
Inmunologika revisiones

Anticuerpos monoclonales y uso en diagnóstico

Julio Coll Morales*, Concepción Palomo Sanz, Santiago Martín Hurtado

1. Interés actual del tema

Debido a la gran especificidad de la reacción antígeno anticuerpo, los ensayos basados en esta reacción se han venido usando como método para la detección de sustancias moleculares complejas en líquidos biológicos. La correlación que en muchos casos existe entre la presencia o ausencia de una molécula concreta y ciertas enfermedades, ha hecho que estas reacciones se hayan usado desde hace varias décadas como una prueba de diagnóstico tanto en clínica como en veterinaria.

Ahora bien, los diagnósticos convencionales basados en la reacción antígeno-anticuerpo (anticuerpos policlonales), generalmente adolecen de falta de reproducibilidad. Además existen enfermedades cuyo diagnóstico es imposible mediante técnicas inmunológicas convencionales debido a la dificultad de purificación del antígeno o a otros problemas técnicos tales como la especificidad, sensibilidad, reactividad, cruzada, etc. La necesidad de aumentar al máximo la fiabilidad de este tipo de diagnósticos sobre todo

en enfermedades humanas, ha hecho que la utilización de anticuerpos monoclonales (cuya obtención es técnicamente posible sólo desde 1975) sea un tema de actualidad en el campo del diagnóstico.

Este mismo interés se ha venido demostrando tanto a nivel científico como empresarial durante los últimos años. Especialmente durante 1981 y 1982 tuvieron lugar, respectivamente:

— La Reunión «Monoclonal Antibodies» organizada por Robert First que se desarrolló en Alemania en Agosto de 1981 y en la que se hizo especial énfasis en la aplicación de anticuerpos monoclonales en diagnóstico y las posibilidades que tienen tanto en purificación de proteínas como en una posible terapéutica del cáncer.

— Las Jornadas Técnicas «Anticuerpos Monoclonales en diagnóstico clínico», organizadas por el Instituto Tecnológico para Posgraduados que se desarrollaron en España en Diciembre de 1981, con el asesoramiento del Massachusetts Institute of Technology y la participación de empresas, hospitales y universidades españolas.

— Por último, el Congreso: «First Annual Congress for hybridoma Research», que se celebró en Los Angeles en febrero de este año y que es un exponente, de la importancia y proyección que está alcanzando esta nueva tecnología.

* Dirección Instituto Tecnológico para Postgraduados
Paseo de Juan XXIII, 3, Madrid-3

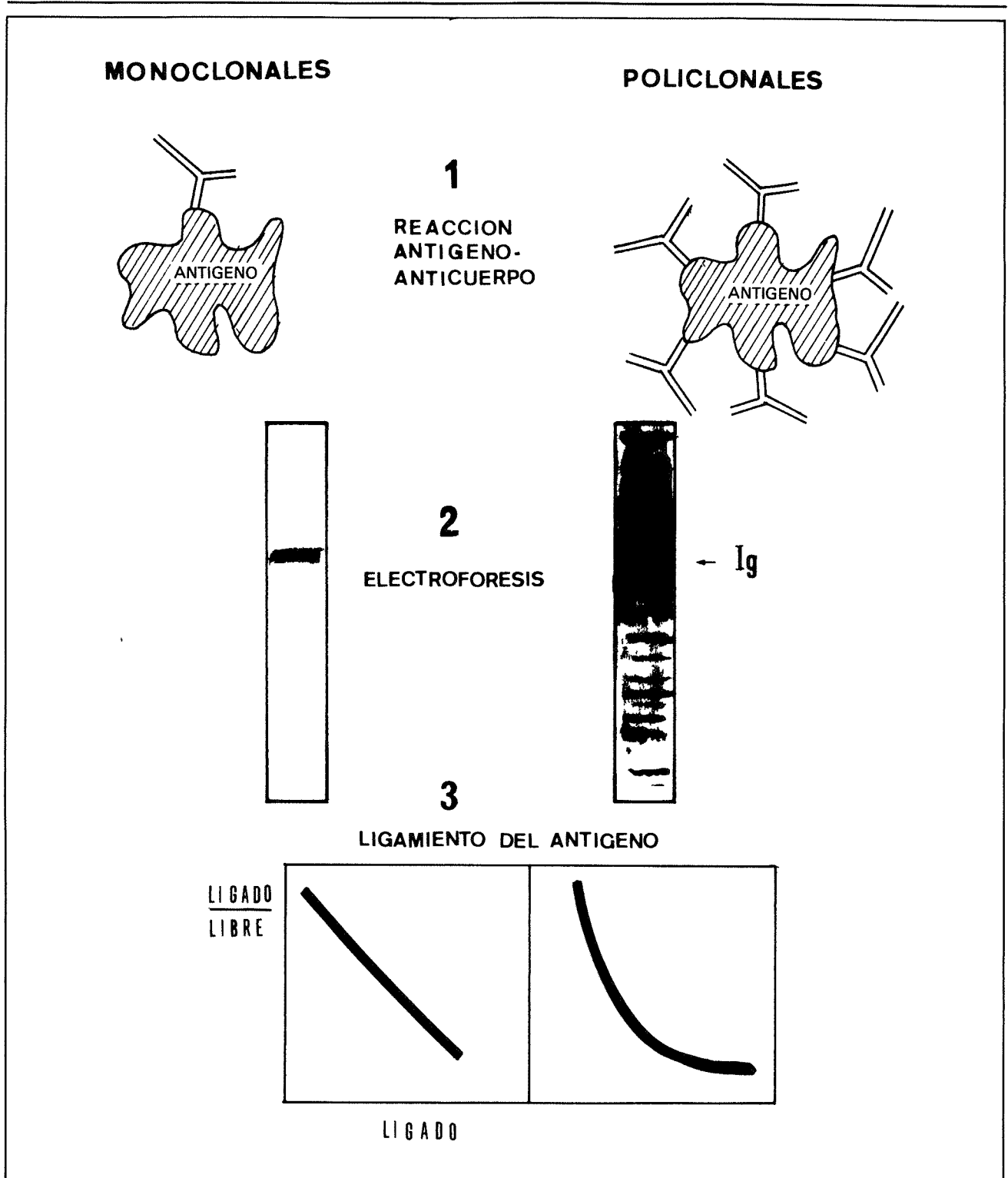


Figura 1 Comparación esquemática de algunas propiedades de los anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales (Convencionales)

En este esquema se comparan la reacción antígeno anticuerpo (1), la pureza de los reactivos (2) y la cinética del ligamiento del antígeno (3). Los anticuerpos monoclonales por lo tanto reaccionan con un solo sitio del antígeno (determinante antigénico), tienen poca contaminación de otras proteínas del suero y son homogéneos (una sola clase de molécula) y su respuesta es lineal comparada con los anticuerpos convencionales (especialmente importante para cuantificar la reacción).

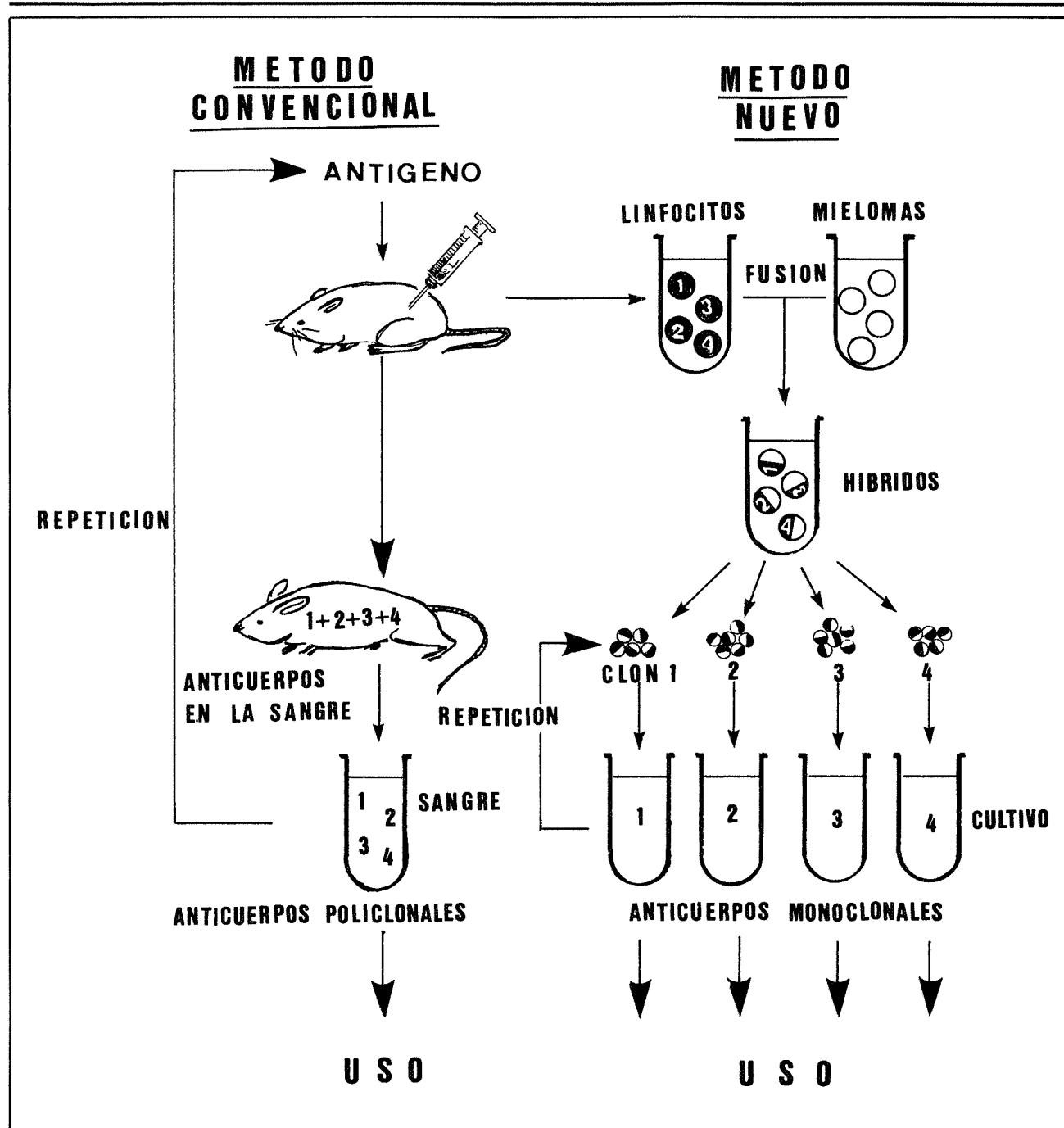


Figura 2 Esquema comparativo de la obtención de anticuerpos según el método convencional y el nuevo método

El método convencional utiliza los anticuerpos vertidos a la sangre de un animal experimental al inyectarles el antígeno. Para conseguir grandes cantidades de anticuerpo hay que repetir todo el proceso. El nuevo método conocido como anticuerpos monoclonales se basa en la obtención de un híbrido monoclonal productor del anticuerpo. Una vez conseguido el híbrido, lo único que hay que hacer es reproducirlo en las cantidades que se deseen.

TABLA I
Principales aplicaciones de los anticuerpos monoclonales

Tipo de aplicación	Aplicaciones	Estado del «arte»
Diagnóstico	Clínica Veterinaria Alimentación Imaging de tumores	Comercial Corto plazo Corto plazo Largo plazo
Purificación	Obtención de vacunas Purificación de proteínas Cromatografía de afinidad	Se usan a escala de laboratorio
Terapéutica	Sustitución de antígenos Terapia del cáncer Absorción extracorpórea de toxinas o virus	Largo plazo

La producción de anticuerpos monoclonales con una especificidad prefijada, es actualmente posible mediante la preparación de híbridos celulares. Estos productos se utilizan ya en diagnósticos en hospitales y en veterinaria sustituyendo a los anticuerpos policlonales que se venían usando para estos diagnósticos. Este hecho es debido a que (Figura 1):

1. Los anticuerpos monoclonales son más reproducibles y ofrecen mayor garantía de suministro que el método convencional de obtención de anticuerpos, el cual depende de la variabilidad animal y de su peculiar productividad

2. Los anticuerpos monoclonales son más específicos y de mayor pureza que las mezclas de anticuerpos (anticuerpos policlonales) que se producen según los métodos convencionales. Este punto es de singular importancia a la hora de utilizar anticuerpos como métodos de diagnóstico de enfermedades. (Figura 1).

3. No es necesario el obtener antígeno cada vez que se quiere preparar un anticuerpo, al contrario que en los métodos convencionales. Este punto por sí solo abaratará extraordinariamente la producción de muchos anticuerpos ya que los antígenos necesarios para producirlos según el método convencional son caros por ser necesarios emplearlos muy purificados.

4. No se necesita purificar el antígeno. Este hecho hace que sea posible el diagnóstico basado en la detección de sustancias moleculares cuya purificación es actualmente imposible, abriendo así un enorme abanico de posibilidades.

Aún siendo importante la aplicación de los anticuerpos monoclonales en diagnóstico, donde

se especula que en el futuro va a revolucionar la medicina, es en el campo de la terapéutica. Debido a las propiedades antes mencionadas es posible pensar en tratamientos contra el cáncer, tema en el que se investiga activamente (Tabla 1). La invasión de nuevos productos ya se está produciendo ya han salido al mercado los primeros kits de diagnóstico.

En diagnósticos, los anticuerpos monoclonales mejoran la exactitud, reducen costes y abren nuevas posibilidades de test inmunológico. Los avances más probables incluyen:

— Anticuerpos con baja reactividad cruzada de antígenos.

— Anticuerpos contra antígenos complejos como tumores, antígenos de superficie y microorganismos.

— Anticuerpos contra antígenos no purificables

— Anticuerpos que requieren especificidades únicas y una garantía de suministro, como son los usados en enzima, radio o fluorescencia-inmunoensayos

— Anticuerpos necesarios como standards mundiales

— Anticuerpos que puedan ser marcados e inyectados en vivo en el hombre para localizar tumores y órganos (imaging)

2. Anticuerpos policlonales (método convencional)

Los animales superiores son capaces de reaccionar frente a la entrada en su organismo de sustancias extrañas a ellos (antígenos, Ag) mediante respuestas. Esta respuesta tiene dos tipos de manifestaciones. Una de ellas consiste en la producción de unas sustancias (anticuerpos, Ac), que neutralizan al antígeno reaccionando específicamente con él y la otra está mediada por células que reconocen al antígeno y son capaces de destruir las células portadoras del mismo (Figura 2).

