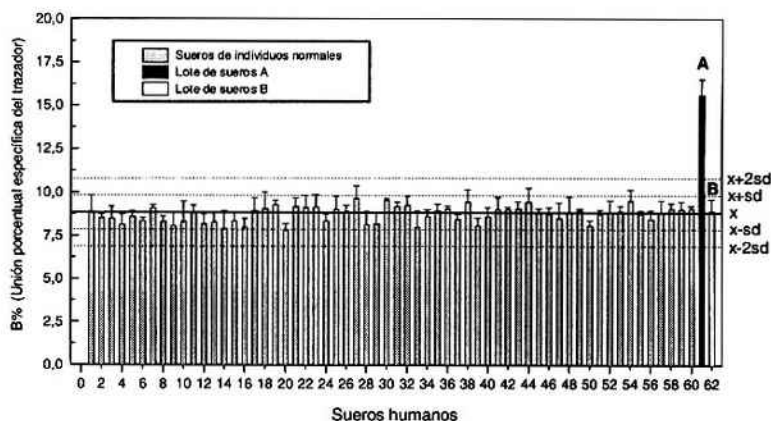


Tabla 1: Detección de anticuerpos anti-rhGM-CSF en los lotes de sueros A y B, antes y después de su purificación por precipitación salina y posterior concentración mediante ultrafiltración.

Lotes de Sueros		B % (unión porcentual del trazador)
Previa purificación	A	15,6 ± 0,9
	B	8,9 ± 0,7
Post-purificación	A	60,8 ± 0,7
	B	9,3 ± 0,3

Imunoprecipitación de rhGM-CSF por acción de las inmunoglobulinas humanas en presencia de proteína A

Con el fin de confirmar la identidad de las inmunoglobulinas humanas como proteínas séricas responsables de la interacción con rhGM-CSF, se desarrolló un ensayo de inmunoprecipitación de la citoquina por acción de las inmunoglobulinas humanas en presencia de proteína A-Sepharosa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 2 donde la presencia del rhGM-CSF precipitado por anticuerpos específicos de suero de conejo (carril 4) fue empleada como control positivo del ensayo. Por otro lado, no se visualizó interacción de naturaleza inespecífica entre la proteína A inmovilizada, las inmunoglobulinas de especificidad irrelevante y la citoquina. Finalmente, en el carril 3 de la membrana de nitrocelulosa se observó una banda de inmunoprecipitación del rhGM-CSF en presencia de las inmunoglobulinas humanas purificadas a partir del lote de sueros A. La identificación de rhGM-CSF sobre la membrana de nitrocelulosa permitió confirmar a los anticuerpos humanos como las proteínas presentes en el lote de sueros A con capacidad para interactuar con la citoquina. De esta manera fue posible descartar la presencia factores séricos de diferente naturaleza con habilidad para unir la citoquina en ensayos como el RBA. Asimismo, debido a la elevada afinidad y especificidad de la proteína A por la moléculas de IgG, sería posible establecer la probable naturaleza isotípica IgG de las inmunoglobulinas humanas capaces de interactuar con la citoquina.

Inhibición de la interacción de [¹²⁵I]rhGM-CSF con el receptor presente en células TF-1

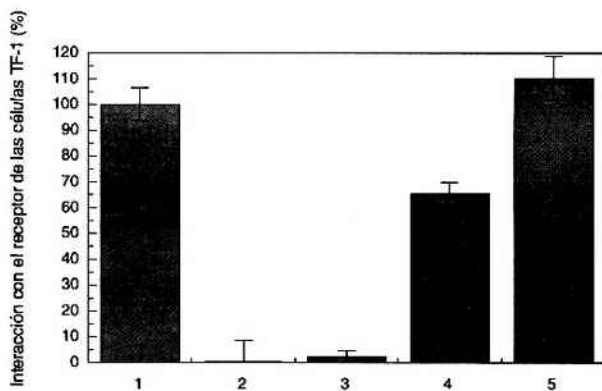
El presente estudio fue llevado a cabo con el objeto de evaluar la capacidad de las inmunoglobulinas humanas para bloquear la unión del rhGM-CSF con el receptor presente en las células TF-1 como medida indirecta de la probable capacidad neutralizante de la actividad biológica *in vitro* de la citoquina en presencia de tales anticuerpos. Los resultados mostrados en la Fig. 3 fueron expresados como porcentaje de interacción de la citoquina radiyodada con el receptor en presencia o ausencia de los restantes componentes analizados.

