

---

# Desarrollo de anticuerpos monoclonales

---

O. Massó, A. Carceller, J. Adán, E. Rosell,  
F. Blasco, F. Mitjans y J. Piulats

Laboratorio de Bioinvestigación. MERCK-IGODA S.A. Barcelona.

## Introducción

Con la introducción de la tecnología de anticuerpos monoclonales en 1975 por Koller y Milstein<sup>1</sup> ha sido posible disponer de anticuerpos con especificidades predefinidas y en cantidades prácticamente ilimitadas. Hacia mediados de la década de los ochenta se iniciaron diversos estudios clínicos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra diversos tumores. Estos estudios han demostrado que los anticuerpos monoclonales pueden ser utilizados con éxito y con efectos secundarios reducidos, siendo muy extraña la aparición de reacciones adversas graves. Debido a que los anticuerpos monoclonales poseen una reducida capacidad citotóxica, se han iniciado diversas estrategias combinando el uso de anticuerpos con agentes citostáticos, isótopos radiactivos y citocinas, recombinantes con el objetivo de incrementar el efecto citotóxico del anticuerpo. Finalmente, la ingeniería genética ha aportado las herramientas necesarias para convertir los anticuerpos obtenidos en ratón en anticuerpos *quasi* humanos y así obviar la respuesta inmune antiproteínas de ratón.

En nuestro laboratorio se inició la obtención de anticuerpos monoclonales, tanto de ratón como de humanos, a mediados de la década de los ochenta. Inicialmente nos focalizamos en el campo del melanoma para, posteriormente, estudiar otras aplicaciones como el adenocarcinoma de colon y páncreas y, más recientemente, empezar a trabajar en el campo de la metástasis. Fruto de este trabajo ha sido la obtención y caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales específicos de melanoma y el estudio de diversas aproximaciones a la obtención de los mismos. La característica común en toda nuestra línea de trabajo es el uso de antígenos glucídicos como antígenos asociados a tumores.

## Las estructuras glucídicas de glucolípidos y glucoproteínas como antígenos asociados a tumores

Existen diversas evidencias de que las alteraciones genéticas inherentes a todo proceso oncológico se traducen en múltiples alteraciones de las moléculas expresadas en la membrana celular. Estas alteraciones genéticas modifican la síntesis y expresión de un gran número de marcadores de membrana implicados en la interacción, desarrollo y diferenciación celular<sup>2</sup>. Diversos grupos han demostrado que tanto enzimológica como inmunológicamente existe un paralelismo entre la célula tumoral y su equivalente embrionario<sup>3</sup>. Uno de los patrones que exhiben un mayor paralelismo es el patrón de glucosilación de la membrana celular<sup>4</sup>.

Uno de los cambios más significativos que experimenta la célula tumoral es el incremento en la expresión de glucolípidos y glucoproteínas de membrana. Estos cambios son tanto cuantitativos como cualitativos. Cualitativamente es frecuente el aumento en el grado de sialización y fucosilación de las cadenas de hidratos de carbono sin que se hayan descrito estructuras de neosíntesis, mientras cuantitativamente se incrementa de forma considerable el ritmo de síntesis de glucolípidos y glucoproteínas de membrana, y en muchos casos éstos son liberados al torrente circulatorio<sup>5</sup>.

Los gangliósidos representan uno de los grupos de glucolípidos que incrementan más su expresión en muchos tumores; este incremento es especialmente importante en tumores de origen neuroectodérmico tales como melanoma, glioma y neuroblastoma.

La célula de melanoma presenta un incremento en la expresión del gangliósido GD3, mientras que en neuroblastoma es más frecuente un incremento en la expresión de GD2<sup>6</sup>. En determinados casos se ha descrito la expresión

de derivados acetilados de ambos gangliósidos<sup>7</sup>. En la célula normal de GD3 se expresa en las neuronas, médula adrenal, melanocitos y determinadas subpoblaciones de linfocitos T. La distribución tisular del GD2 es más restringida, pero se encuentra presente en el cerebro y otros tejidos de origen neuroectodérmico<sup>8,9</sup>. En ningún caso se ha descrito la expresión de derivados acetilados GD3 o GD2 en células normales.

