



Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba
15 al 19 de mayo de 2023

Generación de anticuerpos monoclonales contra el Antígeno B sanguíneo

Alejandro Miranda Ariza¹
Elizabet Galindo Arias²
Suyén Rodríguez Pérez³
Gilberto Soler Noda⁴
Yisenia Romero Díaz⁵
Osvaldo Bes Gómez⁶

¹ LABEX, Santiago de Cuba, Cuba, amiranda@cim.sld.cu

² LABEX, Santiago de Cuba, Cuba, elizabetg@cim.sld.cu

³ LABEX, Santiago de Cuba, Cuba, suyen@cim.sld.cu

⁴ IHI, La Habana, Cuba, gsolern@infomed.sld.cu

⁵ IHI, La Habana, Cuba, yisi2801@gmail.com

⁶ Universidad de Ciencias Médicas-Santiago de Cuba, Cuba, osvaldojwbes@gmail.com

Resumen:

Introducción: El reactivo hemoclasificador anti-B es ampliamente utilizado en los bancos de sangre y laboratorios clínicos para la tipificación de muestras de sangre humana. La disponibilidad de este reactivo impacta especialmente en la calidad de los servicios de medicina transfusional y de trasplantes. El hemoclasificador anti-B utilizado actualmente en Cuba se importa, lo que constituye una vulnerabilidad para el Sistema Nacional de Salud.

Objetivo: obtener un anticuerpo monoclonal con capacidad aglutinante específica de eritrocitos humano del grupo B y, por tanto, adecuado como componente activo para el desarrollo de hemoclasificadores anti-B a tono con los requisitos regulatorios establecidos por el CECMED.

Método: Se fusionaron células X63-Ag8.653 con esplenocitos de ratón BALB/c previamente sensibilizados con eritrocitos humanos del grupo B. Los pozos con crecimiento se seleccionaron según la actividad anti-B y se aplicaron clonaciones celulares sucesivas por diluciones limitantes. Los clones obtenidos fueron evaluados según su capacidad de satisfacer los requisitos regulatorios vigentes para reactivos hemoclasificadores.

Resultados: se aislaron tres clones de hibridoma secretores de anticuerpos anti-B de la clase IgM y con potencias de aglutinación superiores a 256 y avidez de entre 3 y 4 segundos, siendo estos resultados comparables con las referencias comerciales utilizadas en los ensayos.

Conclusiones: Se generaron tres clones de hibridoma secretores de anticuerpos monoclonales anti-B de la clase IgM. Las pruebas preliminares de especificidad, así como las de potencia de aglutinación y avidez permiten que estos anticuerpos sean considerados como candidatos para el desarrollo de reactivos hemoclasificadores anti-B de origen cubano.

Palabras clave: Antígeno B, hemoclasificador, hemaglutinación, anticuerpo monoclonal, hibridoma.

INTRODUCCIÓN

El reactivo hemoclasificador anti-B es ampliamente utilizado en los bancos de sangre, hospitales y laboratorios clínicos para la detección de eritrocitos portadores del antígeno B sanguíneo en la superficie celular. El mismo se utiliza conjuntamente con otros reactivos hemoclasificadores, principalmente del sistema de clasificación sanguíneo ABO y del sistema RH para la tipificación de la sangre de donantes y receptores de sangre y órganos, por lo que su aplicación tiene alto impacto en la medicina transfusional y de trasplante de órganos y tejidos.

El sistema de grupo sanguíneo ABO fue descubierto por Karl Landsteiner en el año 1900, valiéndole un Premio Nobel en 1930 ⁽¹⁾. Este sistema continúa siendo hasta la fecha el más importante y de mayor relevancia clínica para la medicina transfusional y de trasplantes de entre los 33 sistemas de clasificación existentes. Si bien los primeros reactivos hemoclasificadores utilizados en la práctica médica fueron policlonales de origen humano, los cuales eran procesados in situ en las mismas unidades de bancos de sangre, actualmente los hemoclasificadores de sistema de clasificación sanguínea ABO están compuestos por anticuerpos monoclonales.

