



Anticuerpos monoclonales para la pesquisa neonatal de enfermedades heredometabólicas

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Inmunoensayo (CIE). La Habana, Cuba

AUTORES PRINCIPALES: Greilys Morejón García¹, Iria García de la Rosa, Sadys Feal Carballo¹

Otros autores: Joel Manuel Quintana Guerra¹, Ernesto Carlos González Reyes¹, Elisa María Castells Martínez¹, Pedro Lucio Pérez Morás¹, Maylín Pupo Infante¹, Yesdiley Lafita Delfino¹, Liliana Hernández Pérez¹, Amarilys Frómata Suárez¹, Pedro Rolando Almenares Guasch¹, Mary Triny Segura González¹

Colaboradores: Carlos Silva León¹, Irinia Yelena Valdivia Álvarez¹, Antonio Melchor Rodríguez¹, Anett Rubio Torres², Imara Caridad Stable Vernier², Alik Rosabal Poloshkov¹, Milenén María Hernández Marín¹, Luisa Martínez Beltrán¹, Lesley del Río Fabre¹, Yileidis Tejeda Gómez¹

Filiación: ¹Centro de Inmunoensayo (CIE). La Habana, Cuba. ²Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, Cuba

Palabras clave

anticuerpos monoclonales; pesquisa neonatal; enfermedades heredometabólicas

RESUMEN

Los errores innatos del metabolismo generalmente no producen síntomas clínicos en el momento del nacimiento, sino marcadores elevados que posibilitan su detección mediante programas de pesquisa neonatal (PN). En Cuba la salud es un objetivo estratégico, y con esa premisa surgió el sistema ultramicroanalítico (SUMA), una tecnología propia, adaptable a nuestro sistema sanitario y compatible con sus recursos financieros limitados. El Centro de Inmunoensayo (CIE) desarrolla y produce diagnosticadores basados en el SUMA, lo que ha permitido la implementación de programas de pesquisa neonatal de trastornos heredometabólicos en Cuba y su aplicación en otros países, principalmente latinoamericanos. La obtención de anticuerpos monoclonales (AcMs) contra marcadores de dichas enfermedades resulta esencial para el desarrollo y la mejora de los métodos de pesquisa neonatal. La disponibilidad en el CIE de AcMs propios permite desarrollar nuevos diagnosticadores, mejorar el proceso productivo y el desempeño analítico de los ya existentes, reducir los costos de producción y garantizar la disponibilidad de esas materias primas. En este trabajo se aplica la tecnología del hibridoma para generar AcMs útiles para investigar tres enfermedades heredometabólicas. De los hibridomas obtenidos, el 7G11E3 secreta un AcM anti-TSH que sustituye eficazmente a los dos AcMs –uno de ellos era importado– de la fase sólida de los diagnosticadores UMELISA® TSH Neonatal y UMELISA® TSH, para pesquisa neonatal y confirmación, respectivamente, del hipotiroidismo congénito. La línea 6E2G9 secreta un AcM contra la 17 α -hidroxiprogesterona, de utilidad en la fase sólida del UMELISA® 17OH Progesterona Neonatal, ensayo para la pesquisa neonatal de la hiperplasia adrenal congénita (HAC). Dicho AcM reemplaza los anticuerpos policlonales de conejo que se empleaban, los cua-

les presentaban niveles permisibles de reactividad cruzada. De los hibridomas generados contra la tripsina humana, dos secretan AcMs que pueden utilizarse indistintamente para recubrimiento de placas de ultramicro-ELISA, y un tercero secreta un anticuerpo útil como revelador. Con ellos se desarrolló un nuevo ensayo para cuantificar la tripsina inmunorreactiva, UMELISA® TIR Neonatal, cuyo estudio piloto de 2018 evidenció que puede ser empleado para la pesquisa neonatal de la fibrosis quística (FQ). La novedad científica de la propuesta está avalada por doce presentaciones en eventos internacionales y por dos artículos publicados en revistas de amplia visibilidad internacional, como son *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2018) y *Clinica Chimica Acta* (2018), así como un tercero en proceso de revisión en esta última revista. Los resultados se presentaron en dos tesis de diploma de la Facultad de Biología (UH) y una tesis de maestría en Tendencias de la Biotecnología Contemporánea. Con este trabajo se sustituye la importación de una materia prima (AcM anti-TSH) y se emplea por primera vez en el mundo un AcM en un inmunoensayo comercial para la pesquisa neonatal de HAC. Dados los resultados obtenidos, se encuentra en fase de registro sanitario el primer diagnosticador cubano para la PN de la FQ. Además de aplicarse en Cuba, este ensayo sumado a los ya existentes cuyos registros sanitarios fueron modificados luego de la introducción de los nuevos AcMs descritos en este trabajo, fortalece la oferta de diagnosticadores para pesquisa neonatal a los países donde se comercializa la tecnología SUMA.