Clínicamente se ha estudiado la evolución en la expresión de gangliósidos desde el melanocito normal hasta el melanoma maligno. En el melanocito no neoplásico el gangliósido mayoritario es el GM3, mientras que GD2 y GD3 constituyen menos del 5% del total de gangliósidos<sup>10</sup>. En el melanocito maligno se mantiene la expresión de GM3, pero existe un incremento en la expresión de GD2 y GD3. Este incremento de expresión se debe a la activación de la alfa (2→8) sialiltransferasa<sup>11</sup>, enzima clave en la síntesis de disialogangliósidos. En la célula transformada la expresión de GD3 puede llegar a representar hasta el 75% del total de los gangliósidos que se encuentran en la célula, mientras que la proporción GM3:GD3 puede llegar a variar desde 19:1 en el melanocito normal hasta 1:15 en el melanocito patológico<sup>12</sup>. Esta inversión se acentúa con la diferenciación del tumor y llega al máximo con la aparición de metástasis<sup>13</sup>.

Se han obtenido una gran cantidad de anticuerpos monoclonales específicos de diversos gangliósidos que son capaces de inhibir, tanto *in vivo* como *in vitro* el crecimiento del tumor. Una gran mayoría de estos anticuerpos son específicos de GD3<sup>14</sup>, aunque existen otros anticuerpos específicos de GD2<sup>15</sup> o con reactividad cruzada GD3-GD2<sup>16</sup>. Recientemente se han obtenido anticuerpos contra derivados acetilados de GD3<sup>17</sup>.

### **Estrategias en la obtención de anticuerpos monoclonales murinos**

Obtener una respuesta inmunológica contra un glucolípido no es fácil. Se trata de antígenos muy poco inmunogénicos, y que en muchos casos incluso poseen actividad inmunosupresora<sup>18</sup>. Sin embargo, se ha descrito la obtención de un considerable panel de anticuerpos monoclonales contra epítomos glucídicos<sup>19</sup>. En nuestro laboratorio hemos ensayado cuatro aproximaciones al problema de la inmunización con estos antígenos.

#### *Inmunización con células tumorales*

Es la aproximación más sencilla y la más utilizada. Se basa en inmunizar ratones con células de líneas tumorales mantenidas en cultivo y realizar el cribaje de los híbridos obtenidos mediante el antígeno purificado o bien empleando un panel de líneas celulares del que conocemos su fenotipo de membrana. Frente a su sencillez metodológica presenta varios inconvenientes. En primer lugar, si deseamos obtener anticuerpos contra un antígeno minoritario en la membrana celular las probabilidades de éxito son escasas por problemas de competencia antigénica; en segundo lugar, al inmunizar con una mezcla de varios antígenos los anticuerpos obtenidos suelen presentar bastantes reacciones cruzadas y, finalmente, cabe mencionar que el rendimiento obtenido en las fusiones es bajo, siendo frecuente la obtención de anticuerpos IgM.

#### *Inmunización con neoglicoproteínas sintéticas*

Debido a la escasa inmunogenicidad de los gangliósidos *per se* o asociados a células tumorales, se ha ensayado su conjugación a transportadores proteicos, tipo seroalbúmina bovina o hemocianina, y la inmunización mediante esta neoglicoproteína. Este tipo de estrategia incrementa considerablemente la inmunogenicidad del glucolípido y permite obtener anticuerpos monoclonales IgG de elevada afinidad por el antígeno.

#### *Inmunización con conjugados glucolípido-Salmonella minesotta*

En esta estrategia se absorben los glucolípidos con lisados ácidos de la bacteria *Salmonella minesotta*. Es una aproximación sencilla que podría producir buenos resultados. El principal inconveniente es el escaso rendimiento de la misma y la baja especificidad de los anticuerpos obtenidos.

