Anticuerpos monoclonales y terapéutica del cáncer

J. Piulats

Laboratorio de Bioinvestigación. Merck Química, S.A.

Introducción

Las clásicas estrategias terapéuticas aplicadas en el cáncer, quimioterapia, radioterapia y cirugía han logrado en los últimos años avances significativos en el control de la enfermedad. Las limitaciones de cada una de estas estrategias obliga a entender la terapia actual del cáncer como un ejercicio de armonización de sus diversas posibilidades[1], pero a su vez nos señalan la necesidad urgente en la búsqueda de nuevas vías capaces de dar respuesta a una enfermedad tan heterogénea como es el cáncer.

En la última década el conocimiento sobre la biología tumoral ha encontrado en los avances de la inmunología y la biología molecular dos firmes apoyos para su profundización. Nos referimos a la capacidad de producir y purificar *linfoquinas, citoquinas, antígenos relacionados* con el tumor y sus correspondientes anticuerpos monoclonales, así como abordar el problema de las metástasis a través del reconocimiento de las estructuras moleculares responsables de los procesos de adherencia y neovascularización.

Todo ello ha posibilitado la definición de nuevas estrategias, que se agrupan con el nombre de bioterapia[2]. En esta ponencia se revisan los fundamentos de las mismas y se analizan, con mayor profundidad, los problemas de investigación experimental inherentes a la producción de anticuerpos monoclonales humanos, como agentes terapéuticos, por ser éste el proyecto de nuestro laboratorio de bioinvestigación.

Bioterapia del cáncer

A nivel clínico ya fueron ensayados, en la década de los setenta, diversos protocolos de *inmunoterapia inespecífica*, que pretendían estimular la respuesta inmune del paciente mediante agentes de origen bacteriano (por ejemplo BCG). Los resultados no fueron satisfactorios, pero aquellos agentes o derivados estructurales de los mismos pueden tener interés como adyuvantes de tratamientos específicos. Este fracaso inicial de la inmunoterapia propició un rechazo hacia la utilización de productos de origen biológico en el tratamiento del cáncer.

Durante la misma época, los inmunólogos profundizaban en el estudio del significado biológico de las linfoquinas y citoquinas[3,4]. La posibilidad de obtener, mediante tecnología del ADN-recombinante, estos mediadores de los que dependen los procesos de proliferación, diferenciación y cooperación intercelular[5], relanzó el papel de la bioterapia. Así, SA Rosenberg et al[6] y MA Cheever et al[7] inician la llamada *inmunoterapia celular adoptiva*. Inicialmente, esta estrategia terapéutica consistía en la administración al paciente de sus propias células LAK (*lymphokine activated killer*), previamente activadas *in vitro* con interleuquina-2 (IL-2), más perfusión de IL-2. La toxicidad de este protocolo llevó a una vía alternativa en la que se utilizaron los linfocitos TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*). Recientemente, se han publicado los resultados de dos ensayos independientes en los que se utilizaron TIL + IL-2[8,9].

Una tercera vía que se encuentra en estudio es la *inmunoterapia específica activa*. Su fundamento es análogo a la vacunación frente a las enfermedades infecciosas, pero en el caso de la enfermedad neoplásica la finalidad no sería preventiva, sino terapéutica y por tanto el antígeno a utilizar debería ser la propia célula tumoral del paciente[10], un antígeno asociado al tumor (TAA: *tumor associated antigen*), o bien el antiidiotipo, como imagen interna del antígeno seleccionado[11-24].

Alternativamente, una *inmunoterapia pasiva* perseguiría un efecto terapéutico directo, mediante la acción citotóxica de anticuerpos monoclonales específicos frente a antígenos asociados al tumor, bien por su actividad *per se* o como vehículos de fármacos citotóxicos, es de-

cir, mediante la formación de inmunoconjugados o inmunotoxinas[25].

Finalmente, se podría añadir a esta sucinta revisión una nueva estrategia que trata de inhibir, a nivel molecular, la síntesis de ciertos factores de crecimiento, mediante la utilización de oligonucleótidos complementarios —*antisense*— a una fracción del gen que codifica para el factor.

Cada una de estas vías terapéuticas se encuentra a distintos niveles de investigación experimental o clínica. Nuestro laboratorio participa, desde 1986, en el desarrollo de la inmunoterapia pasiva mediante un amplio proyecto orientado a la obtención de anticuerpos monoclonales (Acm) humanos dirigidos a la terapia del cáncer[26]. En el apartado siguiente se discuten los principales aspectos técnicos del mismo.