El advenimiento de la tecnología del hibridoma desarrollada por Kohler y Milstein en 1975 para la generación de anticuerpos monoclonales revolucionó notablemente la investigación inmunológica ⁽²⁾. Los anticuerpos monoclonales se destacan por su alta especificidad, su disponibilidad potencialmente ilimitada y una reproducibilidad mayor entre lotes de producción si se comparan con los anticuerpos policlonales. A pesar del transcurso de tiempo la generación de hibridomas mantiene plena vigencia en variados campos de la ciencia y técnica tales como la toxicología, la biotecnología animal, medicina, farmacología, así como en la biología celular y molecular ^(3,4).

Aunque están disponibles numerosos informes de anticuerpos monoclonales producidos contra antígenos ABH sólo se hallaron referencias a la obtención y evaluación de hemoclasificadores monoclonales de origen cubano en publicaciones científicas de la década de los 90s ⁽⁵⁾. Los anticuerpos monoclonales generados en aquel entonces permitieron el desarrollo, producción y comercialización de reactivos hemoclasificadores para la red nacional de bancos de sangre y hospitales por parte de los Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX), pero el uso de los mismos tuvo que discontinuarse en 2011 debido al endurecimiento del entorno regulatorio en la nueva regulación sobre los requisitos de los diagnosticadores utilizados en Inmunoematología, emitida por el CECMED. Desde entonces y hasta la fecha la demanda de estos reactivos se ha suplido mediante la importación de los mismos desde Europa con el consiguiente gasto en divisas y el riesgo logístico asociado.

LABEX presentó un proyecto al Programa Nacional de Ciencia y Tecnología conjuntamente con el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), la Universidad de Oriente (UO) y el CECMED para generar anticuerpo monoclonales que permitan en el corto-mediano plazo en desarrollo de reactivo hemoclasificadores del sistema ABO de origen nacional.

El presente trabajo tuvo como **objetivo** obtener un anticuerpo monoclonal con capacidad aglutinante específica de eritrocitos humano del grupo B y, por tanto, adecuado como componente activo para el desarrollo de hemoclasificadores anti-B a tono con los requisitos regulatorios establecidos por el CECMED.

MÉTODO

El presente trabajo describe el desarrollo experimental realizado para la generación y la evaluación de las propiedades inmunoquímicas de anticuerpos monoclonales con capacidad aglutinante específica de eritrocitos portadores del antígeno B sanguíneo.

Preparación de la suspensión inmunogénica: Para la sensibilización de los ratones contra el Antígeno B sanguíneo se preparó una suspensión al 5% de eritrocitos humanos del grupo sanguíneo B en Tampón Fosfato Salino pH 7.2-7.4.

Sensibilización de ratones BALB/c: Se inmunizaron ratones hembras de entre 6 y 8 semanas edad (Cenpalab, Cuba) aplicando cinco inyecciones intraperitoneales a razón de 0.5mL /ratón de la suspensión inmunogénica a intervalos de siete días. El día previo a la quinta inyección se comprobó actividad aglutinante anti-B de suero sanguíneo obtenido a partir de muestras de sangre de cada ratón y cuatro días después de la quinta inyección se sacrificó el ratón donante del suero con mayor intensidad de aglutinación y los esplenocitos se extrajeron para fusión celular.

Fusión celular y selección de clones: Los esplenocitos extraídos fueron fusionados con células X63-Ag8.653 aplicando Polietilenglicol 3350MW (Sigma, Cat # P-3640) al 50% en Tampón Fosfato Salino en una proporción esplenocito/mieloma de 3:1. La fusión celular se realizó según la descripción del método por Yokoyama con ligeras modificaciones^(6,7). Entre 8 y 13 días después se identificaron pozos con colonias celulares en crecimiento. Se tomaron muestras a partir de los pozos con confluencia celular superior a un tercio del fondo y aclaramiento del color del cultivo para detectar reconocimiento de eritrocitos del grupo B por aglutinación en tubos. Los pozos de las muestras con intensidad de 5+ fueron sometidos a tres clonaciones sucesivas por diluciones limitantes a 1 células por pozo respectivamente en placas de cultivo de 96 pozos. Los pozos de la última clonación con intensidad anti-B de 5+, que procedieron de pozos con crecimiento de una sola colonia celular en la clonación anterior se expandieron en cultivo para preservar por congelación, y para evaluar posteriormente las propiedades inmunoquímicas de los anticuerpos monoclonales.

