

MEJORA EN EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES MEDIANTE SELECCIÓN Y CLONACIÓN DE HIBRIDOMAS EN MEDIO SEMISÓLIDO

Betiana Bolzán¹; Horacio Rodríguez²

¹Becaria de la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe (Instituto de Salud y Ambiente del Litoral-FBCB-UNL)

²Director de la Beca (Instituto de Salud y Ambiente del Litoral-FBCB-UNL)

Ciencias Biológicas, Biotecnología, Grupo Y

INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento, los anticuerpos monoclonales (mAbs) han tenido una amplia variedad de aplicaciones no solo en investigación, sino también en medicina, siendo fundamentales tanto en diagnóstico como en tratamiento de enfermedades, además de ser útiles en la detección de contaminantes (*Albitar, 2007*).

La obtención de mAbs por la técnica tradicional descrita por Milstein y Köhler (*Köhler y Milstein, 1975; Galfré y Milstein, 1981; Yokoyama y col., 2013*) es un proceso complejo y laborioso que demanda aproximadamente 6 meses de trabajo, pudiendo resultar en la selección de clones duplicados idénticos.

Como alternativa a esta técnica, se ha desarrollado una metodología de producción de MABs utilizando un medio semisólido basado en metilcelulosa (ClonaCell™- HY, 2009).

La aplicación de la técnica de selección y clonado de mAbs en medio semisólido representa una ventaja más que alentadora ya que no solo reduce los tiempos de ejecución de la técnica sino que también se verían disminuidos el consumo de reactivos y el tiempo que el profesional debería dedicarle.

Dado el potencial impacto en la reducción de reactivos y tiempos de ejecución de la técnica es que consideramos de gran importancia probar esta alternativa al protocolo tradicional de obtención de mAbs y comparar la calidad y performance de los mAbs obtenidos por ambas técnicas.

OBJETIVOS

General

El objetivo general de este proyecto es evaluar la metodología de clonado y selección clonal en medio semisólido para la producción de mAbs en comparación con el método convencional.

Objetivos particulares

- Obtener, caracterizar y purificar mAbs correspondientes a porciones antigénicas de la proteína glutatión S-transferasa (GST) mediante la técnica tradicional de dilución límite.
- Obtener, caracterizar y purificar mAbs correspondientes a porciones antigénicas de la proteína GST mediante la técnica alternativa en medio semisólido.
- Comparación de performance de anticuerpos provenientes de cada metodología.

METODOLOGÍA

Obtención del Antígeno Recombinante e Inmunización

En esta etapa se realizó la síntesis de la proteína GST del parásito *Schistosoma japonicum*, en la cepa bacteriana *Escherichia coli* JM109, mediante técnicas de ADN recombinante y expresión de proteínas de fusión en células procariotas. La proteína de fusión fue purificada utilizando una columna cromatográfica GSTrap™ (GE, Healthcare, Argentina). La purificación fue chequeada en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Posteriormente a la obtención y purificación del antígeno GST, se procedió a la inmunización de ratones Balb/c. La respuesta inmune de los animales se evaluó mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto.

Fusión celular, selección de hibridomas y clonado

En esta etapa tuvo lugar la fusión de las células linfocíticas provenientes del bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma de la línea NSO, mieloma no secretor obtenido a partir de la cepa BALB/c. Una vez realizada la fusión celular se procedió al clonado celular y selección de los hibridomas positivos por la metodología tradicional de dilución límite en medio líquido y la metodología alternativa en medio semisólido.

- **Metodología tradicional:** El método se basó en enriquecer un medio de cultivo celular con hipoxantina y timidina, y en agregar aminopterina como inhibidor de la síntesis de novo de purinas (HAT). En estas condiciones sólo sobreviven aquellas células que expresen la enzima *hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa* (HGPRT). Se seleccionaron aquellos hibridomas que expresaban anticuerpos específicos para la proteína GST en el sobrenadante de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó una densidad celular adecuada se procedió a monitorear la presencia anticuerpos específicos anti-GST mediante ELISA específico indirecto. Las líneas de hibridomas productores fueron amplificadas gradualmente de forma tal de obtener una cantidad de células apropiada para la criopreservación, selección y clonado posterior.

