



Obtención de anticuerpos monoclonales de ratón contra el factor C3 del sistema del complemento humano

Alejandro Miranda Ariza¹

Suyén Rodríguez Pérez¹

Gilberto Soler Noda²

Gabriel Llauradó Maury³

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

²IHI/Hematología, La Habana, Cuba, gsolern@infomed.sld.cu

³UO/Cebi, Santiago de Cuba, Cuba, gabriel@uo.edu.cu

Resumen:

Introducción: El Suero de Coombs es un reactivo ampliamente utilizado en los bancos de sangre y laboratorios clínicos para la detección tanto de anticuerpos anti-eritrocitarios, así como de fragmentos del factor C3 del complemento adheridos a la superficie de los eritrocitos mediante la Prueba Coombs. La disponibilidad de esta prueba impacta especialmente en la calidad de los servicios de medicina transfusional y en el estudio de desórdenes autoinmunes. El reactivo utilizado actualmente en Cuba se importa al granel desde un único proveedor, lo que constituye una vulnerabilidad para el Sistema Nacional de Salud.

Objetivo: Obtener un AcM con capacidad aglutinante específica de eritrocitos C3b/d (+), adecuado como componente activo anti-complemento de sueros antiglobulínicos humanos mono y poliespecíficos según los requisitos regulatorios establecidos por el CECMED.

Métodos: Se fusionaron células X63-Ag8.653 con esplenocitos de ratón BALB/c previamente sensibilizados con el fragmento C3d humano mediante la tecnología del Hibridoma. Los pozos con crecimiento se seleccionaron según la actividad aglutinante específica de eritrocitos C3b/d (+) y los clones fueron aislados mediante clonaciones celulares por dilución limitante.

Resultado: se aislaron tres clones de hibridoma secretores de anticuerpos de la clase IgM anti-C3b/d y con potencia de aglutinación igual o mayor que las referencias comerciales utilizadas en los ensayos, tanto en ascitis de ratón como en sobrenadante de cultivo celular.

Conclusión: Los AcM obtenidos cumplieron los requisitos regulatorios de especificidad y potencia vigentes, por lo que permitirá el desarrollo de Sueros antiglobulínicos humanos de origen nacional.

Palabras clave:

suero de coombs, prueba de coombs, complemento, anticuerpo monoclonal, hibridoma.

I. INTRODUCCIÓN

Los reactivos antiglobulínico humano o sueros de Coombs son ampliamente utilizados en los bancos de sangre y laboratorios clínicos para la detección tanto de anticuerpos anti-eritrocitarios, así como de fragmentos del complemento adheridos a la superficie de los eritrocitos mediante un ensayo de hemaglutinación conocido como Prueba Coombs o Prueba de Antiglobulina Humana ⁽¹⁾. La aplicación de esta prueba tiene un impacto directo en la calidad de los servicios de salud, con particular relevancia en el ámbito de la medicina transfusional y en el estudio de varios desórdenes inmunohematológicos ^(2,3).

La mayoría de los sueros antiglobulínicos humanos contienen un anticuerpo monoclonal como componente anti-C3, si bien todavía se pueden encontrar versiones con componentes anti-C3 policlonales. No obstante, los primeros se han impuesto gracias a su alta especificidad, a sus altos títulos de aglutinación y a una menor variabilidad entre los lotes de producción con respecto a los segundos. Estos anticuerpos monoclonales son de la clase IgM, los cuales poseen gran capacidad de aglutinar eritrocitos debido a que su conformación estructural pentamérica les confiere un tamaño molecular lo suficientemente grande como para superar la distancia de repulsión existente entre eritrocitos provocada por el potencial Z, unirse a determinantes antigénicos presentes en la superficie de células distintas y formar el enrejado característico que conduce a la aglutinación mediada por anticuerpos ⁽⁴⁾.

La proteína C3 es relativamente abundante en sangre, con una concentración que puede superar el gramo por litro ⁽⁵⁾. Se ha reportado la obtención de anticuerpos monoclonales anti-C3d a partir de la sensibilización de ratones con la proteína purificada a partir de suero sanguíneo ⁽⁵⁾, o inmunizando con eritrocitos revestidos con el fragmento C3d, lo que se puede lograr mediante la estimulación de la ruta alternativa de activación del complemento, en la cual el fragmento C3b espontáneamente se adhiere directamente a la membrana celular sin mediación de anticuerpos, el cual posteriormente se degrada a C3d al exponerse la suspensión de eritrocitos a digestión proteolítica controlada en presencia de tripsina.

