



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Producción de anticuerpos monoclonales murinos mediante la tecnología de los hibridomas.

Production of murine monoclonal antibodies using hybridoma technology.

Medina Flores, Yolanda<sup>1</sup>; Mata Ruíz, Olga<sup>1</sup>; Lloret-Sánchez, Lourdes<sup>1</sup>; Manzo-Sandoval, Anabelle<sup>2</sup> y Cortés Sarabia, Karen<sup>3</sup>.

1. Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales. Unidad de Desarrollo Tecnológico e Investigación Molecular. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE).
2. Laboratorio de Inmunología. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), sede Palo Alto. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
3. Laboratorio de Inmunobiología y Diagnóstico Molecular. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero.

\*Correspondencia. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE). Francisco P. Miranda # 177, Col. Lomas de Plateros, C.P 01480 Álvaro Obregón, CDMX, México.  
CP. Tel. +52 (55) 50 62 16 00 Ext. 59349, 59336, yolanda.medina@salud.gob.mx

### Resumen

Los anticuerpos monoclonales son producidos por una sola clona de linfocitos B y tienen la característica principal de reconocer específicamente un solo epítipo en el antígeno. Actualmente, son ampliamente utilizados en la investigación, diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y cáncer. Los métodos de producción de anticuerpos monoclonales son diversos, entre ellos se encuentran; la inmortalización de linfocitos B, *phage display*, cultivo de células CHO e insectos, sin embargo, el método más utilizado es el descrito por Köhler y Milstein en 1975 que consiste en la producción de células híbridas. Los hibridomas son generados mediante la fusión de células del bazo de un ratón inmunizado con el antígeno de interés y las células de un plasmocitoma. Posterior a la fusión, se realiza una selección bioquímica en medio HAT (Hipoxantina – Timidina - Aminopterina), que permitirá la supervivencia y selección específica de hibridomas. A continuación, se evalúa por ELISA indirecto la presencia de anticuerpos que reconocen el antígeno de interés a partir del sobrenadante de cultivo de los hibridomas, con la finalidad de

### Abstract

Monoclonal antibodies are produced by a single B-cell; which main characteristic is the specific recognition of just one epitope in the antigen. In recent years, monoclonal antibodies have been plenty used in research, diagnostic and treatment of infectious or autoimmune diseases and cancer. Several methods for monoclonal antibodies production are available, among them; B-cell immortalization, phage display or CHO and insect cell culture, however, the most widely used methods is the production of hybridomas described by Köhler and Milstein in 1975. Hybridomas are generated by the fusion of two cells, spleen cells derived from immunized mice with the antigen of interest and cells derived from a plasmacytoma. After fusion, biochemical selection is performed in HAT (Hypoxanthine-Thymidine-Aminopterin) medium that allows the survivor and specific selection of hybrid cells. Next, the presence of antibodies that recognize the antigen of interest using the culture supernatant of hybridomas is assessed by indirect ELISA, this method allows the identification of wells with producing hybrid cells. Afterward, cloning is performed at least twice for the isolation of a single

identificar pozos en la placa de cultivo con híbridos productores. Finalmente, se realizan al menos dos ciclos de clonaciones con el objetivo de aislar un solo clon celular, el cual será expandido hasta obtener suficiente sobrenadante de cultivo para realizar la caracterización completa del anticuerpo producido: clase y subclase; especificidad, actividad biológica y aplicación final.

**Palabras claves:** Anticuerpos monoclonales, células B, hibridoma.

hybrid cell, after, selected hybrid will be expanded until enough culture supernatant for complete antibody characterization could be performed, among them: immunoglobulin class and subclass, specificity, biological activity and final application.

**Keywords:** Monoclonal antibodies, B-cells, hybridoma.

## Introducción

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por las células B de vertebrados y se consideran el principal componente del sistema inmune humoral que protege contra patógenos como virus y bacterias [1]. Estructuralmente, un anticuerpo está compuesto por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas por enlaces disulfuro. Contienen dos regiones biológicamente relevantes: *a) la región variable* es responsable del reconocimiento del antígeno, mientras que *b) la región constante* es responsable de la actividad efectora del anticuerpo. Las cadenas pesadas contienen una región variable y tres constantes, mientras que las cadenas ligeras únicamente tienen una región variable y una constante [2].

Con base a su origen, los anticuerpos pueden dividirse en dos grupos:

- a) *Los anticuerpos policlonales (AcPo)*, son secretados por diferentes clones de células B y reconocen múltiples epítopos dentro de un antígeno. Se generan al inyectar un inmunógeno en un animal inmunológicamente competente para inducir una respuesta inmune, posteriormente, los anticuerpos pueden ser obtenidos del suero sanguíneo o purificados.
- b) *Los anticuerpos monoclonales (AcMo)*, son secretados por una sola clona de células B por lo que son de naturaleza monoespecífica; es decir, reconocen un epítipo específico del antígeno y para su producción se requieren modelos *in vivo* e *in vitro* [3].

En 1975, César Milstein y George Köhler desarrollaron la tecnología de generación de hibridomas para la obtención de AcMo, técnica por la cual fueron acreedores al premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984. La obtención de hibridomas se realiza mediante la fusión de dos tipos celulares

(linfocitos B y mieloma), esto se logra a través del uso del virus Sendai (como lo hicieron originalmente Köhler y Milstein) o del polietilenglicol (PEG), un desestabilizante de membranas (utilizado en años recientes). Los linfocitos B de ratón son productores de anticuerpos específicos, mientras que los mielomas presentan la característica principal de poder dividirse indefinidamente como toda célula cancerosa.