Los errores innatos del metabolismo generalmente no producen síntomas clínicos en el momento del nacimiento, pero sí marcadores elevados que posibilitan su detección mediante programas de pesquisa neonatal (PN)¹. En Cuba la salud es un objetivo estratégico, y con esa premisa surgió el sistema ultramicroanalítico (SUMA), una tecnología propia, adaptable a nuestro sistema de salud y compatible con sus recursos financieros limitados². El Centro de Inmunoensayo (CIE) desarrolla y produce diagnosticadores basados en el SUMA, algunos de los cuales han permitido la implementación de programas de PN de trastornos heredometabólicos en Cuba, y estos se han aplicado en otros países, principalmente latinoamericanos³. La obtención en el CIE de AcMs propios contra los marcadores de dichas enfermedades ha permitido desarrollar nuevos diagnosticadores, mejorar el proceso productivo y el desempeño analítico de los ya existentes, reducir los costos de producción y garantizar la disponibilidad de esas materias primas.

El hipotiroidismo congénito (HC) es la principal causa de retraso mental tratable y tiene una incidencia mundial de 1:4000⁴. Su PN comenzó en Cuba en 1986 y actualmente se realiza con el UMELISA® TSH Neonatal, ensayo tipo sándwich que utiliza en su fase sólida AcMs específicos contra la cadena β de la TSH³. La confirmación del HC se hace con el UMELISA® TSH que emplea esa misma fase sólida. Uno de los AcMs era importado, lo que dificultaba su suministro estable e implicaba altos costos, razón por la cual en el presente trabajo se propone la obtención de AcMs que lo sustituyeran eficazmente.

La hiperplasia adrenal congénita (HAC) se caracteriza por crisis de pérdida de sales, virilización de genitales externos en las hembras, crecimiento acelerado y retardo de la pubertad. Su forma clásica presenta una incidencia global de 1:15 000. En Cuba se pesquisa desde 2005 con el UMELISA® 17OH Progesterona Neonatal, ensayo competitivo que mide la 17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP) y que empleaba en su fase sólida anticuerpos policlonales de conejo con niveles permisibles de reactividad cruzada⁵. En el presente trabajo se propone la sustitución de los policlonales por anticuerpos monoclonales para una mejor producción y desempeño de dicho estuche.

La fibrosis quística (FQ) es un trastorno multisistémico que afecta la calidad de vida y la supervivencia de los enfermos. El reflujo de las enzimas pancreáticas a la sangre eleva los niveles de tripsina inmunorreactiva, principal marcador diagnóstico⁶. En Cuba la FQ tiene una incidencia estimada de 1:3900⁷, valor basado en estudios aislados porque en el país no se ha implementado aún un programa de PN. Con este trabajo se propone obtener AcMs antitripsina humana que permitan normalizar un UMELISA® para la cuantificación de dicho marcador.

En este trabajo se aplica la tecnología del hibridoma para generar AcMs útiles para investigar esas tres enfermedades. Los AcMs se caracterizaron mediante: a) determinación de reactividad cruzada frente a biomoléculas relacionadas estructural y funcionalmente con los marcadores, b) evaluación en las fases sólida y líquida de los ensayos, c) estudio del reconocimiento de epítomos y d) evaluación preliminar en ensayos UMELISA® para la cuantificación de los marcadores.

