

Construcción de un mapa antigénico de la hormona gonadotropina coriónica humana

J.M. Rodríguez Frade, L. Kremer, J.P. Albar, J.E. Martín-Oar y R. Llopis

Instituto Kabi de Biotecnología. Madrid.

Introducción

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glicoproteica de 38 kD, secreta por la placenta a lo largo del embarazo. Esta hormona está estructuralmente relacionada con las hormonas luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y estimulante de tiroides (TSH). Todas ellas están compuestas por dos subunidades distintas, unidas no covalentemente, denominadas alfa y beta¹⁻³. La subunidad alfa, que es compartida por las 4 hormonas está codificada por un gen único. En contraste, las subunidades beta son específicas de cada hormona y en el caso de la hCG se han descrito hasta 7 genes que podrían codificar para dicha subunidad⁴. Las secuencias de las 4 subunidades beta presentan diferentes grados de homología. Así, por ejemplo, la subunidad beta de la LH (116 aminoácidos) y de la hCG (147 aminoácidos) presentan un 80 % de identidad en la parte de secuencia común, difiriendo, principalmente, en un péptido carboxilo terminal de 30 aminoácidos presente en la subunidad beta de la hCG y ausente en la LH. La actividad de cada hormona se expresa únicamente después de la interacción específica, no covalente, de las dos subunidades⁵.

Aunque las funciones fisiológicas de la hCG están aún por clarificar, existe un conjunto de evidencias que demuestran que desempeña un papel determinante en el desarrollo de una gestación normal⁶. En la actualidad la hCG constituye una de las dianas elegidas por la OMS para el control de la fertilidad humana.

En ausencia de datos cristalográficos resulta esencial disponer de un mapa antigénico detallado de la mayor parte de la superficie de la hCG. En este contexto, describimos en esta comunicación nuestros intentos para mostrar evidencias directas de que ratones de la cepa Balb/c generan un gran repertorio de anticuerpos con especificidades diferentes que, en su conjunto, cubren más del 65 % de la superficie estimada de la hormona nativa. Nuestras

conclusiones se basan en un estudio particularmente detallado de las orientaciones relativas de los sitios de unión de un grupo de 25 Acm anti-hCG. Los detalles finos del mapa antigénico obtenido se están resolviendo con la ayuda de los anticuerpos antiidiotipo de cada Acm y de un conjunto de 221 péptidos sintéticos que abarcan, superponiéndose, la totalidad de la estructura primaria de la proteína.

Métodos

Inmunizaciones

Los ratones Balb/c se inmunizaron con una emulsión de gonadotropina coriónica humana en adyuvante de Freund completo. Las pautas de inmunización tuvieron una duración variable entre 15 días y un año, con inyecciones de recuerdo intraperitoneales mensuales de 50 µg de hCG en adyuvante incompleto de Freund. Los días 4, 3 y 2 antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección de recuerdo intravenosa de 100 µg de hCG en solución salina.

Fusiones celulares

Se realizaron 8 fusiones celulares entre esplenocitos de ratones inmunizados y diferentes mielomas murinos no productores de inmunoglobulinas⁷⁻⁹. La selección de hibridomas productores de anticuerpos frente a hCG se realizó analizando los sobrenadantes de cultivo mediante técnicas de ELISA y/o RIA. Los hibridomas se clonaron varias veces por dilución límite hasta conseguir una producción estable de inmunoglobulina.

Producción y caracterización de los anticuerpos monoclonales

Los diferentes hibridomas se expandieron y se inyectaron intraperitonealmente en ratones

TABLA I
ENSAYO TIPO «SANDWICH»

Anticuerpo adsorbido a la fase sólida	Anticuerpo marcado con biotina (D.O. 492 nm)					
	KF-hCG 1	KF-hCG 18	KF-hCG 20	KF-hCG 22	KF-hCG 23	KF-hCG 24
KF-hCG 1	0,005	0,005	0,010	0,015	0,010	0,015
KF-hCG 18	1,870	0,030	1,050	1,300	0,030	1,200
KF-hCG 20	0,005	0,005	0,005	0,016	0,005	0,020
KF-hCG 22	1,070	0,770	1,900	0,080	0,850	1,820
KF-hCG 23	0,980	0,030	2,000	1,300	0,070	2,000
KF-hCG 24	0,450	0,250	0,070	0,430	0,520	0,060

Un primer anticuerpo monoclonal se adsorbió a un pocillo de una placa *microtitre* (100 μ l / pocillo a una concentración de 3 μ g / ml en 0,15 mM NaCl, 10 mM fosfato sódico, pH 7,4 [PBS]). Después de bloquear los sitios de unión restantes con BSA, se incubó durante 90 minutos a 37 °C con hCG. Después de lavar la placa, un segundo anticuerpo marcado con biotina se añadió e incubó durante 90 minutos adicionales a 37 °C. Finalmente, la reacción se reveló con avidina marcada con peroxidasa y OPD como sustrato. Se consideraron positivas aquellas señales iguales o superiores a cinco veces las observadas en ausencia de hCG. Todos los controles en los que o bien se empleó como segundo Acm el mismo que servía para tapizar o aquellos en los que no se incluyó el primer Acm siempre dieron negativos.

Balb/c para producir líquidos ascíticos que se purificaron por precipitación con sulfato amónico y cromatografía de afinidad con proteína A-sepharosa. Los anticuerpos monoclonales purificados se conjugaron posteriormente a biotina¹⁰. Los diferentes anticuerpos monoclonales se caracterizaron determinando sus afinidades^{11,12}, clase y subclase de inmunoglobulina (inmunodifusión radial) así como sus reacciones cruzadas frente a LH, TSH, FSH y las subunidades alfa y beta de la hCG. El anticuerpo monoclonal FB12, que nos fue suministrado por el Dr. J.M. Bidart (Villejuif, Francia), reconoce la región 111-116 del péptido carboxilo terminal (aminoácidos 109-145) de la subunidad beta de la hCG¹³.

Anticuerpos antiidiotipo

Los anticuerpos antiidiotipo de los diferentes Acm se obtuvieron en conejos neozelandeses utilizando como inmunógeno la porción F (ab')2

de los correspondientes Acm¹⁴. Las actividades antiisotípicas de los sueros inmunes antiidiotípicos se eliminaron por inmuoabsorción frente a inmunoglobulinas normales de ratón. Los anticuerpos antiidiotipo se caracterizaron por ELISA y RIA para: a) comprobar la ausencia de actividad antiisotípica; b) analizar el conjunto de reactividades cruzadas con los diferentes idiotipos y c) evidenciar la inhibición, por los anticuerpos antiidiotipo, de la unión de la hormona con cada anticuerpo específico.