Aglutinación directa en láminas: Las muestras de suero sanguíneo de ratón se enfrentaron a volúmenes iguales contra una suspensión de eritrocitos B al 40% en Solución Salina Fisiológica en láminas de vidrio de 7.5 x 2.4cm. La lámina se meció hasta que se observó la aglutinación.

Aglutinación directa en tubos: Las muestras de sobrenadante de cultivo y de líquido ascítico se mezclaron a volúmenes iguales con suspensiones al 2% de eritrocitos en Solución Salina Fisiológica en tubos de vidrio de 13 x 100mm. Los tubos se incubaron por 1min en la meseta del laboratorio (24°C), posteriormente se centrifugó a 1000rpm x 1min. Los tubos se inclinaron y rotaron suavemente hasta que el sedimento se desprendió y se procedió a leer la intensidad de la aglutinación en escala de 0 a 5+ según se establece en la regulación nacional vigente para los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología⁽⁸⁾.

Potencia de aglutinación y puntaje: La potencia de aglutinación se determinó diluyendo la muestra a evaluar en una serie doble sucesiva en Solución Salina Fisiológica con BSA al 2%. Luego cada punto de dilución se enfrentó a partes iguales con una suspensión de eritrocitos del grupo B sanguíneo al 2% en Solución Salina Fisiológica por el método de aglutinación directa en tubos descrita más arriba. El puntaje para cada serie de dilución se determinó atribuyendo un valor de 12 a cada punto de la serie con 5+, de 10 a cada punto con 4+, de 8 a cada punto con 3+, de 5 a cada punto con 2+ y de 2 a cada punto con 1+, y luego se determinó el valor sumando

todos los valores individuales de la serie. Para cada muestra a evaluar se utilizaron suspensiones de eritrocitos de tres donantes diferentes.

Isotipaje: El isotipo del anticuerpo obtenido fue comprobado por inmunodifusión doble de Ouchterlony en gel de agarosa-PEG según el método descrito por Hornbeck⁽⁹⁾. En el pocillo central se aplicaron las muestras de anticuerpo en ascitis diluidas 1:20, mientras en los pocillos periféricos se aplicaron los reactivos isotipo específicos, uno en cada pozo (Sigma-Aldrich, Cat # ISO2-1KT). La placa de agarosa se incubó en cámara húmeda por 48 horas, y se comprobó la formación de la línea de precipitación isotipo específica.

RESULTADOS

A partir de la inmunización de los ratones BALB/c con eritrocitos humanos del grupo sanguíneo B se detectó reconocimiento específico anti-B con valores de intensidad entre 1+ y 2+ en todas las muestras de suero, excepto una muestra con valor de 3+, por lo que este último ratón fue seleccionado para la extracción del bazo. En los ratones usados como control negativo que no fueron inmunizados no se observó aglutinación frente a eritrocitos B.

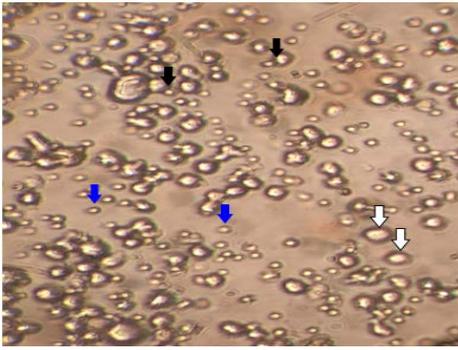


Fig. 1 Células recién sometidas a fusión celular. Blanco: células X63-Ag8.653 no fusionadas. Azul: esplenocitos no fusionados. Negro: células fusionadas. Enfoque a 400X.