#### *Inmunización con liposomas*

Es la estrategia de más reciente implantación y en ella se mimetiza a la célula tumoral mediante liposomas que incorporan glucolípidos anclados en la bicapa lipídica. El empleo de liposomas nos permite emplear distintas composiciones de lípidos para aumentar la inmunoge-

nicidad de los glucolípidos y inmunizar con el glucolípidos purificado. La respuesta obtenida a estas inmunizaciones es muy específica y en forma de IgM e IgG.

### **Caracterización de los anticuerpos obtenidos**

Los anticuerpos empleados en terapéuticas oncológicas no tan sólo deben ser específicos, sino que también deben reconocer y destruir las células tumorales que expresan el antígeno en estudio. Así mismo, la especificidad no se debe medir tan sólo por el reconocimiento del antígeno, sino que debe estudiarse el posible reconocimiento de tejidos normales que también expresan el antígeno en estudio.

Frente a la célula tumoral el mecanismo efector más potente es la citotoxicidad tanto celular como mediada por complemento. La citotoxicidad no es sólo función de la especificidad del anticuerpo por el antígeno sino que es también función del isotipo del mismo y de la densidad de expresión del antígeno en la célula diana. En el ratón sólo los isotipos IgM, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>2a</sub> poseen actividad citotóxica, si bien la IgM no es capaz de activar la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente<sup>20</sup>. Por otra parte, se debe tener en cuenta que la densidad mínima del antígeno en la membrana celular para que la citotoxicidad sea efectiva se sitúa en 10.000 moléculas por cada célula. Curiosamente, la afinidad del anticuerpo por el antígeno soluble es menos importante de lo que se pensó en un principio dado que se trata de anticuerpos que deben reconocer antígenos anclados en la membrana celular. Es frente al antígeno particulado que se debe medir la afinidad del anticuerpo y esto imposibilita el cálculo de la constante de afinidad y sólo nos permite disponer de datos comparativos entre distintos anticuerpos.

Finalmente, deben realizarse ensayos *in vivo* en ratones del poder citotóxico de los anticuerpos. Estos ensayos se realizan con ratones atímicos nu/nu que no son capaces de rechazar xenoinjertos tumorales. El protocolo se basa en la implantación subcutánea del tumor o bien mediante implantaciones ortóticas y el posterior tratamiento con el anticuerpo purificado administrado por vía intravenosa. Los resultados se miden por el número de ratones que desarrollan el tumor y por el tamaño de los mismos. Los controles negativos se realizan mediante un anticuerpo no relacionado o con

tumores que no expresen el antígeno en estudio<sup>21</sup>. Recientemente, se están sustituyendo los ensayos con ratones atímicos por ensayos con ratones con SCID (*severe combined immunodeficiency*). Estos ratones carecen totalmente de linfocitos T y B y pueden ser repoblados con linfocitos humanos y desarrollar una respuesta inmunológica humana<sup>22</sup>. Esta última aproximación, aunque tiene una mayor complejidad metodológica, aporta unos resultados mucho más próximos a la realidad.

### **Anticuerpos monoclonales humanos**

Cuando se emplean anticuerpos monoclonales murinos en el hombre se produce una fuerte reacción inmune contra la proteína de ratón. Los anticuerpos que vehiculizan esta respuesta reciben el nombre de HAMA (*Human Anti Mouse Antibodies*) reducen la efectividad del tratamiento y llegan a provocar reacciones anafilácticas en determinados casos<sup>23</sup>. La alternativa a los anticuerpos de ratón son los anticuerpos monoclonales humanos.

A diferencia de la obtención de anticuerpos monoclonales de ratón, la obtención de monoclonales humanos es difícil especialmente por la falta de un mieloma estable que permita obtener hibridomas con las suficientes garantías. Existen dos estrategias para obtener anticuerpos monoclonales humanos. En primer lugar, la transformación de linfocitos de sangre periférica mediante virus de Epstein-Barr y, en segundo lugar, la humanización de anticuerpos de ratón mediante técnicas de ingeniería genética.