Péptidos sintéticos

Los 137 nonapéptidos que abarcan, superponiéndose, la totalidad de la estructura primaria de la subunidad beta de la hCG así como los 84 que corresponden a la subunidad alfa, se sintetizaron sobre varillas de poliestireno recubiertas con ácido poliacrílico (Rob Meloen et al, manuscrito en preparación). El péptido correspondiente a los aminoácidos 109-145 de la

TABLA II
ENSAYO COMPETITIVO

Anticuerpo sin marcar	Anticuerpo marcado con biotina (D.O. 492 nm)					
	KF-hCG 1	KF-hCG 18	KF-hCG 20	KF-hCG 22	KF-hCG 23	KF-hCG 24
KF-hCG 1	0,060	1,030	1,400	0,940	1,040	1,050
KF-hCG 18	0,340	0,080	1,650	0,950	1,040	0,990
KF-hCG 20	0,350	1,160	0,110	0,910	0,850	1,540
KF-hCG 22	0,360	1,070	2,000	0,060	1,000	1,060
KF-hCG 23	0,300	0,320	1,800	0,750	0,050	1,110
KF-hCG 24	0,395	1,190	0,390	1,090	0,810	0,070
	0,250	1,190	1,260	1,000	1,080	1,030

Una preparación de hCG (5 µg/ml en 0,1 M NaHCO₃, pH 9,6) se adsorbió a las placas *microtitre*. Después de bloquear los posibles sitios de unión inespecíficos con BSA, se añadieron simultáneamente dos Acm purificados, uno marcado con biotina y el otro no marcado. Se trabajó siempre en la zona de máxima sensibilidad del ensayo. Las placas se incubaron 90 minutos a 37 °C y después de lavarlas se revelaron con avidina marcada con peroxidasa y OPD. La obtención de una señal inferior a la mitad de la obtenida en ausencia de Acm no marcado indica una clara competición. Se hicieron controles que incluían el mismo anticuerpo marcado y no marcado, y otros en los que se competía con inmunoglobulinas inespecíficas de ratón.

región carboxilo terminal de la subunidad beta de la hCG, nos fue gentilmente donado por el Dr. J.M. Bidart, Villejuif, Francia.

Ensayos de unión simultánea

La capacidad de cada par de anticuerpos para unirse simultáneamente a una molécula de hormona se estudió mediante los siguientes tipos de ensayos: a) ensayo tipo «sandwich»; b) ensayo competitivo y c) ensayo cooperativo.

La descripción de estos ensayos se encuentra en las tablas I-III, respectivamente.

Resultados

Preparación de hibridomas productores de Acm anti-hCG

En la tabla IV se resumen los resultados de las ocho fusiones realizadas entre esplenocitos

de ratones Balb/c inmunizados con hCG y diferentes mielomas murinos no productores de inmunoglobulina.

En este trabajo se han empleado tres líneas diferentes de mielomas no productores. La línea celular FO, como puede observarse en la tabla IV, es la que muestra mayor eficiencia de fusión. Por otra parte, la línea 653 da lugar a híbridos más estables que los obtenidos con FO. La línea 653 neo^R es muy similar en su comportamiento a la 653 pero, además, proporciona híbridos resistentes al antibiótico G-418.

Los tiempos de inmunización empleados oscilaron entre 15 días y un año. Los anticuerpos monoclonales de mayor afinidad derivaron de fusiones en las que los ratones habían experimentado pautas de inmunización de más de 150 días. La eficiencia de hibridación específica osciló entre el 7 y el 35 %. Este dato resulta difícil de correlacionar con otras variables, ya que las cuatro primeras fusiones se analizaron mediante un ELISA en el que la hCG se adsorbió

TABLA III
ENSAYO COOPERATIVO

Anticuerpo unido a la fase sólida	Anticuerpo preincubado con hCG ^{125-I}						
	KF-hCG 1	KF-hCG 18	KF-hCG 20	KF-hCG 22	KF-hCG 23	KF-hCG 24	
KF-hCG 1	1,100	3,770	4,090	4,600	5,600	4,080	1,330
KF-hCG 18	9,580	1,440	9,220	13,920	7,430	9,470	9,870
KF-hCG 20	5,730	5,980	1,540	9,400	8,740	1,390	3,320
KF-hCG 22	4,990	5,720	6,580	1,630	4,430	4,420	2,570
KF-hCG 23	7,370	1,420	9,110	8,040	3,080	8,440	4,770
KF-hCG 24	5,520	9,710	3,640	15,400	13,980	1,600	5,180

Un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón purificado por afinidad (10 µg/ml en PBS), se adsorbió a una placa *microtitre* y, después de bloquear los sitios de unión residuales con BSA, se incubó con un sobrenadante de cultivo que contenía un primer Acm anti-hCG. Simultáneamente, en un tubo aparte, hCG marcada con ¹²⁵I se incubó toda la noche a 4 °C con una dilución de un segundo anticuerpo. Después de lavar la placa que contenía la hormona marcada y el segundo anticuerpo, se incubó 2 horas adicionales a 37 °C. Tras un último lavado se contó en un contador la radiactividad retenida. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm) retenidas por la fase sólida.

a las placas de *microtitre* mientras que las cuatro restantes se analizaron mediante un RIA en el que no se detectaban la mayor parte de los mAbs con afinidad inferior a 10⁸M⁻¹.

Caracterización de los Acm anti-hCG

Nuestro laboratorio posee en la actualidad más de 1.000 hibridomas productores de Acm anti-hCG. El presente estudio se ha realizado con 26 de estos hibridomas que se seleccionaron en función de la especificidad, afinidad y título de los sobrenadantes de los híbridos no clonados. Los anticuerpos producidos por estos híbridos se clasificaron inicialmente en 3 grupos, dependiendo de las propiedades que manifestaban en cuanto al reconocimiento de la hormona intacta y cada una de las subunidades. En la tabla V se resumen los datos de afinidad, especificidad y reacciones cruzadas con la hormona LH de estos monoclonales. Como puede apreciarse las constantes de afinidad oscilan entre 5 × 10¹⁰ M⁻¹ y valores inferiores a

10⁷ M⁻¹. Las reacciones cruzadas con la LH van del 100 % hasta menos del 0,1 %. Únicamente los anticuerpos específicos de la subunidad alfa reconocen, igualmente, las hormonas TSH y FSH. Por otra parte, los anticuerpos KF-hCG-1, 26 y 12 son los únicos capaces de reconocer el péptido carboxilo terminal cuando éste se adsorbe a una fase sólida (dato no mostrado). Este último resultado ha sido confirmado por Rob Meloen et al (manuscrito en preparación) que han podido demostrar que existen secuencias específicas presentes en el péptido carboxilo terminal con capacidad de interaccionar con los Acm KF-hCG-1, 12 y 26. Todos los Acm estudiados son IgG1, k con la excepción del KF-hCG-7 que es una Ig2b, k.

Ensayos de unión simultánea

Cuando dos Acm son capaces de unirse simultáneamente a un molécula que no presenta epítomos repetidos, los epítomos reconocidos deben ser diferentes y encontrarse a cierta distancia sobre la superficie de la molécula anti-

TABLE IV
OBTENCIÓN DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
ANTI-hCG

Número de fusión	1	2	3	4	7	8	9	10
Mieloma		653				FO	653	653 neoR
Período de inmunización (días)	18	150	150	150	150	360	360	360
Número de ratones empleados	5	3	2	2	2	1	1	1
Pocillos crecidos/ pocillos totales	180/190	340/530	80/500	40/160	710/720	710/720	828/940	614/926
Pocillos hCG- positivos	64	39	4	3	108	167	246	208
Porcentaje hCG positivos / crecidos	35	11	13	8	15	23	26	22
Rango de constantes de afinidad (M^{-1})		10^6 — 10^8					10^9 — 10^{10}	

génica. Tomando como base este razonamiento hemos construido un mapa antigénico de la hCG a partir de la comparación de los patrones de unión de los diferentes Acm. En nuestra experiencia, especialmente cuando se maneja un gran número de Acm, la elaboración de dichos patrones no constituye un proceso trivial carente de ambigüedades. En la práctica, y a fin de eliminar tales ambigüedades, nos hemos visto obligados a diseñar tres inmunoanálisis, conceptualmente diferentes, que tomados en su conjunto, obvian las limitaciones de cada uno tomado individualmente. Debemos indicar que en ningún caso se obtuvieron resultados contradictorios entre los diferentes ensayos, aunque con ciertas parejas únicamente fue posible mostrar posibilidad o imposibilidad de unión simultánea a la hormona en un tipo de ensayo. En general, los resultados poco claros obtenidos en un determinado ensayo se han debido a características de cada anticuerpo tales como su interacción con las fases sólidas, su constante de afinidad, la cantidad de anticuerpo activo presente en cada preparación y a diferencias en la naturaleza de la interacción antígeno-anticuerpo cuando la hormona se encuentra adsorbida a una fase sólida o en solución. En la figura 1 se esquematizan los diferentes ensayos empleados en este estudio.