Los anticuerpos son proteínas con sitios de combinación que reconocen la «forma» de las superficies de los antígenos. La combinación del anticuerpo con el antígeno desencadena procesos capaces de neutralizar y eliminar la sustancia extraña. Además de esta función fisiológica, los anticuerpos han sido y son herramientas muy específicas para el diagnóstico clínico y la investigación. Cuando se inyecta un antígeno a un animal, este responde elaborando anticuerpos dirigidos contra las distintas partes del mismo antígeno o bien contra la misma parte, pero con distinta afinidad (anticuerpos policlonales). Es

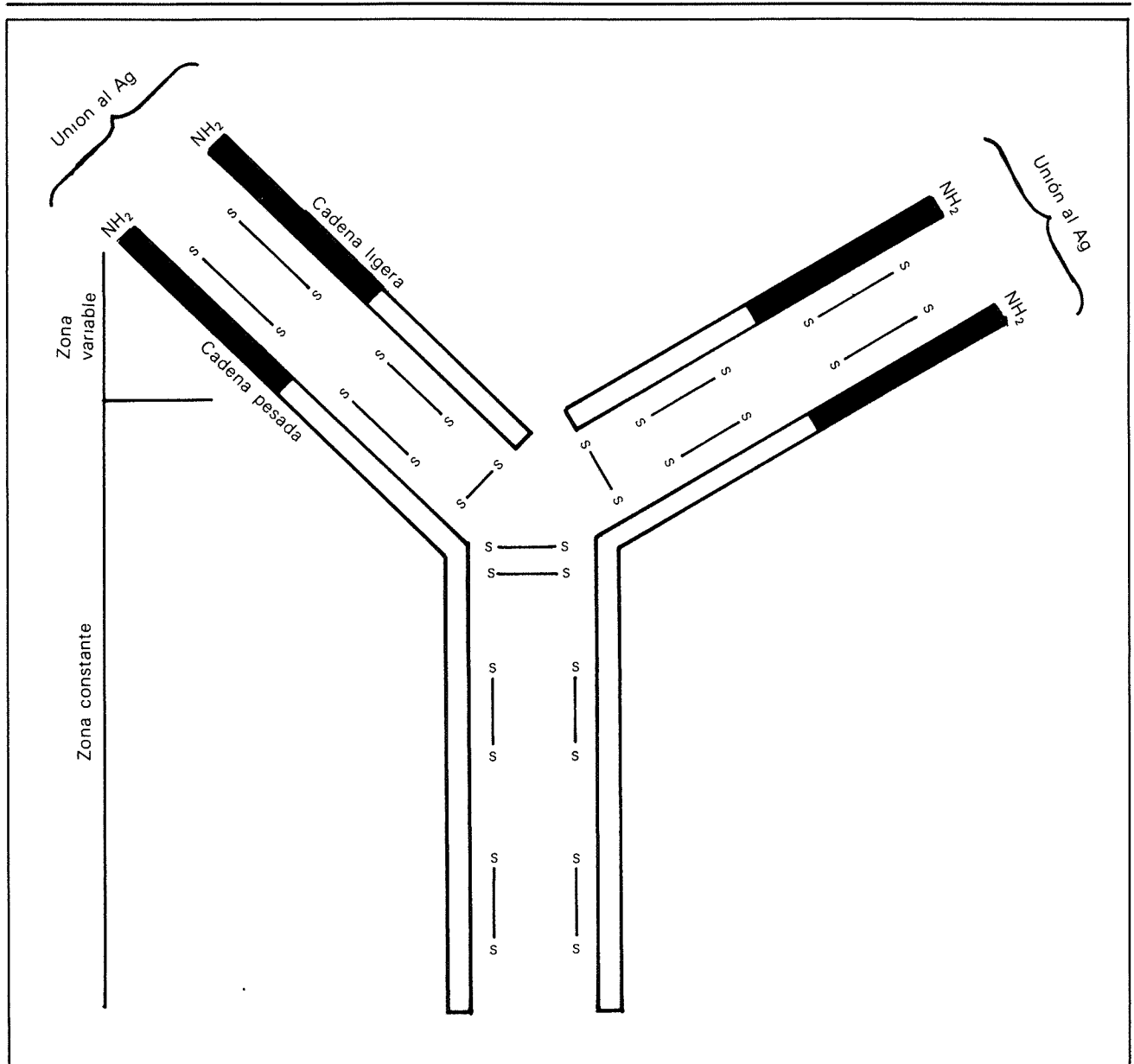


Figura 3 Esquema de una molécula de anticuerpo

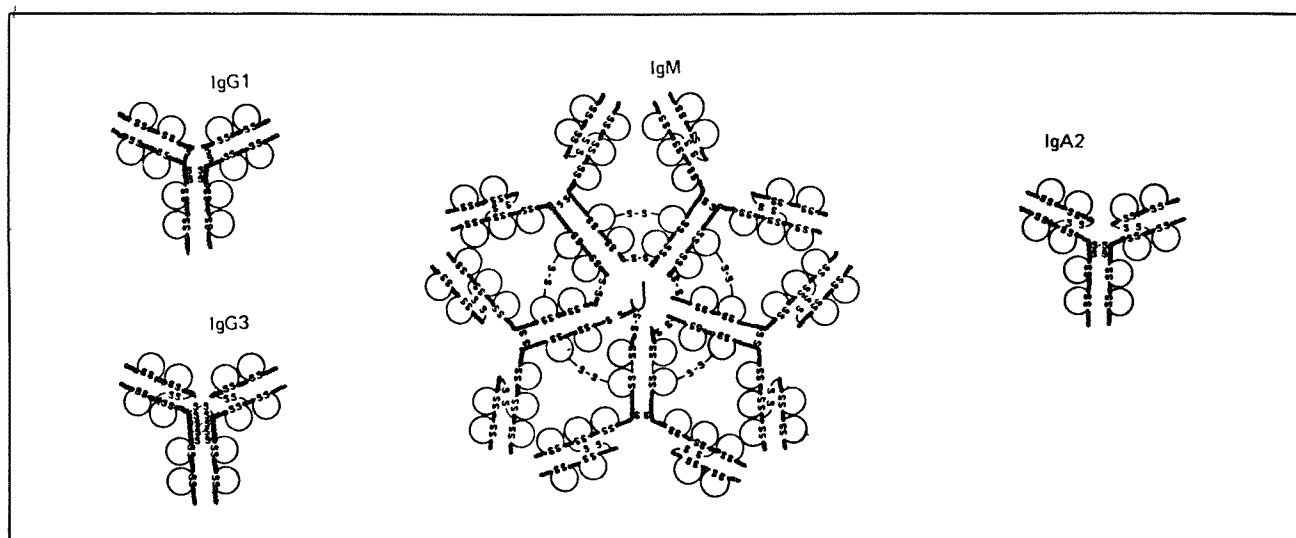
Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas son proteínas que se producen específicamente frente a un antígeno (Ag) capaces de unirse a él. Están compuestas de dos tipos de cadenas protéicas de distinto tamaño: pesada (P) y ligera (L) unidas entre sí. A su vez, cada una de estas cadenas está constituida por dos zonas, una constante entre los distintos anticuerpos de la misma clase y otra variable. Esta zona es la que determina la especificidad de la reacción Ag-Ac.

prácticamente imposible separar totalmente los distintos anticuerpos debido a que son moléculas muy semejantes. El animal produce por lo tanto una mezcla de anticuerpos contra un mismo antígeno y estas mezclas son las que se han venido usando para diagnósticos (Figura 2).

Hay distintas clases de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), pero la estructura es semejante en todas (Figura 3). Están constituidas por dos tipos

de cadenas protéicas de distinto tamaño: una pesada, de unos 90 000 daltons (P) y otra ligera, de unos 25 000 daltons (L) unidas por puentes disulfuro. A su vez, cada una de estas cadenas está formada por dos zonas, una de ellas constante entre los distintos anticuerpos de la misma clase, y otra cuya secuencia de aminoácidos es variable. Esta zona variable es la que determina que la reacción antígeno-anticuerpo sea especí-

TABLA II
Características de los distintos anticuerpos o inmunoglobinas en el hombre



x 10 ³ daltons					
Clase de Ig	Tipo de cadena	Peso molecular	% del total Ig en suero	Concentración Ig suero mg/ml	Fijación complement
G	γ	150	80	8-16	+
M	μ	900	6	0,5-2	+
A	α	160	13	1,5-4	—
D	δ	180	1	Trazas	—
E	ϵ	180	0 002	Trazas	—

fica Por lo tanto para cada parte del antígeno se elabora un anticuerpo cuya región variable reconoce esa parte. Según el tipo de cadena pesada que posea, en el hombre existen cinco tipos de anticuerpos cuyas características se muestran en la Tabla 2.

La molécula de anticuerpo además de reaccionar específicamente con el Ag frente al que se ha producido, tiene otro tipo de actividades relacionadas con la eliminación del antígeno. Estas son, entre otras, fijación del complemento (conjunto de proteínas del suero que dan lugar a la lisis de células que hayan sido reconocidas por un anticuerpo), aumento de la fagocitosis por macrófagos, respuesta alérgica, etc. Estas actividades están localizadas en la parte de la molécula constituida exclusivamente por la zona constante de las cadenas pesadas, por lo que depende de éstas y no las poseen todos los tipos de anticuerpos (Tabla 2).

La formación de anticuerpos, se realiza en células especializadas procedentes de la médula ósea y del bazo, llamadas linfocitos B. Se postula (Figura 4 y 5) que el antígeno al entrar en un organismo, tras una serie de interacciones entre las células del sistema inmune (linfocitos T y macrófagos), establece contacto con receptores

en la membrana de los linfocitos B. Estos receptores son moléculas de anticuerpo. Cada célula tiene un solo tipo de receptores característico que determina con que antígeno será capaz de reaccionar y que anticuerpo producirá frente a él. Una vez que el antígeno se ha unido a los receptores de un cierto linfocito, por mecanismos que no se conocen completamente, en el núcleo se inicia la producción de RNA mensajero. Este dará lugar a las cadenas P y L, que tras ser ensambladas formando la molécula de anticuerpo se excreta fuera de la célula. Otro de los efectos producidos por la industria del linfocito consiste en que este comienza a dividirse dando lugar a un conjunto de células (clon) productoras del mismo anticuerpo (Figura 4).

En una molécula de antígeno existe un número variable y relacionado con el tamaño de la molécula, de grupos o partes (determinantes antigénicos) capaces de producir la inducción del correspondiente número de linfocitos B. Cada linfocito es capaz de reaccionar frente a un solo determinante antigénico produciendo anticuerpos específicos contra él. Debido a este hecho, la respuesta inmunológica de un animal aparecerá una mezcla de distintos anticuerpos producidos todos frente al mismo antígeno, pero frente a

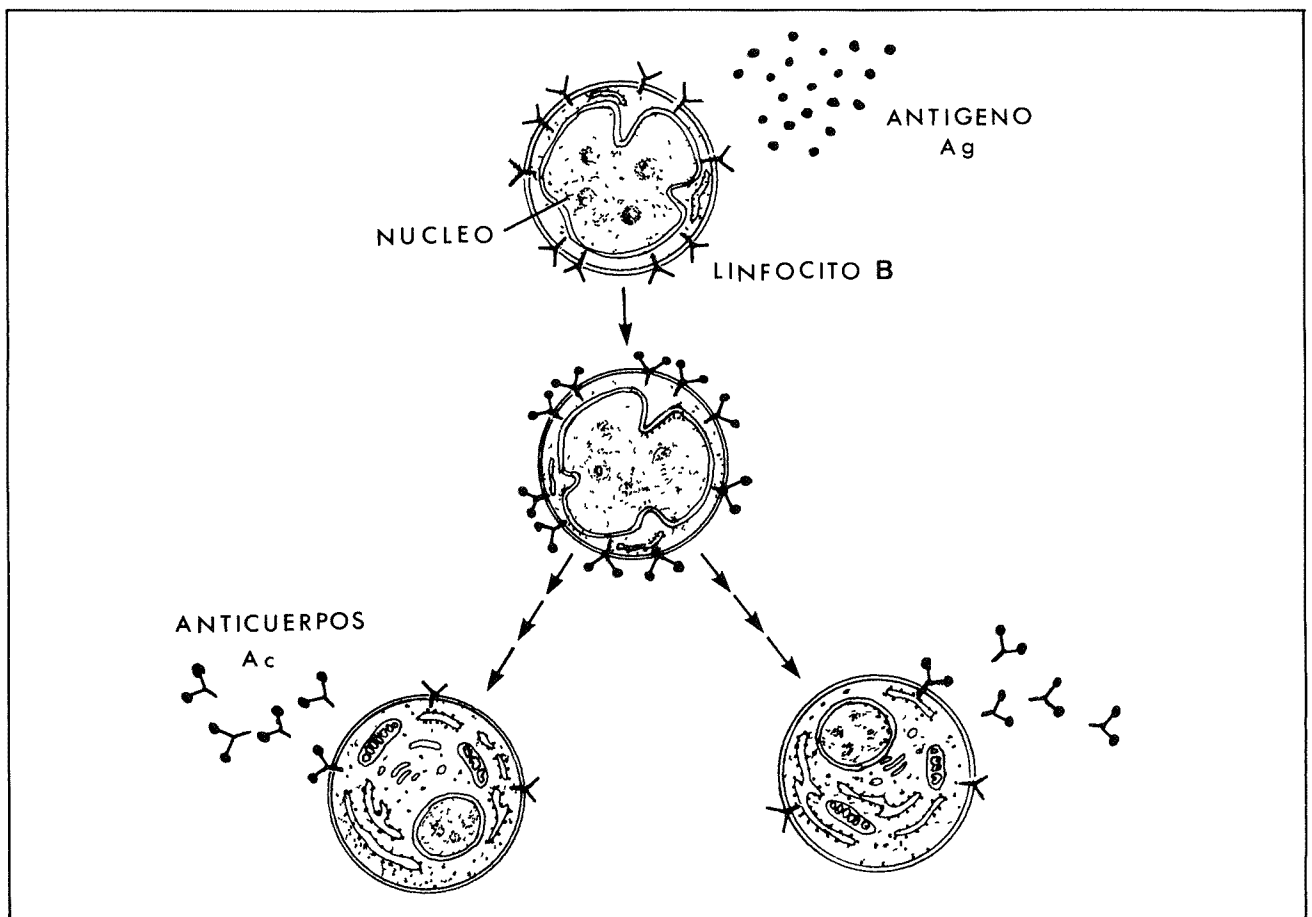


Figura 4

distintas partes de él (Figura 5)

La producción de anticuerpos se favorece con la mayor permanencia del antígeno en el organismo. Para conseguir esto se emplean varios métodos. Uno de ellos consiste en el empleo de adyuvantes. Otro consiste en repartir el antígeno en varias dosis. Tras la primera inyección transcurre algún tiempo hasta que empieza a detectarse niveles de los anticuerpos en la sangre, pero la cantidad producida es pequeña y desaparece en poco tiempo. Sin embargo, obteniéndose aproximadamente 10-50 veces más cantidad de anticuerpo específico (Figura 6).

Debido a su gran especificidad los anticuerpos se han usado para identificar, cuantificar, clasificar y purificar moléculas, por todo lo cual son ampliamente usados en clínicas. Sin embargo, ésta utilización tiene el inconveniente de la imprevisible y heterogénea respuesta de distintos animales frente a los mismos antígenos y la producción de anticuerpos frente a pequeños contaminantes de la preparación de antígeno. Incluso cuando se obtiene un antisero de alta especificidad, a menudo contiene anticuerpos con distinto grado de afinidad y actividad biológica (fijación de complemento, precipitación, aglutinación, etc.), por todo lo cual, los resultados

obtenidos con distintos stocks de anticuerpos pueden ser confusos. De este problema surgió el interés de generar reproduciblemente grandes cantidades de anticuerpos puros y altamente específicos (Figura 2). Esto podría resolverse estimulando *in vitro* un linfocito B con un antígeno de modo que le indujera a la proliferación y producción de anticuerpos que serían homogéneos. Sin embargo, una de las características de los linfocitos B es que mueren en cultivos *in vitro*. Por otro lado, los experimentos llevados a cabo mediante hiperinmunización de animales, con la esperanza de inducir linfocitos tumorales (mielomas) secretores de grandes cantidades de anticuerpos homogéneos específicos han fracasado.

3. Anticuerpos monoclonales (método nuevo)

En 1975 Kohler y Milstein pusieron a punto una nueva técnica que permite que los linfocitos B productores de anticuerpos específicos frente a un cierto determinante antigénico puedan ser cultivados «*in vitro*» mediante su fusión con células de mieloma.