#### *Transformación de linfocitos mediante virus de Epstein-Barr*

Muchos grupos han conseguido anticuerpos monoclonales humanos partiendo de linfocitos de sangre periférica de enfermos oncológicos. Se trata de una metodología relativamente sencilla y muy bien referenciada en la bibliografía<sup>24</sup>. Desgraciadamente, si bien el rendimiento de las transformaciones es elevado, los clones obtenidos son muy inestables y muestran una elevada tendencia a perder la capacidad de síntesis de inmunoglobulinas y en muchos casos se acaban perdiendo. Se han ensayado varias estrategias para estabilizar los clones transformados sin que ninguna de ellas haya aportado resultados significativos y son muy escasos los clones que se han podido caracterizar adecuadamente.

### Humanización de anticuerpos

La respuesta humana contra el anticuerpo de ratón puede ser parcialmente reducida transformando, mediante técnicas de ingeniería genética, el anticuerpo original de ratón en un anticuerpo quimérico. En los anticuerpos quiméricos la región variable del anticuerpo de ratón se sustituye con una región constante humana<sup>25</sup>. Sin embargo, cuando se emplean anticuerpos quiméricos en el hombre todavía conservan un importante poder inmunogénico. Esta capacidad inmunogénica es variable y parece estar en función de la secuencia de la región variable del anticuerpo de ratón y del grado de homología que existe entre esta cadena y su equivalente humano<sup>21</sup>.

Existe otra alternativa que nos permite reducir casi al completo la inmunogenicidad de los anticuerpos de ratón; esta alternativa se basa en la obtención de anticuerpos *humanizados*. La región variable de los anticuerpos contiene 6 regiones que interactúan directamente con el antígeno, estas regiones o CDR (*Complementary-Determining Regions*) están situadas dentro de secuencias de soporte o *frameworks* que mantienen su estructura tridimensional. El grupo de Winter en Cambridge<sup>26</sup> ha desarrollado una metodología por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite introducir los fragmentos CDR del anticuerpo de ratón en un anticuerpo completamente humano. Dado que los fragmentos CDR sólo poseen entre 4 y 7 aminoácidos, la inmunogenicidad de estos anticuerpos *humanizados* es muy reducida cuando no nula.

Los dos principales efectos de la baja inmunogenicidad de los anticuerpos *humanizados* son un incremento en el efecto biológico de los anticuerpos y una mayor vida media en circulación de los mismos. Existe una tercera ventaja del empleo de los anticuerpos *humanizados* y es su capacidad de interactuar con la malla antiidiotípica del paciente y provocar la aparición de anticuerpos antiidiotipo con acción reguladora.

El punto clave en el diseño y construcción de anticuerpos *humanizados* es la determinación de las secuencias del anticuerpo murino que deben conservarse. Los fragmentos CDR murinos se encuentran insertos en las secuencias marco (*frameworks*) también murinas, y estas secuencias no tienen porqué corresponderse con las secuencias *frameworks* humanas que se empleen en el diseño del anticuerpo *humanizado*. Estos cambios pueden distorsionar la estructu-

ra tridimensional de los fragmentos CDR y pueden provocar la aparición de anticuerpos no funcionales<sup>25</sup>.

Este problema puede solucionarse buscando secuencias variables humanas con un alto grado de homología con la secuencia de la región variable del anticuerpo de ratón original con el objetivo de ocasionar una mínima distorsión en la estructura de los fragmentos CDR. El empleo de programas de simulación mediante ordenador constituye una importante herramienta para determinar la estructura tridimensional de las regiones CDR y su interacción con el epítipo antigénico<sup>27</sup>.