Hemos decidido presentar los datos numéricos de seis de nuestros Acm (KF-hCG-1, 18, 20, 22, 23 y 24) que, de alguna forma, resumen las características observadas en las 625 parejas estudiadas.

Ensayo tipo «sandwich»

En la tabla I se muestran los datos obtenidos en este tipo de ensayo, con los seis Acm tomados como ejemplo. Se puede observar que las parejas KF-hCG-1/20, KF-hCG-18/23 y KF-hCG-20/24 parecen no unirse simultáneamente a la hormona. En ningún caso se observa señal positiva cuando los Acm KF-hCG-1 y 20 se encuentran en la fase sólida; sin embargo, tanto el uno como el otro son capaces de dar señales indicativas de unión simultánea cuando se utilizan, marcados con biotina, como segundos anticuerpos.

Resulta interesante remarcar que los niveles de señal obtenidos en este ensayo no dependen necesariamente de las afinidades de los anticuerpos unidos a la fase sólida o marcados con biotina. En la tabla I se puede observar que el anticuerpo KF-hCG-24, marcado con biotina ofrece una señal más alta cuando se utiliza con el anticuerpo KF-hCG-23 ($K_a = 2 \times 10^9 M^{-1}$)

TABLA V
PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-hCG

<i>Acm</i>	<i>Número de fusión</i>	<i>Constante de afinidad (M⁻¹)</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Reacción cruzada con LH (%)</i>
KF-hCG-1	1	<10 ⁷	βhCG / hCG ^a	<0,1
KF-hCG-2	2	8×10 ⁶	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-6	7	2×10 ⁹	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-8	8	6×10 ⁹	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-11	2	<10 ⁷	βhCG / hCG	100
KF-hCG-12	3	<10 ⁷	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-13	2	<10 ⁷	βhCG / hCG	100
KF-hCG-14	2	<10 ⁷	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-16	7	5×10 ⁹	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-17	8	5×10 ¹⁰	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-18	8	3,5×10 ¹⁰	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-19	8	5,5×10 ⁹	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-23	8	2×10 ⁹	βhCG / hCG	100
KF-hCG-26	7	<10 ⁷	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-27	10	2×10 ¹⁰	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-28	9	2×10 ⁹	βhCG / hCG	<0,1
KF-hCG-4	4	<10 ⁷	αhCG / hCG ^b	100
KF-hCG-9	3	<10 ⁷	αhCG / hCG	100
KF-hCG-21	8	2×10 ¹⁰	αhCG / hCG	100
KF-hCG-24	8	6,5×10 ⁹	αhCG / hCG	100
KF-hCG-5	7	1,5×10 ⁶	α+β hCG ^c	60
KF-hCG-7	7	2×10 ⁶	α+β hCG	60
KF-hCG-15	7	4×10 ⁷	α+β hCG	100
KF-hCG-20	8	1,5×10 ⁹	α+β hCG	<0,1
KF-hCG-22	8	5,5×10 ⁹	α+β hCG	50
KF-hCG-25	10	9,5×10 ⁹	α+β hCG	5

a) El Acm reconoce tanto la subunidad beta de la hCG como la hCG intacta. b) El Acm reconoce tanto la subunidad alfa de la hCG como la hCG intacta. c) El Acm reconoce únicamente la hCG intacta.

que cuando se utiliza con el anticuerpo KF-hCG-18 ($K_a = 3,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$).

Ensayo competitivo

En la tabla II se recogen los resultados obtenidos con los seis Acm elegidos. Como puede observarse, algunas parejas (KF-hCG-18/23 y KF-hCG-20/24) compiten únicamente en una dirección. Ningún anticuerpo es capaz de inhibir significativamente las señales proporcionadas por la unión de los anticuerpos KF-hCG-1 y 22 marcados con biotina. En algunos casos se observan ligeras disminuciones de señal que pueden deberse a impedimentos estéricos, ya que mayores concentraciones del anticuerpo competidor no conducen a una mayor disminución de la señal.

Ensayo cooperativo

Los resultados del ensayo cooperativo para los seis Acm tomados como ejemplo se describen en la tabla III. En algunos casos en los que los Acm tienen afinidades bajas o medias, las cooperaciones son particularmente evidentes, es el caso de, por ejemplo, las parejas KF-hCG-1/23, KF-hCG-20/22 y KF-hCG-22/24. Las parejas KF-hCG-20/24 y KF-hCG-23/18 parecen competir por el sitio de unión, ya que la cantidad de hormona unida es inferior a la que cada anticuerpo es capaz de retener por él mismo.

Frecuentemente hemos encontrado diferencias significativas en los resultados obtenidos cuando se invierten los componentes de la pareja. En estos casos, la cooperación no se observa cuando un anticuerpo de muy alta afini-

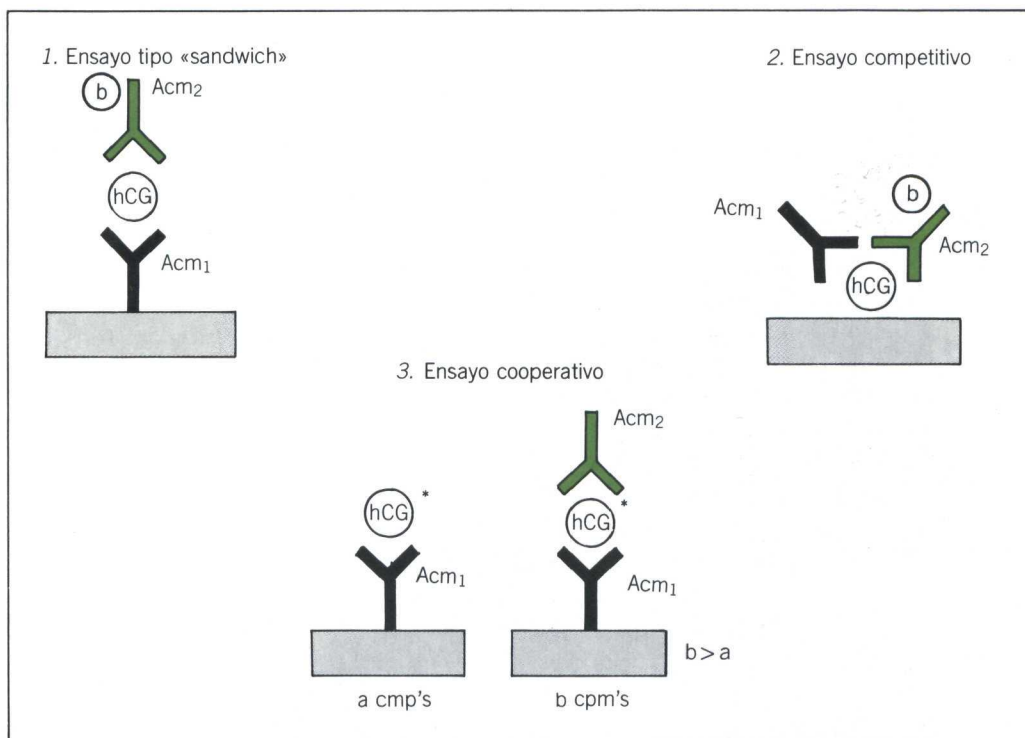


Fig. 1. Esquema de los ensayos de unión simultánea. El símbolo *b* indica que el anticuerpo está marcado con biotina. El símbolo * indica que la hormona está marcada con ¹²⁵I.

dad se encuentra en la fase sólida. Las parejas KF-hCG-1/18, KF-hCG-1/24, KF-hCG-18/20 y KF-hCG-18/24 constituyen ejemplos de este efecto.