Anticuerpos monoclonales humanos

La técnica de obtención de anticuerpos monoclonales murinos[27], (MuAcm) frente a un determinado antígeno, ha sido ampliamente utilizada y ha ofrecido magníficos resultados en el área del diagnóstico clínico, aunque su utilidad terapéutica se ha visto limitada por la aparición en el paciente, bajo tratamiento, de anticuerpos séricos frente a las proteínas murinas (HAMA: *human antimouse antibodies*). Los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han demostrado que prácticamente el 80-90 % de los pacientes tratados con MuAcm desarrollan HAMA, pero sólo un porcentaje inferior al 5 % presentan reacciones anafilácticas a los mismos. Sin embargo, la presencia sérica de los HAMA bloquea el efecto terapéutico de los monoclonales administrados.

Estos problemas justifican que se pretenda obtener anticuerpos monoclonales humanos (HuAcm), bien por el uso escrito de células humanas en todo el proceso, o bien por la «humanización» de anticuerpos murinos[28-31], pero ambos objetivos presentan múltiples dificultades técnicas. Algunas de ellas son tratadas con mayor detalle a continuación.

Antígenos asociados con el tumor

Un problema común a la obtención de anticuerpos monoclonales, tanto murinos como humanos, es la adecuada selección del antígeno. La ausencia de auténticos antígenos específicos de la célula tumoral obliga a un estudio previo de la selectividad del antígeno sobre la célula tumoral y normal. Según cual sea el antígeno seleccionado nos podemos encontrar con estructuras escasamente inmunogénicas. En ciertos tipos de tumores resultan de interés, como antígenos, los receptores de ciertos factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico [EGF], transferrina, interleuquina-2). Estos receptores suelen ser proteínas codificadas por oncogenes, pero en otros casos el antígeno mayormente expresado sobre la célula tumoral puede ser un glicolípido o hidrato de carbono, que suelen ser muy poco inmunogénicos. Por otra parte, cualquier intento experimental para aumentar la inmunogenicidad de la estructura antigénica deberá cuidar el mantenimiento y presentación adecuada del epítopo a las células inmunocompetentes. Precisamente este problema de la baja inmunogenicidad antigénica es lo que ha conducido, en la inmunoterapia activa específica, a la substitución del antígeno por su correspondiente antiidiotipo.

En realidad, los mecanismos inmunológicos implicados en el procedimiento de antígenos tipo glicolípido o hidrato de carbono son aún poco conocidos, en comparación con los antígenos proteicos. Éstos son reconocidos por la célula B a través de las inmunoglobulinas de superficie, lo que supone la activación inicial de la célula B en reposo; la posterior internalización, procesamiento y reexpresión de dicho antígeno sobre la membrana celular, en cooperación con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC: *major histocompatibility complex*), permitirá su adecuada presentación al linfocito T cooperador (T_H: T-helper), que a su vez iniciará la producción de factores de crecimiento y diferenciación de la célula B, como interleuquinas 4, 5 y 6[32,33]. La cooperación de otras células presentadoras de antígeno (APC) como son los macrófagos o células dendríticas parece imprescindible en la activación inicial de las células T_H en reposo[32,34]. Este triángulo cooperativo entre las células B, T_H y APC deberá ser estudiado en profundidad con los antígenos (o haptenos) no proteicos, a fin de definir los óptimos protocolos de inmunización, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Ejemplos de lo que antecede son nuestros estudios actuales sobre inmunización con glicolípidos del tipo gangliósido. Así, utilizando el gangliósido GD_3 (disialolactoceramida) unido a diversas moléculas portadoras, *carriers*, se han podido obtener y caracterizar varios anticuerpos monoclonales específicos para fragmentos de la estructura del GD_3. Los estudios en curso pretenden dilucidar la mejor forma de pre-

sentación de estructuras afines a GD_3, a las células inmunocompetentes mediante modelos *in vivo* e *in vitro*.