El presente trabajo tuvo como **objetivo** la obtención de un anticuerpo monoclonal con capacidad aglutinante específica de eritrocitos C3b/d positivos y, por tanto, adecuado como componente activo para el desarrollo de sueros antiglobulínicos humanos según los requisitos regulatorios establecidos por el CECMED.

II. MÉTODO

Preparación de la suspensión inmunogénica: Para la sensibilización de los ratones contra la molécula C3 se preparó una suspensión de eritrocitos de ratón BALB/c revestidos con C3d humano en Tampón Fosfato Salino pH 7.2-7.4. El revestimiento se realizó según los “Métodos recomendados para la evaluación de potencia, especificidad y reactividad de antiglobulina humana” de la FDA ⁽⁶⁾, pero sustituyendo los eritrocitos humanos por eritrocitos de ratón y empleando como fuente del antígeno una mezcla de 10 volúmenes de suero humano normal de donantes diferentes doblemente absorbida con eritrocitos de ratón ⁽⁷⁾.

Sensibilización de ratones BALB/c: Se inmunizaron ratones hembras de entre 6 y 8 semanas edad (Cenplab, Cuba) aplicando cinco inyecciones intraperitoneales a razón de 1×10^8 eritrocitos revestidos con C3d /0.5mL /ratón de Tampón Fosfato Salino a intervalos de siete días. El día previo a la quinta

inyección se comprobó actividad aglutinante anti-C3d en muestras de suero sanguíneo y cuatro días después de la quinta inyección se sacrificó el ratón 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^(8,9). Entre 12 y 13 días después se identificaron los pozos con actividad específica por aglutinación en tubos frente a eritrocitos humanos revestidos con C3d. Los pozos con mayor intensidad de aglutinación anti-C3b y anti-C3d fueron sometidos a clonaciones por diluciones limitantes sucesivas a 1 y a 0.5 células por pozo respectivamente. Los clones correspondientes a las muestras con mayor título se expandieron en cultivo para preservar por congelación, y para evaluar las propiedades de los anticuerpos monoclonales.

Prueba antiglobulina: Las muestras de anticuerpo en suero, sobrenadante de cultivo y ascitis maligna fueron evaluadas en tubos de 13 x 100mm. Se enfrentó en cada tubo 100µL de la muestra con una suspensión de eritrocitos O+ a los 5% recubiertos con C3b o C3d. Para determinar el título se preparó previamente una dilución seriada 1:2 de la muestra. Para las pruebas de especificidad se midió la muestra pura frente a eritrocitos de los grupos A₁, B y O no recubiertos, y eritrocitos del grupo O recubiertos con C3b, C3d, C4b/d e IgG humana⁽¹⁰⁾.

Isotipaje: El isotipo del anticuerpo obtenido fue comprobado por inmunodifusión doble de Ouchterlony en gel de agarosa-PEG⁽¹¹⁾. 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.

III. RESULTADOS

El recubrimiento de eritrocitos de ratón con C3 humano por estimulación de la vía alternativa de activación del Sistema del Complemento se empleó como una variante al uso de C3 purificado a partir de suero humano normal, como inmunógeno para la sensibilización de los ratones previo a la fusión celular. La potencia anti-C3b estuvo en un rango de 8 a 16, mientras la potencia anti-C3d estuvo en el rango de 16 a 32. Cuando se prepararon recubrimientos simultáneos de eritrocitos de ratón y eritrocitos humanos, a partir de la misma muestra de suero humano absorbido, la potencia de aglutinación frente a los eritrocitos de ratón recubiertos fue en la mayoría de los casos un punto inferior a la obtenida frente a eritrocitos humanos recubiertos, mientras en una minoría de pruebas dieron resultados similares. No se detectaron aglutinaciones frente a eritrocitos de ratón o humanos no recubiertos. También se comprobó que los eritrocitos recubiertos con C3d mantenían la potencia de aglutinación específica hasta 72 horas después del momento de recubrimientos cuando el botón de eritrocitos era conservado a 2-8°C en Tampón Fosfato Salino.