El lote de inmunoglobulinas con actividad anti-rhGM-CSF fue capaz de inhibir la interacción en un 35 ± 2% (n=3) diferenciándose del lote de anticuerpos considerado negativo, que demostró incapacidad absoluta para bloquear la asociación del trazador con el receptor de las células TF-1. La presencia de inmunoglobulinas humanas anti-rhGM-CSF disminuyó la interacción entre el receptor de las células TF-1 y la citoquina, indicando la habilidad de los anticuerpos para bloquear la unión de la hormona al receptor y estableciendo, a su vez, la probable capacidad neutralizante de la actividad biológica *in vitro* de la hormona. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Svenson y col. (24), que describieron la supresión de la interacción de [¹²⁵I]rhGM-CSF con el receptor presente en otra línea celular (HL-60) y PMN humanos en una manera dependiente de la dosis de inmunoglobulinas ensayadas.

Figura 2: Inmunoprecipitación de rhGM-CSF en presencia de proteína A-Sepharosa. La IPP de rhGM-CSF por acción de las inmunoglobulinas humanas en presencia de proteína A-Sepharosa fue analizada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. La presencia de rhGM-CSF fue detectada empleando un MAb anti-rhGM-CSF y anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con fosfatasa alcalina. Finalmente, la interacción fue revelada mediante reactivos quimioluminiscentes. *Carril 1*, rhGM-CSF sin inmunoprecipitar; *carril 2*, IPP de rhGM-CSF en presencia de inmunoglobulinas irrelevantes de conejo; *carril 3*, IPP de rhGM-CSF en presencia de inmunoglobulinas humanas purificadas a partir del lote de sueros A; *carril 4*, IPP de rhGM-CSF en presencia de suero de conejo anti-rhGM-CSF.



Figura 3: Interacción de $[^{125}\text{I}]$ rhGM-CSF con el receptor presente en células TF-1 en presencia de las inmunoglobulinas humanas purificadas. La interacción de $[^{125}\text{I}]$ rhGM-CSF con su receptor (1) fue evaluada en presencia de: (2) rhGM-CSF no radioactivo ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); (3) MAb anti-rhGM-CSF (M7E10) neutralizante de la actividad biológica, (4) inmunoglobulinas humanas purificadas a partir del lote A y (5) del lote B.



Inhibición competitiva de la interacción de [¹²⁵I]rhGM-CSF con un panel de MAb anti-rhGM-CSF en presencia de las inmunoglobulinas humanas

Con el objeto de evaluar la naturaleza de la población de inmunoglobulinas humanas con actividad anti-rhGM-CSF y describir los posibles epitopes reconocidos, se desarrolló un ensayo de inhibición competitiva. Para ello, se empleó un panel de MAb anti-rhGM-CSF previamente caracterizado desde el punto de vista inmunoquímico (28). Los epitopes reconocidos por cada MAb fueron previamente individualizados mediante el empleo del método de SPOT Síntesis (29, 30), demostrándose que el MAb CC5B5 reconoce el epítopo conformacional constituido por los aminoácidos A18E21R23R24F119 y R24E21N17W13, el MAb M1B8 reconoce el epítopo discontinuo P118F119W13E14 y el MAb M7E10, el epítopo representado por la secuencia L61YKQGLRGS LTK72. El MAb CC1H7 reconoce el extremo N-terminal de la citoquina representando el epítopo lineal constituido por la secuencia A1PAR4.