Adicionalmente, esta célula presenta dos mutaciones genéticas que la hace carente de las enzimas hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT) y timidina cinasa (TK); estas características inhabilitan a los mielomas para efectuar la vía alterna en la síntesis de DNA. Al cultivar las células fusionadas y adicionarles medio suplementado con HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina), solamente aquellos híbridos linfocito B-mieloma podrán sobrevivir debido a que tendrán las enzimas HGPRT y TK aportadas por la célula B, que permitirán la sintetizar de DNA por la vía alterna, ya que la aminopterina bloquea la síntesis de DNA de *novo*. De esta forma, las células híbridas resultantes heredarán del linfocito B la capacidad de producir el anticuerpo específico y la resistencia a ciertos fármacos, mientras que el mieloma aportará la inmortalidad y la capacidad de secreción [4].

La producción de anticuerpos monoclonales inicia con la elección del antígeno a utilizar y su posterior inmunización en ratones BALB/c- y una vez que éstos presentan un título elevado de anticuerpos, las células B del bazo son aisladas y fusionadas con las células de mieloma. Las líneas celulares de mieloma más utilizadas para el desarrollo de anticuerpos monoclonales murinos son X63-Ag 8.653 [5] y Sp2/0-Ag 14 [6] de la cepa de ratón BALB/c. Finalmente, las células pueden fusionarse al adicionar PEG, o al combinar este con métodos como la electrofusión [7].

Durante la fusión, además de haber híbridos linfocito B-mieloma, puede haber híbridos provenientes de dos linfocitos B o de dos células de

mieloma, mismos que serán incapaces de sobrevivir en el medio que contiene HAT por la selección bioquímica (incapacidad de realizar la vía alterna de la síntesis de DNA), mientras que los linfocitos B serán incapaces de sobrevivir debido al periodo de tiempo que se mantienen en el cultivo. Los sobrenadantes de cultivo proveniente de los hibridomas se analizan por ELISA para detectar anticuerpos específicos; si el resultado es positivo, se procede a realizar una clonación celular por la técnica de dilución limitante,

en la que las células serán diluidas de forma secuencial hasta individualizar una célula por pocillo con la finalidad de asegurar la monoclonalidad, es decir, la obtención de una línea celular originada a partir de una célula madre que produzca un AcMo específico de forma homogénea. Después de seleccionar las mejores clonas, estas serán cultivadas masivamente y los AcMo serán purificados a partir del sobrenadante de cultivo, para finalmente ser caracterizados y validados de acuerdo a su aplicación [8]. (Figura 1)

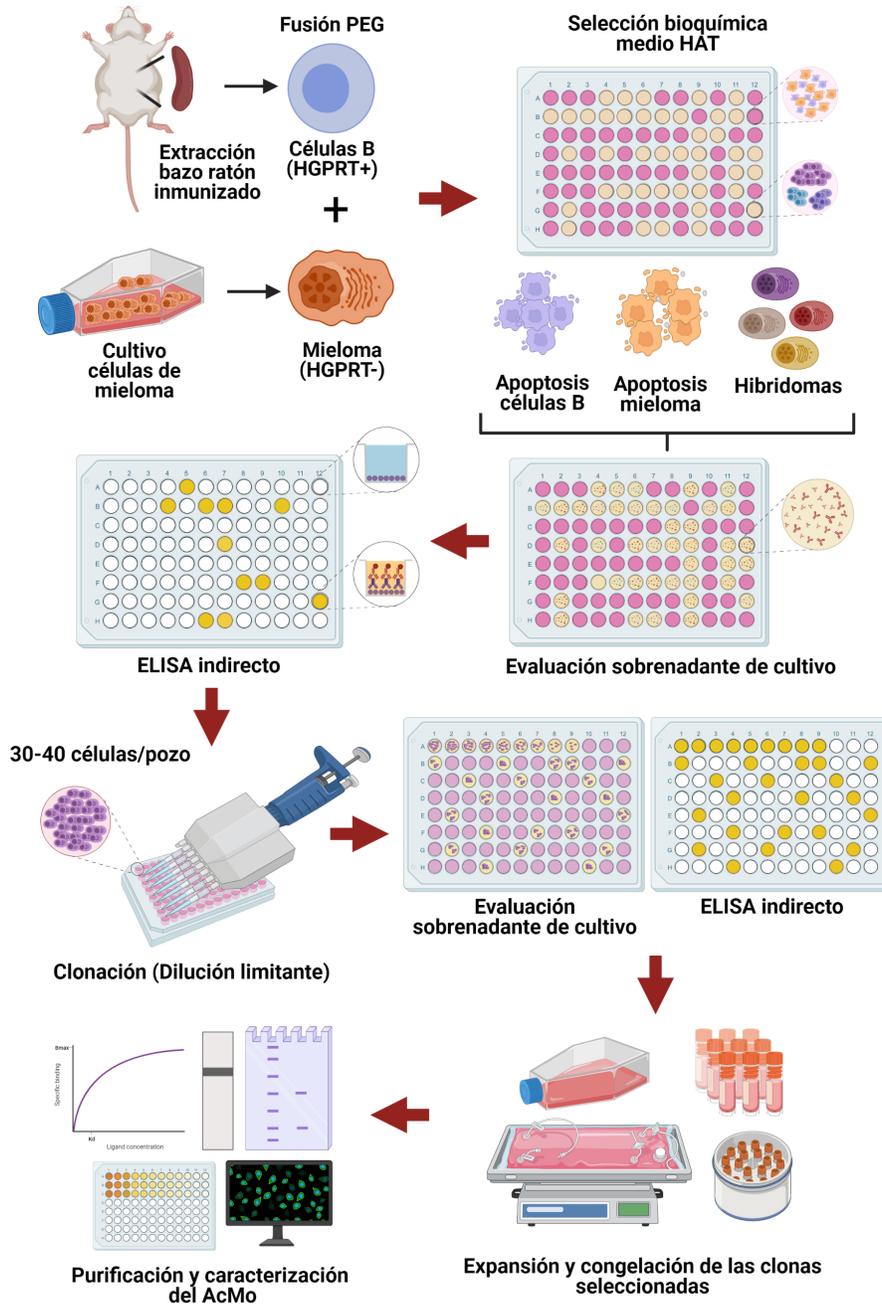


Figura 1.- Proceso de producción de anticuerpos monoclonales.