Durante la inmunización de los ratones se aplicaron inyecciones intraperitoneales seriadas de una suspensión de eritrocitos de ratón recubiertos con C3d humano, y se confirmó la sensibilización contra esta molécula al medir actividad aglutinante específica en muestras de suero sanguíneo de los ratones inmunizados sobre una suspensión eritrocitos humanos previamente recubiertos. La intensidad de aglutinación de los ratones sensibilizados fue de 2+ (escala de intensidad 0 – 5+), y entre estos se eligió el

que tuvo aglutinados más grandes como donante de los esplenocitos para fusión (Figura 1). No se observó aglutinación anti-C3d en muestras de ratones no inmunizados.

Del bazo se extrajeron 18×10^7 células con 98% de viabilidad, las que se fusionaron con células X63-Ag8.653 en una razón de 3:1 y se sembraron en 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 permanece en su forma simple no fusionada (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 (Figuras 2, 3 y 4).



Fig. 1. Detección de actividad anti-C3d en muestra de suero sanguíneo de ratón inmunizado con eritrocitos de ratón revestidos con C3d humano.

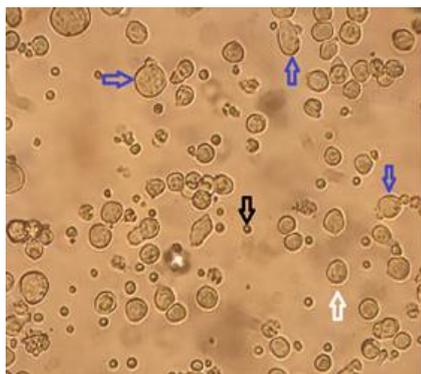


Fig. 2. Células recién sometidas a fusión celular. Flecha blanca: célula X63-Ag8.653 no fusionada. Flecha negra: esplenocito no fusionado. Flechas azules: células fusionadas. Enfoque a 400X.

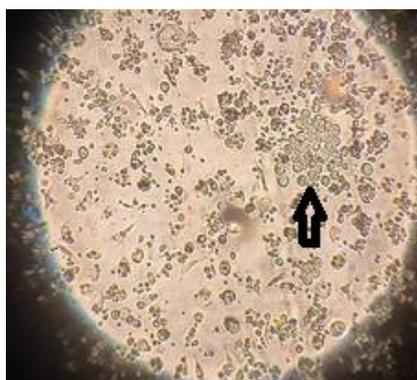


Fig. 3. Crecimiento selectivo incipiente de colonias de hibridomas en Medio HAT a los 5 días después de la fusión celular. Enfoque a 100X.

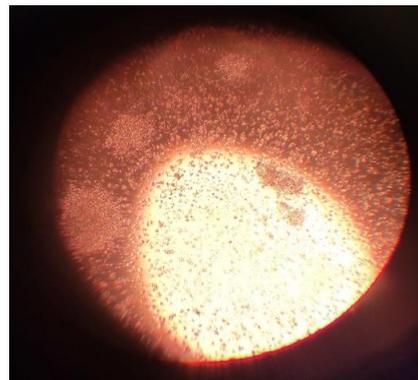


Fig. 4. Colonias de hibridomas formadas en Medio HAT a los 10 días después de la fusión celular. Enfoque a 40X.

Durante la segunda semana se detectaron al microscopio 5978 colonias en 959 pozos de los 960 sembrados (Tabla 1). La eficiencia de fusión, entendida como el porcentaje de pozos con crecimiento de colonias con respecto al total de pozos sembrados, fue de un 100%, lo que se atribuye a que la densidad celular de siembra en las placas fue superior al valor recomendado ⁽⁷⁾, dada la gran cantidad de células con alta viabilidad celular extraídas del bazo. Este argumento gana peso al observar que el valor promedio de 6 colonias celulares por pozo, un valor relativamente alto si se busca obtener un mínimo de colonias celulares por pozo, distribuidas en una mayor cantidad de pozos, lo que permitiría facilitar el posterior aislamiento de clones productores específicos ⁽⁸⁾. Por otro lado, se descartó el crecimiento anormal de colonias de X63-Ag8.653. Se sembró una placa control con estas células en medio HAT, y se verifi-

có la muerte del 100% de las mismas 6 días después al observar muestras del cultivo en presencia de Azul de tripano al 0.4% en Tampón Fosfato Salino.

Tabla 1. Distribución de colonias celulares en crecimiento en las placas de cultivo.