- **Metodología en medio semisólido:** se realizó el sembrado de las células obtenidas de la fusión en el medio semisólido *HAT-metilcelulosa*, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante para el uso de ClonaCell Flex. Las placas fueron incubadas a 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂ durante 14 días, luego de los cuales se examinaron las placas para reconocer las colonias de hibridomas productores de mAbs anti-GST. De las colonias identificadas, algunas fueron cosechadas y transferidas cada una a un pocillo individual de placas de cultivo de 96 pocillos. Se determinó la presencia de mAbs anti-GST en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA específico indirecto. Los clones positivos fueron amplificados gradualmente de forma tal de obtener una cantidad de células apropiada para la criopreservación y clonado posterior.

Obtención y purificación de mAbs anti-GST

En esta etapa se expandieron los clones productores de mAbs seleccionados, en frascos T75. Posteriormente, se purificaron los mAbs obtenidos por cromatografía de afinidad a proteína G, se determinó las variantes de isotipo de cadena pesada y se evaluó su pureza por la técnica de SDS-PAGE.

Comparación de performance de los mAbs

Mediante la técnica de ELISA específico indirecto se determinó el título de los mAbs anti-GST obtenidos por ambas técnicas. La determinación del título de anticuerpos por técnica de ELISA específico nos brindó información acerca de la especificidad y

afinidad aparente de los anticuerpos por el antígeno inmovilizado en fase sólida, así como información con respecto a su concentración.

RESULTADOS

Obtención del Antígeno Recombinante e Inmunización

Se obtuvo la proteína recombinante GST que se usó como antígeno para inmunizar a los ratones Balb/c. La purificación de la proteína se hizo por SDS-PAGE.

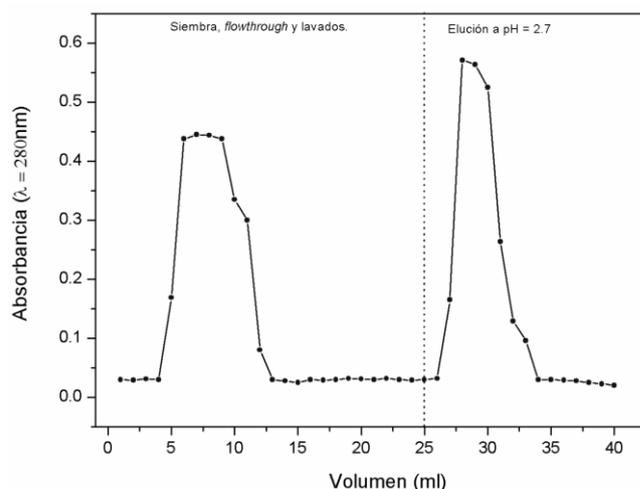
Fusión celular, selección de hibridomas y clonado

Por la metodología tradicional se obtuvieron 21 líneas de hibridomas productores y por la metodología en medio semisólido, 18. Los hibridomas, detallados en la *Tabla 1*, fueron amplificadas gradualmente de forma tal de obtener una cantidad de células apropiada para la criopreservación, selección y clonado posterior.

Tabla 1: Líneas de hibridomas obtenidas en el procedimiento de fusión celular.

DILUCIÓN LIMITE				MEDIO SEMISÓLIDO			
Nº	HIBRIDOMA	Nº	HIBRIDOMA	Nº	HIBRIDOMA	Nº	HIBRIDOMA
1	P1.A9	12	P4.G9	1	P1.B6	12	P3.A7
2	P1.C11	13	P5.A9	2	P1.C1	13	P3.B1
3	P1.F6	14	P6.C11	3	P1.E3	14	P3.C10
4	P1.F10	15	P6.H11	4	P1.E11	15	P3.E2
5	P1.G3	16	P7.A3	5	P1.F5	16	P3.D9
6	P2.F8	17	P7.C2	6	P1.H2	17	P3.G11
7	P2.E9	18	P7.H9	7	P2.A3	18	P3.H10
8	P3.G10	19	P8.A6	8	P2.A10		
9	P4.A3	20	P8.B2	9	P2.B8		
10	P4.A10	21	P10.G8	10	P2.D10		
11	P4.H11			11	P2.G9		

Obtención y purificación de mAbs anti-GST



Tanto los mAbs anti-GST obtenidos por la metodología tradicional como los obtenidos por la técnica en medio semisólido fueron purificados utilizando una columna de 1 ml de matriz comercial de proteína G. A modo de ejemplo, se muestra en la *Figura 1* un cromatograma típico obtenido durante la purificación del mAb mP5.B3, monitoreado por lecturas espectrofotométricas a una $\lambda = 280\text{nm}$.