Resumen del conjunto de ensayos de unión simultánea

En la figura 2 se resume el conjunto de los datos obtenidos para las 625 parejas estudiadas en los tres ensayos descritos previamente. Los resultados de los ensayos tipo «sandwich» o cooperativo son de clara interpretación únicamente cuando se han obtenido señales positivas al menos en uno de los sentidos. En estos casos, se concluye que ha existido una unión simultánea de ambos Acm. La interpretación del ensayo competitivo es únicamente clara en aquellos casos en que se observa una competición al menos en un sentido. Cuando ello sucede, se concluye que existe una imposibilidad de unión simultánea de ambos Acm. En ningún caso hemos observado resultados contradicto-

rios entre los diferentes ensayos aunque, en algunas ocasiones, únicamente hemos podido demostrar la unión simultánea de una pareja de anticuerpos a la hormona en un determinado tipo de ensayo. La pareja, por ejemplo, KF-hCG-27/11, no puede unirse simultáneamente a la hormona porque en el ensayo competitivo muestra una clara competición. La no unión simultánea en el ensayo tipo «sandwich» confirmaría este resultado pero por ella misma no significaría nada. La pareja KF-hCG-26/22 sería capaz de unirse simultáneamente a la hormona porque en el ensayo cooperativo hay una clara cooperación, aunque en el ensayo tipo «sandwich» no se obtenga señal. Por otra parte, la pareja KF-hCG-17/7, es capaz de unirse simultáneamente a la hormona porque en el ensayo tipo «sandwich» se obtiene una señal clara. El resultado del ensayo competitivo en este caso es coherente con el resultado anterior, pero por sí mismo no sería concluyente.

En la figura 3 se muestra el resumen de los diferentes comportamientos de unión simultá-

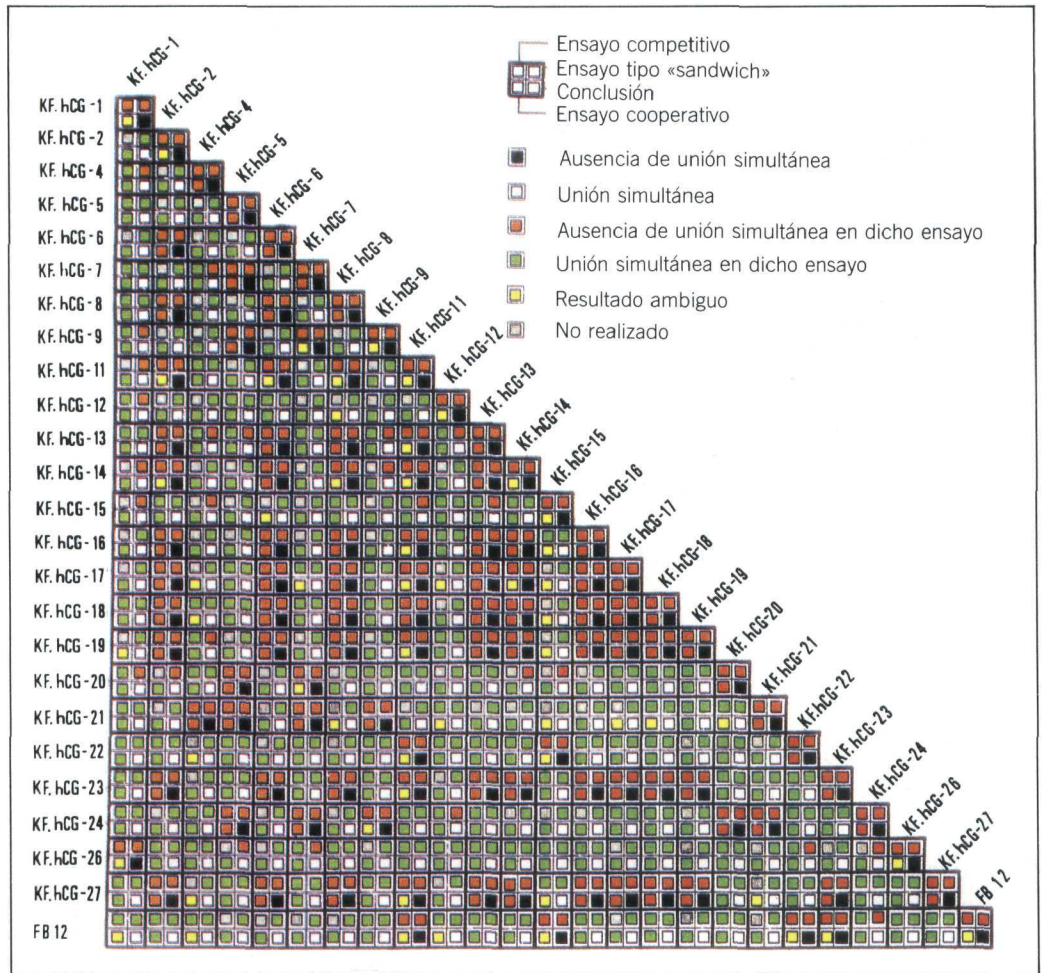


Fig. 2. Resumen del conjunto de ensayos de unión simultánea. En esta figura se resume para cada pareja de anticuerpos el conjunto de los resultados de los diferentes ensayos de unión simultánea. Cada uno de los cuadros, correspondientes a una pareja de anticuerpos, está subdividido en cuatro partes. El cuadrante superior derecho indica el resultado el ensayo tipo «sandwich»; el cuadrante superior izquierdo el resultado del ensayo competitivo; el cuadrante inferior izquierdo el resultado del ensayo cooperativo y el cuadrante inferior derecho la interpretación del conjunto de los tres ensayos.

nea a la hormona. Hemos identificado 13 comportamientos de unión diferente para los 15 Acm estudiados que definen 15 regiones anti-génicas. Cuatro de ellos (alfa-1 a alfa-4) están situados en la subunidad alfa. Siete (beta-1 a beta-7) en la subunidad beta y, finalmente, cuatro en la hormona intacta (alfa + beta). Anticuerpos con diferentes especificidades, aunque tengan el mismo comportamiento de unión simultánea, han sido considerados en diferen-

tes grupos. Éste es el caso, por ejemplo, del Acm KF-hCG-24 (alfa) y los Acm KF-hCG-5 y 7 (hormona intacta). El primero define la región alfa-4 y los segundos la región (alfa + beta-1). Lo mismo sucede con el mAB KF-hCG-13 (reconoce la subunidad beta con una alta reacción cruzada con la hormona LH) y los Acm KF-hCG-2, 6, 8, 14, 16, 17, 18, 19 y 27 (beta específicos, sin reacción cruzada con la LH). KF-hCG-13 define la región beta-3 mientras que los nueve Acm