Todos los ratones inmunizados con TSH humana mostraron títulos máximos de anticuerpos ($\geq 1:128\ 000$). De las cuatro fusiones realizadas se lograron nueve híbridos específicos de los que se obtuvieron nueve hibridomas secretoras de IgG1 y dos de IgG2b, con constantes de afinidad de 3×10^7 - $8,5 \times 10^9$ L/mol. Los AcMs 1A4D10, 20A9C11 y 20A9E7 reconocieron la subunidad α , común para todas las hormonas glicoproteicas, el 10B12C7 reconoció la interfase α - β de la TSH y los demás anticuerpos eran afines por la cadena β . De estos últimos, el 7G11E3 presentó la más alta constante de afinidad ($8,5 \times 10^9$ L/mol), reconoció bajas concentraciones de la hormona en solución y mostró un 92 a 100 % de inhibición con los AcMs 4A2A8 (obtenido y producido en el CIE) y 11E4 (HyTest, Finlandia) de la fase sólida de los ensayos UMELISA® TSH Neonatal y UMELISA® TSH. Este estudio demostró también que los AcMs 4A2A8 y 11E4 reconocen epítomos distintos en la subunidad β de la TSH, de lo que se deduce que el AcM 7G11E3 se une a una región de la hormona donde quedan superpuestos los epítomos reconocidos por los otros dos AcMs. La elevada afinidad y el reconocimiento epitópico distintivo del AcM 7G11E3 explican su mejor desempeño en la fase sólida de los ensayos UMELISA® para la captura de bajas cantidades de TSH en comparación con los otros AcMs, ya sea solos o en pareja.

Dada la escasez de trabajos publicados que referían la obtención de AcMs con reconocimiento específico por la 17-OHP, se aplicaron esquemas de inmunización propuestos para otro hapteno, la progesterona⁸. Como los ratones inmunizados con dosis bajas del inmunógeno [17-OHP-3-(O-carboximetil) oxima-albúmina sérica bovina] en intervalos cortos tuvieron una respuesta inmunitaria insuficiente (títulos $\leq 1:1000$), se modificó el esquema mediante la aplicación de dosis altas y consecutivas del mismo con lo que se alcanzó un título apropiado. En la fusión realizada se generaron cuatro híbridos específicos de los que se obtuvieron 12 líneas secretoras de IgG1 y tres de IgG2b con afinidades de $1,07$ - $4,02 \times 10^9$ L/mol. Los anticuerpos de la familia 6E2 mostraron valores de reactividad cruzada inferiores al 3 % con hormonas similares a la 17-OHP que interfieren en los ensayos de pesquisa.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos con los anticuerpos policlonales de conejo de la fase sólida del UMELISA® 17OH Progesterona Neonatal. Por último, se estudiaron dos paneles de muestras de sangre seca sobre papel de filtro de neonatos pertenecientes al programa cubano de PN. Las muestras se evaluaron con el AcM 6E2G9 en fase sólida mediante adsorción directa pasiva e inmovilización mediada por inmunoglobulinas. Se observó una disminución considerable de los valores medios de 17-OHP y de los casos falsos posi-

tivos con respecto al ensayo que usa los policlonales. Este trabajo demostró la especificidad del 6E2G9 y la posibilidad de su inclusión en el ensayo UMELISA® 17OH Progesterona Neonatal.