Los mielomas son células tumorales que segregan anticuerpos. Estas células, al contrario de las

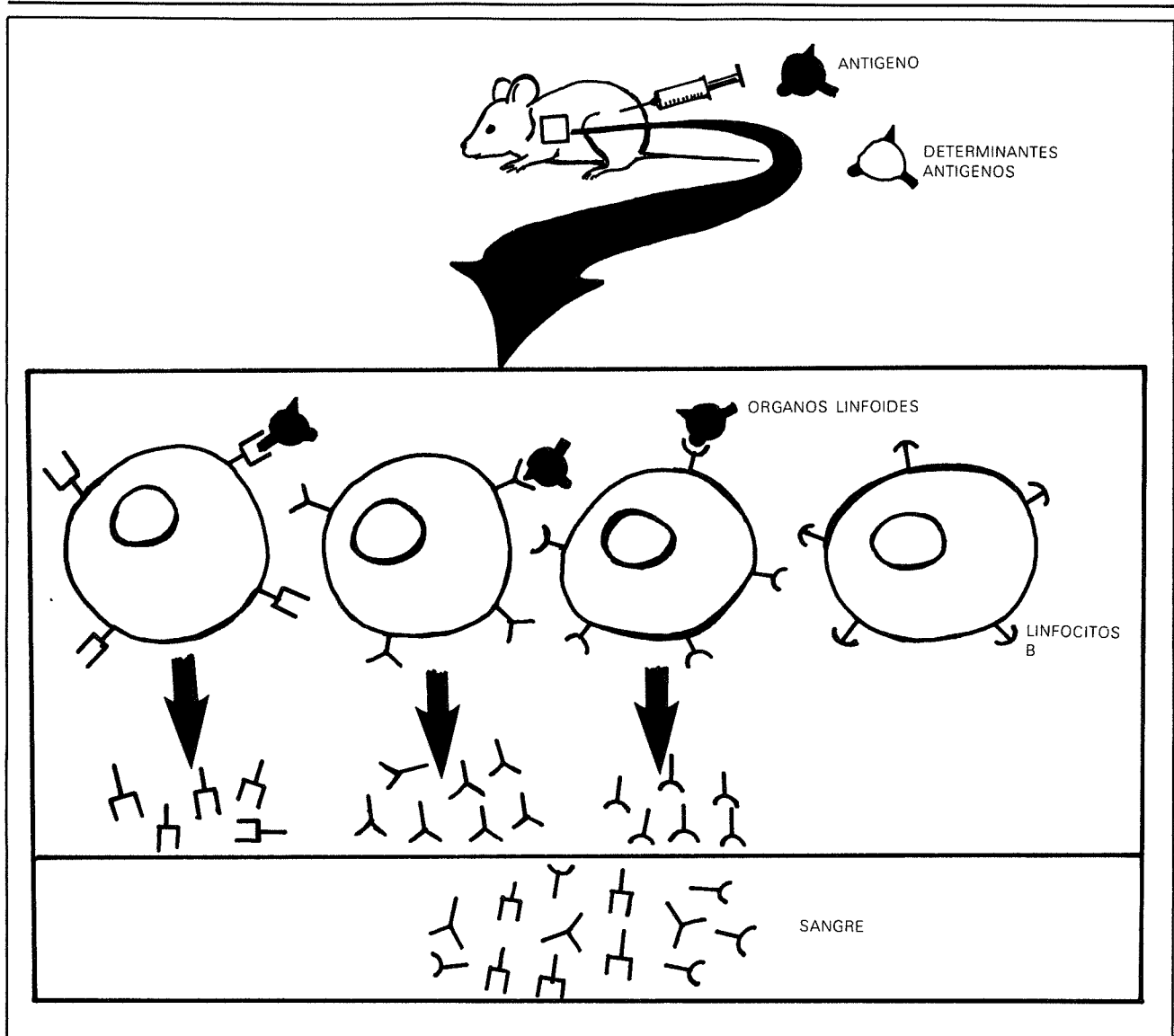


Figura 5 Respuesta policlonal ante un antígeno

La respuesta de un linfocito frente a un Ag no es ante la molécula total sino contra partes específicas llamadas determinantes antigénicos. Cada linfocito da un solo Ac frente a un solo determinante, por lo que al actuar el sistema inmunológico frente a un Ag se produce una respuesta policlonal, es decir, cada uno de los determinantes del Ag sensibiliza un determinado linfocito que prolifera y da lugar a un clon de células productoras de un cierto Ac, por lo que en el suero de la sangre aparece un conjunto de Ac frente a determinantes distintos del Ag, es decir, es un antisuero multiespecífico (Anticuerpos policlonales). Estos anticuerpos específicos (0,01-1 mg/ml) inducidos por la inyección del antígeno se añaden a una cantidad superior de Ac previamente existente en la sangre (8-18 mg/ml).

células normales productoras de anticuerpos, poseen capacidad de proliferación in vivo o in vitro. El mieloma es un clon «inmortal» de células descendientes de una sola célula progenitora. Las células de mielomas pueden cultivarse inde-

finidamente y todos los anticuerpos que segregan tienen una estructura química idéntica. Estos anticuerpos son por lo tanto monoclonales, pero no hay forma de saber contra qué antígeno se dirigen, ni de qué modo pueden inducirse

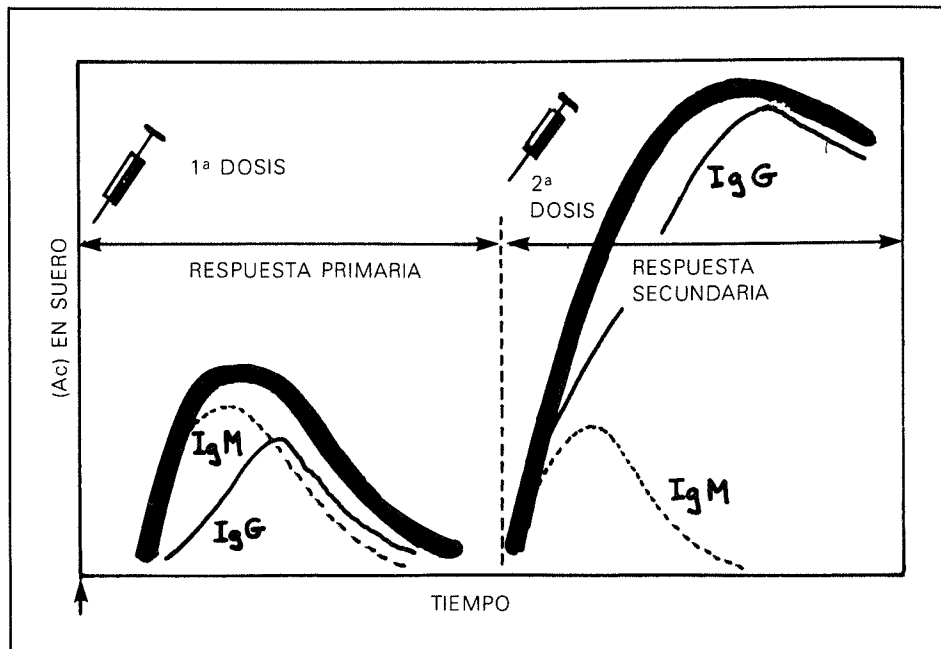


Figura 6 Respuesta secundaria ante la inmunización por un Ag

La producción de Ac se favorece con dosis repetidas del Ag. En una primera exposición (respuesta primaria) se producen Ac en pequeña cantidad, sin embargo, tras un segundo encuentro con el Ag ocurre una respuesta frente a él, que se caracteriza por menor período de retraso desde la inoculación hasta que aparecen niveles detectables de Ac, mayor velocidad de síntesis de Ac y mayor concentración de Ac en suero que en el caso de la respuesta primaria. El tiempo de respuesta depende del Ag, de la vía de inyección, del animal y del adyuvante y es del orden de semanas. La concentración de Ac en la sangre es directamente proporcional al número de linfocitos B estimulados.

mielomas que produzcan anticuerpos frente a un antígeno específico.

La fusión de los mielomas con los linfocitos B productores de un anticuerpo conocido dan lugar a algunos híbridos o hibridomas que conservan las características deseables de sus progenitores: sobreviven en cultivo y producen anticuerpos específicos frente al antígeno de interés (Figura 7). Puesto que cada uno de estos híbridos puede ser aislado, es posible así obtener un anticuerpo monoclonal de conocida especificidad, es decir, procedente de un solo clon de células. Para la producción de estos anticuerpos en cantidad, el híbrido puede ser cultivado «in vitro» o inyectado en la cavidad peritoneal de otro ratón, en el que se produce un tumor que libera grandes cantidades de anticuerpo monoclonal que pueden recogerse del líquido ascítico o bien de la sangre. El esquema general de esta técnica se representa en la Figura 8.

Para la obtención de preparados de linfocitos B enriquecidos en linfocitos productores de un determinado anticuerpo, se utiliza generalmente un esquema tradicional de inmunización consis-

tente en doble inyección. Para ratones, se inyectan unos 100 μg de antígeno con adyuvante y al cabo de unos 20 días se inyectan 10 μg de antígeno. Después de tres días desde la última inyección, se analiza la sangre de los ratones inyectados y aquellos que dan mayor título de anticuerpos se utilizan para obtener la preparación de linfocitos. Cuando mayor es la actividad de los anticuerpos en la sangre mayor es la proporción de linfocitos B específicos en el bazo y por lo tanto más probabilidades existen de obtener el híbrido buscado.

En la Figura 9 se esquematizan distintas formas de obtener linfocitos B sensibilizados frente a un antígeno. La inmunización tradicional mediante inyecciones y posterior extracción del bazo rinde unas 10^6 células/bazo productoras de anticuerpos específicos. Sin embargo, otros métodos combinando inmunización «in vivo» e «in vitro» pueden llegar a dar 10 veces más células sensibilizadas, lo que es una ventaja teniendo en cuenta que éste es uno de los pasos limitantes del éxito en la obtención del híbrido.

La búsqueda de nuevos y más poderosos

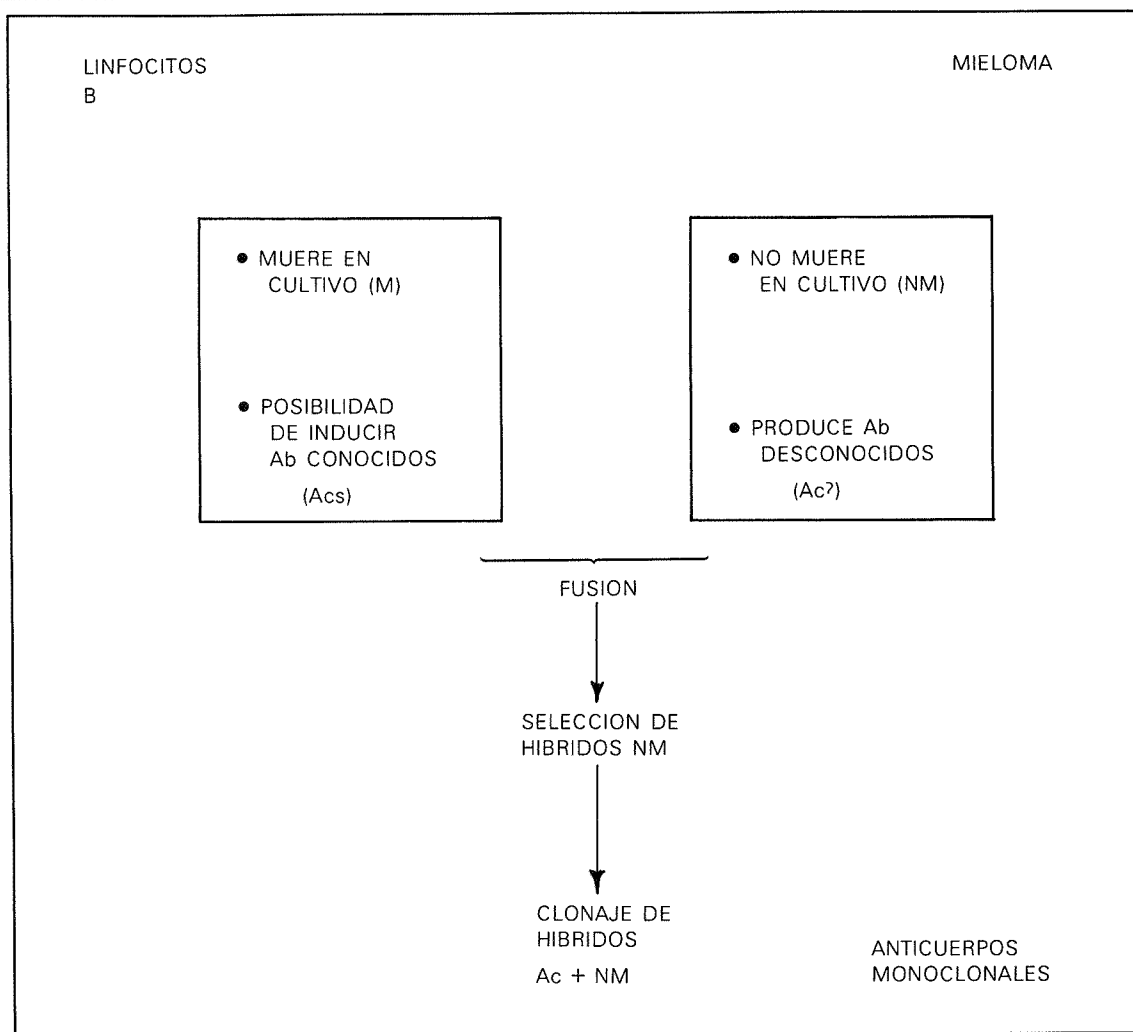


Figura 7 Esquema de la obtención de híbridos

Los linfocitos B pueden ser estimulados a producir anticuerpos conocidos pero no pueden mantenerse en cultivo in vitro o in vivo. Los mielomas producen anticuerpos desconocidos, pero pueden mantenerse indefinidamente en cultivo. Algunos de los híbridos linfocito-mieloma son capaces tanto de producir el anticuerpo deseado como de propagarse en cultivo, por lo que mediante su selección y luego su clonaje, pueden obtenerse clones productores de un solo anticuerpo, anticuerpos monoclonales.

métodos de enriquecimiento de las preparaciones de linfocitos B en los linfocitos productores de anticuerpos de interés es un tema actual de investigación ya que estas técnicas permiten un aumento del porcentaje de híbridos específicos con un esfuerzo técnico menor.

Los mielomas utilizados para obtener híbridos productores de anticuerpos tienen las siguientes características:

— Son células tumorales que pueden propagarse in vitro indefinidamente utilizando técnicas estándar de cultivos celulares (un pH constante de aproximadamente 7.2, medio RPM I 1640 o Dubeco, antibiótico, 10-20% de suero de ternera fetal, temperatura de 37°C, incubadores con o

sin CO₂, etc). Para mantenimiento los cultivos se inician con 10⁴ células/ml y se desdoblan cuando llegan a los 20-50 × 10⁴ células/ml.

— Generalmente las líneas celulares utilizadas en la fusión no producen anticuerpos, no segregan anticuerpos o al menos no poseen una de las cadenas. Esta característica aumenta la especificidad de los anticuerpos a segregarse por el híbrido al no producirse mezclas con el anticuerpo del mieloma. Algunas de las cepas utilizadas se describen en la Tabla 3.