Células implicadas en la formación del hibridoma

El procedimiento general para obtención de anticuerpos monoclonales se basa en el método descrito por Köhler y Milstein en 1975[27]. El método permite la obtención de célula híbridas o hibridomas resultantes de la fusión entre células B, procedentes del bazo de ratones previamente inmunizados con el antígeno seleccionado y células de mieloma de ratón. A su vez, la célula de mieloma debe reunir dos propiedades: que no sea productora de inmunoglobulinas y que contenga un defecto enzimático (ausencia del enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa, HGPRT) que permite tras el proceso de fusión, la selección de los hibridomas en medios específicos. De esta forma la nueva célula híbrida recoge las dos propiedades fundamentales de las células progenitoras: la supervivencia en cultivo de la célula neoplásica y la capacidad de síntesis de anticuerpos de la célula B.

Este método es también válido para la obtención de los hibridomas humanos. Sin embargo, en este caso se deben superar tres dificultades: *a*) la disponibilidad de células B humanas; *b*) la inmunización *in vitro* de los linfocitos B, y *c*) la obtención de células de mieloma o plasmacitoma humanos aptas para la hibridación.

En nuestro laboratorio trabajamos con linfocitos B procedentes de amígdalas, de sangre periférica o bien con esplenocitos. Cada una de estas fuentes tiene unas características distintas con respecto al número y grado de maduración de los linfocitos B. Los linfocitos de sangre periférica contienen una proporción menor de linfocitos B que en el bazo, por ello los esplenocitos serían las células de primera elección, pero por razones evidentes su disponibilidad es muy limitada. Por otra parte, los linfocitos de amígdalas suelen presentar un elevado grado de contaminación bacteriana, que dificulta los modelos de inmunización *in vitro* que se desea estudiar.

Naturalmente, la obtención de anticuerpos monoclonales humanos puede seguir otra alternativa a la que aquí comentamos; así podríamos fusionar, sin inmunización *in vitro*, linfocitos procedentes de pacientes, pues dichas células ya presentarían un cierto grado de inmunización frente a sus propios antígenos tumorales. Esta alternativa ya ha sido utilizada con éxito; como ejemplo podemos citar la producción de anticuerpos monoclonales humanos frente al gangliósido GD_2[35].

Esta vía, aunque válida para ciertas estrategias terapéuticas, no coincide con nuestro objetivo de descifrar un método más general, que nos permita la obtención de anticuerpos monoclonales humanos procedentes de linfocitos normales.

En nuestro laboratorio hemos ensayado diversos modelos de inmunización *in vitro* de linfocitos murinos, así como de linfocitos humanos periféricos y esplenocitos. Los resultados preliminares nos han permitido caracterizar las principales condiciones de cultivo para lograr la inmunización *in vitro* de células murinas frente a antígenos inmunogénicos de estructura proteica. Una amplia revisión sobre este tema se puede encontrar en Borrebaeck et al[36] y la primera descripción sobre la producción de anticuerpos monoclonales humanos *in vitro* en los trabajos de Olsson y Kaplan[37]. Sin embargo, queda aún un gran esfuerzo para ampliar aquellos conocimientos al sistema humano y al caso particular de antígenos no inmunogénicos, para que un anticuerpo humano alcance la fase de investigación clínica.

Pero aun suponiendo solventados los problemas anteriores nos deberíamos enfrentar con un nuevo obstáculo: ¿qué método de inmortalización de la célula B humana debemos usar?

En el sistema murino se han obtenido células de mieloma, con una alta eficiencia de fusión, que han permitido que la tecnología de hibridomas, entre células murinas, sea un proceso de rutina en muchos laboratorios. Sin embargo, no se ha podido encontrar la célula de mieloma o plasmacitoma humano que logre la fusión celular con niveles equivalentes de eficiencia y estabilidad posfusión. En algunos laboratorios se recurre a la inmortalización B mediante la infección con el virus de Epstein-Barr (EBV). Este método, aunque efectivo, resulta discutible cuando el producto final que se persigue es un agente terapéutico. Otra vía utilizada ha sido la fusión celular entre los linfocitos humanos y un mieloma murino, con infección previa o no de los linfocitos humanos con EBV. Al igual que otros grupos[38] nuestro laboratorio investiga la obtención de nuevas líneas celulares aptas para la fusión. Uno de los métodos utilizados es la selección de heterohíbridos, murino-humanos, a los que se inducen efectos metabólicos que permitan su posterior selección en los medios de cultivo adecuados.

Una vía alternativa es la propuesta por Jonak[39,40] que consiste en la obtención de linfocitos B transformados por transfección de oncogenes como *myc* o *ras*. Son los llamados transfectomas. Inmunización *in vitro* e inmortalización del linfocito B humano son pues los objetivos prioritarios de nuestros proyectos de investigación.