La disponibilidad de anticuerpos *humanizados* permite afrontar estudios clínicos con pacientes minimizando al máximo los efectos secundarios de la administración del anticuerpo y aumentando la potencia de los mismos al reducir la respuesta inmunológica contra la proteína de ratón. Por otra parte, una respuesta antiidiotípica puede ser evitada utilizando combinaciones de anticuerpos con distintos idiotipos<sup>28</sup>.

### Desarrollo de anticuerpos monoclonales

En nuestro laboratorio hemos focalizado nuestro esfuerzo en el campo del melanoma y del adenocarcinoma de colon. Los epítipos escogidos son el gangliósido GD3 como marcador de melanoma y los antígenos sialil-Tn, disialo-lacto-N-tetraosa como marcadores de adenocarcinomas de colon.

En el caso de melanoma se han ensayado las cuatro estrategias de inmunización descritas anteriormente. La inmunización con conjugados de GD3-*Salmonella* provoca la aparición de gran cantidad de anticuerpos con un elevado grado de inespecificidad y un escaso poder citotóxico, por lo que su utilidad terapéutica es nula y actualmente hemos abandonado esta estrategia. La inmunización con neoglicoproteínas sintéticas permite obtener anticuerpos muy específicos, generalmente IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>1</sub> pero que, si bien reconocen el antígeno mediante ELISA, no son capaces de reconocer células de melanoma y no muestran ninguna capacidad citotóxica.

Las dos aproximaciones que nos han proporcionado unos mejores resultados son la inmunización con células de melanoma y el empleo de liposomas. Mediante la inmunización con células de melanoma hemos obtenido un panel de anticuerpos anti-GD3 de entre los que destacaremos los anticuerpos 14F9, 14G4 y 2A10.

El anticuerpo 14F9 es IgG<sub>3</sub>, mientras que los otros dos son IgM. Los anticuerpos 14F9 y 2A10 reconocen exclusivamente al gangliósido GD3, mientras que el anticuerpo 14G4 presenta alguna reacción con el derivado acetilado 9-O-Acetil-GD3. Por lo que respecta a su reactividad celular todos ellos reconocen exclusivamente melanoma, neuroblastoma y glioma y ninguno muestra reacción positiva frente a otros tipos de tumores. Histológicamente los 3 anticuerpos reconocen débilmente melanocitos normales y nevos displásicos, no habiéndose detectado reacciones positivas ni con tejido nervioso ni con ningún otro tejido. Los anticuerpos 14F9 y 14G4 reconocen una subpoblación de linfocitos T CD4 positivos, el anticuerpo 2A10 no muestra esta reactividad. Los 3 anticuerpos muestran reacción positiva muy débil con una subpoblación no determinada de monocitos.

Los resultados más interesantes que hemos obtenido del análisis de estos anticuerpos son los datos desprendidos del análisis de su afinidad y de la cinética de unión con el anticuerpo. Los anticuerpos 2A10 y 14G4 muestran una afinidad por el antígeno soluble muy elevada, mientras que el anticuerpo 14F9 presenta una afinidad menor; sin embargo, estos datos son muy diferentes cuando se analiza la afinidad hacia células de melanoma, en donde los anticuerpos más afines son 14F9 y 2A10. Este dato, y el hecho de que los 3 anticuerpos no reconozcan células normales que en mayor o menor grado expresan GD3 en su membrana, nos sugieren la idea de que los gangliósidos expresados en la membrana de la célula tumoral adoptan una conformación espacial diferente, probablemente debida a interacciones provocadas por su elevada concentración en la membrana. Recientemente hemos iniciado la humanización del anticuerpo 2A10 y hoy día está disponible en forma de IgG<sub>1</sub> humana.

El empleo de liposomas nos ha proporcionado una poderosa herramienta para incrementar la escasa inmunogenicidad de los gangliósidos, provocando una respuesta sumamente específica y con un elevado poder citotóxico, por lo que actualmente nos estamos planteando su empleo en el campo de la inmunoterapia activa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Köler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.