— Una vez realizada la fusión es necesario eliminar los mielomas, para lo cual las cepas utilizadas poseen una mutación que les hace

TABLA 3
Líneas de mieloma usadas para producir híbridos

Línea celular	Cadenas de Ig expresadas
P ₃ — X ₆₃ Ag ⁸	Y ₁ K
P ₃ — NS 1/1 — Ag 4-1 (NS-1)	K (no la excreta)
SP ₂ /0 — Ag 14	ninguna
45 6 T6 1 7	Y ₂ b, K
4 T00 1 L1	K
X 63 Ag 8 653	ninguna
U — 266 AR,	

resistentes a la 8-azaguanina. Esta mutación puede perderse si el medio de cultivo no contiene la droga por lo que periódicamente se ha de incluir en el medio o efectuar un reclonaje de la línea celular. La mutación afecta a la enzima HGPRT (Figura 10)

— Los mielomas se pueden congelar en N₂ líquido a $2-4 \times 10^6$ células/ml en 90% suero de ternera fetal y 10% de dimetil sulfoxido. La congelación debe ser relativamente lenta (a 70°C durante unas 12 horas para llegar a 140°C a las 24 horas). La descongelación por el contrario ha de ser rápida colocando el vial con las células en un baño a 37°C y poniendo las células rápidamente en medio de cultivo a altas densidades. Esta propiedad hace que se puedan conservar los mielomas y los híbridos resultantes indefinidamente.

— Para la fusión han de utilizarse mielomas en el mejor estado posible. Estos son los mielomas de un cultivo en fase exponencial cuya densidad está alrededor de las 10^5 células/ml. Para efectuar una fusión se necesitan 0,5-1 litros de dichos cultivos. El encarecimiento de los medios de cultivo hace que las investigaciones sobre el reemplazamiento del suero por medios definidos sea un tema de actualidad (Coll and Ingram, 1981; Coll, 1978).

La fusión puede realizarse por medio de polietilenglicol. Para llevarla a cabo se mezclan células de bazo con células de mieloma, en proporción entre 1:1 y 10:1. Dado que, normalmente se obtienen 10^8 células nucleares por bazo de ratón (Mishell y Shiigi, 1980; Kwan y Cols 1980), cada bazo se fusiona con $10^7 - 10^8$ células de mieloma. Se ha observado que esta relación no es crítica, aunque un exceso de células de bazo es ventajosa (Kohler y Milstein, 1976) debido a que aumenta la probabilidad de obtener híbridos mieloma-linfocito B disminuyendo la de mieloma-mieloma.

Para efectuar la fusión, los mielomas, los linfocitos y el polietilen-glicol se ponen en un baño a 37°C. Después de mezclar y centrifugar

los mielomas y linfocitos, se les añade cuidadosamente el polietilen-glicol con medio de cultivo y suero de ternera fetal. Hay que tener en cuenta que el polietileno-glicol es altamente tóxico para las células, precipita muchas proteínas y su medio es hipotónico. Es por esto que el tratamiento sólo dura 6 a 7 minutos y evitando movimientos bruscos que lisan las células.

Como resultado de la fusión se obtiene un híbrido por cada 2×10^5 células de bazo, aproximadamente (Kwan y Cols, 1980; Yelton y Sharff 1980). Además de los híbridos linfocito-mieloma existen los tipos celulares: linfocitos y mielomas que no han fusionado o que han fusionado entre sí: linfocito-linfocito y mieloma-mieloma.

Los linfocitos no son estables en cultivo y mueren a las pocas semanas. Por el contrario, las células de mieloma son capaces de vivir indefinidamente en cultivo. Para efectuar la selección, las cepas de mielomas que se utilizan son deficientes en el enzima Hipoxantina-Guanina-Fosforribosil-Transfenasa (HGPRT). La ausencia de este enzima hace imposible uno de los caminos de síntesis de purinas (ruta de rescate) quedándoles solamente la síntesis de novo como única ruta de síntesis de purinas y por lo tanto de ácidos nucleicos. Los híbridos tienen la síntesis de novo tanto del linfocito como del mieloma y además la ruta de rescate procedente del linfocito. Para efectuar la selección, se añade al medio aminopterina que bloquea la síntesis de novo. Esto provoca la muerte de los mielomas deficientes de HGPRT pues es su única fuente de purinas, mientras que permite vivir a los linfocitos gracias a la ruta de rescate (Figura 10). También se añaden al medio hipoxantina y timidina que son precursores de la ruta de rescate para asegurarse de su funcionamiento (Medio HAT).

Una vez realizada la fusión, por lo tanto, se cultivan las células en medio HAT en pocillos individuales (10^6 células/pocillo). La aparición de crecimiento celular en los pocillos no supone la aparición de híbridos formadores de anticuerpos ya que en una inmunización óptima sólo el 1% de los linfocitos B están estimulados para producir un anticuerpo específico contra el antígeno empleado (Kwan y Cols, 1980). Es corriente que únicamente 0,1% o incluso 0,01% de los linfocitos sean productores de anticuerpos contra el antígeno. Esta baja frecuencia impone actualmente serias limitaciones para antígenos poco inmunogénicos. Por ejemplo, en el mejor caso, en que la respuesta interesa al 1% de la población de linfocitos B (10^6 células) si fusionamos las células de un bazo (10^8 células) con células de mieloma obtendremos aproximadamente 500 híbridos (uno por cada 2×10^5 células de bazo) (Yelton y Sharff, 1980; Kwan y Cols,

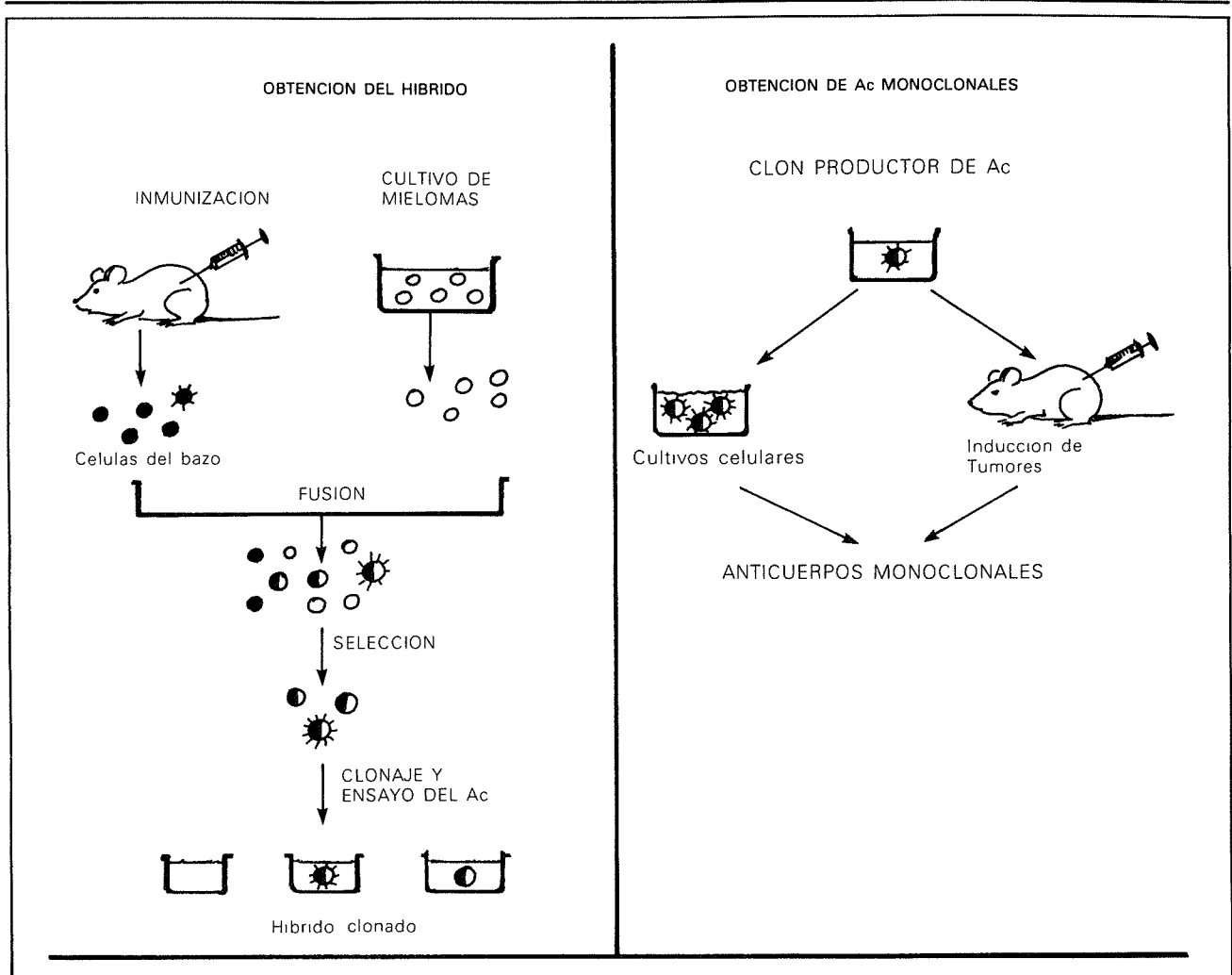


Figura 8 Esquema de la obtención de anticuerpos monoclonales

La obtención de Ac monoclonales consta de dos etapas: obtención del clon productor del Ac deseado y obtención del anticuerpo a partir del clon. Para obtener el híbrido se fusionan linfocitos del bazo de un ratón sensibilizado ante el Ag, con células de mielomas. La ventaja de esta fusión consiste en que los linfocitos por sí solos mueren en cultivos in vitro, sin embargo la unión de las células del mieloma les confiere la capacidad de ser cultivados. Una vez que se obtiene el híbrido clonado, éste puede cultivarse para obtener Ac o bien inyectarse en ratones en los que se inducen tumores que producen Ac.

1980) que al separarlos en 96 pocillos nos darán crecimiento en todos los pocillos. De estos el 1% serían productores de anticuerpos frente al antígeno, lo que nos daría 5 clones específicos entre los 500. Esta cantidad se multiplica por 4-6, debido a que la fusión enriquece los híbridos formadores de anticuerpos. Haciendo los mismos cálculos para inmunógenos más débiles que estimulan, p. ej. al 0.01% de la población (10^4 células de 10^8) sería necesaria la fusión de 10 bazo y probar 5 000 clones de híbridos para encontrar un clon de híbridos productor de anticuerpos contra el antígeno. Las dificultades de ensayo y clonaje hacen difícil el lograr anti-

cuerpos monoclonales contra estos antígenos poco inmunogénicos, con los métodos actuales.

Para efectuar la selección, uno de los métodos que se utilizan (Oi y Herzenberg, 1980) consiste en añadir un volumen del medio HAT al cultivo un día después de la fusión, generalmente 0.1 ml. Después cada dos días se retira un volumen del medio sobrenadante y se vuelve a añadir un volumen del medio HAT. Los linfocitos B mueren alrededor de la primera semana mientras que los mielomas tardan en desaparecer unos diez días. Al cabo de los 14 a los 20 días las únicas células supervivientes son híbridos linfocitos-mieloma. Los cultivos se pueden pasar a medio de cultivo

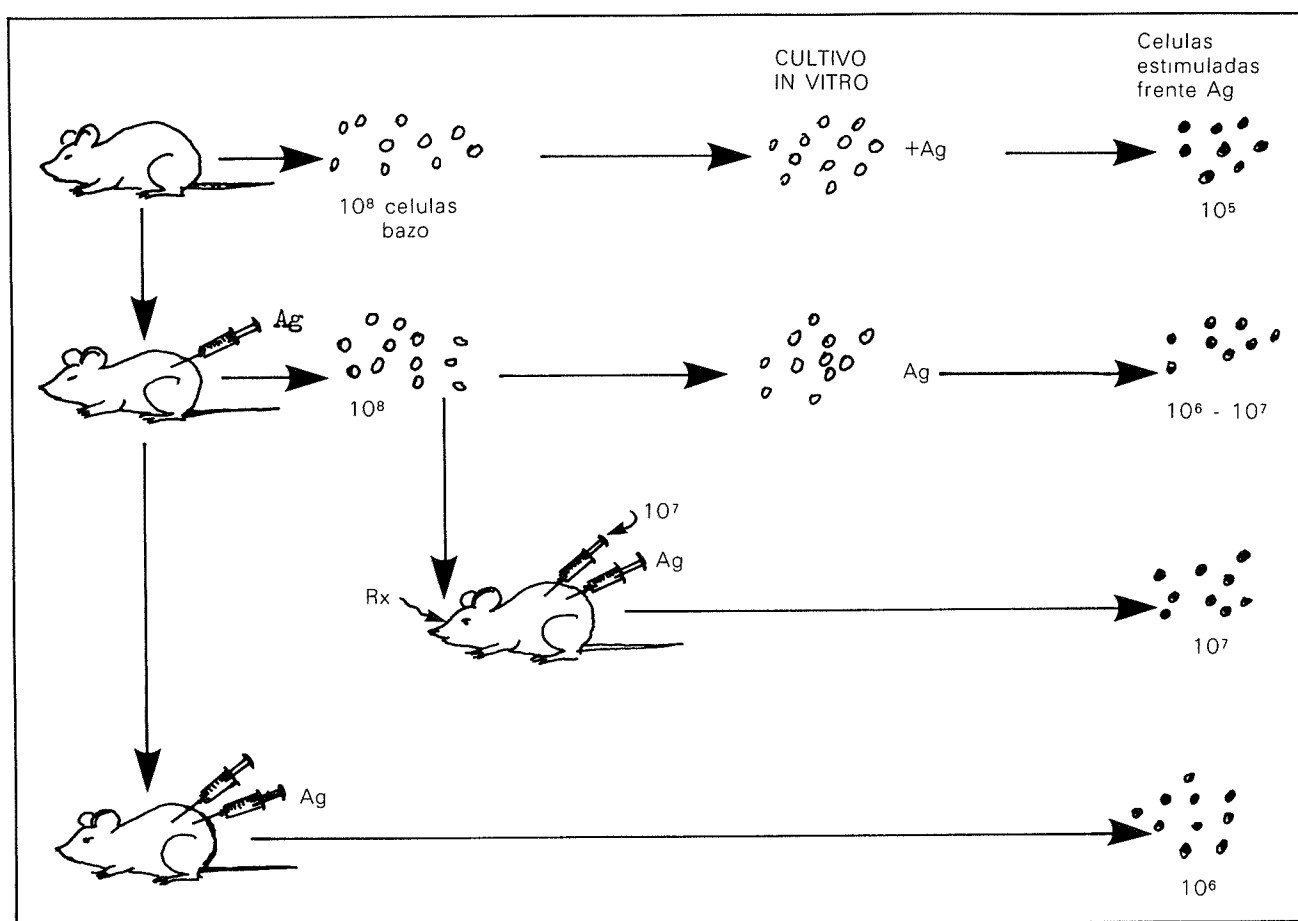


Figura 9 Obtención de linfocitos B sensibilizados

Dependiendo del método utilizado para la sensibilización de los linfocitos B pueden obtenerse rendimientos variables. La inmunización «in vivo» requiere al menos dos dosis de Ag inyectadas al animal, en cuyo bazo se encontrará un 1% de los linfocitos sensibilizados frente al Ag. Otro método consiste en la incubación con el Ag, de linfocitos extraídos del bazo de ratones que pueden o no haber sido inyectados con el Ag previamente. Las células del bazo de ratones inmunizados una vez frente al Ag pueden ser inyectadas simultáneamente con una dosis de Ag en ratones cuyo sistema inmune ha sido suprimido por irradiación. Los datos de la figura corresponden al caso en que el Ag son células rojas de la sangre, que muestran un gran poder antigénico (Mishell y Shiigi, 1980, Kwan y Col., 1980, Fox y Col., 1981).

normal poco a poco durante una semana y se les pasa a pocillos mayores de 1 ml. Para saber qué pocillos están produciendo los anticuerpos buscados, se debe esperar unos tres días después de efectuar el último cambio de medio, para permitir una suficiente acumulación del anticuerpo en el medio de cultivo.