Otra fase en el desarrollo de dichos proyectos es la optimización de la tecnología de hibridomas para lograr mejorar las eficiencias de fusión en el sistema humano. El método clásico de fusión utiliza como agente fusógeno el polietilenglicol (PEG) y nosotros hemos estudiado la eficacia del método de electrofusión comparado al del PEG.

Inicialmente el método se ensayó en sistema murino observándose una eficiencia cinco veces superior al del PEG, aunque los resultados dependen del tipo de célula mielomatosa que se usa. Actualmente se ensaya en el sistema humano. En algunos casos la eficiencia se mantiene similar a la obtenida con polietilenglicol, pero la posibilidad de realizar la fusión con un bajo número de linfocitos humanos ya significa una importante ventaja metodológica.

Isotipos de inmunoglobulinas y humanización de anticuerpos murinos

La obtención de anticuerpos monoclonales con una finalidad terapéutica exige una atención especial sobre el tipo de isotipo de la inmunoglobulina específica producida por el hibridoma, ya que las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas murinas y humanas presentan una distinta afinidad por el complemento humano y por las células efectoras de la citotoxicidad celular. En otras palabras, según cual sea el isotipo se obtendrá una mayor o menor respuesta en los mecanismos de citotoxicidad dependientes del complemento o de la citotoxicidad inducida por células dependientes del anticuerpo (ADCC: *antidoby-dependent cellular citotoxicity*).

Así, por ejemplo, la IgM y la IgG3 murinas presentan la mejor eficacia en la citotoxicidad mediada por complemento humano, mientras que los isotipos murinos IgG2a y IgG3 ofrecen los mejores resultados en los modelos de ADCC con células efectoras humanas. Si se trata de anticuerpos monoclonales humanos los mejores resultados con complemento siguen este orden: IgM > IgG1 > IgG3 > IgG2 > IgG4, mientras que en ADCC los isotipos humanos eficaces son IgG1 e IgG3[31]. El gran tamaño molecular de la inmunoglobulina IgM dificulta su circulación y acceso al tumor y por tanto no debe ser, para terapia, la inmunoglobulina de elección. Sin embargo, la tecnología de hibridomas nos conduce a la obtención de un determinado isotipo, sin que exista por nuestra parte ningún control sobre dicho proceso.

La necesidad de inmunoglobulinas del tipo IgG para terapia nos conduce a revisar uno de los fenómenos más interesantes de la inmunología, como es el cambio de clase de inmunoglobulina *(isotype switching)* durante la diferenciación de los linfocitos B. Los fenómenos de reorganización del genoma que darán lugar al cambio —*switch*— tienen una gran importancia fisiológica ya que las propiedades biológicas, citadas anteriormente, de los distintos isotipos de inmunoglobulinas, residen en la mitad C-terminal de las cadenas pesadas (H), mitad que es codificada por los genes C_H[41].

Una aproximación a la regulación experimental en el tipo de isotipo nos lo ofrecen los trabajos de Snapper y Paul[42] y Stevens et al[43]. Los primeros han demostrado que a los linfocitos murinos estimulados policlonalmente se les puede inducir la expresión de determinados isotipos mediante gamma-IFN e IL-4.

El gamma-IFN induce la expresión de IgG2a e inhibe la producción de IgG3, IgG1, IgG2b e IgE. Mientras que IL-4 promueve la formación de IgG1 e IgE e inhibe la IgM, IgG3, IgG2a e IgG2b. Por su parte, Stevens et al[43] han descrito la existencia de dos tipos de clones T_H. Ambos sintetizan IL-3 y el factor estimulador de colonias granulocito-monocito (GM-CSF), pero sólo T_{H1} produce IL-2, gamma-IFN y linfotoxina, mientras que T_{H2} produce IL-4 e IL-5. Ambos tipos de células T_H inducen la secreción de IgM e IgG3, mientras que los clones T_{H1} y T_{H2} inducen específicamente a las células B antígenospecíficas a segregar IgG2 e IgG1, respectivamente. Esta regulación se realiza en dos etapas: *a)* interacción entre las células T y B, y *b)* interacción entre las linfoquinas, producidas por las células T y las células B.

Estas aportaciones experimentales al control de isotipos son de gran interés, pero serán necesarios más estudios a nivel molecular que puedan explicar el papel de los factores T en los cambios de accesibilidad a las regiones S (cambio) del gen, de las enzimas responsables de las recombinaciones genómicas que configuran finalmente el isotipo.