Se calculó el grado de inhibición de la interacción de cada MAb con el trazador en presencia de las inmunoglobulinas humanas parcialmente purificadas y concentradas (Fig. 4). La presencia de las inmunoglobulinas humanas anti-rhGM-CSF disminuyó la capacidad de interacción de la totalidad de los MAb neutralizantes de la actividad biológica de la citoquina (M1B8, M7E10 y CC5B5). Contrariamente, el MAb no neutralizante CC1H7 fue el único anticuerpo cuya interacción con la hormona radiactiva no fue afectada por las inmunoglobulinas humanas. Por otro lado, ninguno de los MAb fue afectado en su capacidad de interacción con rhGM-CSF cuando el ensayo de interacción competitiva se llevó a cabo empleando las inmunoglobulinas humanas parcialmente purificadas a partir del lote de sueros B.

Los ensayos de inhibición competitiva entre los anticuerpos humanos y murinos permitieron, en forma indirecta, evaluar los epitopes reconocidos por las inmunoglobulinas humanas anti-rhGM-CSF. De

esta manera, el bloqueo parcial de la interacción de la citoquina radioyodada con el receptor fue confirmada por la habilidad de las inmunoglobulinas humanas para competir con los MAb neutralizantes, uniendo sitios de la citoquina relevantes para ejercer su actividad biológica. Por otro lado, la competición demostrada con los MAb, que mapean áreas diferentes sobre la hormona, permitió establecer que la población de anticuerpos humanos anti-citoquina no es homogénea.

Evaluación de la capacidad de interacción de las inmunoglobulinas humanas con rhGM-CSF no glicosilado y glicosilado

La Fig. 5 muestra las curvas típicas de un ensayo de competición, observándose la disminución de la interacción del trazador con la inmunoglobulinas humanas anti-rhGM-CSF (relación B/F) a medida que se incrementa la concentración de citoquina tanto en su versión glicosilada como no glicosilada.

Para comparar la avidez de las inmunoglobulinas humanas por ambos tipos de citoquinas, se determinó la concentración de rhGM-CSF no marcado necesaria para inhibir el 50 % de la interacción de los anticuerpos humanos con [¹²⁵I]rhGM-CSF. Se requirió mayor concentración de citoquina glicosilada, con respecto a la correspondiente no glicosilada, para producir el 50 % de inhibición de la interacción de las inmunoglobulinas con el trazador (292 pM y 20 pM, respectivamente). Esto último es consecuencia de la menor avidez de las inmunoglobulinas humanas por la hormona glicosilada. De esta manera, el comportamiento de las inmunoglobulinas humanas frente a ambas versiones de la citoquina puede homologarse a una heterogeneidad de afinidades de los anticuerpos policlonales. La presencia de hidratos de carbono en la molécula producida por células de mamífero perturbaría la capacidad de interacción de los anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF debido al ocultamiento de epitopes. De esta manera, la glicosilación sería responsable de la menor interacción de dichos anticuerpos por la versión glicosilada de la citoquina.

Figura 4: Inhibición competitiva de la interacción de [¹²⁵I]rhGM-CSF con el panel de MAb anti-rhGM-CSF en presencia de las inmunoglobulinas humanas. En eje de ordenadas se graficó el porcentaje de neutralización de la interacción de [¹²⁵I]rhGM-CSF con cada MAb en presencia de las inmunoglobulinas purificadas por precipitación salina a partir del lote de sueros A (■) y del lote de sueros B (○).