El método de ensayo de penderá en cada caso del tipo de anticuerpo y antígeno. El método debe ser sobre todo rápido, debido a la gran cantidad de cultivos que hay que ensayar y a que las decisiones sobre el cultivo han de hacerse rápidamente.

Dependiendo del volumen de cultivo donde se

haya realizado la selección debe transferirse los cultivos con resultados positivos a otros pocillos mayores para expandirlos y congelarlos. A partir de estos cultivos se realizan el clonaje bien por dilución límite, bien en agar blando o bien en microplacas. Independientemente del procedimiento de clonaje, se trata de obtener poblaciones procedentes de una única célula (clones). Esto se logra, bien diluyendo y haciendo alícuotas de tal modo que estadísticamente o por observación al microscopio tengamos la certeza de que cada población proviene de una sola célula, o bien por extensión en agar de las células, quedando inmóviles y dando cada célula

TABLA IV
Obtención de anticuerpos por método convencional y por híbridos - Comparaciones

	Método Convencional	Híbridos (H)		
		Cultivos Celulares	Inyección en ratones	
			Sangre	Líquido ascítico
Tiempo en obtener Ac	Semanas	4-6 días	10-30 días	10-30 días
Cantidad de líquido	1 ml/ratón / 100 mg Ag	1 $1/10^6$ + -10^7 H	1 ml/ratón + $/10^6-10^7$ H	2-10 ml/ratón 10^6-10^7 H
Concentración de Ac	0.001-1 mg/ml	0.01-0.06+ mg/ml	1-10 mg/ml ^o	1-10 mg/ml
Concentración de proteína	60 mg/ml*	9 mg/ml*	60 mg/ml	25 mg/ml ^o
Concentración de IgG	8-18 mg/ml*	1.2-2.7 mg/ml	8-18 mg/ml	12 mg/ml
Ac/prot porcentaje de Ac	0.02-1.6%	0.1-0.6%	1.6-16.6%	4-40%
Ac/IgG porcentaje de Ac	0.06-12.5%	0.37-5%	5.5-125%	8.3-83%

+Datos de Oi y Herzenberg (1980) *Las concentraciones de proteínas en suero son de Putman (1975) *La concentración de proteína en líquido ascítico según los datos de Hozumi y Sugiyama (1973) Calculado según una concentración de suero fetal del 15% ^oDatos de Kwan et al., 1980 Orthoclone Eisen 1974 El porcentaje de proteína que es Ac da una idea del factor de purificación necesario para obtener el Ac aislado El porcentaje de IgG que es el Ac buscado da una idea de las impurezas que va a tener el Ac después de purificado mediante una columna con proteína A, por ejemplo una columna de antígeno daría el más alto grado de pureza del Ac, pero este método no es viable en la mayoría de los casos

una colonia distinguible visulamente de las demás

El siguiente paso es el ensayo de estas nuevas poblaciones para la producción de anticuerpo (Figura 11) Los clones con resultados positivos crecen y se congelan, realizándose un segundo clonaje.

Los cultivos en los que en un primer ensayo se encontró la presencia de anticuerpo, pueden perder esta capacidad de producción debido a pérdida de cromosomas, crecimiento de otras poblaciones híbridas no productoras de anticuerpos o productoras de anticuerpos de otra especificidad, etc. Por ello se hace necesario comprobar la estabilidad de cada clon antes de proceder a su uso.

La Figura 12 esquematiza una escala de tiempos aproximadamente para producir un anticuerpo monoclonal suponiendo que todos los pasos tengan éxito.

El objetivo final puede resumirse en dos puntos:

- Conseguir un clon suficientemente estable y capaz de producir gran cantidad de anticuerpo
- Conseguir un anticuerpo monoclonal que sea capaz de comportarse en el diagnóstico análogamente a como lo hacen las preparaciones de anticuerpos convencionales

Una vez obtenido el clon productor del anticuerpo en cantidades mínimas que permitan al mantenimiento del clon y su conservación mediante congelación, se plantea el problema de

obtener al anticuerpo en cantidad. Para ello, actualmente, se pueden utilizar dos métodos:

— Cultivo celular in vitro del clon en grandes cantidades. El anticuerpo se acumula en el sobrenadante del cultivo.

— Inyección del clon en ratones apropiados e inducción intraperitoneal de tumores. El anticuerpo se acumula en la sangre o en el líquido ascítico en la cavidad peritoneal del ratón.

La Tabla 4 expone y permite la comparación entre estos dos métodos principales y el método convencional de obtener anticuerpos. En cada método se compara el tiempo necesario para obtener el anticuerpo, la cantidad de líquido obtenido, la concentración del anticuerpo, la concentración total de proteínas y la concentración de IgG. El tiempo necesario para obtener el anticuerpo da una idea del coste debido al mantenimiento de ratones o cultivos celulares que tiene una parte importante en el coste total. La cantidad de líquido y concentración del anticuerpo da una idea de la producción total que cabe esperar.

El porcentaje de proteínas que es anticuerpo da una idea del factor de purificación necesario para obtener el anticuerpo aislado o de las impurezas que la preparación va a tener. El porcentaje de IgG que es el anticuerpo buscado (suponiendo que es una IgG) da una idea de las impurezas que va a tener después de purificado con una columna de afinidad con proteína A, por ejemplo (Método que separa IgG). Una purifica-

TABLA V
Ejemplos de algunos productos a diagnosticar

1 Proteínas		
— Hemoglobina	— Crioglobulinas	— Albúmina
— Fibrinógeno	— Fetoproteína	— Tranferina
— Igs (M G A, D E)	— Ceruloplasmina	— etc
— Fracciones complemento		
2 Anticuerpos		
— Anti DNA	— Factor reumatoide	
— Anti RNA	— Antiestrptolisina	
— Anti Tiroides	— etc	
— Anti Insulina		
3 Tipificación de Tejidos		
— Histocompatibilidad	— Grupos sanguíneos	
4 Enzimas		
— Creatinina	— CPK	— CHE
— Fosfatasas	— G L DH	— Aldolasa
— LDH e isoenzimas	— LAP	— Lipasa
— Amilasa	— GT	— etc
5 Hormonas		
— Tiroxinas	— Serotomicina	— etc
— Cortisol	— FSH	
— Tetrosterona	— Prolactina	
	— Insulina	
6 Antibióticos y drogas		
— Gentamicina		
— Tobramicina		
— Amikacina		
—etc		
7 Virus y bacterias		
— Hepatitis	— Rubéola	
— Teponema	— Varicela	
— Cólera	— Meningitis	
— Toxoplasma	— etc	
8 Tumores		
— Carcinoma hepatocelular primario		

Todos los posibles productos a diagnosticar se han clasificado en 8 categorías basadas en que los problemas y criterios para diagnóstico son en buena medida similares, aunque cada diagnóstico concreto tiene sus características peculiares

ción total podría lograrse con una columna de afinidad con el antígeno, pero este método no es viable a gran escala en la mayoría de los casos.

Según estos datos aproximados, el método más rápido para obtener una cantidad determinada de anticuerpos es la inyección en ratones del clon, siendo el más lento el método convencional. En cuanto a cantidad del fluido y concentración de anticuerpos, la obtención del líquido ascítico en ratones inyectados con el clon es el método que ofrece una mayor producción. Por otra parte este es el método que tiene una menor proporción de proteína e IgG contaminante y por lo tanto produce el anticuerpo monoclonal más

puro o más fácil de purificar totalmente. En cada caso concreto podrá convenir uno u otro método según cada objetivo.

Estas líneas celulares tienen deficiencias enzimáticas que permitirán la selección posterior del híbrido en el medio adecuado. Algunas de ellas sintetizan y excretan al medio anticuerpos; sin embargo, otras solo sintetizan cadenas ligeras o incluso ninguna. (Kwan et al, 1980). Para obtener híbridos productores de anticuerpos monoclonales se prefiere en principio, utilizar líneas de mieloma que no producen cadenas de anticuerpo ya que de esta manera las cadenas de los anticuerpos deseados no se mezclan con las

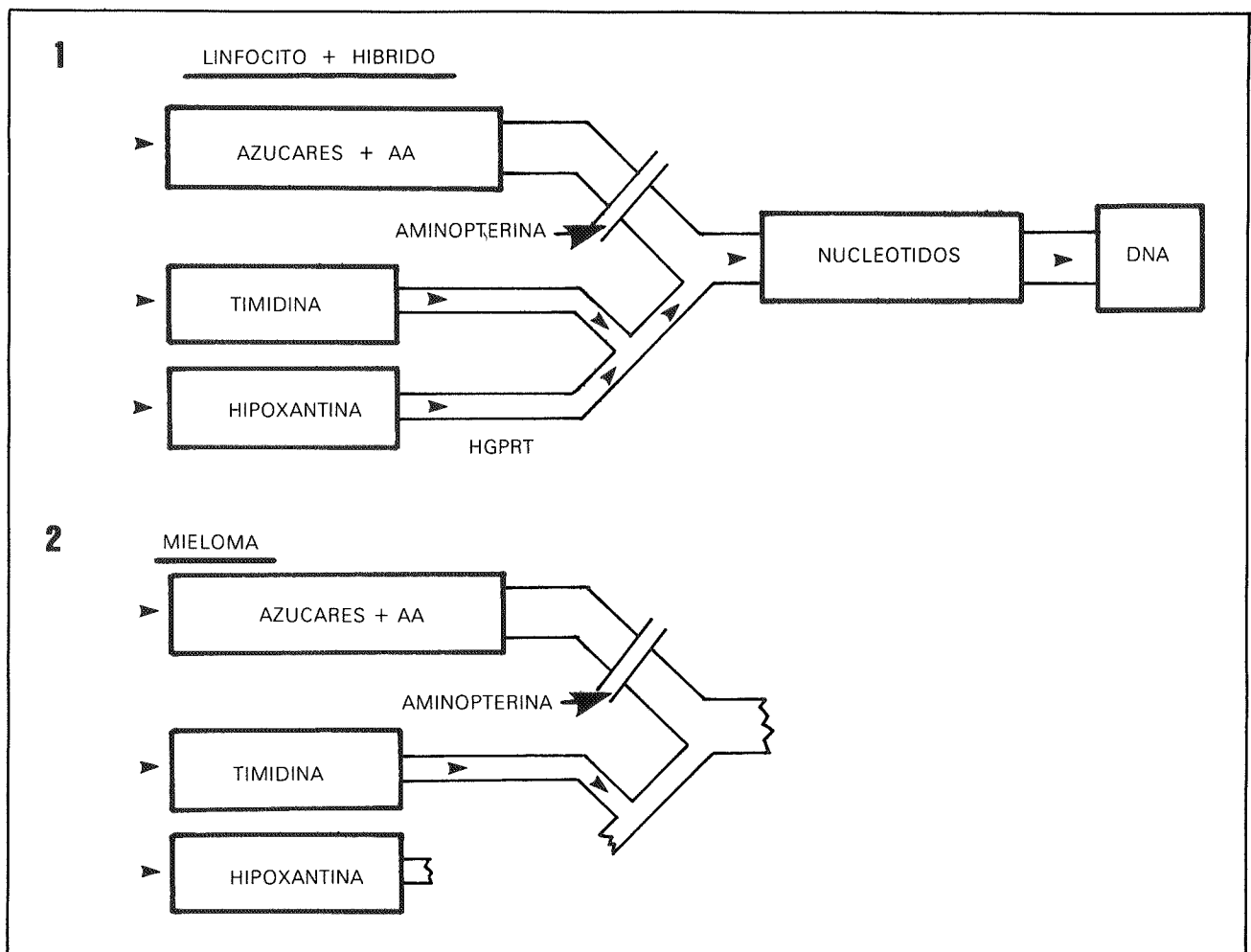


Figura 10 Fundamentos de la selección en el medio hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT)

Para seleccionar las células híbridas entre células de bazo y de mieloma se utiliza el medio HAT debido a:

- La síntesis de nucleótidos se lleva a cabo por un camino principal, (síntesis de novo), y por una vía secundaria que rescata las bases timidina e hipoxantina (ruta de rescate).
- La aminopterina presente en el medio HAT bloquea la síntesis de novo. Para vivir las células requieren timidina e hipoxantina.
- Las células de mieloma carecen de una enzima necesaria para la incorporación de la hipoxantina (HGPRT) por lo que mueren en medio HAT. La mutación se obtiene por cultivos en medios con 8 azaguanina.
- Los linfocitos no son estables en cultivo.
- Las células híbridas poseen la enzima HGPRT y sobreviven a expensas de la hipoxantina y timidina del medio.

cadena que podrían ser producidas por el mieloma. Algunas de estas líneas, pueden obtenerse del Cell Distribution Center at the Salk Institute P.O. Box 1809; San Diego CA 92112 USA.

Datos de Oi y Herzenberg (1980). *Las concentraciones de proteínas en suero son de Putman (1975). La concentración de proteínas en líquido ascítico datos de Hozumi y Sugiyama (1973);

Calculado según una concentración de suero fetal del 15%. Datos de Kwan et al, 1980. Orthoclone. Eisen, 1974. El porcentaje de proteínas que es Ac da una idea del factor de purificación necesario para obtener el Ac aislado. El porcentaje de la IgG que es el Ac buscado da una idea de las impurezas que va a tener el Ac después de purificarlo mediante una columna con proteína A, por ejemplo una columna de

TABLA VI

Tipos de diagnósticos en los que los anticuerpos monoclonales ofrecen ventajas técnicas

Criterios	Proteínas	Anticuerpos	Tipificación tejidos	Enzimas	Hormonas	Antibiot Drogas	Virus Bacter	Tumores
Difícil Purificación	x		x	x	x			x
Manipulación peligrosa							x	
Baja inmunogenicidad					x			
Alta inmunogenicidad interespecífica			x					x
Productos de catabolismo	x				x	x		
Variabilidad genética							x	
Pequeñas diferencias (isoenzimas, hemoglobinas)	x	x		x				
DIAGNOSTICO								
Criterios	Reproducibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Linealidad				
Hemólisis	x							
Precipitación	x							
Aglutinación	x							
Fijación C	x							
RIA	x	x	x	x				
IRMA	x	x	x	x				
EIA, ELISA	x	x	x	x				
Inmunofluorescencia	x	x	x					
Biototoxicidad	x							
Rosetas	x							

x significa ventajas técnicas. Esto es solo indicativo para los tipos de diagnósticos. En cada caso deberá estudiarse en detalle. La evaluación de estos criterios variará con el antígeno-anticuerpo concreto. Mientras que la reproducibilidad es una ventaja de los anti-cuerpos monoclonales quizá su principal desventaja esté en lo elevado de la inversión inicial para conseguir un clon. Para todos los diagnósticos no es necesariamente viable utilizar anticuerpos monoclonales (Coll, 1982)

TABLA VII

Ejemplos de anticuerpos monoclonales comerciales de importancia clínica (Diciembre, 1981)

Anticuerpos Monoclonales contra	Diagnóstico	Casas comerciales
Linfocitos T	Leucemia	H, BRL, M, O
Antígeno Ia	Respuesta inmune	H,
Gonadotropina coriónica	Embarazo	H, M, Me
TSH	Función tiroidea	H, M, Me
Fetoproteína	Tumores	H, M
Antígeno carcinoembrionario	Tumores	H
Ferritina	Almacenamiento de hierro	H,
IgE	Alergias (Kit comercial)*	H
Virus hepatitis	Hepatitis	H,
Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, etc.)	Respuesta inmune	BRL, S

H Hybritech, BRL, Bethesda Research Labs, M Miles Lab, Me, Medix, S Seward, O Orthoclone. Aunque el número de anticuerpos monoclonales actualmente disponibles comercialmente es relativamente pequeño, este número representa un gran avance si se toma en consideración lo reciente de la técnica y la gran cantidad de laboratorios y casas comerciales que actualmente están trabajando en la estabilización de clones y en los pasos finales de la incorporación de anticuerpos monoclonales a kits de diagnóstico.