Los AcMo presentan algunas ventajas sobre los AcPo ya que son homogéneos, altamente selectivos y son menos vulnerables a presentar reacción cruzada; sin embargo, su producción es más tardada y costosa en comparación con los AcPo. Al ser homogéneos y reconocer sólo un epítipo, su uso pudiera no ser factible en algunos tipos de inmunoensayos por lo que durante el proceso de caracterización y validación deben comprobarse todas las posibles utilidades [9]. Por ejemplo, en terapias contra venenos de serpientes los antisueros policlonales son más eficientes que los monoclonales [10].

Para el tratamiento de enfermedades humanas los AcMo de ratón no pueden ser utilizados debido a que los pacientes desarrollan una respuesta inmune dirigida contra los anticuerpos de ratón (trastorno conocido como HAMA, del inglés *Human Anti-Mouse Antibodies*) [11]. Con la finalidad de reducir los efectos HAMA asociados con la administración de AcMo de ratón, se han desarrollado métodos alternativos para la producción de AcMo en los cuales se hace uso de la tecnología recombinante para rediseñar la estructura del anticuerpo conservando su eficacia y especificidad [12,13]. Entre las estrategias más utilizadas en la ingeniería de anticuerpos se encuentran: la separación de los fragmentos de unión a antígeno (Fab) de los dominios constantes (Fc), la fusión de las regiones VH y VL para obtener un *single chain fragment variable* (scFv) y así expresar por separado las regiones de reconocimiento antigénico, el intercambio de los CDR entre ratón y humano, y la reducción del tamaño de los anticuerpos [10,14,15]. Otro de los métodos utilizados para la producción de AcMo es la tecnología de *Phage display* que consiste en la exposición de antígenos sobre la superficie de fagos filamentosos [16]. Este método permite el descubrimiento de nuevos blancos mediante la exploración de bibliotecas de miles de millones de fagos que incorporan a su genoma la secuencia de DNA que codifica para la proteína de interés formando parte de su cápside viral; dicha metodología fue acreedora al premio Nobel de Química en 2018 [17,18]. Las bibliotecas de fagos se construyen a partir de cDNA mediante retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) [19,20], los fagos se seleccionan por afinidad a la proteína de interés y su DNA es secuenciado y clonado dentro de vectores plasmídicos de expresión que contengan promotores potentes para la producción de la proteína en una variedad de sistemas biológicos distintos al ratón, principalmente *Escherichia coli*, levaduras, células de mamífero, insectos y plantas [21].

En años recientes se han producido ratones transgénicos que codifican para inmunoglobulinas humanas con alta especificidad y afinidad. La estrategia experimental implementada para tal procedimiento incluye la inserción de un conjunto de genes que codifican para inmunoglobulinas humanas en un cromosoma artificial (bacteriano o de levaduras), en ovocitos o la transfección de células madre. Así mismo, se han generado modelos animales *knock-out* a los que se le han insertado los segmentos V, D, J y C necesarios para la producción de anticuerpos humanos [22].

Los anticuerpos son herramientas útiles en la medicina y la investigación ya que se aplican en diferentes técnicas tales como citometría de flujo, ELISA, *Western blot*, *Dot blot*, inmunofluorescencia y cromatografía de afinidad [23]. Así mismo, los AcMo han sido utilizados para la identificación y caracterización de antígenos celulares superficiales e intracelulares [24], para clasificar y aislar subpoblaciones de células hematopoyéticas [25,26], para el desarrollo de biomarcadores que distinguen células aberrantes o cancerosas de células normales [27–29] y en años recientes, han sido utilizados en el desarrollo de biosensores [30]. En el ámbito terapéutico, hasta el año 2020, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado 81 AcMo para el tratamiento de cáncer, septicemia, infecciones virales, asma, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, hemofilia, mieloma múltiple y anemia drepanocítica [31].

## Materiales y reactivos

### *Materiales biológicos*

- Ratón de la cepa BALB/c de 6-8 semanas, preferentemente hembras.
- Células X63Ag8.653 (American Type Culture Collection ATCC)
- Antígeno (contra el cual se producirá el anticuerpo monoclonal)

**NOTA:** El antígeno puede ser una proteína recombinante, un péptido, un péptido en formato MAPS, un multipéptido, microorganismo, extracto, proteico, etc.