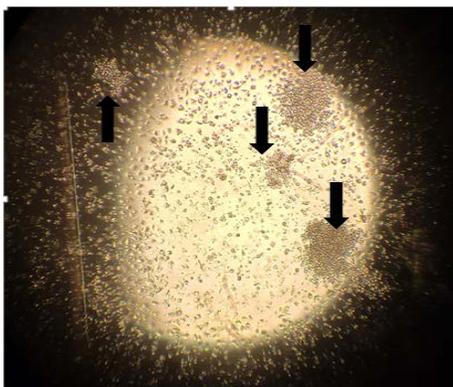


Fig. 1 Células recién sometidas a fusión celular. Blanco: células X63-Ag8.653 no fusionadas. Azul: esplenocitos no fusionados. Negro: células fusionadas. Enfoque a 400X.

Del bazo se extrajeron 25×10^7 células con 97% de viabilidad, las que se fusionaron con células X63-Ag8.653 en una razón de 3:1, y la suspensión celular resultante fue sembrada en 10 placas de 96 pozos. Al ser la fusión celular un proceso aleatorio y con una eficiencia relativamente baja, solo una parte minoritaria del total rinde productos de fusión viables, mientras la mayoría de las células permanecen no fusionadas o con fusiones aberrantes (Figura 1). Durante la primera semana de incubación las células viables comenzaron a dividirse formando colonias incipientes, las que fueron ganando tamaño y definición a finales de la segunda semana (Figura 2).

En el transcurso de la segunda semana se detectaron 810 pozos con crecimiento de colonias celulares de los 960 sembrados (Tabla 1). La formación de colonias células no fusionadas debido a que está reportado que los linfocitos B extraídos del ratón mueren a alrededor de los 14 días en cultivo y no forman colonias en estas condiciones; mientras las células X63-Ag8.653, al no poseer la ruta de salvamento para la síntesis de nucleótidos mueren durante la primera semana bajo los efectos del medio HAT, el cual posee Aminopterina en su composición con el propósito de bloquear la ruta síntesis *de novo* de nucleótidos. Esto último fue corroborado al sembrar pozos con células X63-Ag8.653 justo después de la siembra de las células fusionadas, a una concentración de 0.3×10^6 células/mL en una placa de 96 pozos en la que se comprobó la muerte de las células en cultivo sobre el sexto día por conteo celular de muestras diluidas en el colorante vital Azul Tripano al 0.4% en Tampón Fosfato Salino.

Tabla 1. Resultado de crecimiento de colonias en pozos de fusión celular.

Placa #	Pozos con crecimiento	Porcentaje por placa (%)
1	76	79
2	85	89
3	90	94
4	85	89
5	83	86
6	83	86
7	80	83
8	77	80
9	76	79
10	75	78
Total	810	***
Promedio	81	84

Del total de pozos evaluados se detectaron 10 muestras de sobrenadante con actividad aglutinante anti-B. Al enfrentar nuevamente las muestras con eritrocitos de los grupos O+ y A+ se descartaron nueve de los diez pozos por tener reactividad cruzada. El único pozo con reactividad específica anti-B fue sometido a tres clonaciones sucesivas por dilución limitante a 1 célula/pozo. A partir de la tercera clonación se identificaron tres clones: 1A7, 1B5 y 1B11, los que fueron evaluados mediante ensayos de especificidad de aglutinación frente a eritrocitos de grupos diferentes según el sistema ABO (Tabla 2), y se comprobó la especificidad de reconocimiento del antígeno B en los tres casos.

Tabla 2. Resultados de especificidad de los clones frente a diferentes grupos del sistema ABO.

Clon	A ₁	A ₂	A ₁ B	A ₂ B	B	O
1A7	0	0	5+	5+	5+	0
1B5	0	0	5+	5+	5+	0
1B11	0	0	5+	5+	5+	0

La potencia de aglutinación a partir de muestras de cultivo celular fue similar en 1A7 y 1B5 aunque 1A7 tuvo un puntaje ligeramente superior, mientras los resultados en 1B11 fueron inferiores (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la potencia de aglutinación y del puntaje.

Clon	Puro	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	Puntaje
1A7	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	0	149
1B5	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+	0	142
1B11	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	4+	4+	4+	3+	2+	0	0	0	127

Los clones fueron mantenidos en cultivo celular por aproximadamente 1 mes para comprobar su estabilidad y posteriormente se crió preservaron en nitrógeno líquido.