(*) Actualmente, es el único kit que existe en el mercado.

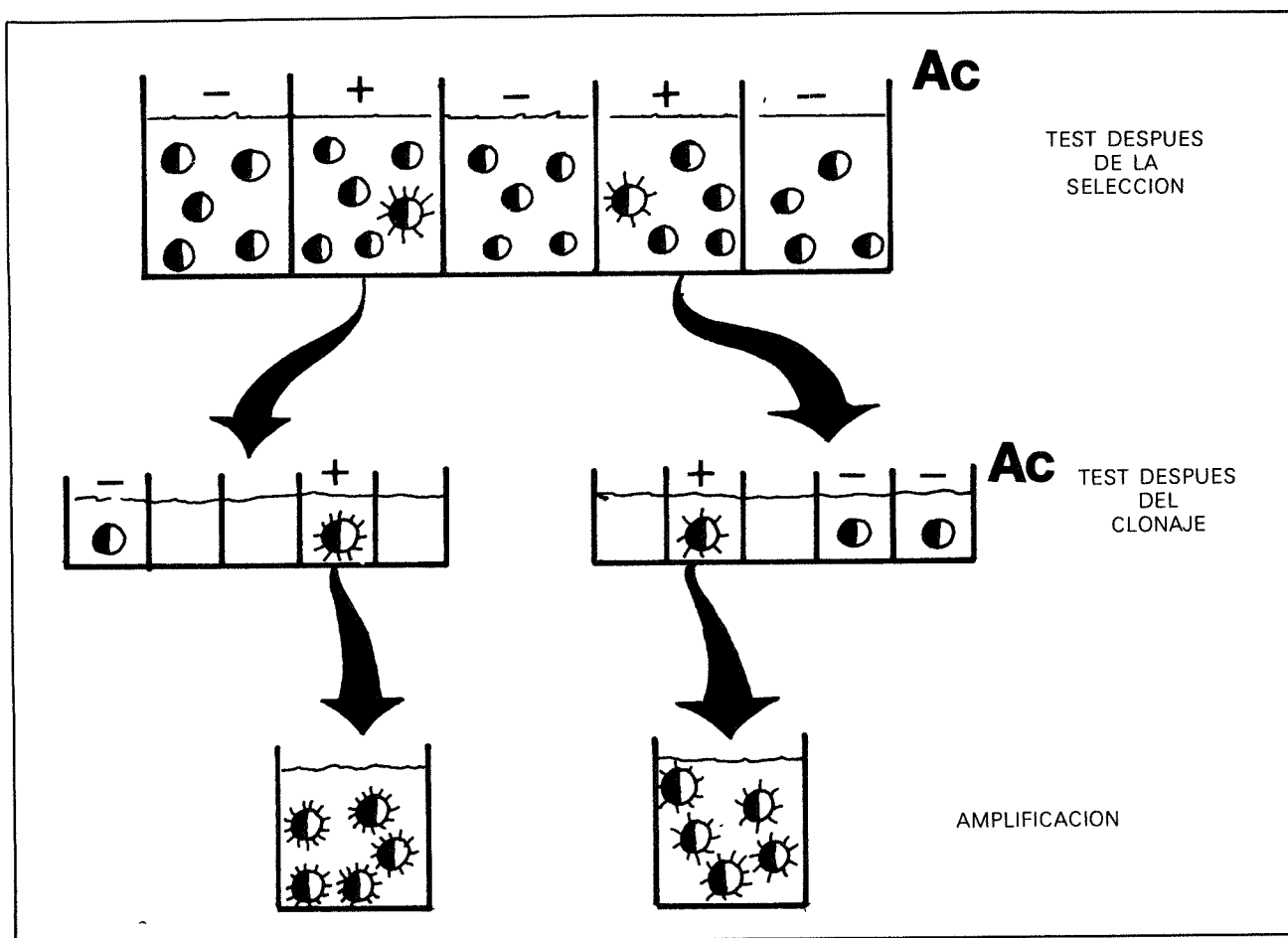


Figura 11 Ensayo del anticuerpo y clonaje por disolución del híbrido

Después de la selección de los híbridos en el medio HAT se ensaya la presencia de anticuerpo en el sobrenadante de los cultivos. Si resulta positivo se expande el cultivo para clonarlo. El clonaje consiste en individualizar las células de tal modo que al proliferar den una colonia, físicamente separada del resto. Puede hacerse por dilución límite, diluyendo las células de tal modo que tengamos la seguridad de que la colonia proviene de una sola célula, o bien extendiendo e inmovilizando las células en un gel (agar nutritivo). Sobre estos cultivos se ensaya de nuevo la presencia de anticuerpo en el medio para amplificar y conservar los que sean monoclonales y produzcan anticuerpos.

antígeno daría el más alto grado de pureza del Ac, pero éste método no es viable en la mayoría de los casos.

Las moléculas a detectar pueden agruparse en las categorías expuestas en la Tabla 5. La figura 13 esquematiza una estimación preliminar del mercado español según categorías:

4. Tipos de diagnóstico

Debido a su alta especificidad y pureza, los anticuerpos monoclonales están encontrando múltiples aplicaciones, algunas todavía por explorar. Por ejemplo, sustitución de suero terapias tratamiento contra tumores, investigación básica, etc. Aquí sólo vamos a tratar su aplicación a métodos de diagnóstico clínico que podríamos denominar extracorpóreo, es decir al reconocimiento de moléculas complejas en la sangre, orina u otros líquidos o tejidos biológicos.

- Proteínas
- Anticuerpos.
- Tipificación de tejidos.
- Enzimas.
- Hormonas.
- Antibióticos y drogas.
- Virus y bacterias.
- Tumores.

Para la detección de estas categorías se utilizan

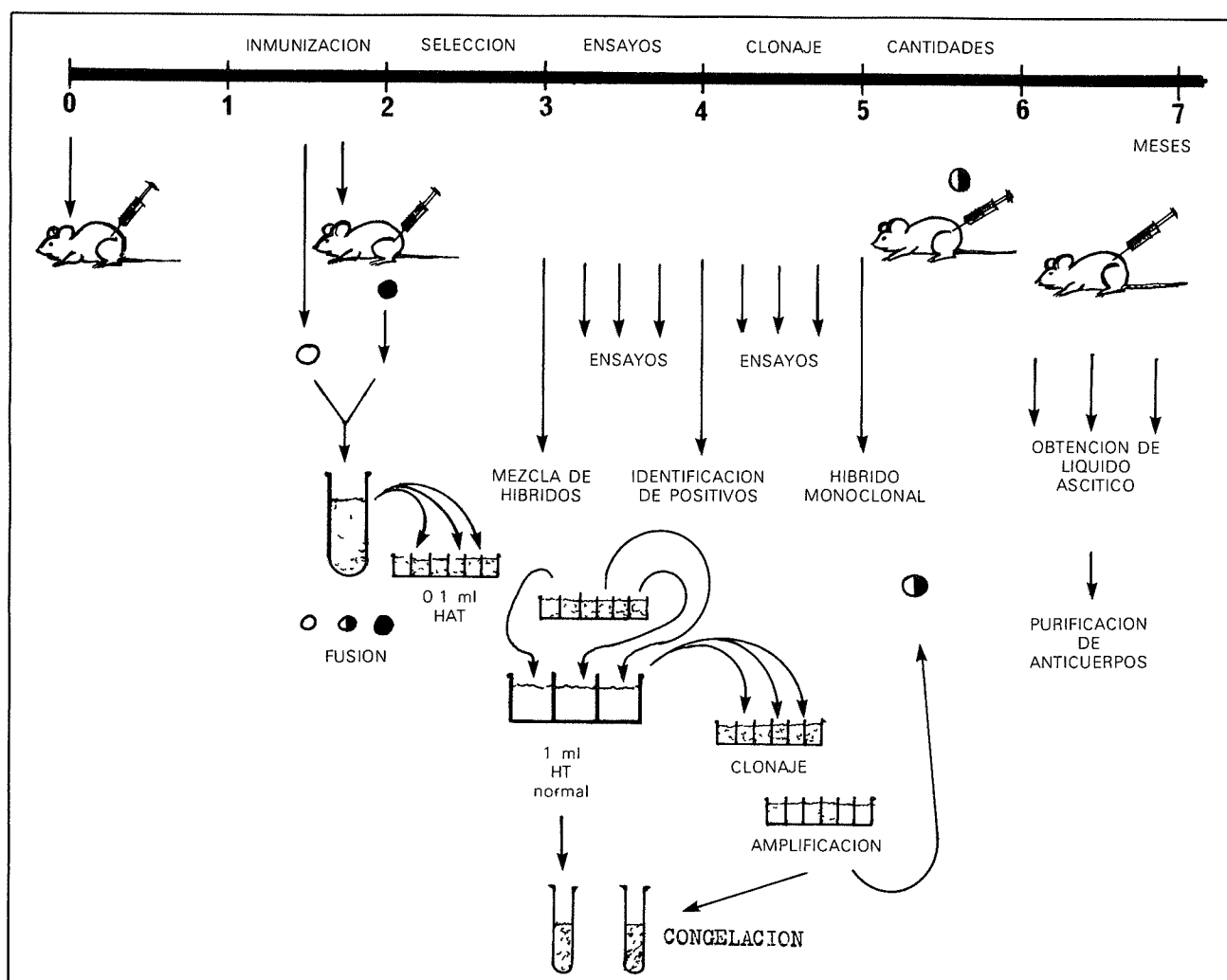


Figura 12 Escala de tiempos completa para producir un anticuerpo monoclonal (Datos de Oi y Herzenberg, 1980)

Se han redondeado los tiempos de manera que se adapten aproximadamente a períodos de 1 mes. El primer mes se inyectan los ratones con el antígeno y se preparan suficiente número de mielomas para la fusión. Una vez efectuada ésta se procede a seleccionar los híbridos con medio HAT durante al menos 15 días aproximadamente. En los cultivos con híbridos mezclados se procede al ensayo de anticuerpos (entre 18 y 32 días después de la fusión), después tienen que pasarse a medio HT, y a medio normal (7 días) para después amplificarlos a cultivos de 1 ml para congelación y clonaje. Una vez clonados y ensayados (unos 14-20 días) se amplifican los cultivos y se congelan o se inyectan en ratones para su obtención en cantidad lo cual tarda en comenzar unos 10-30 días después de la primera inyección.

varios métodos de diagnóstico que usan anticuerpos o antiseros convencionales. Los anticuerpos monoclonales, principalmente debido a la mayor garantía de regularidad en su suministro y a su especificidad pueden ir poco a poco sustituyendo a los convencionales en casi todos estos métodos.

Para dar una idea de posibles aplicaciones de los anticuerpos monoclonales en diagnóstico vamos a esquematizar brevemente algunos de

ellos. Todos los métodos pueden usarse indistintamente para medir la concentración de antígeno o anticuerpo en un fluido. Prácticamente, todos los métodos en diagnóstico pueden usarse:

— Directamente, utilizando la reacción antígeno-anticuerpo

— Indirectamente: utilizando la reacción antígeno-anticuerpo-anticuerpo. Es decir usando un segundo anticuerpo que reconoce el primer

anticuerpo amplificando la reacción

Entre los métodos que se utilizan actualmente para la diagnosis están:

Hemolisis por activación del complemento. Lisis de hematíes recubierto del antígeno por actuación sucesiva del anticuerpo y complemento (conjunto de proteínas sericas cuya acción en cascada es iniciada por anticuerpos unidos a la superficie celular y provoca ruptura) Debe de tenerse en cuenta que sólo ciertas clases de anticuerpos son capaces de interaccionar con el complemento y que al pertenecer un anticuerpo monoclonal a una sola clase, ha de determinarse si posee tal capacidad.

Test de fijación de complemento. Miden la reacción antígeno-anticuerpo mediante la inactividad de complemento. El complemento libre se mide por la hemolisis de células rojas sensibilizadas con un antígeno y su anticuerpo.

Técnicas de aglutinación. Formación de agregados visibles compuestos de partículas (hematíes, latex) recubiertas de antígeno y moléculas de anticuerpo. Dada la alta capacidad específica de los anticuerpos monoclonales y su monoespecificidad, suelen originar fenómenos de prozona a diluciones bajas. Las reacciones de aglutinación, miden la cantidad de un antígeno particulado mediante su aglutinación por el anticuerpo. Los agentes más utilizados son bacterias, células rojas y partículas inertes a las que se pega el antígeno.

Técnicas de precipitación. Formación de complejos supramoleculares antígeno-anticuerpo: puede visualizarse directamente (inmunodifusión en medio sólido, inmunoelectroforesis) o por registro turbidométrico (nefelometría) Requiere la presencia de al menos dos determinantes antigénicos por molécula de antígeno, situación que no siempre se cumple en antígenos protéicos. Esto hace que los anticuerpos monoclonales no precipiten con estos antígenos, situación que puede resolverse usando mezclas de distintos anticuerpos monoclonales.

Citotoxicidad. Destrucción de células diana recubiertas de antígeno por anticuerpos en presencia de complemento (o de cierto tipo de linfocitos). La liberación de sustancias del interior de la célula (sales radiactivas, ATP) al medio de incubación es una medida del daño celular.

Rosetas. Formación de complejos multicelulares por reacción de células recubiertas de antígeno y células portadoras de anticuerpo

Técnicas inmunoradiométricas. (IRMA). Método para medir la concentración de antígeno determinado la cantidad de anticuerpo radiactivo que es

capaz de reaccionar con aquel. Puede usarse un segundo anticuerpo (no radiactivo) para fijar el antígeno a una fase sólida (ensayo en tandem) Este segundo anticuerpo puede ser igualmente un anticuerpo monoclonal, pero en este caso ha de reconocer una región de la molécula de antígeno distinta a la reconocida por el primero (radiactivo)

Técnicas de radioinmunoensayo. (RIA) Método para medir la concentración de un antígeno por estudio del desplazamiento de la reacción entre un anticuerpo y la molécula del antígeno marcada radiactivamente

Técnicas inmunoenzimáticas (EIA, ELISA). Conceptual idéntico al IRMA, pero se substituye la sonda radiactiva por un enzima, midiéndose la reacción antígeno-anticuerpo por la subsiguiente interacción enzima-sustrato

Inmunofluorescencia. Detección de antígenos de la superficie celular o intracelulares (core de tejidos) mediante anticuerpos conjugados a moléculas capaces de ser detectadas por fluorescencia. El uso de enzimas como moléculas sonda permite el empleo de técnicas citoquímicas para la localización tisular del antígeno

La caracterización del anticuerpo monoclonal obtenido comprende principalmente:

- Determinar a que clase de inmunoglobinas pertenece
- Determinar su pureza y si es o no necesario proceder a una purificación, y
- Determinar sus propiedades de reacción con el antígeno

Entre los métodos que se utilizan para la caracterización de anticuerpos están:

- La inmunodifusión (identificación de la clase de anticuerpo)
- Inmunoelectroforesis (identificación de impurezas).
- Inmunoprecipitación (identificación de la clase de anticuerpo)
- Inmunoadsorción y cromatografía de afinidad (purificación).
- Electroforesis de las cadenas (determinación del peso molecular, identificación de impurezas).
- Isoelectroforesis (determinación del punto isoelectrico, e identificación de impurezas).
- Filtración molecular (determinación del peso molecular, identificación de IgG)
- Radioinmunoensayos o enzimoimmunoensayos (identificación de impurezas).
- Cromatografía de afinidad prot A (purifica-