Las dificultades inherentes a la producción de Hu Acms y la importancia terapéutica del isotipo de inmunoglobulina ha conducido a nuevas

estrategias, que han sido posibles gracias a los avances en la biología molecular e ingeniería de proteínas. Nos referimos a los anticuerpos quimera[44,45] y a la remodelación de anticuerpos humanos[46].

Los anticuerpos quimera poseen la zona de reconocimiento antigénica del monoclonal murino, pues conservan sus regiones variables y la región constante del anticuerpo humano.

La remodelación consiste en el trasplante de únicamente la zona de unión del antígeno del anticuerpo murino, en lugar de toda la zona variable, sobre las regiones variables del anticuerpo humano.

Las potenciales ventajas de estos anticuerpos son las reducción de la inmunogenicidad debida al anticuerpo murino y a la posibilidad de selección del isotipo humano.

Pero aún es prematuro conocer el alcance clínico de estos anticuerpos obtenidos mediante las técnicas del ADN recombinante.

Conclusiones

La revisión, en esta ponencia, de las dificultades técnicas que acompañan al proyecto de obtención de Acms, como agentes terapéuticos del cáncer, coincide con los temas en estudio en nuestro laboratorio. No se han abordado otros temas de gran interés como son la formación de inmunoconjugados y la cinética *in vivo* de las inmunoglobulinas o sus fragmentos Fab, pues todavía ocupan un segundo orden de prioridad en nuestro trabajo experimental.

A pesar de que los interrogantes son muchos, el enorme esfuerzo internacional puesto en este tipo de proyectos, así como la rápida evolución en la tecnología implicada, sugieren que muy pronto podamos recoger los resultados sobre su aplicación clínica. Los principales problemas continuarán siendo la heterogeneidad de la célula tumoral y la ausencia de antígenos tumorales específicos, pero confiamos que estos nuevos agentes biológicos puedan aportar, conjuntamente con la cirugía, radioterapia y quimioterapia, una mejora real en el tratamiento del cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amiel JL, Ronëssé J, Machover D. Manual de Oncología. Toray-Masson, Barcelona, 1978.
2. Oldham RK. Biotherapy: General principles. En: Oldham RK, ed. Principles of cancer biotherapy. Nueva York, Raven Press, 1978: 1-20.
3. Dumonde DC, Wolstencroft RA, Panay CS, Matthew H, Money J, Howson WT. Lymphokines: Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. Nature 1969; 224: 38.
4. Oppenheim JJ, Cohen S. eds. Interleukins, lymphokines and citokines. Nueva York, Academic Press, 1983.
5. Green AR. Peptide regulatory factors: multifunctional mediators of cellular growth and differentiation. Lancet 1989; 1: 705-707.
6. Rosenberg SA, Eberlein T, Grimm E, Mazumder A, Rosenstein M. Adoptive transfer of lymphoid cells expanded in T-cell growth factor: murine and human studies. En: Fefer A, Goldstein AL, eds. The potential role of T cells in cancer therapy. Progress in cancer research and therapy. Nueva York, Raven Press, 1982; 22: 161-170.
7. Cheever MA, Greenberg PD, Gillis S, Fefer A. Specific adoptive therapy of murine leukemia with cells secondarily sensitized *in vitro* and expanded by culture with interleukin 2. En: Fefer A, Goldstein AL, eds. The potential role of T cells in cancer therapy. Progress in cancer research and therapy. Nueva York, Raven Press, 1982. 22: 127-144.
8. Rossenberg SA et al. Use of tumor-infiltrating lymphopcytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastasic melanoma. N Eng J Med 1988; 319: 1.676-1.680.
9. Kradin RL et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in treatment of advanced cancer. Lancet 1989; 1: 577-580.
10. Marx JL. Cancer vaccines show promise at last. Science 1989; 245: 813-815.
11. Thanavala Y. Anti-idiotype vaccines. Tibtech 1989; 7: 62-66.
12. Burdette S, Schwarts RS. Current concepts: Immunology idyotypes and idiotypic networks. New Eng J Med 1987; 317 (4): 219-224.
13. Maloney DG, Kaminski MS, Burowski D, Haimovich J, Levy R. Monoclonal anti-idiotype antibodies against the murine B cell lymphoma 38C13: Characterization and use as probes for the bioloby of the tumor *in vivo* and *in vitro*. En: Steplewski Z, ed. Monoclonal Antidoby News. Mary Ann Liebert, Inc Pub 1985; 4 (3): 191-209.
14. Wettendorff M, Iliopoulos D, Schmoll E, Koprowski H, Herlyn D. Specific detection of antibodies in cancer patients following immunotherapy with anti-idiotype. J Immunol Methods 1989; 116: 105-115.
15. Kennedy RC, Zhou EM, Landford RE, Chanh TC, Bona CA. Possible role of anti-idiotypic antibodies in the induction of tumor immunity. J Clin Invest 1987; 80: 1.217-1.224.
16. Diakun KR, Matta KL. Synthetic antigens as immunogens: Part III. Specificity analysis of an anti-anti idiotypic antibody to a carbohydrate tumor-associated antigen. J Immunol 1989; 142: 2.037-2.040.
17. Kaminiski MS, Kitamura K, Maloney DG, Campbell MJ, Levy R. Importance of antibody isotype