2. Sell S. Cancer associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 1990; 21: 1.003-1.019.
3. Feizi T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 1985; 314: 53-57.
4. Singhal A, Hakomori S. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays* 1990; 12: 223-230.
5. Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res* 1989; 52: 257-331.
6. Tsuchida T, Ravindranath MH, Saxton RE, Irie RF. Gangliosides of human melanoma: Altered expression *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 1987; 47: 1.278-1.281.
7. Sjöberg ER, Manzi AE, Khoo KH, Dell A, Varki A. Structural and immunological characterization of O-Acetylated GD2. Evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-Acetyl-transferase in human melanoma. *J Biol Chem* 1992; 267: 16.200-16.211.
8. Dippld W, Bernhard H. Immunorecognition of ganglioside epitopes: Correlation between affinity and cytotoxicity of ganglioside antibodies [resumen]. *J Cancer* 1992; 28: 1.605-1.610.
9. Urmacher C, Cordon Cardo C, Houghton AN. Tissue distribution of GD3 ganglioside detected by mouse monoclonal antibody R24. *Am J Dermatopathol* 1989; 11: 577-582.
10. Ravindranath MH, Tsuchida T, Morton DL, Irie R. Ganglioside GM3: GD3 ratio as an index for the management of melanoma. *Cancer* 1991; 67: 3.029-3.035.
11. Thampoe IJ, Furukawa K, Vellve E, Lloyd KO. Sialyl-transferase levels and ganglioside expression in melanoma and other cultured human cancer cells. *Cancer Res* 1989; 49: 6.258-6.264.
12. Ravindranath MH, Tsuchida T, Irie RF. Diversity of ganglioside expression in human melanoma. En: Oettgen HF, editor. *Gangliosides and cancer*. Nueva York: VCH Publishes, 1989; 81-91.
13. Ravindranath MH, Irie RF. Gangliosides as antigens of human melanoma. En: Nathanson L, editor. *Malignant melanoma: biology, diagnosis and therapy*. Boston: Kluwer Academic Publishers 1988; 17-43.
14. Steffens TA, Bajorin DF, Houghton AN. Immunotherapy with monoclonal antibodies in metastatic melanoma. *World J Surgery* 1992; 16: 261-269.
15. Cheung NKV, Saarinen UM, Neely JE, Landmier B, Donovan D, Coccia PF. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1985; 45: 2.642-2.651.
16. Thurin J, Thurin M, Kimoto Y, Herlyn M, Lubeck M, Elder D et al. Monoclonal antibody defined correlations in melanoma between levels of GD2 and GD3 antigens and antibody mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1987; 47: 1.229-1.233.
17. Cheresch D, Varki A, Varki N, Stallcup W, Levine J, Reisfeld R. A monoclonal antibody recognizes

- an O-Acylated sialic acid in a human melanoma associated ganglioside. *J Biological Chemistry* 1984; 259: 7.453-7.459.
18. Grayson G, Ladisch S. Immunosuppression by human gangliosides. *Cell Immunol* 1992; 139: 18-29.
  19. Magnani JL. Mouse and rat monoclonal antibodies directed against carbohydrates. *Meth Enzymol* 1987; 138: 484-491.
  20. Herlyn M, Koprowski H. Melanoma antigens: immunological and biological characterization and clinical significance. *Ann Rev Immunol* 1988; 6: 283-308.
  21. Sung MC, Queen C. Humanized antibodies for therapy. *Nature* 1991; 351: 501-502.
  22. Hellström I, Brankovan V, Hellström K. Strong antitumor activities of IgG3 antibodies to a human melanoma associated ganglioside. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1.499-1.502.
  23. McCune JM. SCID mice as immune system models. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 224-228.
  24. Smith LH, Teng NNH. Applications of human monoclonal antibodies in oncology. En: Strelkankas AJ, editor. *Human hybridomas. Diagnostic and therapeutic applications*. Nueva York: Dekker Publishers, 1987; 8.
  25. Riechmann L, Clark M, Waldman H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332: 21-25.
  26. Winter G, Milstein C. Man made antibodies. *Nature* 1991; 349: 293-299.
  27. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementary determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321: 522-525.
  28. Sixth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer. San Diego, California, EE.UU.: UCSD Cancer Center, 1990.