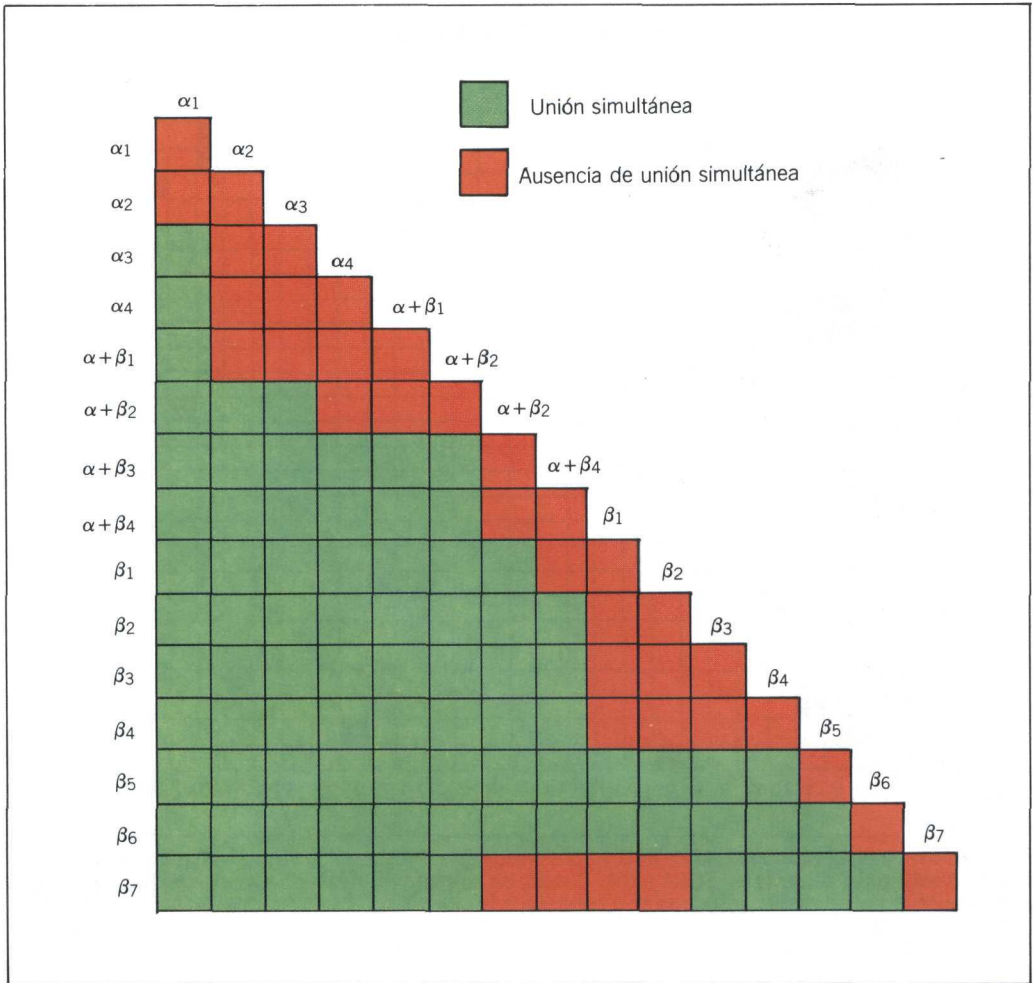


Fig. 3. Resumen de los patrones de unión simultánea de los diferentes Acm a la hormona. Alfa-1 a alfa-4 representan a los grupos de Acm que reconocen con un mismo patrón determinantes antigénicos presentes en la subunidad alfa. Beta-1 a 7 representan a los grupos de Acm que reconocen con un mismo patrón determinantes antigénicos presentes en la subunidad beta. (Alfa + beta 1-4) representan a los grupos de Acm que reconocen con un mismo patrón determinantes antigénicos presentes sólo en la hormona completa.

mencionados definen la región beta-4. En la figura 5 se indican los diferentes Acm incluidos en cada región.

Anticuerpos antiidiotipo

En la actualidad hemos desarrollado anticuerpos antiidiotipo en conejo contra los Acm KF-hCG-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27

y 28. Los diferentes anticuerpos antiidiotipo obtenidos han sido estudiados analizando tanto sus reactividades cruzadas con los diferentes Acm anti-hCG (resultado no mostrado) como sus capacidades para competir con cada Acm anti-hCG por su unión a la hormona. En la figura 4 se muestran las conclusiones de los diferentes ensayos de inhibición. La capacidad que presentan los sueros antiidiotípicos para inhibir la unión de los Ab1 a la hormona indica que es-

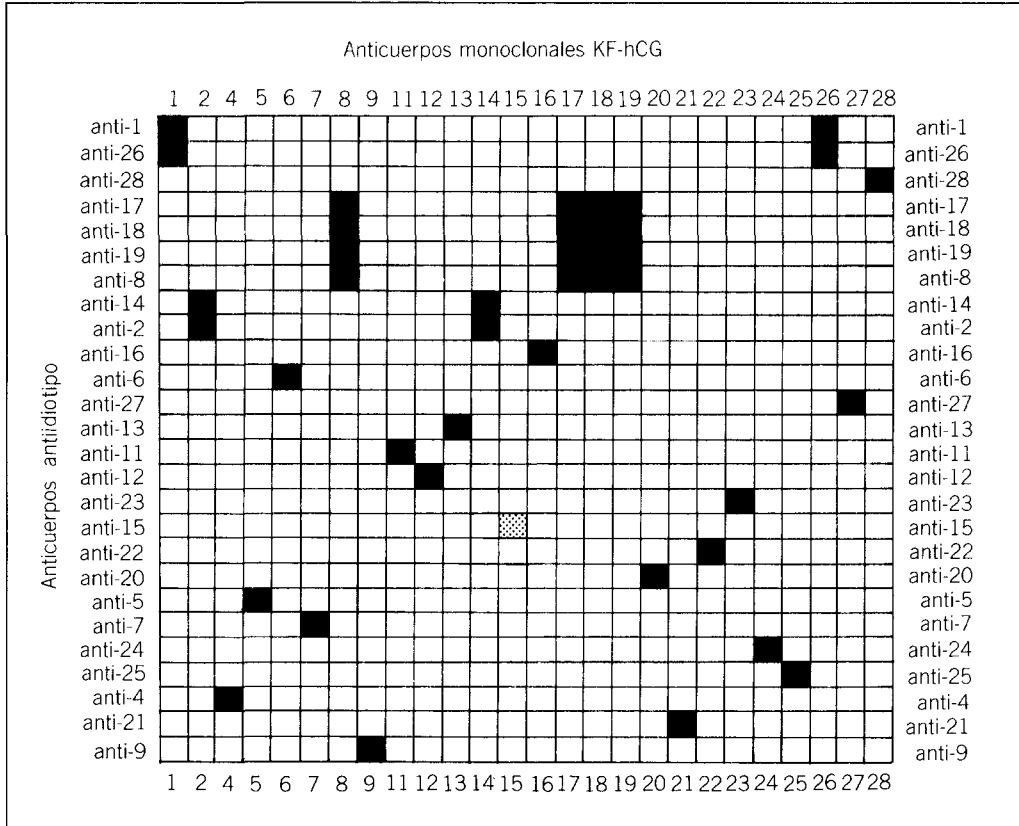


Fig. 4. Resumen de la capacidad de los anticuerpos antiidiotipo de inhibir la unión de cada Acm a la hCG. Se estudió mediante las técnicas de ELISA y RIA. Cuando se emplean Acm con una baja constante de afinidad el ensayo de ELISA se realiza adsorbiendo la hormona a la fase sólida; a continuación se incuba con el Acm biotinilado en presencia de anticuerpo antiidiotipo y se revela con avidina peroxidasa. Para Acms de alta afinidad, se adsorbe el anticuerpo a la fase sólida y se incuba con hormona biotinilada en presencia de anticuerpos antiidiotipo. En el RIA, una cantidad de Acm capaz de unir el 50% de la hormona marcada con ¹²⁵I se incuba en presencia de anticuerpos antiidiotipo; el complejo resultante se precipita con un segundo anticuerpo. En la figura se resume si un anticuerpo antiidiotipo es capaz (■) o no (□), de inhibir la unión del Acm correspondiente a la hormona. (▨) refleja una baja, pero detectable, capacidad de inhibición.