DISCUSIÓN

La generación de hibridomas de ratón es en la actualidad una tecnología madura que ha sufrido cambios hasta el presente con el propósito de incrementar su eficiencia tanto en términos de capacidad para generar colonias celular viables como en su capacidad de aumentar la cantidad de hibridomas específicos contra el antígeno de interés. A pesar del desarrollo de nuevas tecnologías más avanzadas, la tecnología del hibridoma continua siendo muy utilizada a nivel internacional en la obtención de anticuerpos monoclonales con fines investigativos y para el desarrollo de diagnosticadores.

La eficiencia de fusión celular obtenida fue de un 84%, entendiendo la misma como el porcentaje de pozos con crecimiento de hibridomas con respecto al total de pozos de sembrados. Este resultado es satisfactorio para la técnica aplicada, con la cual debe obtenerse crecimiento de colonias celulares entre el 50% y el 80% de los pozos. Por otro lado, la eficiencia de fusión específica fue de un 1.2%, un valor inferior al rango 2.5% - 6.0% esperado para el método aplicado, en el cual debieron detectarse entre 20 y 50 clones con reconocimiento del antígeno de interés. Este resultado pudo deberse a que la respuesta del sistema inmune del ratón no fue lo suficientemente potente bajo el esquema de inmunización propuesto, tomando en cuenta que en una escala de intensidad de aglutinación con un valor máximo de 5+ se obtuvieron valores de 1+ y 2+ en la mayoría de las muestras de suero de los animales inmunizados, y 3+ en el animal que se sacrificó para la fusión. Otra explicación podría ser que al inmunizar con eritrocitos humanos completos, otros determinantes antigénicos presentes en estas células podrían haber desplazado la atención del sistema inmune. Evidentemente la pureza del antígeno aplicado en el esquema de inmunización determina la eficiencia de la respuesta por parte del sistema inmune. La reactividad cruzada en nueve de los diez de los pozos con capacidad aglutinante del antígeno B no es del todo inesperada. La diferencia estructural entre el antígeno A y el antígeno B relativamente poca, al observar que la misma se basa en que el antígeno B posee un residuo de D-Galactosa en la posición donde el antígeno A posee un residuo de N-Acetilgalactosamina. Estos resultados de actividad cruzada se han reportado igualmente en publicaciones previas sobre la generación de hibridomas contra determinantes antigénicos del sistema sanguíneo ABO.

El uso de anticuerpos monoclonales como ingredientes farmacéuticos activos de reactivos hemoclasificadores implica que los mismos deben cumplir los requisitos de especificidad, potencia y avidéz establecidos de forma detallada en regulaciones nacionales e internacionales. Los reactivos hemoclasificadores pertenecen a la clase de riesgo D, la más alta entre los diagnosticadores que otorga la entidad regulatoria cubana CECMED. Concretamente, los hemoclasificadores anti-B deben reconocer únicamente eritrocitos que posean el antígeno B mediante aglutinación específica, ya sea en sangre del grupo B o de los subgrupos de AB. En estos últimos existe una expresión simultánea de ambos antígenos en la superficie del eritrocito. Para corroborar que estos clones resulta adecuados para el desarrollo de hemoclasificadores anti-B es necesario enfrentar los anticuerpos de los clones candidatos frente a un panel más diverso y representativo de eritrocitos que los empleados en el presente trabajo. No obstante, los resultados preliminares los avalan como candidatos viables. Por otro lado, la potencia de aglutinación del hemoclasificador debe de ser igual o superior a 256, entendiendo este valor como el inverso del título de aglutinación de la muestra en dilución doble seriada, y la avidéz de aglutinación no debe superar los 30 segundos, siendo la avidéz de aglutinación el tiempo que transcurre entre el

momento en que se enfrenta la muestra con la suspensión de eritrocitos y el momento de aparición del aglutinado. Los tres clones candidatos cumplieron con los límites potencia de aglutinación y los valores de avidéz fueron inferiores a los 4 segundos, por debajo incluso de referencias comerciales utilizadas en nuestro laboratorio bajo nuestras condiciones, cuyos valores de avidéz están entre los 6 y 9 segundos.