### *Reactivos*

#### Inmunización

- Adyuvante completo (Sigma Aldrich Cat. F5881) e incompleto (Sigma Aldrich Cat. F5506) de

Freund o TiterMax Gold (Sigma Aldrich Cat. T2684). *Immunización de los animales:*

### Cultivo

- Medio DMEM (Sigma Aldrich Cat. D6429).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco Cat. 16000-044).
- DMSO para cultivo celular (Sigma Aldrich Cat. D2438).
- HAT Media Supplement (50×) (Sigma Aldrich Cat. H0262-10VL).
- HT Media Supplement (50×) (Sigma Aldrich Cat. H0137-10VL).
- Polietilenglicol 1500 (PEG) (Sigma Aldrich Cat. P7181).
- Antibiótico/Antimicótico 100X (Gibco Cat. 15240096)
- Botellas de Cultivo de 25 (Corning Cat. CLS430639), 75 y 150 (Corning Cat. CLS430825) cm<sup>3</sup>.
- Tubos cónicos de 15 mL (Corning Cat. CLS430791) y de 50 mL (Corning Cat. CLS430829).
- Crioviales de 1.5 mL (Corning Cat. CLS431416).
- Placas de cultivo de 96 pozos, de poliestireno, fondo plano, estéril con Tapa (Costar Cat. 3599).

### ELISA

- Placas de 96 pozos de alta afinidad EIA/RIA (Costar Cat. CLS3590).
- Anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante (Jackson 115-035-208).
- Leche descremada (Difco Cat. 90002-594).

### Equipo

- Gabinete de bioseguridad II.
- Incubadora de CO<sub>2</sub>.
- Pipeteador automático.
- Microscopio invertido.
- Lector de microplacas.
- Contenedor de Nitrógeno Líquido.
- Ultracongelador de -70 °C.
- Microfuga

### **Procedimiento**

Para producción de anticuerpos monoclonales se requiere un mínimo de 4 mg de antígeno, mismos que serán utilizados a lo largo de todo el proceso. El tiempo total del procedimiento es de aproximadamente 6 meses.

- a) Utilizar un lote de 3 a 5 ratones BALB/c de 6 a 8 semanas para la inmunización. Cada ratón será marcado (cabeza, cola, lomo, etc.) con un hisopo humedecido en solución de ácido pícrico al 0.5% o de la forma que el analista elija.
- b) Preparar una mezcla homogénea del antígeno-adyuvante en un volumen de 200 µL para cada ratón. La concentración del antígeno a utilizar dependerá de la naturaleza del mismo, en promedio se utilizan de 20 a 50 µg/ratón en un volumen de 100 µL (se puede utilizar PBS 7.2 estéril para diluir) mismo que será mezclado en un volumen 1:1 con el adyuvante completo (primera inmunización) o incompleto de Freund (a partir de la segunda inmunización).
- c) La solución preparada será administrada vía intraperitoneal. Las inmunizaciones serán realizadas de forma semanal o quincenal. Para la evaluación de la respuesta inmune, los animales serán sangrados vía retroorbital (o cualquier otra vía de sangrado) en los días 0, 14 y 28 después de iniciar con la inmunización.
- d) El suero colectado será analizado a través de ensayos de ELISA indirecto (como se describe en el siguiente paso). Seleccionar al ratón que tenga los títulos de anticuerpos más altos (≥ 1:4,000).
- e) Días previos a la fusión (3 a 4 días), se realizará una inmunización final con antígeno sin adyuvante, misma que servirá como refuerzo.

### *Evaluación de la respuesta inmune por ELISA*

#### Indirecto:

- a) Preparar la solución del antígeno a la concentración establecida (evaluar inicialmente tres concentraciones diferentes 1, 5 y 10 µg/mL) en solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6. Utilizar un volumen de 100 µL/pozo para sensibilizar la placa de 96 pozos para ELISA de alta afinidad.
- b) Incubar la placa durante toda la noche a 4° C o 2 horas a 37 °C.
- c) Eliminar la solución vertiendo el contenido de los pozos y secar el exceso sobre una gasa o papel absorbente. Lavar la placa 3 veces con 200 µL/pozo de buffer de lavado (PBS-Tween 20 al 0.05%) durante 5 minutos cada uno.

d) Bloquear la placa con 200  $\mu$ L/pozo de leche descremada al 5% diluida en buffer de lavado e incubar durante 30 minutos a 37°C. Repetir el paso "c".

e) Colocar 100  $\mu$ L/pozo de la muestra a evaluar e incubar 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C, incluir los siguientes controles: positivo, negativo y control de conjugado (suero de ratón diluido 1:1000).

**Nota:** Para la evaluación de la respuesta inmune hacer una dilución inicial 1:500 en PBS pH 7.2 y realizar diluciones dobles seriadas para determinar el título de anticuerpos, mientras que los sobrenadantes de cultivo se colocan directamente. Al concluir el tiempo de incubación, repetir el paso "c".

f) Preparar el anticuerpo secundario, anti-gamma globulina total de ratón acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido en buffer de lavado (previa titulación) e incubar a 37°C durante 2 horas. Repetir el paso "c".

g) Preparar la solución de cromógeno/sustrato (4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/4mg de ortophenyldiamine OPD en 10 mL de Buffer de citratos 0.1 M) y colocar 100  $\mu$ L/pozo, incubar durante 90 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, detener la reacción enzimática, con 100  $\mu$ L/pozo de ácido sulfúrico 2N.

h) Medir la densidad óptica a 490 nm en un lector de microplacas y construir una gráfica con los datos obtenidos.

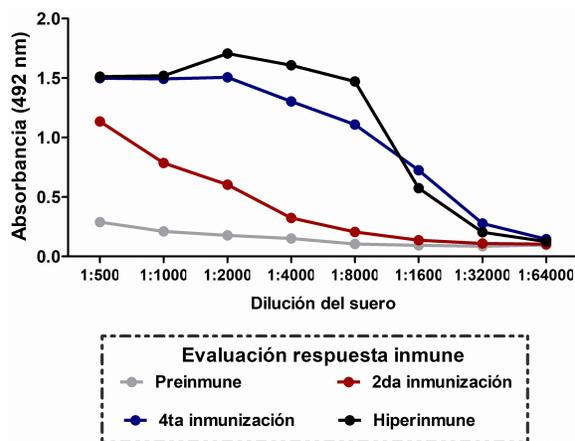


Figura 2.- Gráfica representativa del título de anticuerpos en el suero de un ratón inmunizado.