Como la tripsina es capaz de autodegradarse, se diseñó un esquema de inmunización con altas dosis de inmunógeno que, una vez preparadas, se administraron rápidamente al animal por vía intraperitoneal para que su sistema inmune respondiera mayoritariamente contra la proteína intacta. Al evaluar la respuesta inmune se alcanzó un título satisfactorio ($\geq 1:128\ 000$) y se procedió a la fusión celular. De cinco híbridos obtenidos se generaron 16 líneas secretoras de IgG1 específica con valores de afinidad de $3,98 \times 10^9$ - $1,4 \times 10^{10}$ L/mol. Se determinó que los AcMs reconocieron diferentes epítomos conformacionales de la molécula de tripsina humana y que el AcM 4C9E11 se unió a un epítomo diferente al del resto de los anticuerpos. Como estos últimos se inhibieron entre sí en más de un 90%, se concluyó que reconocen epítomos relacionados espacialmente. Con placas recubiertas individualmente con los AcMs 4C9C9 y 9D5H5 y el AcM 4C9E11 conjugado a FA se desarrolló un UMELISA® tipo sándwich para la pesquisa de FQ. Con el AcM 4C9C9 en la fase sólida se cuantificaron cuatro controles del CDC para una exactitud relativa entre -6,7 y 9,3 %, con el AcM 9D5H5 la evaluación de otros cuatro controles del CDC rindió porcentajes de recobrado entre -2,7 y 21,6 %, resultados que en general fueron buenos si se considera como criterio de aceptación una variación interserial inferior a ± 20 %⁹. Con el empleo de un valor de corte >70 ng/mL para el 99,5 percentilo de la distribución, el ensayo con el AcM 9D5H5 identificó como positivas seis muestras de fibroquísticos procedentes del Programa de PN de Brasil. La cuantificación de tripsina con el UMELISA® sándwich diseñado demostró la potencialidad de los AcMs para la normalización de un ensayo de PN de FQ.

Con este trabajo se lograron AcMs contra TSH, 17-OHP y tripsina que resultan materias primas esenciales para el desarrollo y la producción de diagnosticadores para la PN de tres enfermedades heredo-metabólicas. Con el AcM anti-TSH 7G11E3 se sustituye una materia prima importada, el 6E2G9 es el primer AcM anti-17-OHP en utilizarse en un inmunoensayo comercial para HAC y con los AcMs antitripsina se diseñó el primer diagnosticador cubano para FQ, actualmente en fase de registro sanitario. La posterior normalización de los ensayos correspondientes y sus registros sanitarios ante la entidad reguladora CECMED han permitido la introducción de los AcMs en el proceso productivo de estos diagnosticadores que integran, junto a otros estuches de la tecnología SUMA, el programa de PN en Cuba. Además, los resultados presentados en este trabajo permiten fortalecer la oferta de

diagnosticadores para PN a los países donde se comercializa esta tecnología.

Referencias bibliográficas

1. Queiruga G, Lemes A, Ferolla C, Machado M, Queijo C, Garlo P et al. *Pesquisa Neonatal: lo que puede prevenir una gota de sangre*. Montevideo: Editorial Centro de Estudios en Seguridad Social, Salud y Administración; 2010.
2. Sánchez A, Gorry C. Immunodiagnosics: the convergence of biotech and public health. *MEDICC Rev* 2013;15(1):7-10.
3. González EC, Castells EM, Frómeta A, Arteaga AL, Del Río L, Tejada Y et al. SUMA technology and newborn screening tests for inherited metabolic diseases in Cuba: an overview of the first 30 years. *J Inborn Errors Metab Screen* 2016;4:1-9.
4. Núñez, O. Hipotiroidismo congénito. *Paediatrica* 2003;5(2):93-100.
5. González EC, Marrero N, Pérez PL, Frómeta A, Zulueta O, Herrera D et al. An enzyme immunoassay for determining 17 α -hydroxyprogesterone in dried blood spots on filter paper using an ultramicro analytical system. *Clin Chim Acta* 2008;394:63-66.
6. Therrell BL, Hannon WH, Hoffman G, Ojodu J, Farrell PM. Immuno-reactive trypsinogen (IRT) as a biomarker for cystic fibrosis: challenges in newborn dried blood spot screening. *Mol Genet Metab* 2012;106:1-6.
7. Silva Filho LVRF, Castaños, C, Hernán, H. Cystic fibrosis in Latin America—improving the awareness. *J Cyst Fibros* 2016;15(6):791-3.
8. Waldmann A. Monoclonal antibodies to progesterone: characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk. *Hybridoma* 1999; 18(3):289-96.
9. Roldán AM. Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva [Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud]. Universidad Miguel Hernández; 2013.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

MSc. Iria García de la Rosa. Calle 134 y Ave. 25, Reparto Cubanacán, Playa, La Habana. Correo electrónico: iria.garcia@cie.cu