Se terminó que en las inmunoglobulinas obtenidas se correspondieron con la clase IgM, este resultado era esperado debido a que la IgM es secretada formando mayoritariamente pentámeros de la inmunoglobulina, estructura que posee de 10 a 12 sitios de unión con el antígeno. Esta propiedad polivalente de la molécula de IgM le confiere una alta avidéz por el antígeno, la que es superior a las de otras inmunoglobulinas como la IgG, la cual no forma polímeros por lo que es bivalente. Por otro lado, esta macro inmunoglobulina tiene una talla que le permite abarcar tramos de hasta 35nm, suficientes para superar el espacio de alrededor de 25nm entre eritrocitos en suspensión causada por la nube de iones de carga negativa que rodean la membrana externa de los eritrocitos, provocando una repulsión entre estos y evitando aglutinen espontáneamente⁽¹⁰⁾.

Los anticuerpo monoclonales anti-B generados podrían, una vez que se profundicen los estudios de especificidad de reconocimiento, constituir el ingrediente farmacéutico activos de un reactivo hemoclasificador de origen cubano con el cual se podría sustituir el actualmente utilizado en la red nacional de bancos de sangre y laboratorios clínicos de origen europeo en un tiempo relativamente corto, contribuyendo a la sustitución de importaciones y a disminuir la vulnerabilidad logística del sistema de salud cubano por este tipo de reactivo considerado estratégico tanto en tiempo de paz como en tiempo de guerras y catástrofes naturales.

CONCLUSIONES

1. Se generaron tres clones celulares secretores de anticuerpo monoclonales aglutinantes de eritrocitos portadores del antígeno B sanguíneo mediante la tecnología clásica del hibridoma.
2. Los anticuerpos monoclonales tuvieron especificidad por el antígeno B sanguíneo, no obstante deben realizarse ensayos más exhaustivos frente a un panel más amplio de eritrocitos según lo establecido en las regulaciones vigentes.
3. Los valores de intensidad, potencia y avidéz de aglutinación fueron satisfactorios para proponerlos como ingredientes farmacéuticos activos potenciales de reactivos hemoclasificadores.

REFERENCIAS

1. Farhud DD. Karl Landsteiner (1868-1943). Iran J Public Health. 2018 Jun;47(6):777-778. PMID: 30087861; PMCID: PMC6077641.
2. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. doi: 10.1038/256495a0. PMID: 1172191.
3. Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. J Genet Eng Biotechnol. 2021 Oct 18;19(1):159. doi: 10.1186/s43141-021-00264-6. PMID: 34661773; PMCID: PMC8521504.
4. Zaroff S, Tan G. Hybridoma technology: the preferred method for monoclonal antibody generation for *in vivo* applications. Biotechniques. 2019 Sep;67(3):90-92. doi: 10.2144/btn-2019-0054. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31347924.
5. Rivero RA, Suárez LE, Bencomo AA, González R, Martínez MN, Tormo BR, et al. Ensayo de terreno de los reactivos hemoclasificadores monoclonales Hemo-CIM anti-A y Hemo-

- CIM anti-B como productos terminados. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1998;14(3):167-75.
6. Yokoyama WM, Christensen M, Santos GD, Miller D. Production of monoclonal antibodies. Current Protocols in Immunology. 2006; 74:2.5.1-2.5.25.
 7. Chronopoulou E, Uribe-Benninghoff A, Corbett CR, Berry JD. Hybridoma technology for the generation of rodent mAbs via classical fusion. Methods Mol Biol. 2014; 1131:47-70.
 8. CECMED. Requisitos de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología. Regulación No. D59-21. 2021. Acápite 2.11.
 9. Hornbeck, P. 2017. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (Ouchterlony). Curr. Protoc. Immunol. 116: 2.3.1-2.3.4.
 10. Sathe A, Cusick JK. Biochemistry, Immunoglobulin M. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 December 28, 2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32310455/> Consultado en Dic/2022.