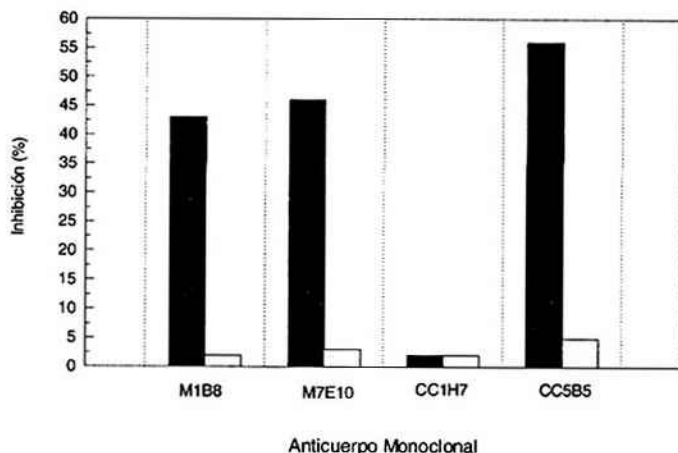
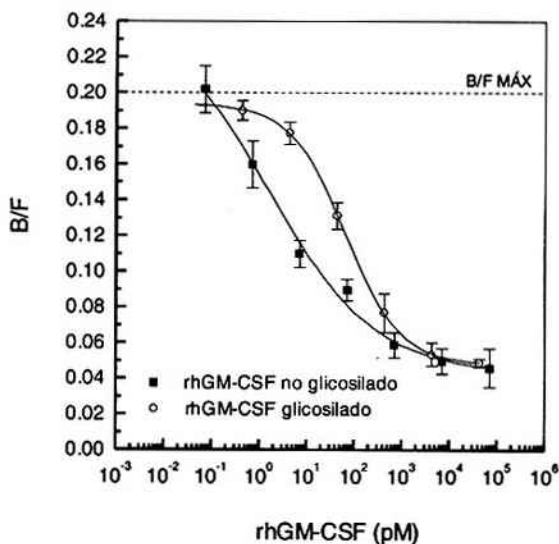


Figura 5: Evaluación de la capacidad de interacción de [¹²⁵I]rhGM-CSF con las inmunoglobulinas humanas anti-rhGM-CSF en presencia de las versiones no glicosilada y glicosilada de la citoquina. La magnitud de la interacción de las inmunoglobulinas humanas con el trazador fue analizada midiendo la radioactividad precipitada por acción del reactivo precipitante (*B*) en relación a la radioactividad libre en solución (*F*). La línea cortada paralela al eje de abscisas indica la relación B/F en ausencia de competidor.



Conclusiones

Se detectó actividad anti-rhGM-CSF en un lote de sueros destinado a la preparación farmacéutica de inmunoglobulinas humanas de uso terapéutico. Asimismo, tales anticuerpos inhibieron la interacción de rhGM-CSF con su receptor, sugiriendo la capacidad de los mismos de neutralizar la actividad biológica que esta citoquina desarrollaría *in vitro*.

El empleo del panel de MAb anti-rhGM-CSF caracterizado inmunquímicamente, permite establecer cuáles son las áreas factibles de ser reconocidas por las inmunoglobulinas humanas por ser sitios similares o solapados con las regiones reconocidas por los MAb. Los ensayos de competición sugieren, además, la habilidad neutralizante de las inmunoglobulinas humanas y describen la naturaleza heterogénea de la respuesta autoinmune, debido a la diferente especificidad de los epitopes reconocidos.

Finalmente, los anticuerpos humanos anti-rhGM-CSF demostraron habilidad para reconocer a la citoquina independientemente de la ausencia o presencia de hidratos de carbono en la superficie macromolecular. Sin embargo, la capacidad de interacción de las inmunoglobulinas humanas con la versión no glicosilada de la citoquina fue superior con respecto a la completamente glicosilada producida en células de mamífero.

Este trabajo demostró la presencia de anticuerpos en sueros normales con capacidad para inhibir la interacción con el receptor de hGM-CSF *in vitro* y el reconocimiento de epitopes potencialmente importantes para que la citoquina interacte con dicho receptor. La detección de estos autoanticuerpos naturales se convierte en un hecho relevante al definir un plan de tratamiento con rhGM-CSF no glicosilado o glicosilado, con el fin de predecir su efecto terapéutico. Teniendo en cuenta que el lote A está constituido por un número elevado de sueros y posee actividad anticuerpo específica, y que ningún suero del lote B es positivo, es posible suponer que a nivel poblacional, la frecuencia de individuos con autoanticuerpos naturales es baja. Por lo tanto, los individuos con autoanticuerpos naturales tendrían títulos elevados, tornándose importante la detección de dichos anticuerpos antes de aplicar un tratamiento con la citoquina.