tos anti-Id, al menos, reconocen idiotipos asociados al paratopo del anticuerpo monoclonal inmunizante (Ab1). Hasta el momento hemos podido agrupar los anticuerpos antiidiotipo estudiados en 21 comportamientos diferentes. La región beta-4 está definida por 5 grupos de anticuerpos claramente diferentes. Los epítomos definidos por los anticuerpos KF-hCG-8, 17, 18 y 19 podrían ser muy semejantes al igual que los definidos por los anticuerpos KF-hCG-2 y 14. Los otros tres anticuerpos de la región beta-4 (KF-hCG-6, 16 y 27) estarían reconociendo, cada uno, motivos claramente diferentes. Los

patrones de inhibición que muestran los antiidiotipos anti-KF-hCG 5 y 7 sugieren que los motivos estructurales reconocidos por los correspondientes Acm en la molécula de hCG son distintos y, por tanto, la región antigénica que definen en ensayos de unión simultánea podría subdividirse en dos especificidades diferentes. Por el contrario, los anticuerpos KF-hCG-1 y 26 presentan un comportamiento indiferenciable cuando son analizados con el conjunto de los anticuerpos antiidiotipo. El anticuerpo KF-hCG-28, que se sitúa probablemente en la región beta-6 (resultado no mostrado), junto con KF-

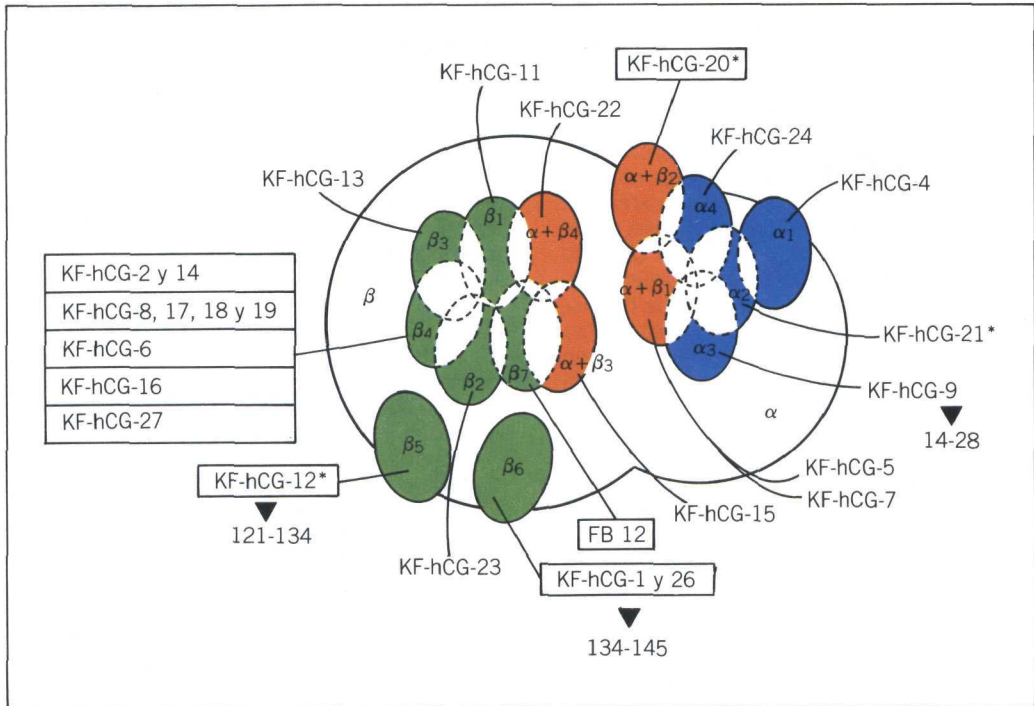


Fig. 5. Modelo antigénico de la hormona hCG definido por los diferentes Acm y sus correspondientes anticuerpos antiidiotipo. En la figura se esquematiza la hormona con sus dos subunidades (alfa y beta). Se representan las regiones antigénicas reconocidas por anticuerpos contra la subunidad alfa (azules), beta (verdes) y hormona completa (rojas). Los Acm incluidos en cuadros son específicos de la hCG. Las regiones (beta-4 y alfa + beta-1) están divididas en cinco y dos subregiones, respectivamente, sobre la base de los datos del análisis con los anticuerpos antiidiotipo. Los números indicados debajo de los Acm KF-hCG-12, KF-hCG-1 y 26 y KF-hCG-9 representan secuencias de la estructura primaria que probablemente estén implicadas en la unión de dichos Acm.

hCG-1 y 26, podría reconocer motivos claramente diferentes de los reconocidos por dichos Acm.

Modelo antigénico de la hCG definida por este panel de Acm y sus anticuerpos antiidiotipo

En la figura 5 se resume la totalidad de los datos expuestos asumiendo un modelo rígido para la hormona que no modificaría su conformación después de la unión del primer Acm. En este modelo se definen quince regiones antigénicas, cuatro sobre la subunidad alfa (zonas azules), siete sobre la subunidad beta (zonas verdes) y cuatro únicamente sobre la hormona intacta (zonas rojas). De las cuatro regiones específicas de la estructura cuaternaria, dos interaccionarían con las regiones situadas en la subunidad beta y las otras dos con las regiones

definidas en la subunidad alfa. Los diferentes anticuerpos incluidos en los recuadros son específicos de la hormona hCG; el resto presenta reactividad cruzada con la hormona LH. Los números indicados debajo de los Acm KF-hCG-12, KF-hCG-1 y 26 y KF-hCG-9 representarían secuencias probables de la estructura primaria implicada en la unión de los diferentes Acm (Rob Meloen, comunicación personal).

Si se consideran los Acm KF-hCG-25 y 28 que no están incluidos en la figura 5, los anticuerpos antiidiotipo han permitido la identificación de 22 especificidades de unión diferenciables en el conjunto de los 27 Acm estudiados.

Comentario

El establecimiento de una correlación entre la estructura y función de una proteína requiere

re un conocimiento detallado de la superficie molecular de la misma. En el caso de la hCG, para la que no se dispone de modelos cristalográficos, resulta esencial generar un mapa antigénico detallado de la mayor parte de su superficie. La antigenicidad de esta hormona ha sido estudiada por diferentes autores utilizando enfoques complementarios. La orientación relativa de la unión a la hormona de tres paneles independientes de Acm se ha descrito recientemente¹⁵⁻¹⁷. Por otra parte, algunos estudios de reactividad cruzada entre la hormona o determinados péptidos de la misma y Acm antihormona o antipeptidos, han suministrado valiosas informaciones sobre las regiones de la hCG que interaccionan con tales Acm¹⁸⁻²⁰. Finalmente, ha sido posible, mediante la mejora de los sistemas de expresión en células de mamíferos, conseguir análogos estructurales de la hormona que de alguna forma están clarificando la antigenicidad de la misma^{21,22}.

En este contexto, describimos en esta comunicación el mapa antigénico más detallado de esta hormona disponible en la actualidad. En él definimos, sin ambigüedad, las posiciones relativas de unión a la hormona de un panel de 25 Acm. Hemos encontrado 13 patrones de unión simultánea y 22 especificidades de unión diferenciables. Teóricamente, es posible conseguir la unión simultánea de 7 Acm diferentes. Una combinación posible sería, por ejemplo, la formada por los anticuerpos KF-hCG-4, 9, 20, 15, 18,1 y 12. Si asumimos que la superficie del antígeno excluida por el anticuerpo del contacto con el medio acuoso²³ es de 750 \AA^2 , estamos cubriendo un mínimo de la superficie de la molécula de 5250 \AA^2 . Por otra parte, la superficie estimada de la hormona²⁴ es aproximadamente de 8000 \AA^2 por lo que estos datos implican que estamos en condiciones de evaluar antigénicamente más de un 65 % de la superficie total de la hormona. Es importante resaltar que este cálculo no considera, por ejemplo, que regiones tales como la beta-4_o (alfa + beta-1) deberían implicar más de 750 \AA^2 de superficie ya que incluyen varias especificidades de unión diferentes puestas de manifiesto con los sueros antiidiotipo. Por lo tanto, estamos en presencia de un cálculo que estima, probablemente, menos superficie de la que realmente está siendo evaluada.