in monoclonal anti-idiotype theraphy of a murine B cell lymphoma. A study of hybridoma class switch variants. J Immunol 1986; 136: 1.123-1.130.
18. Keay S, Rasmussen L, Merigan TC. Syngeneic monoclonal anti-idiotype antibodies that bear the internal image of a human cytomegalovirus neutralization epitope. J Immunol 1988; 140 (3): 944-948.
19. Stevenson FK, Gordon J. Immunization with idiotypic immunoglobulin protects against development of B lymphocytic leukemia, but emerging tumor cells can evade antibody attack by modulation. J Immunol 1983; 130: 970-973.
20. Sasaki T, Tamete E, Muryoi T, Takai O, Yoshinaga K. *In vitro* manipulation of human anti-DNA antibody production by anti-idiotypic antibodies conjugated with neocarzinostatin. J Immunol Vol. 1989; 142: No. 4.
21. Courtenay-Luck NS, Epenetos AA, Sivolpaneko GB, Larche M, Barkans JR, Ritter MA. Development of anti-idiotypic antibodies against tumourantigens and autoantigens in ovarian cancer patients trated intraperitoneally with mouse monoclonal antibodies. Lancet 1988; 2: 894-897.
22. Weiner GJ, Kaminski MS. Idiotype variants emerging after anti-idiotype monoclonal antibody of a murine B cell lymphoma. J Immunol 1989; 142: 343-351.
23. Campbell MJ, Esserman L, Levy R. Immunotheraphy of stablished murine B cell lymphoma. Combination of idiotype immunization and cyclophosphamide. J Immunol 1988; 141: 3.227-3.233.
24. Stevenson FK. Idiotypes and diseases. Immunology Today 1986; 10: 287-288.
25. Third International Conference on Monoclonal Antidoby Immunoconjugates for cancer. UCSD Cancer Center. San Diego, California, 4-6 de febrero, 1988.
26. Piulats J. Anticuerpos monoclonales en la terapia del cáncer. Proyecto EUREKA EU-208. Ciencia industria farmacéutica. 1988; 7 (4): 111-116.
27. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495.
28. Von Baehr R., Grunow R, Kiess St. Hybridomtechnik-tierische und humane monoklonale antikörper. Annalen der Charite 1988: 134-147.
29. James K, Bell GT. Human monoclonal antibody production current status and future prospects. J Imm Methods 1987; 100: 5-40.
30. Morrison SL, Wims L, Wallick S, Tan L, Oi VT. Genetically engineered antibody molecules and their application. Ann N Y Acad Sci 1988; 507: 187-198.
31. Dillman RO. Monoclonal antibodies for treating cancer. Ann Inter Med 1989; 111: 592-603.
32. De Franco AL. Cell-cell interactions in the antibody response. Nature 1988; 334: 199-200.
33. Kupfer A, Swain SL, Singer SJ. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. J Exp Med 1987; 165: 1.565-1.580.
34. Lassila O, Vainio O, Matzinger P. Can B cells turn on virgin T cells? Nature 1988; 334: 253-255.
35. Irie RF, Morton DL. Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 8.694-8.698.
36. Borrebaeck CAK, Ed. *In vitro* immunization in hybridoma tehcnology. Amsterdam, Elsevier 1988.
37. Olsson L, Kaplan HS. Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 5.429-5.431.
38. Dorfman NA. The optimal technological approach to the development of human hybridomas. J Biol Response Mod 1985; 4: 213-239.
39. Jonak ZL, Owen JA, Machy P, Leserman LD, Greig RG. Gene transfection and lymphocyte immortalization: a new approach to human monoclonal antibody production. Advanced Drug Delivery Reviews 1988: 207-228.
40. Jonak ZL, Owen JA, Machy P. Strategies for the immortalization of B lymphocytes. En: Borrebaeck CAK, ed. *In vitro* immunization in hybridoma technology. Amsterdam Elsevier Science Publishers, 1988: 163.
41. Taussig MJ, Sims MJ, Krawinkel U. Regulation of immunoglobulin gene rearrangement and expression. Immunology Today 1989; 10 (5): 143-146.
42. Suapper CM, Paul WE. Interferon-and B-cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. Science 1987; 236: 944-947.
43. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. Nature 1988; 334: 255-258.
44. Bloom BR. Perspective on molecular immunology and modulation of immune responses. Cell Immunol 1986; 99: 61-72.
45. Beidler CB, Ludwing JR, Cardenas J et al. Cloning and high level expression of a dimeric antibody with specificity for human carcinoembryonic antigen. J Immunol 1988; 141: 4.053-4.060.
46. Riechmann L, Clarck M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. Nature 1988; 332: 323-327.