## DISCUSIÓN

F. GARRIDO: Quería insistir de nuevo en que el sistema inmunológico celular sólo reconoce los antígenos si son procesados intracelularmente y presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad. Conocemos que esto es así para las células linfoides, linfocitos T, y conocemos muy poco todavía acerca del receptor de las células NK, prácticamente nada. Ha quedado claro en su exposición que están detectando unas moléculas en la membrana de melanoma, y quizá otros tumores, los gangliósidos, que están expresados en estas células, y que son reconocidos por anticuerpos murinos más o menos humanizados, pero siempre en la porción que se une al epítipo murino. Creo que es claramente distinguible lo que llamamos antígenos tumorales de lo que son estos antígenos a los que prefiero denominar antígenos asociados a tumores, nunca antígenos reconocidos por el sistema celular del individuo.

O. MASSÓ: Evidentemente, desde el punto de vista inmunológico, tiene usted razón. En nuestro caso, mediante Epstein-Barr y a partir de linfocitos B de sangre periférica obtenemos clones que producen anticuerpos humanos que reconocen células tumorales. Por desgracia, estos clones son tremendamente inestables, y esta inestabilidad impide por completo su uso terapéutico debido a que no existe la suficiente producción de inmunoglobulina.

F. GARRIDO: Pero éstos podrían ser autoanticuerpos.

O. MASSÓ: Lamento no poder compartir su opinión.

A. CANO: Me interesa un aspecto que ha mencionado al principio, al hablar del empleo de los anticuerpos anti-GD3. Aparte del efecto citotóxico sobre las células de melanoma, ha comentado que se producía una disociación o *detachment* de las células de la matriz, mi pregunta es: ¿pueden ambos efectos ser disociables?, es decir, ¿utilizando diferentes dosis de anticuerpos pueden delimitar el efecto citotóxico del efecto de *detachment*? y, en segundo lugar, me gustaría conocer su opinión acerca de una posible interacción de este tipo de gangliósidos con moléculas de adhesión tipo fibronectina.

O. MASSÓ: En relación con la primera pregunta hemos visto que la adición de anticuerpos a células en cultivo impide la adhesión de estas células. Sin embargo, no hemos analizado si existe un efecto dosis-dependiente, por lo que no puedo dar una respuesta concreta a esta cuestión.

Con respecto a la segunda pregunta, hace alrededor de un año empezamos a trabajar no con fibronectina, sino con vitronectina y su receptor, y observamos un efecto paralelo de incremento de la adhesión vía integrinas, vía gangliósidos, pero de momento estamos a un nivel simplemente de investigación básica.

C. DEL ÁGUILA: Me resisto a asumir la generalización de que la transformación por Epstein-Barr dé lugar a líneas inestables. Creo que quizás el problema de partida es que sus antígenos son muy poco inmunogénicos, y no facilitan el aislamiento en estos primeros estadios los clones que posteriormente deberán estabilizarse.

En cualquier caso, en mi opinión, los clones transformados por virus de Epstein-Barr son un excelente material de partida para aplicarles, incluso antes de estabilizarlos, las técnicas de amplificación de DNA por PCR para obtener las librerías de genes de inmunoglo-

bulinas y posteriormente clonarlas, por ejemplo, en fagos filamentosos que tan buenos resultados están empezando a dar. ¿Quizás han considerado ya esta posibilidad y están trabajando en esta dirección?

O. MASSÓ: Creo que es casi una cuestión de suerte, según mi información existe en Sloan Kettering de Nueva York dos líneas estables con especificidad antigangliósido GD2 obtenidas por Epstein-Barr. Lo que ocurre es que el mismo grupo reconoce haber clonado más de 900 clones para conseguir 2 clones estables.