En esta comunicación describimos también los diferentes patrones experimentales que hemos estado obligados a seguir a fin de establecer, sin ambigüedad, la posición relativa de unión a la hormona de los diferentes Acm. Para

determinadas parejas de anticuerpos, la pregunta de si pueden unirse simultáneamente a la hormona o no, no constituyen una cuestión trivial. Tres inmunoanálisis, conceptualmente diferentes y considerados en su conjunto, nos han permitido, sin embargo, dar una respuesta clara en el caso de las 625 parejas estudiadas. Cada ensayo presenta determinadas limitaciones. Así, por ejemplo, el ensayo tipo «sandwich» puede conducir a resultados difícilmente interpretables cuando se estudian parejas de Acm de baja afinidad o Acm que pierden su actividad después de la unión a la fase sólida. La pareja de Acm KF-hCG-1/20 constituye un ejemplo claro de las limitaciones de este ensayo. Por lo tanto, este ensayo da lugar a interpretaciones claras únicamente en el caso de resultados positivos.

Por otra parte, el ensayo competitivo está limitado por el hecho de que se necesitan concentraciones extremadamente altas de anticuerpos, para hacer efectivas algunas competiciones. Este efecto puede ponerse particularmente de manifiesto en aquellos casos en el que un Acm de baja afinidad debe competir por la unión de un Acm de alta afinidad. En algunos casos se observa que la competición es únicamente efectiva en una dirección, por lo que resulta esencial efectuar el ensayo en ambas direcciones. El ensayo competitivo da lugar a interpretaciones claras únicamente en el caso en el que se observan disminuciones de señal importantes.

El ensayo cooperativo permite la determinación indirecta de aquellos Acm que se unen simultáneamente a las hormonas gracias al efecto sinérgico que se observa cuando se comparan los Acm individualmente con la pareja. El ensayo presenta limitaciones porque, al menos en nuestras condiciones, no todos los Acm que son capaces de unirse simultáneamente a la hormona pueden inducir un efecto cooperativo. Este ensayo ha sido particularmente útil en parejas de Acm de baja afinidad, tales como los Acm KF-hCG-1/14.

En el conjunto de los ensayos descritos, hemos utilizado tanto hormona marcada como no marcada al igual que hormonas y anticuerpos en fase sólida o líquida. Limitaciones tales como daños producidos sobre la hormona por el marcaje, orientaciones preferenciales de la hormona cuando se une a la fase sólida, incapacidad de los Acm de baja afinidad unidos a la fase sólida para capturar la hormona de la fase líquida, inactivación de los anticuerpos unidos a la fase sólida o bajas concentraciones de anticuerpo activo en las diferentes preparaciones, se co-

rigen por la diversidad de ensayos usados o por los criterios empleados en el análisis.

El mapa antigénico presentado en esta comunicación nos está permitiendo racionalizar la búsqueda de aquellos anticuerpos que nos permitirían tener la posibilidad de evaluar antigénicamente el 100 % de la superficie de la hormona. En cualquier caso, los resultados expuestos en el presente trabajo proporcionan evidencias directas que soportan el punto de vista de que una proteína es esencialmente, un continuo de sitios antigénicos potenciales²⁵. Finalmente, nuestro grupo está extendiendo el enfoque aquí presentado al resto de las hormonas glicoproteicas humanas (LH, FSH y TSH) y se están desarrollando diversas líneas de actuación a fin de asignar un significado biológico y fisiológico a algunas de las regiones definidas en el modelo antigénico presentado.

Resumen

La posición relativa de las zonas reconocidas por 25 anticuerpos monoclonales (Acm) anti-hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) se ha determinado analizando en tres inmunoanálisis complementarios un total de 625 parejas de anticuerpos. Los detalles finos de cada región se están resolviendo con la ayuda de anticuerpos antiidiotipo y el mapeo con péptidos sintéticos. En total hemos identificado 13 patrones de unión simultánea, 22 especificidades de unión diferenciables y la posibilidad, al menos teórica, de que siete Acm puedan unirse simultáneamente a la hormona. Los datos presentados permiten evaluar antigénicamente más del 65 % de la superficie estimada de la hCG y proporcionan evidencias directas que soportan la hipótesis de que una proteína es un continuo de sitios antigénicos potenciales.

Agradecimiento

Agradecemos a Patrocinio Baranda, Tomás Cascón, Amparo López, Isabel García, Carmen del Águila y Catherine Mark su colaboración en el desarrollo de este trabajo; a María Cuesta y a Coral Bastos, quienes realizaron el mecanografiado del manuscrito. Todos los miembros de nuestro Departamento colaboraron directa o indirectamente. Francisco Calvo Riera participó en las fases iniciales del trabajo y nos enseñó todo lo que sabemos sobre anticuerpos monoclonales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chatterjee N, Munro HN. Structure and biosynthesis of human placental peptide hormones. En: Vitamins and hormones, vol. 35. Nueva York, Academic Press 1977; 149-208.
2. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann Rev Biochem* 1981; 50: 465-495.
3. Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC et al. Structure-function relationships of gonadotropins. *Recent Prog Hormone Res* 1987; 43: 383-429.
4. Talmadge K, Boorstein WR, Fiddes JC. The human genome contains seven genes for the beta-subunit of chorionic gonadotropin but only one gene for the beta-subunit of luteinizing hormone. *DNA* 1983; 2: 281-289.
5. Canfield RE, Morgan FJ, Kammeraman S, Bell J, Agosto G. Studies of human chorionic gonadotropin. En: *Recent Prog in Hormone Res*, Nueva York, Academic Press 1971; 27: 121-164.
6. Braunstein GD. Physiologic functions of human chorionic gonadotropin during pregnancy. En: Mochizuki M, Hussa R, eds *Placental protein hormones*. Amsterdam, Elsevier Science Publ, 1988; 33-41.
7. Fazekas de St. Groth S, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J Immunol Methods* 1980; 35: 1-21.
8. Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K. A new mouse myeloma line that has lost immunoglobulin expression that permits the construction of antibody-secreting hybrid lines. *J Immunology* 1979; 123: 1.548-1.550.
9. Calvo Riera F, Blam SB, Teng NH, Kaplan HS. Somatic cell hybrid selection with a transfectable dominant marker. *Somat Cell Molec Genet* 1984; 10: 123-127.
10. Goding JW. *Monoclonal antibodies: Principles and practice*. Nueva York, Academic Press, 1983; 230-233.
11. Scatchard G. Attractions of proteins to small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949; 51: 660.
12. Moyle WR, Ehrlich PH, Canfield RE. Use of monoclonal antibodies to subunits of human chorionic gonadotropin to examine the orientation of the hormone in its complex with receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 2.245-2.249.
13. Bellet DH; Bidart JM, Ozturk M et al. Synthetic peptides and monoclonal antibodies of predetermined specificity in the study of human chorionic gonadotropin. *Nucl Med Biol* 1987; 14: 295-304.
14. Parham P. Preparation and purification of active fragments from mouse monoclonal antibodies. En: Weir DM, ed. *Handbook of experimental immunology*, 4ª ed.: Oxford, Blackwell Scientific Publ., 1986; 14: 1-23.
15. Schwarz S, Berger P, Wick G. Epitope-selective, monoclonal antibody-based immunoradiometric assays of predictable specificity for differential measurement of choriogonadotropin and its subunits. *Clinical Chem* 1985; 31: 1.322-1.328.