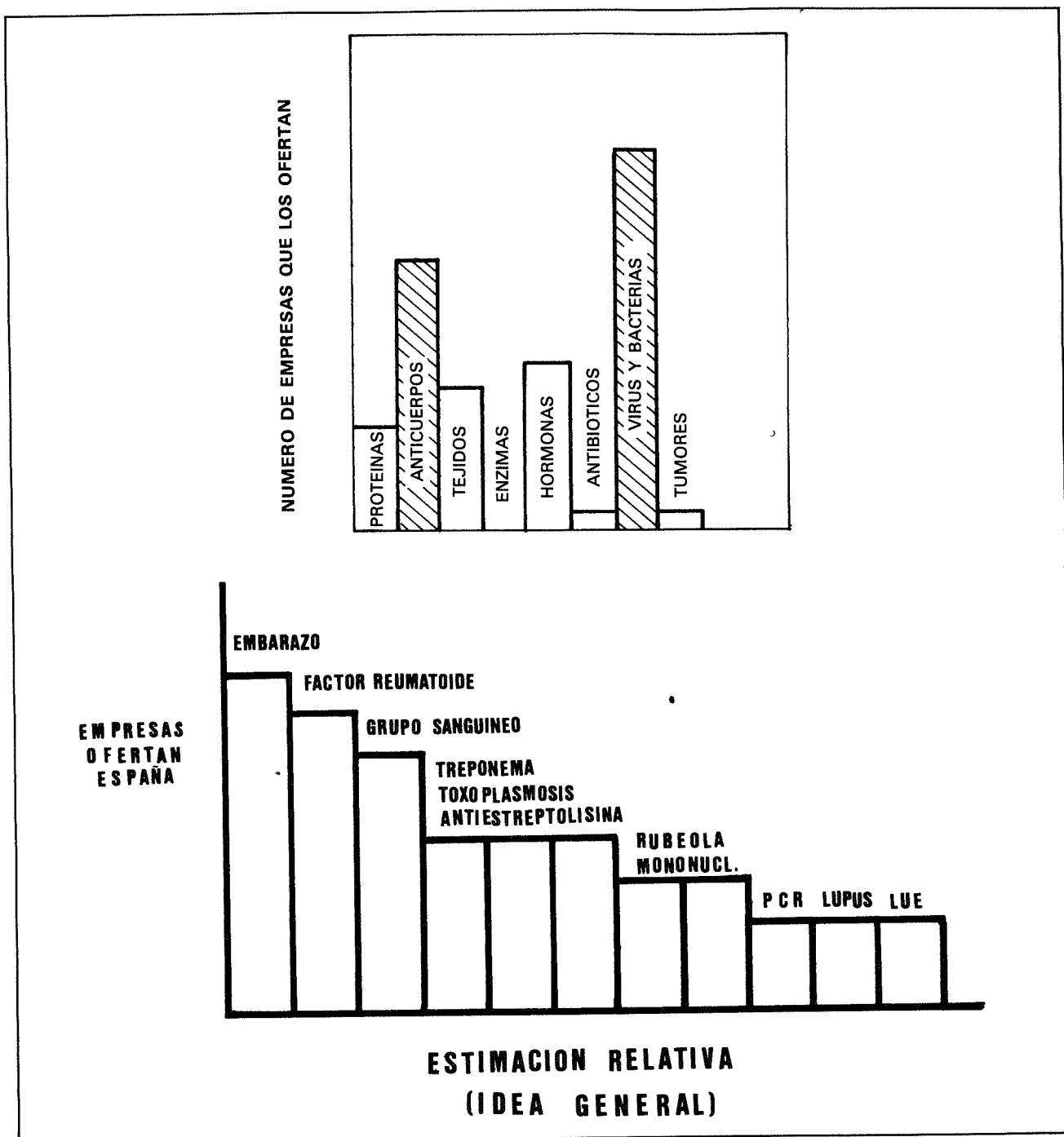


Figura 13 Estimación cualitativa del mercado español según las categorías o tipo de sustancias a diagnosticar

Esta estimación preliminar está hecha teniendo en cuenta el número de empresas que ofertan en España kits de diagnóstico utilizando anticuerpos convencionales para las categorías de sustancias indicadas.

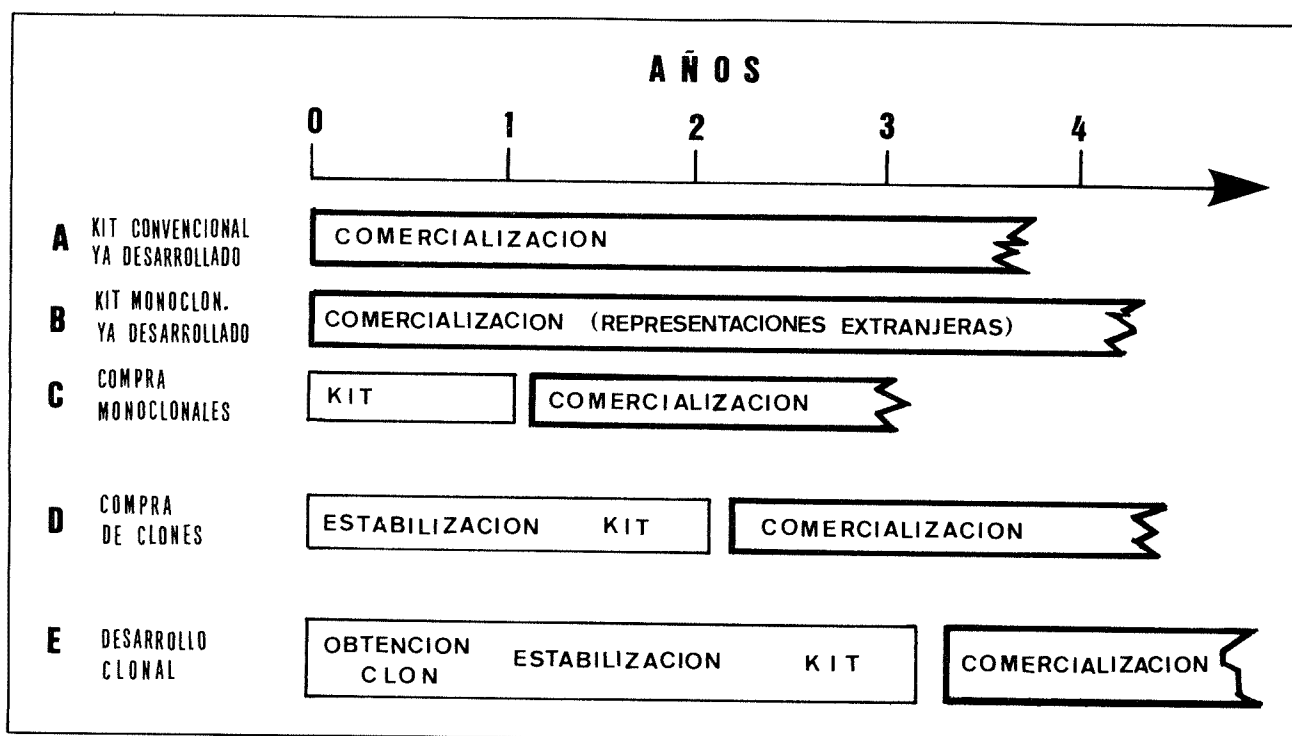


Figura 14 Principales alternativas para la producción y uso de diagnóstico basados en anticuerpos monoclonales

La alternativa A consiste en seguir usando los métodos convencionales aún cuando a medio plazo van a ser desplazados por los anticuerpos monoclonales

La alternativa B consiste en esperar a que las representaciones extranjeras desarrollen los kits y se hagan con el mercado

Las alternativas C, D y E consisten en efectuar algo (C y D) o todo (E) el desarrollo en España

ción e identificación de IgM o de IgG)

— Cromatografías, precipitación con etanol o sulfato amónico (purificación, eliminación del contaminante albúmina)

La puesta a punto del método de diagnóstico que se intente sustituir o establecer. Hay numerosas variables que intervienen en el funcionamiento correcto de cualquier método de diagnóstico. Estas variables toman distintos valores según el origen de los antisueros y con mayor motivo según el preparado con actividad inmunológica sea poli o monoclonal. Por ejemplo, se ha comprobado que muchos anticuerpos monoclonales no son capaces de precipitación o ésta es más débil (fenómeno en el que se fundamentan numerosos ensayos clínicos). La solución a este problema puede estar en la utilización de mezclas de anticuerpos monoclonales o bien en el de las variables que influyen en la puesta a punto del método de diagnóstico concreto.

Entre las variables que hay que optimizar para la puesta a punto del método de diagnóstico con

anticuerpos monoclonales están:

- Temperatura
- Concentración de sales.
- pH.
- Variables específicas del método (hemaglutinación, ELISA, inmunofluorescencia, etc.)

Por ejemplo, para optimizar un ensayo por aglutinación se puede seguir la estrategia experimental siguiente.

1. Establecimiento de un criterio objetivo y cuantificable de la reacción que identifique positivos y negativos. A menudo este criterio objetivo es diferente del criterio utilizado en el ensayo clínico que suele ser una aproximación visual directa, por lo que hay que establecer equivalencias entre los dos métodos de cuantificación del ensayo.

2. Estudio de las condiciones de mínima autoaglutinación del agente a aglutinar para evitar falsos positivos. Se trata de investigar las curvas de variación de la reacción en función de

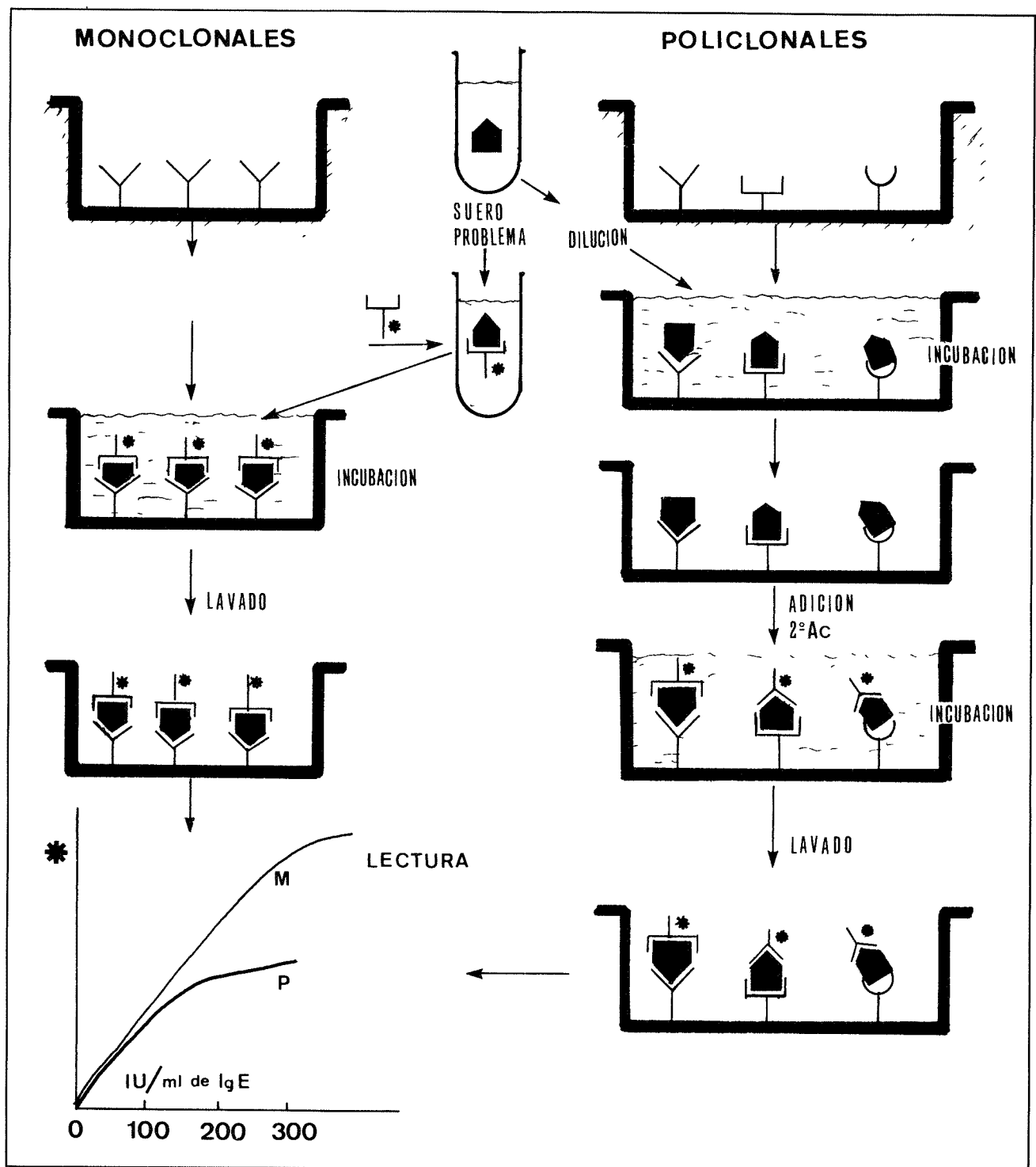


Figura 15 Comparación entre la cuantificación de IgE por el método monoclonal (M) y el método convencional (P)

IgE, * marcado El uso de 2 anticuerpos monoclonales con distinta especificidad, permite

- No es necesario diluir el suero problema
- Adición simultánea de suero problema y el segundo anticuerpo marcador
- Un solo lavado y una sola incubación
- Un mayor rango de linealidad en el ensayo

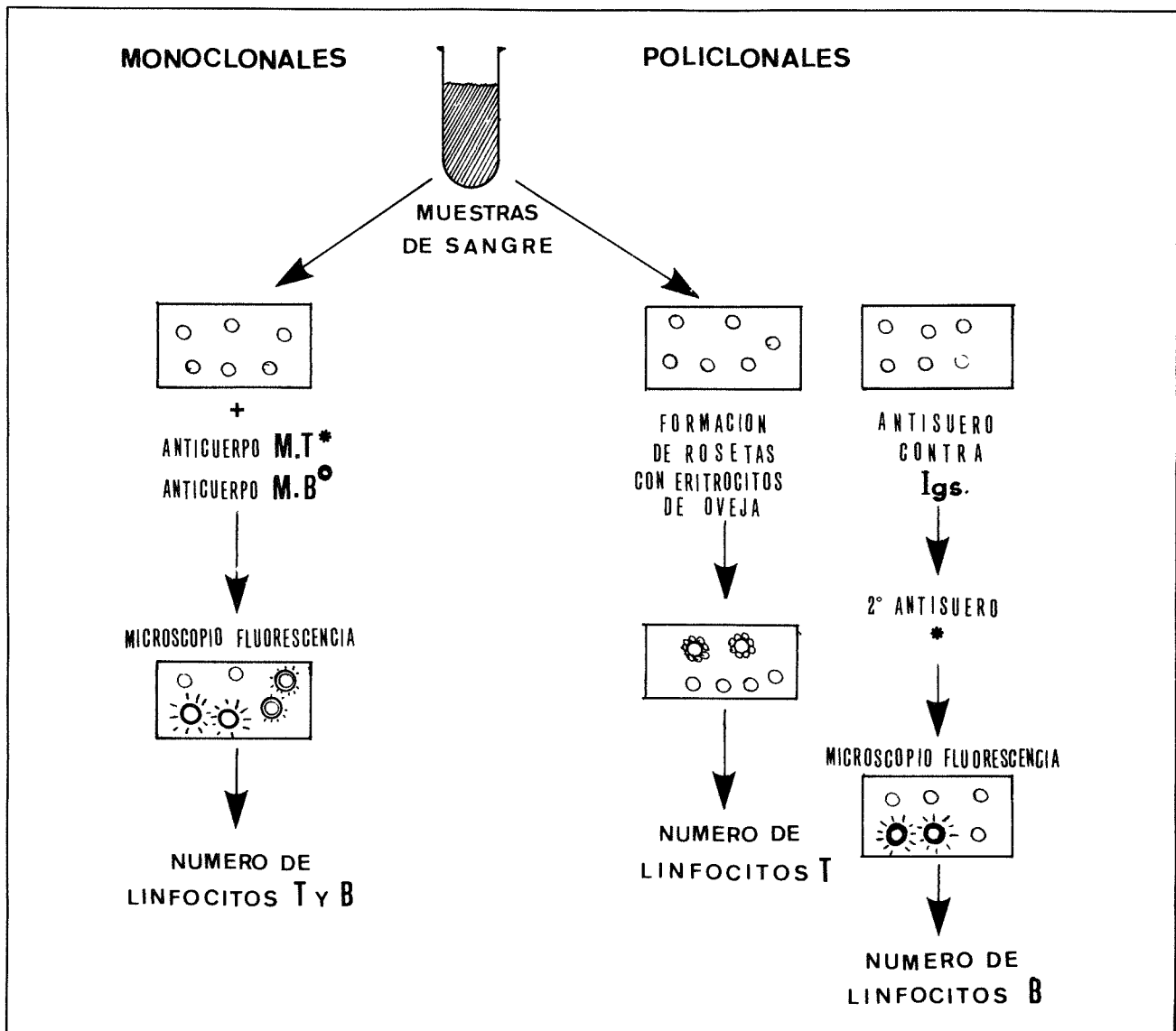


Figura 16 Comparación esquemática de la posible cuantificación de linfocitos B y T por anticuerpos monoclonales y convencionales