### Preparación del mieloma X63Ag8.653

A partir de este paso, todos los procedimientos se realizan en gabinete de bioseguridad.

a) Preparar medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10% (referido en el texto como medio DMEM suplementado).

b) Tomar el vial de células de mieloma congeladas y sumergirlo inmediatamente en agua a 37°C.

c) Transferir el contenido del vial a un tubo cónico de 15 mL que contenga 7 mL de medio de cultivo DMEM libre de SFB a 37°C.

d) Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar la solución crioprotectora.

e) Desechar el sobrenadante, resuspender el botón celular en 5 mL de medio de cultivo suplementado y colocar el contenido del tubo en una botella de cultivo de 25 o 75 cm<sup>3</sup> de acuerdo a la cantidad de células obtenidas.

f) Incubar las células a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Expandir las células previo a la fusión, deben encontrarse en fase logarítmica para su uso en este paso. Conservar algunas alícuotas como se describe más adelante.

### Fusión celular

a) Anestesiarse al ratón seleccionado y sangrar a blanco por la vía seleccionada. El suero obtenido será utilizado como control positivo en las siguientes evaluaciones. Finalmente, el ratón será sacrificado por dislocación cervical.

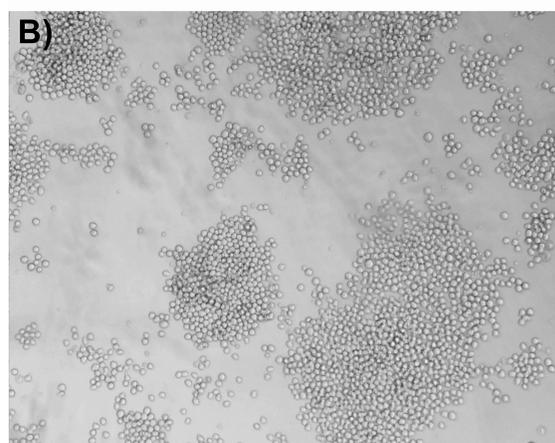
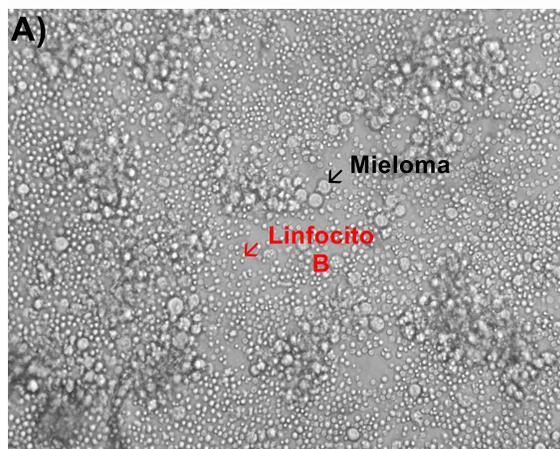
b) Extraer el bazo del ratón y colocarlo en una caja de Petri estéril que contenga 5 mL de medio DMEM y un trozo de tela de organza en la cual se envuelve el bazo, disgregar el tejido con ayuda del émbolo de una jeringa estéril para obtener los linfocitos B.

c) Colocar los linfocitos liberados en un tubo cónico estéril de 50 mL que contenga 30 mL de medio de cultivo DMEM sin suplementar y centrifugar a 2500 rpm 5 minutos a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.

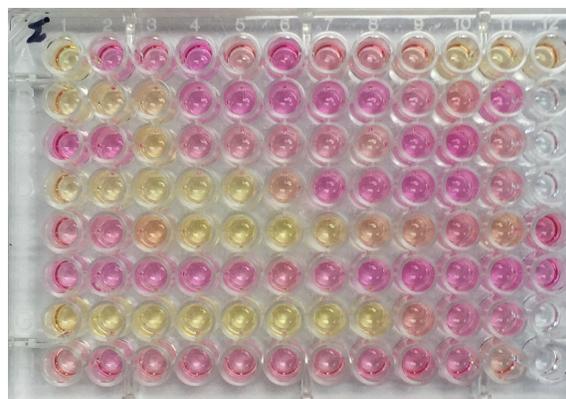
d) Colectar las células de mieloma por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante y resuspender

en 30 mL de medio DMEM sin suplementar. Repetir el paso de centrifugación.

- e) Resuspender los linfocitos y las células de mieloma en 1 mL cada uno y contar el número de células existentes en un hemocitómetro.
- f) Mezclar ambos tipos celulares en proporción 1:5 (1 célula de mieloma por cada 5 linfocitos) en un tubo cónico de 50 mL, aforar a 20 mL utilizando medio DMEM sin suplementar y centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante y disgregar completamente el botón celular con ligeros golpes.
- g) Añadir 1 mL de PEG por goteo durante un minuto e ir mezclando suavemente el tubo que contiene a las células. Durante este paso, el tubo debe mantenerse sumergido en baño de agua a 37°C.
- h) Agregar 5 mL de medio de cultivo DMEM sin suplementar en un lapso de 3 minutos, manteniendo una agitación suave y en baño de agua a 37°C.
- i) Agregar 15 mL de medio DMEM sin suplementar en un lapso de un minuto, manteniendo en agitación suave y en baño maría a 37°C.
- j) Centrifugar la mezcla de células a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
- k) En un recipiente estéril, colocar 98 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10% y 2 mL de solución HAT 50X. Mezclar el botón celular con el medio recién preparado y resuspender suavemente mediante pipeteo.
- l) Distribuir la suspensión celular en 5 placas de cultivo de 96 pozos (200 µL/pozo). Marcar cada placa utilizando números consecutivos e incubar a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.
- m) Las placas serán revisadas diariamente hasta obtener una viabilidad celular entre 60 al 80%, realizando cambios de medio cada tercer día. Se utilizará medio DMEM suplementado con SFB al 10% y HAT 50X durante los primeros 10 días, para posteriormente mantener los híbridos en medio DMEM suplementado con HT durante los siguientes 5 días.
- n) Evaluar por ELISA indirecto, la presencia de anticuerpos específicos contra el antígeno de interés.