Por otra parte, el seguimiento de los niveles y especificidades de los anticuerpos desarrollados durante el tratamiento con la citoquina, mediante

ensayos llevados a cabo con el panel de MAb, podría guiar la terapia a seguir, seleccionando la versión de la citoquina que resulte realmente efectiva. Será interesante monitorear la respuesta anti-GM-CSF en individuos que, presentando o no una inmunidad natural anti-GM-CSF, reciban tratamiento con la citoquina recombinante, con el fin de correlacionarla con el éxito o fracaso terapéutico.

Bibliografía

- 1- Guibert, B., Dighiero, G. and Avrameas, S., 1982. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. Detection, isolation and characterization. *J. Immunol.* **128**, 2779-2787.
- 2- Ross, C., Svenson, M., Hansen, M. B., Vejlsgaard, G. L. and Bendtzen, K., 1995. High avidity IFN-neutralizing antibodies in pharmaceutically prepared human IgG. *J. Clin. Invest.* **95**, 1974-1978.
- 3- Menetrier-Caux, C., Briere, F., Jouvenne, P., Peyron, E., Peyron, F. and Banchereau, J., 1996. Identification of human IgG autoantibodies specific for IL-10. *Clin. Exp. Immunol.* **104**, 173-179.
- 4- Mouthon, L., Nobrega, A., Nicolas, N., Kaveri, S. V., Barreau, C., Coutinho, A. and Kazatchkine, M. D., 1995. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3839-3843.
- 5- Holmberg, D. and Coutinho, A., 1985. Natural antibodies and autoimmunity. *Immunol. Today* **6**, 356-357.
- 6- Ando, K., Kikugawa, K. and Beppu, M., 1994. Involvement of sialylated poly-N-acetylactosaminyl sugar chains of band 3 glycoprotein on senescent erythrocytes in anti-band 3 autoantibody binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 19394-19398.
- 7- Schlesinger, J. S. and Horwitz, M. A., 1994. A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy: antibody in nonimmune serum mediates C3 fixation to the *Mycobacterium leprae* surface and hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* **62**, 280-289.
- 8- Gruppi, A., Pistoresi-Palencia, M. C., Ordonez, P., Cervan, F. and Volterro-Cima, E., 1994. Enhancement of natural antibodies in mice immunized with exoantigens of pl 4.5 from *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett.* **42**, 151-159.
- 9- Bendtzen, K., Svenson, M., Jønson, V. and Hippe, E., 1990. Autoantibodies to cytokines - friends or foes? *Immunol. Today* **11**, 167-169.
- 10- Hansen, M. B., Svenson, M., Abell, K., Yasukawa, K., Diamant, M. and Bendtzen, K., 1995. Influence of interleukin-6