DISCUSIÓN

R. LLOPIS: En el modelo murino, ¿qué pauta de inmunización han utilizado para obtener anticuerpos monoclonales contra gangliósidos? Mi segunda pregunta referida también al modelo murino sería, ¿qué diferencia en número y especificidades de los anticuerpos monoclonales obtienen con y sin inmunización *in vitro*? O, dicho de otra manera, el modelo de inmunización *in vitro* ¿aporta alguna ventaja frente a la pauta convencional de elaboración de anticuerpos monoclonales? Tercero, me gustaría saber cuál es el antígeno que han utilizado en el modelo de inmunización *in vitro*. Por último ¿cuántas líneas de origen linfoide humano clonadas han establecido en su laboratorio o en otros laboratorios de su empresa?

J. PIULATS: En cuanto a la primera cuestión relativa a la obtención de anticuerpos murinos contra gangliósidos, los sistemas de inmunización han sido los convencionales utilizando el glangliósido absorbido a *Salmonella minesotta* como agente adyuvante o transportador de ese gangliósido. En algunos casos se utilizaron así mismo directamente células, del tipo melanoma, pero los mejores efectos siempre se han obtenido empleando *S. minesotta* y pautas de inmunización clásicas, generalmente a 30 días. Se han ensayado modelos de inmunización a más largo plazo, de 3-6 meses, es decir, procesos largos de inmunización para ver si realmente tenían alguna ventaja, observándose que los niveles de anticuerpos séricos no se correspondían con la buena producción de anticuerpos monoclonales en esas células. Es decir, nosotros creemos que no son necesarios procesos de inmunización excesivamente largos con gangliósidos, pero las recomendaciones varían según los autores. Con respecto a la segunda pregunta, según nuestra experiencia la inmunización *in vitro* en sistema murino, no supone una ventaja. Lo que ocurre es que el sistema murino facilita el estudio del sistema humano. En cuanto a la tercera cuestión, el antígeno utilizado eran hematíes de carnero, siguiendo el modelo clásico de Hoffman, aunque evidentemente no estamos interesados en la producción del anticuerpo antihematíes, sino en el efecto de los factores que se introducen en el modelo, como por ejemplo IL-2, entre otros. Contestando a la última pregunta, nosotros todavía no tenemos una colección. Este proyecto se realiza en 3 laboratorios: dos en Alemania y el nuestro en Barcelona. Uno de los laboratorios en Alemania se dedica a la síntesis y purificación de este tipo de antígenos. Nosotros nos ocupamos principalmente de las técnicas de inmunización *in vitro* y producción de monoclonales y el otro laboratorio alemán estudia la especificidad en líneas generales de estos monoclonales en distintos tipos de tejidos. Este proyecto se complementa con 30 acuerdos internacionales de cooperación con centros exteriores. Se trata, por tanto, de un trabajo muy diversificado y en estos momentos no puedo facilitarle una relación de líneas ya clonadas.

R. LLOPIS: Me parece interesante, especialmente para las personas que no están involucradas directamente en la obtención de anticuerpos monoclonales de origen humano, dejar bien sentada la dificultad real y el grado de complejidad de estas técnicas.