**Figura 3.- Fotografías de las células observadas durante el proceso de fusión.** A) Células de mieloma y linfocitos B en las placas de cultivo posterior a la fusión. B) Hibridomas en crecimiento durante la selección bioquímica. Objetivo 10X.



**Figura 4.- Fotografía de una placa de ELISA con sobrenadante de cultivo para la evaluación de híbridos productores de anticuerpos específicos contra el antígeno.** A12; control positivo, G12; control negativo, H12: Control de conjugado.

- o) Expandir los hibridomas positivos en placas de 24, 12 o 6 pozos, posteriormente, expandir las células en botellas de cultivo de 25 o 75 cm<sup>3</sup>.

- p) Criopreservar (como se describe en el siguiente paso) o realizar clonación para la obtención de un solo clon celular (como se describe más adelante).

#### *Criopreservación*

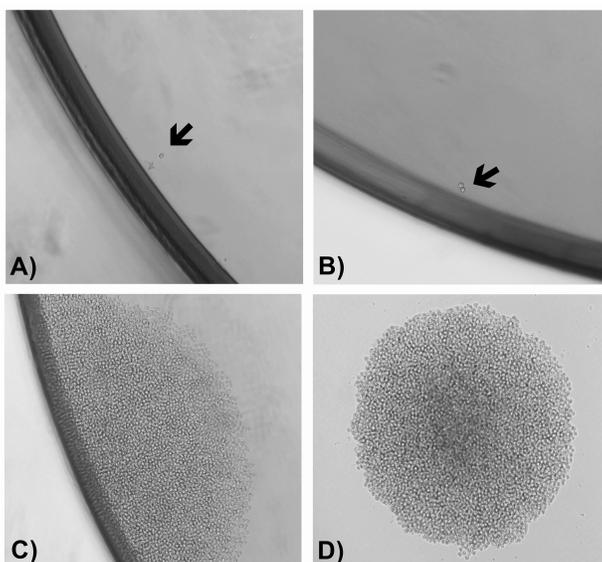
- Se utilizarán hibridomas positivos, con una confluencia >80% y en fase logarítmica.
- Obtener las células por centrifugación (2500 rpm durante 10 minutos) y desechar el sobrenadante.
- Preparar la solución crioprotectora: 90% de SFB con 10% de DMSO y mantener en un baño de hielo.
- Adicionar 1 mL de solución crioprotectora fría por cada  $1 \times 10^6$  células/mL, mezclar suavemente con la micropipeta y vaciar en un criotubo debidamente rotulado.
- Colocar el criovial en una caja de unicel e incubar a  $-70^\circ\text{C}$ , después de 24 horas transferir a nitrógeno líquido.

#### *Clonación por dilución limitante*

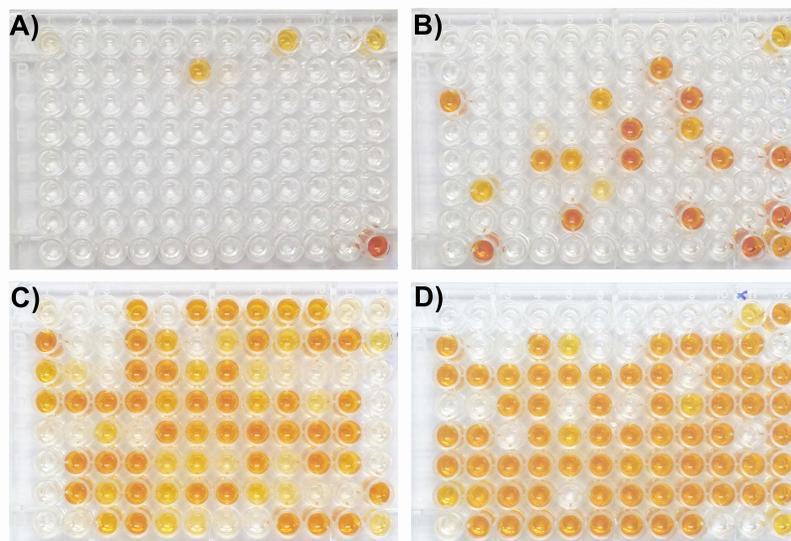
- En una placa de cultivo nueva (placa de clonación), colocar 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo DMEM suplementado en toda la fila A (desde A1 hasta A12).
- Localizar en las placas de cultivo aquellos pozos que fueron positivos por ELISA y observar al

microscopio. Seleccionar los pozos que se van a clonar.