16. Ehrlich PH, Mustafa ZA, Krichevsky A, Birken S, Armstrong EG, Canfield RE. Characterization and relative orientation of epitopes for monoclonal antibodies and antisera to human chorionic gonadotropin. *Am J Reproduct Immunol Microbiol* 1985; 8: 48-54.
17. Norman J, Poulton T, Chard T. Monoclonal antibodies to human chorionic gonadotropin: Implications for antigenic mapping, immunoradiometric assays and clinical applications. *J Clin Endoc Metab* 1985; 61: 1.031-1.038.
18. Bidart JM, Ozturk M, Bellet DH et al. Identification of epitopes associated with hCG and the beta hCG carboxyl terminus by monoclonal antibodies produced against a synthetic peptide. *J Immunol* 1985; 143: 457-464.
19. Bidart JM, Troalen F, Puisieux A et al. Recent progress in the immunochemistry of human chorionic gonadotropin. En: Mochizuki M, Husa R, eds. *Placental protein hormones*. Amsterdam, Elsevier Scientific Publ, 1985; 63-72.
20. Stevens VC, Chou WS, Powell JE, Lee AC, Smoot J. The identification of peptide sequences of human chorionic gonadotropin containing a conformational epitope. *Immunol Letters* 1986; 12: 11-18.
21. Campbell RK, Matzuk MM, Canfield RE, Boime I, Moyle WR. Use of monoclonal antibodies and mutagenesis to study the structure of human chorionic gonadotropin (hCG). En: Mochizuki M, Husa R, eds. *Placental protein hormones*. Amsterdam, Elsevier Science Publ, 1988; 123-132.
22. Matzuk MM, Spangler MM, Camel M, Suganuma N, Boime I. Mutagenesis and chimeric genes define determinants in the beta subunits of human chorionic gonadotropin and lutotropin for secretion and assembly. *J Cell Biology* 1989; 109: 1.429-1.438.
23. Colam PM. Structure of antibody-antigen complexes: Implications for immune recognition. *Advances Immunol* 1988; 43: 99-132.
24. Schwarz S, Berger P, Wick G. The antigenic surface of human chorionic gonadotropin as mapped by murine monoclonal antibodies. *Endocrinol* 1986; 118: 189-197.
25. Benjamin CD, Berzofsky JA, East IJ et al. The antigenic structure of proteins: A reappraisal. *Ann Rev Immunol* 1984; 2: 67-101.

DISCUSIÓN

- L. ENJUANES: Quisiera preguntarle si han detectado monoclonales que reaccionen con dos conjuntos de nonapéptidos bien definidos.
- R. LLOPIS: No. En ocasiones se ha observado algo en la subunidad alfa, pero nunca con un conjunto de 3 o 4 nonapéptidos.
- L. ENJUANES: ¿Dispone de información que le permita afirmar que un solo monoclonal reacciona contra dos zonas distintas de la molécula, que se encuentran separadas cuando se extiende linealmente?
- R. LLOPIS: Tan claro como usted lo plantea, no. Sin embargo, hemos encontrado algún monoclonal que da un patrón con el epítipo *scanning* que podría explicarse de la forma que usted sugiere.
- L. ENJUANES: ¿Esto lo atribuyen a que este monoclonal reacciona con un sitio y, por así decirlo, correlaciona con el otro utilizando la misma técnica de enlace? Es decir, en zonas que están conformadas por el plegamiento de la molécula, ¿puede el mismo monoclonal reconocer en el mismo sitio de enlace y simultáneamente dos péptidos distintos?
- R. LLOPIS: Esto no hemos tenido aún ocasión de observarlo.
- J. ORTÍN: No me ha quedado claro si para la inmunización y preparación de todos estos anticuerpos utilizaban el conjunto alfa-beta en cada una de las hormonas.
- R. LLOPIS: Utilizábamos la hormona intacta.
- J. ORTÍN: La hormona intacta, o sea, nunca han inmunizado con alfa y con beta independientes.
- R. LLOPIS: Hemos inmunizado, pero no hay ningún monoclonal que tenga unas propiedades claramente distintas de las que se han presentado aquí. Por tanto no hemos seguido trabajando con estos monoclonales.
- J. ORTÍN: Entiendo, pues, que con la subunidad alfa o beta independiente no han obtenido monoclonales capaces de identificar la cara oculta.
- R. LLOPIS: Los hemos buscado pero no los hemos visto. Sin embargo, esto es factible, ya que ha sido descrito por otros autores.
- F. MURILLO: Para los que no somos tan expertos en el tema, podría comentar el interés que tiene, ya sea mediante alguna prueba de sondeo o análisis, diferenciar las tres hormonas.
- R. LLOPIS: La hCG es una hormona marcadora de embarazo. Con la ayuda de los monoclonales se han alcanzado niveles de sensibilidad y especificidad que nos permiten por una parte cuantificar cada una de las hormonas en presencia de las otras y, por otra, explorar si

tuaciones fisiológicas que hasta ahora eran inabordables. Así, por ejemplo, recientemente se ha demostrado que un 22 % de los embarazos detectados precozmente por la presencia de hCG terminan en abortos que muchas veces pasan totalmente inadvertidos. Por otra parte, el seguimiento de la LH es extremadamente útil para predecir el momento de la ovulación, ya que sus niveles aumentan considerablemente antes de la misma. Un *kit* sencillo que pudiera ser manejado, sin problemas, por la mayoría de las mujeres constituiría quizás una herramienta muy útil para el control de la natalidad.

M. T. GALLART: Particularmente opino que el principal interés no consiste tanto en estudiar la hormona como en el análisis propiamente dicho de la producción de antiidiotipos. Mi pregunta es ¿cuál era su propósito, analizar la hormona o hacer un análisis idiotípico?

R. LLOPIS: Nosotros estamos utilizando los antiidiotipos como una herramienta más para enriquecer el análisis estructural de la hormona. Por otra parte, están también utilizándose en una estrategia para competir con la hormona en su unión al receptor e intentar identificar cuáles son las regiones de las diferentes hormonas implicadas en sus funciones biológicas.

M. T. GALLART: No he visto muy bien el grado de reactividad cruzada. ¿Hasta qué punto le ha aportado información para este análisis estructural?

R. LLOPIS: Los antiidiotipos nos han permitido

concluir que la mayor parte de los anticuerpos monoclonales utilizados tienen una especificidad diferente, porque las reacciones cruzadas en los diferentes ensayos utilizados demuestran que son distintos.

Por otra parte, hemos podido demostrar en 13 casos intentados, que en la población de anticuerpos antiidiotipo están presentes subpoblaciones que llevan asociadas estructuras que mimetizan las regiones del antígeno reconocidas por los anticuerpos monoclonales originales. Estos experimentos, que no les he mostrado porque el trabajo no está concluido, nos sugieren muy fuertemente que este enfoque antiidiotípico no es únicamente útil para diferenciar anticuerpos monoclonales, sino también para estudiar con gran detalle las diferentes regiones del antígeno analizado.

R. GONZÁLEZ: ¿Se dispone de ensayos funcionales para ver si estos anticuerpos son capaces de inactivar las funciones de la hormona?

R. LLOPIS: Nosotros, en las etapas iniciales del trabajo, estamos intentando inhibir la unión de la hormona a los receptores en las células de Leydig. Estas hormonas, tanto la LH como la hCG, interaccionan con las células de Leydig. Entonces, es interesante saber qué regiones de la hormona están implicadas en ese enlace. No he presentado estos experimentos ya que, por una parte, el trabajo no está terminado y, por otra, los resultados obtenidos son un tanto conflictivos en comparación con lo descrito en la literatura.