Placa	Pozos con colonias	Pozos 0 con colonias	Pozos 1-3 con colonias	Pozos 4-6 con colonias	Pozos 7-9 con colonias	Pozos 10 o más colonias	Porcentaje de pozos con crecimiento	Colonias por placa	Promedio de colonias por pozo
1	1	0	33	48	14	0	99%	415	4
2	0	0	45	45	5	1	100%	347	4
3	0	0	2	38	35	21	100%	704	7
4	0	0	2	29	37	28	100%	767	8
5	0	0	8	36	40	12	100%	653	7
6	0	0	13	48	25	10	100%	584	6
7	0	0	38	39	16	3	100%	437	5
8	0	0	5	32	42	17	100%	700	7
9	0	0	5	48	26	17	100%	645	7
10	0	0	6	32	35	23	100%	726	8
Total	0	0	157	395	275	132	100%	5978	***

Durante los días 12 y 13 después de la fusión celular los pozos se evaluaron por la prueba de antiglobulina anti-C3d. Se detectaron 59 pozos con actividad anti-C3d y con intensidad de aglutinación variada, los cuales quedaron distribuidos heterogéneamente entre las placas en un rango desde 0 hasta 12 por placa (Tabla 2). La eficiencia de fusión específica, entendida como el porcentaje de pozos con actividad anti-C3d con respecto al total de pozos con colonias en crecimiento, tuvo un valor promedio de 5.9% por placa, valor considerado satisfactorio para el método de fusión celular con PEG⁽⁸⁾.

Tabla2. Obtención de pozos de fusión con actividad anti-C3d.

Placa	Pozos evaluados	Pozos anti-C3d: 2+	Pozos anti-C3d: 3+	Pozos anti-C3d: 4+	Pozos anti-C3d: 5+	Pozos anti-C3d
1	95	2	-	-	-	2
2	96	1	4	-	-	5
3	96	-	-	-	-	0
4	96	3	1	2	1	7
5	96	2	-	3	-	5
6	96	1	3	4	3	11
7	96	1	1	9	1	12
8	96	1	2	2	-	5
9	96	3	1	-	-	4
10	96	3	2	3	-	8
Total	959	17	14	23	5	59

Los pozos con intensidad de aglutinación 0, 1+, 2+ y 3+ se desecharon, mientras los pozos con intensidad de aglutinación 4+ y 5+ se conservaron para continuar con el proceso de selección y aislamiento de los mejores candidatos mediante el método de clonación por diluciones limitantes. Los clones fueron

identificados como 4D9, 7D11 y 7E6, los que fueron expandidos en cultivo celular y fueron congelados en nitrógeno líquido.

Simultáneamente se produjo IgM anti-C3 a partir de los cultivos de los clones obtenida tanto en sobrenadante de cultivo celular como en líquido ascítico en ratones BALB/c, a partir de los cuales fueron evaluadas las propiedades funcionales según los requisitos de calidad establecidos en la regulación vigente para el componente anti-C3 de un Suero Antiglobulínico Humano y se determinó el isotipo de las inmunoglobulinas. En los tres casos se comprobó que los anticuerpos producidos correspondieron a inmunoglobulinas de ratón del tipo IgM, el tipo de inmunoglobulina con mayor eficiencia de aglutinación de eritrocitos. La IgM es secretada formando mayoritariamente pentámeros, o hexámeros de la inmunoglobulina, poseyendo de 10 a 12 sitios de unión. 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, de naturaleza bivalente. Por otro lado, esta macro inmunoglobulina tiene un peso molecular de entre 900 y 1050kDa en los pentámeros y hexámeros respectivamente, cuya talla le permite abarcar tramos de hasta 35nm, suficientes para superar la brecha 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, por tanto, que aglutinen espontáneamente⁽¹²⁾.

La especificidad de reconocimiento y el título de aglutinación de los clones fueron determinados frente a un panel de eritrocitos portadores de diferentes determinantes antigénicos. Como se muestra en la Tabla 3, en ningún caso se observaron aglutinaciones en eritrocitos no revestidos suspendidos en Solución Salina Fisiológica, ni en LISS, ni con determinantes antigénicos del Sistema Sanguíneo ABO. Igualmente, no se detectó actividad cruzada con la molécula IgG humana ni con el factor C4 del complemento, por lo que las propiedades funcionales de los anticuerpos están a tono con lo establecido en la Regulación No. D-59/2021 del CECMED⁽¹⁰⁾.