- Dentro del gabinete de seguridad, resuspender las células del pozo y tomar 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y colocarlos en el pozo A1 de la placa de clonación.
- Mezclar suavemente por pipeteo en al menos 5 ocasiones y transferir 100  $\mu\text{L}$  al pozo A2. Repetir este paso, hasta llegar al pozo A12 donde los últimos 100  $\mu\text{L}$  serán desechados. Dejar reposar 10 minutos.
- Tapar la placa y observarla al microscopio invertido, marcar el pozo donde se encuentren aproximadamente entre 30 y 40 células viables.
- Colocar el contenido del pozo seleccionado de la placa de clonación en 18 mL de medio DMEM suplementado, mezclar suavemente y colocar 200  $\mu\text{L}$  en los pozos restantes de la placa (B1-H12). Incubar a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%.
- A partir del día 5, marcar aquellos pozos de la placa que tienen una sola clona. Cuando exista una confluencia >60% evaluar nuevamente el sobrenadante de cultivo por ELISA indirecto, para detectar en que pozos de la placa de clonación se encuentran híbridos productores de anticuerpos contra el antígeno de interés.
- Repetir el proceso de clonación al menos en dos ocasiones o hasta asegurar la monoclonalidad.



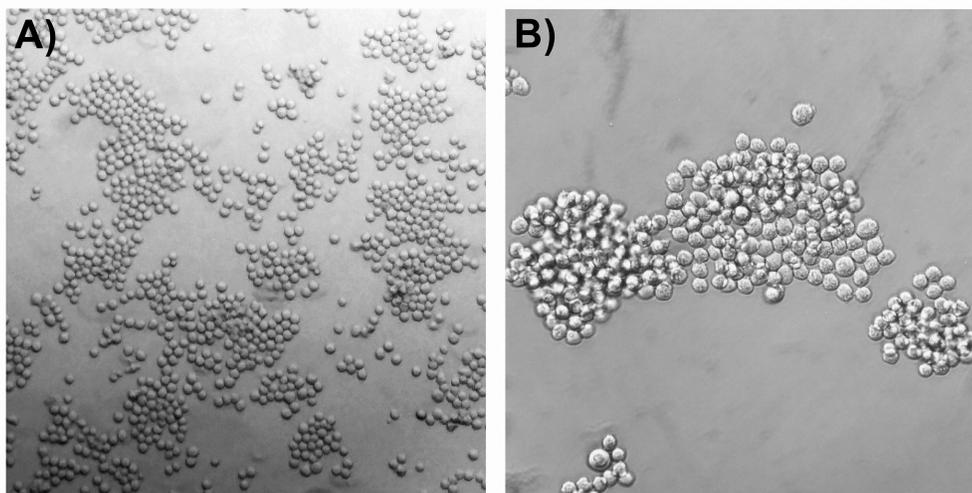
**Figura 5.- Clonación celular. Hibridomas durante el proceso de clonación. A-C) Días 2, 3 y 8 posterior a la clonación. D) Observación de un solo clon celular.**



**Figura 6.- Evaluaciones por ELISA.** A) Imagen representativa de la evaluación de la producción de anticuerpos específicos posterior a la fusión. A12: control positivo, G12: control negativo, H12: control de conjugado. B-D) Imagen representativa de la evaluación por ELISA del proceso de clonación por dilución limitante. B) Primera clonación, C-D) Segunda clonación.

*Expansión clonal y purificación de los anticuerpos monoclonales*

- a) Ubicar en la placa de clonación, aquellos pozos positivos en ELISA y transferir los hibridomas a una botella de cultivo de 25 o 75 cm<sup>3</sup>.
- b) Criopreservar la clona, coleccionar el sobrenadante de cultivo y almacenar a - 20 °C hasta su uso.
- c) Realizar evaluaciones por ELISA para asegurar que la clona siga produciendo anticuerpos.
- d) Comprobar la clase y subclase de inmunoglobulina que produce el hibridoma por ELISA utilizando anticuerpos conjugados específicos de cada clase.



**Figura 7.- Observación de hibridomas al microscopio.** Hibridomas confluentes en cultivo durante el proceso de expansión clonal. Objetivos 10x (A) y 20x (B).

- e) La purificación del anticuerpo monoclonal se realiza por cromatografía de afinidad utilizando columnas de proteína A o G acoplados a sefarosa (dependiendo de la subclase de IgG) o HiTrap (IgM).
- f) Una vez obtenido el anticuerpo, se realiza una electroforesis en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie o plata para verificar la pureza.
- g) Comprobar la actividad biológica del anticuerpo purificado por ELISA, *Western blot*, *Dot Blot* y se procede a realizar la validación para la técnica a implementar.

Tabla 1.- Posibles problemas técnicos durante el proceso de producción de AcMo

Paso	Problema	Posible razón	Solución
<b>Inmunización</b>	Ninguno de los ratones genera suficiente título de anticuerpos contra el antígeno.	Baja concentración de antígeno. Tipo de Adyuvante usado en la inmunización. Tiempo y número de inmunizaciones.	Aumentar la concentración de antígeno o cambiar el adyuvante. Modificar el esquema y tiempos de inmunización.
<b>Evaluación de la producción de anticuerpos por ELISA</b>	Los hibridomas o clonas dejan de producir anticuerpos monoclonales.	Degradación del antígeno. Inestabilidad de los híbridos o las clonas.	Preparar una alícuota nueva del antígeno. Fraccionar el antígeno, evitar pasos de congelación y descongelación. Descongelar una nueva alícuota del hibridoma.
<b>Mantenimiento de los hibridomas</b>	Contaminación de la línea celular.	No se siguieron las medidas de higiene necesarias. Material contaminado.	Descongelar una nueva alícuota del hibridoma. Introducir el hibridoma a un ratón BALB/c.