J. PIULATS: Efectivamente, creo que en los 2 últimos años han aparecido unas 76 publicaciones sobre anticuerpos monoclonales humanos, pero hay que hacer la salvedad de que la mayoría de los grupos utilizan células procedentes de pacientes que, por lo tanto, ya tienen un cierto grado de preinmunización frente a sus propios antígenos tumorales. Es decir, la mayoría de investigadores producen anticuerpos monoclonales transformando las células de pacientes con virus de Epstein-Barr, que seguidamente fusionan con un mieloma murino y obtienen anticuerpos que se consideran como humanos porque proceden de un linfocito humano de paciente. Este no es nuestro caso, ya que lo que pretendemos es que todo el proceso sea humano. Por otra parte, estamos estudiando si realmente el proceso de humanización funciona o no funciona.

L. ENJUANES: Querría hacer un comentario y una pregunta. En muchos casos es importante hacer un cambio de isotipo deseado, pero se plantean dos tipos de problemas. Cuando se trata de hacer el cambio *in vivo* hay que buscar estrategias y sistemas de regulación que permitan hacerlo. Sin embargo, en mi opinión, cuando uno quiere obtener un anticuerpo monoclonal de un isotipo determinado, puede plantearse la estrategia de obtenerlo inicialmente con la especificidad deseada, ya que en realidad los hibridomas producen variantes con una frecuencia en torno a 5-10 de distintos isotipos, y cuando se dispone de anticuerpos monoclonales contra las distintas cadenas pesadas correspondientes a los diferentes isotipos, es relativamente fácil seleccionar *a posteriori* el hibridoma que está pro-

duciendo el isotipo que uno quiere, simplemente con estos anticuerpos específicos y un sensor t. En cuanto a mi pregunta es la siguiente: yo sigo con la idea de que todavía hoy puede ser más práctico a la hora de obtener anticuerpos monoclonales humanos tratar de obtener heterohibridomas ratón-humano. Es decir, partiendo de un hibridoma murino de una especie determinada, tratar de obtener el heterohibridoma ¿qué opina usted sobre este particular?

J. PIULATS: Estoy de acuerdo con su comentario sobre los isotipos, pero en el caso concreto de estructuras de tipo glicolipídico, como los gangliósidos que he presentado, es muy posible que la deficiencias de formación de distintos isotipos sean distintas de las observadas con otros antígenos de tipo proteico. En cuanto a la pregunta, comparto plenamente su opinión, y ésta es otra vertiente de lo que estamos haciendo. Igual que en el laboratorio, no se ha fijado tan sólo una línea única, sino todo un abanico de posibilidades para intentar producir ese anticuerpo.

M. T. GALLART: Quisiera que comentara con un poco más de detalle la utilización del virus de Epstein-Barr como método para inmunizar *in vitro* o amplificar respuestas de células B. ¿Qué opinión le merece esta metodología para seguidamente heterofusionar, como decía el Dr. Enjuanes? ¿Existe en su opinión alguna línea mielomatosa humana que además de ser factible sea práctica de utilizar? Con respecto a los heterohibridomas, quisiera comentar mi experiencia no en la búsqueda de anticuerpos monoclonales, sino para ver qué tipos de anticuerpos secretan determinadas células B. Los resultados fueron altamente positivos, aunque uno de los problemas fue la estabilidad de los heterohíbridos que quizá podríamos comentar en esta discusión.

J. PIULATS: Es evidente que la utilización de virus de Epstein-Barr como agente transformante es muy efectiva. En general lo que se hace es una transformación del virus de Epstein-Barr y seguidamente una fusión con una célula de mieloma con el fin de estabilizar la producción de inmunoglobulinas de esa célula híbrida.

Pero hay que tener en cuenta que nosotros lo que perseguimos es un efecto terapéutico, y en este sentido el uso de Epstein-Barr puede comportar que el producto final tenga un cierto nivel de contaminación con partículas virales. Es decir, una cosa es el aspecto científico y otra el aspecto práctico, cuando se pretende que un producto pueda ser utilizado en el hombre. En cuanto al problema de heterohíbridos, nosotros también hemos estado trabajando con la producción de heterohíbridos, introduciéndoles más de un marcador de deficiencia enzimática para conseguir mayor estabilidad. También en este caso se plantean una serie de problemas no científicos sino relacionados con las patentes en el campo farmacéutico.