Tabla 3. Título de aglutinación de muestras de los AcM 4D9, 7D11 y 7E6

Muestra	A ₁ ^{RhD+}	B ^{RhD+}	O ^{RhD+}	O ^{RhD+} , C3b	O ^{RhD+} , C3d	O ^{RhD+} , C4b/d	O ^{RhD+} , IgG
Referencia Poliespecífica anti-IgG, -C3b/d	0	0	0	1:8	1:128	0	256
Referencia Mono-específica anti-C3b/d	0	0	0	1:32	64	0	0
SC 4D9	0	0	0	1:64	2048*	0	0
SC 7D11	0	0	0	1:16	2048*	0	0
SC 7E6	0	0	0	1:32	2048*	0	0
LAM 4D9	0	0	0	1:1024	2048*	0	0
LAM 7D11	0	0	0	1:1024	2048*	0	0
LAM 7E6	0	0	0	1:1024	2048*	0	0

Leyenda: SC: sobrenadante de cultivo; LAM: líquido ascítico maligno; *: último punto de dilución montado.

El componente anti-C3 en un reactivo antiglobulínico humano debe alcanzar un título similar al de la referencia comercial en un ensayo en paralelo, y en ausencia de esta, debe aglutinar eritrocitos recubier-

tos con C3b con un título no menor que 1:4 y eritrocitos recubiertos con C3d con un título no menor que 1:1 con una intensidad mínima de 2+. Los resultados obtenidos en los tres clones evaluados superan los valores medidos en los reactivos mono y poliespecíficos de referencia, con la excepción de la potencia anti-C3b del sobrenadante de cultivo del clon 7D11 con respecto a la referencia monoespecífica. Si bien los títulos de aglutinación de eritrocitos revestidos con C3d fueron similares en los tres casos, con el anticuerpo del clon 4D9 en sobrenadante de cultivo se midió una mayor potencia de aglutinación frente a eritrocitos recubiertos con C3b, superando en un punto de dilución al sobrenadante de cultivo del clon 7E6 y en dos puntos de dilución al clon 7D11. No obstante, la diferencia observada no descarta el potencial de los clones 7D11 y 7E6 para el desarrollo de reactivos antiglobulínicos anti-complemento por lo que serán conservados.

IV. CONCLUSIONES

- 1- La inmunización con eritrocitos revestidos con el fragmento C3d del complemento constituyó una metodología relativamente sencilla y eficiente para la sensibilización de ratones BALB/c.
- 2- Los anticuerpos monoclonales 4D9, 7D11 y 7E6 cumplieron los requisitos de especificidad y potencia de aglutinación requeridos para un componente anti-C3 de reactivos antiglobulínicos humanos según las regulaciones vigentes para la fabricación de sueros antiglobulínicos humanos.
- 3- Los anticuerpos monoclonales obtenidos podrán considerarse como componentes anti-complemento en el desarrollo de sueros antiglobulínicos humanos poliespecíficos o monoespecíficos anti-C3b/d.

REFERENCIAS

1. Theis SR, Hashmi MF. Coombs Test. [Updated 2019 Oct 03]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>. Consultado en Oct/2020.
2. Segel GB, Lichtman MA. Direct antiglobulin ("Coombs") test-negative autoimmune hemolytic anemia: a review. *Blood Cells Mol Dis*. 2014; 52(4):152-160.
3. Parker V, Tormey CA. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretations, and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med*. 2017; 141(2):305-310.
4. Yeow N, Tabor R, Garnier G. Mapping the distribution of specific antibody interaction forces on individual red blood cells. *Sci Rep* 7,41956 (2017).
5. Ruseva MM, Heurich M. Purification and characterization of human and mouse complement C3. *Methods Mol Biol*. 2014; 1100:75-91.

6. Docket No. 84s-0812. Draft. Recommended Method for Evaluating Potency, Specificity and Reactivity of anti-human Globulin. March 1992. Center for Biologics Evaluation and Research food and drug administration.
7. Cruz C, León G. A simple method for the production of anti-C3d monoclonal antibody. *Hybridoma (Larchmt)*; 2007 Dec; 26(6):433-4.
8. Yokoyama WM, Christensen M, Santos GD, Miller D. Production of monoclonal antibodies. *Current Protocols in Immunology*. 2006; 74:2.5.1-2.5.25.
9. 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.
10. Regulación No. D59-21. Requisitos de los diagnosticadores utilizados en Inmunohematología. CECMED, Cuba (marzo 26, 2021).
11. Hornbeck, P. 2017. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (Ouchterlony). *Curr. Protoc. Immunol.*116: 2.3.1-2.3.4.
12. 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 Ene/2022.