Figura 1: Purificación de mAbs mediante cromatografía de afinidad a proteína G. Se ejemplifica la purificación del mAb mP5.B3. La línea de puntos separa la etapa correspondiente a la siembra, flowthrough y lavados de la etapa de elución a pH = 2.7.

Determinación de las variantes isotípicas de cadena pesada

En la *Tabla 2* se indica el isotipo de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas producidas por cada línea celular, evaluadas por técnica de ELISA específico indirecto.

Tabla 2: Isotipos de cadenas pesadas de los mAbs producidos por los clones obtenidos mediante las dos técnicas.

DILUCIÓN LIMITE				MEDIO SEMISÓLIDO			
LINEA	ISOTIPO	LINEA	ISOTIPO	LINEA	ISOTIPO	LINEA	ISOTIPO
mP3.E12	IgG ₁	mP9.D8	IgG ₁	P1.C1	IgG ₁	P3.A7	IgG ₁
mP6.C7	IgG ₂	mP9.H8	IgM	P1.F5	IgG ₁	P3.H10	IgG ₂
mP8.C6	IgG ₁			P2.A10	IgG ₁	P3.D9	IgG ₁
mP8.F6	IgG ₁			P2.G9	IgG ₂	P2.B8	IgG ₁

Comparación de performance de los MAbs

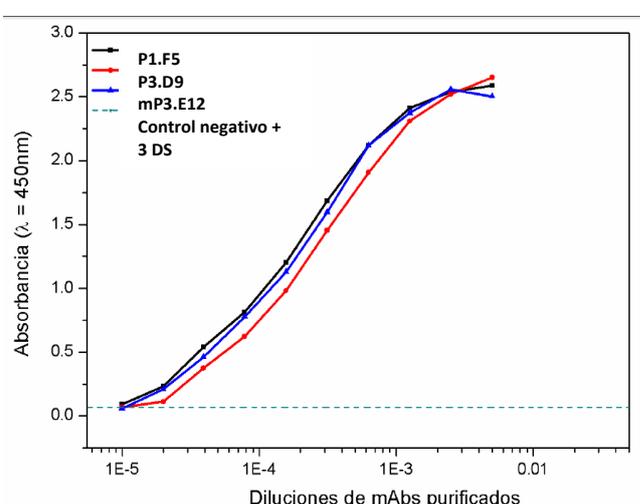


Figura 2: Titulación de los extractos purificados de mAbs anti-GST mediante técnica de ELISA específico indirecto. En línea de puntos se indica el valor promedio del control negativo + 3 D.S.

En la *Figura 2* se observan los títulos de los distintos mAbs anti-GST seleccionados, presentes en soluciones de los productos de purificación, empleando la técnica de ELISA específico indirecto. Se seleccionaron los clones productores P1.F5 y P3.D9 producidos por la técnica en medio semisólido ClonaCell™- HY, y el clon mP3.E12 obtenido por la técnica tradicional. Se definió como título de corte a la mayor dilución de solución de mAbs purificados cuyo valor de absorbancia es mayor que el valor promedio de absorbancia del control negativo más tres desviaciones estándar.

BIBLIOGRAFÍA

Albitar, M., 2007. Monoclonal antibodies: Methods and Protocols. Humana Press. Vol. 378.

ClonaCell™- HY, 2009. HybridomaCloning Kit: Procedure Manual. StemCell Technologies.

Galfré, G., Milstein, C., 1981. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. Methods Enzymol. 73B. AcademicPress, Inc.

Köhler G, Milstein C, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature*; 256: 495-7.

Yokoyama WM, Christensen M, Dos Santos G, Miller D, Ho J, Wu T, Dziegelewski M, Neethling FA, 2013. Production of Monoclonal Antibodies. Curr. Protoc. Immunol. 2013 Oct 1;102: Unit 2.5. doi: 10.1002/0471142735.im0205s102.