## Referencias

- Ma H, O'Kennedy R. (2015) *The structure of Natural and Recombinant Antibodies. Peptide Antibodies*. Methods in Molecular Biology, vol 1348. Springer New York.
- Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM, Aparicio Alonso P. (2008) Roitt. Inmunología. Fundamentos (11a edición). Inmunología. 212-4.
- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J Natl Res Counc Inst Lab Anim Resour*. **46**, 258-68.
- Köhler G, Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**, 495-7.
- Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K. (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol Baltim Md*. **123**, 1548-50.
- Shulman M, Wilde CD, Köhler G. (1978) A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*. **276**, 269-70.
- Stoicheva NG, Hui SW. (1994) Electrically induced fusion of mammalian cells in the presence of polyethylene glycol. *J Membr Biol*. **141**, 177-82.
- Holzöhner P, Hanack K. (2017) Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *J Vis Exp*. **2**, 54832.
- Gavilondo Cowley JV. (1995) Anticuerpos monoclonales. La Habana: Elfos Scientiae.
- Álvarez-Vallina L. (2004) Anticuerpos monoclonales: realidades y perspectivas. Madrid: Editorial Complutense.
- Klee GG. (2000) Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med*. **124**, 921-3.
- Hudson PJ, Souriau C. (2003) Engineered antibodies. *Nat Med*. **9**, 129-34.
- Padlan EA. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*. **31**, 169-217.
- Sandhu JS. (1992) Protein Engineering of Antibodies. *Crit Rev Biotechnol*. **12**, 437-62.
- Dall'Acqua W, Carter P. (1998) Antibody engineering. *Curr Opin Struct Biol*. **8**, 443-50.
- Smith G. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. **228**, 1315-7.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. **348**, 552-4.
- Parmley SF, Smith GP. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*. **73**, 305-18.
- de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, et al. (1999) A Large Non-immunized Human Fab Fragment Phage Library That Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies. *J Biol Chem*. **274**, 18218-30.
- Wu C-H, Liu I-J, Lu R-M, Wu H-C. (2016) Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *J Biomed Sci*. **23**, 8.
- Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. (2013) Expression of Recombinant Antibodies. *Front Immunol*. **4**, 217.
- Brüggemann M, Osborn MJ, Ma B, Hayre J, Avis S, Lundstrom B, et al. (2015) Human Antibody Production in Transgenic Animals. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. **63**, 101-8.
- Basu K, Green EM, Cheng Y, Craik CS. (2019) Why recombinant antibodies — benefits and applications. *Curr Opin Biotechnol*. **60**, 153-8.

24. Matesanz-Isabel J, Sintes J, Llinàs L, de Salort J, Lázaro A, Engel P. (2011) New B-cell CD molecules. *Immunol Lett.* **134**, 104–12.
25. Kung P, Goldstein G, Reinherz E, Schlossman S. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science.* **206**, 347–9.
26. Meuer S, Hussey R, Hodgdon J, Hercend T, Schlossman S, Reinherz E. (1982) Surface structures involved in target recognition by human cytotoxic T lymphocytes. *Science.* **218**, 471–3.
27. Bok RA, Small EJ. (2002) Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat Rev Cancer.* **2**, 918–26.
28. Wagner PD, Maruvada P, Srivastava S. (2004) Molecular diagnostics: a new frontier in cancer prevention. *Expert Rev Mol Diagn.* **4**, 503–11.
29. Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF. (1996) A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* **157**, 3980–7.
30. Afsahi S, Lerner MB, Goldstein JM, Lee J, Tang X, Bagarozzi DA, et al. (2018) Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. *Biosens Bioelectron.* **100**, 85–8.
31. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-J, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J, et al. (2020) Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* **27**, 1.



**M. en C. YOLANDA MEDINA FLORES**

**ID ORCID: 0000-0003-1582-9236**

Bióloga por la Facultad de Ciencias y Maestría con especialidad en Biología Celular, por parte de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Su trabajo lo ha realizado en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud (InDRE), en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales (ACMO), produciendo estas moléculas contra diversos agentes infecciosos (*Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Trichomona vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *Trichinella spiralis*, *Taenia solium*, *Entamoeba invadens*, *Toxocara canis*, *Salmonella* sp, *Babesia* sp.)

También se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra hormona luteinizante y

prolactina ovina, prostaglandina E2 humana, proteínas marcadoras de Amiloidosis primaria y proteínas REST y p16 como marcadoras de algunos tipos de cáncer.

Ha organizado 23 Talleres Internacionales en Producción de Anticuerpos Monoclonales contra Agentes Infecciosos, 5 Talleres Nacionales y más 30 seminarios en diferentes foros sobre uso y aplicación de los anticuerpos monoclonales. 1 Estancia de 6 meses en la Universidad Central del Ecuador transfiriendo la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales.

Su trabajo está descrito en 15 publicaciones internacionales, 3 libros y 2 capítulos de libros y se han graduado más de 40 estudiantes de las licenciaturas de Biología, Química, Químico Farmacéutico Biólogo, Biotecnología y, Nanotecnología, de licenciatura, maestría y doctorado en colaboración con diferentes instituciones del país (IPN, UNAM, Universidad Autónoma de Querétaro, Universidad Autónoma de Guerrero entre otros). Cuenta con 5 solicitudes de patente Internacionales al IMPI.

Le han sido otorgados el Premio: Mujeres Mexicanas Inventoras e Innovadoras. Emisión Iris Estrada 2008. Categoría Técnico-Científica. Primer Lugar “Desarrollo de una Técnica de Diagnóstico para el Virus de Papiloma Humano Utilizando Anticuerpos Monoclonales Marcados con un Fluorocromo de Bajo Costo” además del reconocimiento Laboratorios Kener, José Luis Gonzales Gonzales al “Premio al Mérito en Salud” el 17 de noviembre del 2010.