*, o marcajes fluorescentes con fluoresceína (amarillo-verdoso) y rodamina (rojo). La posibilidad de obtener anticuerpos monoclonales de crossreactividad nula entre células T y B hace posible la determinación cuantitativa de su número en un solo paso, con el mismo método y en la misma muestra minimizando trabajo y errores que llevan consigo los métodos tradicionales utilizando anticuerpos policlonales y la formación de rosetas.

la temperatura, concentración de sales, pH, concentración de agente a aglutinar, etc., y elegir las condiciones de trabajo con mínima autoaglutinación. Los agentes a aglutinar que más se utilizan son los eritrocitos, el latex, bacterias, etc. Se trata de eliminar la aglutinación inespecífica.

3. Condiciones de mínima autoaglutinación del agente a aglutinar sensibilizado. Se trata de investigar las variaciones mencionadas en el punto 2, pero con el agente sensibilizado, es

decir una vez unido al anticuerpo o antígeno que se va a utilizar para la reacción. Se trata de minimizar la sensibilización inespecífica.

4. Condiciones de ensayo en las que existen una máxima diferencia entre negativos y positivos. Se trata de investigar la influencia de la adición de sueros negativos o positivos en la reacción. Para la interpretación de esta reacción que en definitiva es la que interesa, se utilizan los resultados de los puntos 2 y 3, pudiéndose

definir de esta forma las condiciones óptimas para la realización del ensayo

En la Tabla 6, se esquematizan los tipos de diagnósticos en los que los anticuerpos monoclonales ofrecen ventajas técnicas, datos que son conclusión de las Jornadas Técnicas: Anticuerpos Monoclonales en diagnóstico clínico (Coll, 1982). Las ventajas técnicas que ofrece el uso de anticuerpos monoclonales en diagnóstico pueden ser de distintos tipos según afecten al antígeno o al diagnóstico. Además hay que tener en cuenta la necesidad o mercado, criterio que puede ser definitivo desde un punto de vista comercial (Figura 13).

No todos los antígenos son igualmente ventajosos para su diagnosis utilizando las ventajas de los anticuerpos monoclonales. Así en principio ofrecen ventajas aquellos antígenos de difícil purificación (proteínas antígenos de superficie, enzimas, hormonas y antígenos tumorales), de manipulación peligrosa debido a su carácter infeccioso (virus, bacterias y parásitos) de baja inmunogenicidad debido a su similitud estructural a lo largo de la evolución (hormonas), de alta inmunogenicidad interespecífica debido a la cantidad de antígenos que reconocen unas especies en otras (antígenos de superficie en tipificación de tejidos y tumores), de productos de catabolismo, debido a pequeñas diferencias estructurales (isoenzimas, hemoglobinas), etc.

En cuanto al diagnóstico per se, la utilización de los anticuerpos moleculares gracias a su reproducibilidad, garantía de suministro, homogeneidad, especificidad y sensibilidad ofrecen ventajas generales para, en general, todo tipo de diagnóstico. Sin embargo, los diagnósticos que se ven más favorecidos por estas propiedades son aquellos en los que hay que cuantificar, es decir: RIA, IRMA y EIA o ELISA.

La evaluación de estos criterios variará con el antígeno-anticuerpo concreto. Mientras que la reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales es una ventaja frente a los anticuerpos policlonales, quizá su principal desventaja esté en lo elevado de la inversión inicial (inversión económica, de tiempo y de personal).

En cuanto al mercado es el punto más importante desde el punto de vista comercial. La figura 13 muestra una estimación preliminar cualitativa del mercado español basado en el número de empresas que ofertan los diagnósticos convencionales. Una estimación de las necesidades en este campo puede obtenerse a partir de las estadísticas de enfermedades. Según estas estimaciones nos muestran que en general los diagnósticos contra virus, bacterias, parásitos y

anticuerpos son los que más se ofertan. En concreto, las pruebas de embarazo, factor reumatoide y grupos sanguíneos entre otros, aparecen como los diagnósticos simples más utilizados.

El desarrollo actual de la técnica ha permitido la comercialización de unos 50 anticuerpos monoclonales. Algunos de los más importantes están señalados en la Tabla 7. Aunque el número de anticuerpos monoclonales disponibles actualmente es relativamente pequeño, este número representa un gran avance en tan corto tiempo y es predecible que dada la gran cantidad de laboratorios y casas comerciales que están trabajando en la estabilización de clones y en los pasos finales de la incorporación a kits de diagnóstico, el mercado se vea inundado de estos productos en los próximos años y que los anticuerpos policlonales queden prácticamente olvidados.

La Figura 14 presenta el esquema de las principales alternativas comerciales para la producción y uso de los diagnósticos basados en anticuerpos monoclonales, así como una estimación de los tiempos necesarios para llegar a la comercialización del producto.

4. Ejemplos de diagnósticos basados en anticuerpos monoclonales

Dos ejemplos concretos en los que se pueden apreciar las ventajas concretas que ofrece el uso de anticuerpos monoclonales son las de cuantificación de IgE, importante indicador de alergias y la cuantificación de linfocitos B y T importante en algunos diagnósticos de leucemias.

La inmunoglobulina humana IgE está presente en cantidades muy pequeñas en el suero (Figura 15) y además posee características estructurales comunes con el resto de las inmunoglobulinas humanas presentes en mucha mayor cantidad en el suero. Ambos factores hacen que la medida de su cantidad en pacientes alérgicos sea difícil. Hasta ahora, las limitaciones tecnológicas de los anticuerpos policlonales han hecho necesario el uso de métodos de purificación de anti IgE desde los correspondientes antisueros, métodos que son caros, complejos e imperfectos. Además de este procesamiento, los activos convencionales requieren un test diseñado no sólo para medir IgE sino también para compensar las deficiencias inherentes a la fuente del anticuerpo. Por lo tanto, los tests incluyen dilución de las muestras, adiciones secuenciales de anticuerpo en fase sólida —muestra— anticuerpo marcado, varios lavados y varios pasos de incubación. Los anticuerpos monoclonales al contrario, desde el

procedimiento de obtención se ajustan a las características del test deseado, tales como especificidad, afinidad, actividad-pH, características de marcado, etc. Además los anticuerpos monoclonales son reactivos de gran pureza y homogeneidad. Esta ventaja asegura una reproducibilidad intra e inter ensayo. Utilizando dos anticuerpos monoclonales contra dos determinantes antigénicos distintos de la IgE se ha conseguido un ensayo ya comercial que permite (Figura 15):

- Uso de muestras sin diluir, lo que disminuye el trabajo y posibles errores durante el ensayo
- Adición simultánea de la muestra y el segundo anticuerpo marcado.
- Eliminación de un lavado y una incubación minimizando trabajo y errores
- Un mayor rango de linealidad en el ensayo.
- Kit con menos reactivos y sin necesidad de reconstruir los reactivos.
- Reactivos estables a 2-8°C

Todas estas características comparan favorablemente con los kits comerciales disponibles actualmente basados en anticuerpos convencionales

La identificación y enumeración de linfocitos T y B se usa para diagnosticar leucemias linfocíticas, linfomas y en enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias. El método clásico de identificar linfocitos T es la técnica de rosetas utilizando eritrocitos de oveja (Figura 16). Esta técnica es conceptualmente sencilla, pero en la práctica es muy sensible a pequeñas variaciones en el ensayo y sobre todo a la fuente y estabilidad de los eritrocitos de oveja. La identificación de linfocitos B se ha hecho generalmente por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales cuya especificidad se ha logrado por absorciones, con las limitaciones que supone este método. La llegada de la tecnología de los anticuerpos monoclonales ha permitido la identificación y enumeración de los linfocitos T y B dada su especificidad. Aunque todavía no totalmente desarrollado es de esperar que pronto sea comercial un kit de inmunofluorescencia que permita el estudio de los linfocitos T y B simultáneamente y en la misma preparación haciendo uso de marcajes fluorescentes distintos (fluoresceína amarillo-verdoso y rodamina: rojo). Este método permitirá una mayor rapidez y seguridad en estos diagnósticos (Figura 16).

6. Conclusiones

La producción de anticuerpos por nuevos

métodos (tecnología de hibridomas y anticuerpos monoclonales) es la técnica, de toda la nueva biotecnología, cuya aplicación se contempla a más corto plazo. Actualmente es la única que ya tiene productos comerciales en el mercado. Estos productos se utilizan ya en diagnóstico en hospitales y veterinaria sustituyendo a los anticuerpos convencionales que se venían usando para estos diagnósticos. Además se están utilizando para purificación de proteínas y es posible que en un futuro próximo revolucionen el tratamiento del cáncer.

La técnica de producción de anticuerpos monoclonales está desbancando los métodos de obtención de anticuerpos para uso diagnóstico. Prácticamente la totalidad de las casas comerciales que fabrican kits de diagnóstico para hospitales están adquiriendo estas tecnologías.

Puesto que estos productos aumentan la fiabilidad de los reactivos de diagnóstico clásico es de esperar que ayuden algo más a los medios encargados de tratar al enfermo.

Por otra parte, el reciente desarrollo de estas tecnologías hace que todavía sea posible para la actual capacidad tecnológica española el, no perder definitivamente este tren.

7. Agradecimientos

Se agradece a Regina Olaizola haber pasado a máquina el manuscrito final y a Julio Coll Pérez la confección de los dibujos. Asimismo, hemos de mencionar aquí al Instituto Tecnológico para Postgraduados que nos ha dado la infraestructura necesaria y a las Cajas de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid que han facilitado la dedicación de postgraduados a ésta tarea. Fernando Díaz Espada del Hospital Puerta de Hierro de Madrid y Luis Enjuanes del Centro de Biología Molecular de la UAM han supervisado el manuscrito final. A todos ellos nuestro agradecimiento.

Bibliografía

- ALONSO, C B, COLL J M y HERRANZ E L «La ingeniería genética en la biotecnología» Cuadernos CDTI Centro para el desarrollo Tecnológico Industrial Ministerio de Industria y Energía en colaboración con la Universidad Autónoma de Madrid e Instituto Tecnológico para Postgraduados Septiembre 1981 79 pag
- COLL J «Anticuerpos Monoclonales» Selección bibliográfica de revisiones *Biotechnology new thrust in antibodies* Anticuerpos Monoclonales Monoclonal antibodies Los híbridos y sus aplicaciones *The technique of hybridoma production Review whither monoclonal antibodies? Monoclonal Antibodies A powerful new tool in biology and medicine Review article Some properties and applications of monoclonal antibodies Immunoglobulin producing hybrid cell lines Anexo experimental* Septiembre 1981 152 pag
- COLL, J y V M INGRAM «Identification of ovotransferrin as heme colony and burst stimulating factor in chick erythroid cell cultures» *Exp Cell Research* 131 (1981), 173-184
- COLL, J «Factors stimulating chick erythroid cell proliferation and differentiation in vitro» Thesis Massachusetts Institute of Technology, 1978 155 pag
- COLL, J «Anticuerpos Monoclonales en diagnóstico clínico» Jornadas Técnicas organizadas por el Instituto Tecnológico para Postgraduados, Madrid España 15 16 y 17 de Diciembre de 1981 Compilación de las Conferencias grabadas F D España L Enjuanes y J Coll (en preparación)
- EISEN, H N «Immunology» An Introduction to molecular and celular principles of the immune responses in Davis, Dubblecco, Eisen Ginsberg and Wood's *Immunology* Harper & Row Hagerstown (1974)
- ESPADA, D y S MARTIN «Lista de Anticuerpos Monoclonales disponibles actualmente» Diciembre 1981
- FOX, P C, BERSTEIN, E H & SIRUGANIAU, R P, 1981 «Enhancement of frequency of antigen-specific hybridomas» *Eur J Immunol* 11 431 434
- FORM, L CONTINHO A KOHLER, G & JERNE N K 1980 «IgM antibodies induce the production of antibodies of the same specificity» *Proc Natl Acad Sci USA* 77 1125
- GALPHE, G HOWE, S C MILSTEIN, C BUTCHA, G W HOWARD, J C 1977 «Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines» *Nature*, 266 550
- GERHARD, W, GROCE, C M, LOPES, D & KOPROWSKY, H 1978 «Repertoire of antibodies expressed by somatic cell hybrids» *Proc Natl Acad Sci USA* 75 1510
- HOZUMI, M, SUGIYAMA, K et al «Factor(s) stimulating differentiation of mouse myeloid leukemia cells found in ascitic fluid» in *Differentiation and control of malignancy of tumor cells* Ed by Nakahara et al University Park Press, 1973
- KOHLER, G & MILSTEIN, C 1976 «Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion» *Eur J Immunol* 6 511
- KOHLER, G & MILSTEIN, C 1975 «Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity» *Nature* 256 495
- KWAN, S P, YELTON, D E & SCHARFF, M D «Production of monoclonal antibodies in Genetic Engineering Principles and methods» Vol 2 Ed J K Setlow y A Hollaender (1980) p 31 42 Plenum Press, N Y
- LITTLEFIELD, J W 1964 «Selection of hybrids from mating of fibroblast in vitro and their presumed recombinations» *Science* 145 709
- MARTIN S y J COLL «Diagnósticos convencionales de posible sustitución por anticuerpos monoclonales» Septiembre 1981, 105 pag
- OL UT & HERZENBERG, L A «Immunoglobulin producing hybrid cells lines in selected Methods in Cellular Immunology» Ed B B Mithell y S M Shigi (1980) p 351 372 W H Freeman and Co San Francisco
- OLSSON L & KAPLAN, H S 1980 «Human human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined specificity» *Proc Natl Acad Sci USA* 77 5429-31
- ORTHOCLONE «Monoclonal Antibodies» Product Monograph
- PUTNAM, F W «The Plasma Proteins Structure Function and Genetic Control» Vol 1 Academic Press N Y 1975 Pag 26 y 27
- STAINES, N A & LEW A M 1980 Whither monoclonal antibodies? *Immunology* 40 287
- YELTON D E & SCHARFF M D 1980 «Monoclonal Antibodies» *American Scientist* 68 510

* * *