- (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors. *Eur. J. Immunol.* **25**, 348-354.
- 11- Thornton, B. P., Vetvicka, V. and Ross, G. G., 1994. Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. *J. Immunol.* **152**, 1727-1737.
- 12- Smiley, J. D. and Talbert, M. G., 1995. Southwestern internal medicine conference: high-dose intravenous gamma globulin therapy: how does it work? *Am. J. Med. Sci.* **309**, 295-303.
- 13- Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. and Avrameas, S., 1995. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 812-818.
- 14- Wadhwa, M., Bird, C., Fagerberg, J., Gaines-Das, R., Ragnhammar, P., Mellstedt, H. and Thorpe, R., 1996. Production of neutralizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) antibodies in carcinoma patients following GM-CSF combination therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **104**, 351-358.
- 15- Revoltella, R. P., Laricchia-Robbio, L., Moscato, S., Genua, A. and Liberati, A. M., 1997. Natural and therapy-induced anti-GM-CSF and anti-G-CSF antibodies in human serum. *Leukemia Lymphoma* **26**, 29-34.
- 16- Prümmer, O., Seyfarth, C., Scherbaum, W. A., Drees, N. and Porzolt, F., 1989. Interferon- α antibodies in autoimmune diseases. *J. Interferon Res.* **9**, 67-74.
- 17- Pozzetto, B., Mogensen, K. E., Tovey, M. G. and Gresse, I., 1984. Characteristics of autoantibodies to human interferon in a patient with Varicella-zoster disease. *J. Infect. Dis.* **150**, 707-713.
- 18- Suzuki, H., Akama, T., Okane, M., Kono, I., Matsui, Y., Yamane, K. and Kashiwagi, H., 1989. Interleukin-1-inhibitory IgG in sera from some patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **32**, 1528-1538.
- 19- Takemura, H., Suzuki, H., Yoshizaki, K., Ogata, A., Yuhara, T., Akama, T. and Kashiwagi, H., 1992. Anti-interleukin-6 autoantibodies in rheumatic diseases. Increased frequency in the sera of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **35**, 940-943.
- 20- Sioud, M., Dybwad, A., Jespersen, L., Suleyman, S., Natvig, J. B. and Førre, Ø., 1994. Characterization of naturally occurring autoantibodies against tumour necrosis factor- α (TNF- α): in vitro function and precise epitope mapping by phage epitope library. *Clin. Exp. Immunol.* **98**, 520-525.
- 21- Meager, A., Wadhwa, M., Bird, C., Dilger, P., Thorpe, R., Newsom-Davis, J., and Willcox, N., 1999. Spontaneously occurring neutralizing antibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with autoimmune disease. *Immunology* **97**, 526-532.
- 22- Gallay, P., Mach, J. P. and Carrel, S., 1991. Characterization and detection of naturally occurring antibodies against IL-1 α and IL-1 β in normal human plasma. *Eur. Cytokine Netw.* **2**, 329-338.
- 23- Hansen M. B., Svenson, M. and Bendtzen, K., 1991. Anti-interleukin-6 antibodies in normal human sera. *Scand. J. Immunol.* **33**, 777-781.
- 24- Svenson, M., Hansen, M. B., Ross, C., Diamant, M., Rieneck, K., Nielsen, H. and Bendtzen, K., 1998. Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood* **91**, 2054-2061.
- 25- Hunter, W. M. and Greenwood, F. C., 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**, 495-496.
- 26- Ragnhammar, P., Friesen, H. J., Frödin, J. E., Lefvert, A. K., Hassan, M., Österberg, A., Mellstedt, H., 1994. Induction of anti-recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (Escherichia coli-derived) antibodies and clinical effects in nonimmunocompromised patients. *Blood* **84**, 4078-4087.
- 27- Wadhwa, M., Hjelm Skog, A. L., Bird, C., Ragnhammar, P., Lilljefors, M., Gaines-Das, R., Mellstedt, H., Thorpe, R., 1999. Immunogenicity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) products in patients undergoing combination therapy with GM-CSF. *Clin. Can. Res.* **5**, 1353-1361.
- 28- Oggero, M., Frank, R., Kräfte, R. and Etcheverrigaray, M., 2001. Identification of two potential receptor-binding sites of hGM-CSF. *Proceedings of 3rd MERCOSUR Congress on Process System Engineering and 1st MERCOSUR Congress on Chemical Engineering* **3**: 1807-1812.
- 29- Frank, R., 1992. SPOT Synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**: 9217-9232.
- 30- Frank, R. and Overwin, H., 1996. SPOT Synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. "Methods in Molecular Biology". Humana Press Inc. (Totowa, New Jersey, EE.UU.), **LXVI**, 149-169.