

Clonaje de RNA mensajero de linfocitos B. ¿ Una nueva tecnología para obtener anticuerpos monoclonales?

Estepa, A., De Diego, M., Coll, J.M.

CIT-INIA

Departamento de Sanidad Animal

Embajadores 68, 28012 Madrid

La obtención de anticuerpos monoclonales estaba restringida a aquellas especies en las que se han encontrado mielomas (ratón y rata), pero recientemente se está poniendo a punto un nuevo método para la obtención de reactivos monoclonales de cualquier especie animal. Este método se basa en el aislamiento de los RNA mensajeros de una población de linfocitos originados en un animal hiperinmunizado y su clonaje en bacterias por métodos de ingeniería genética. Para el clonaje se usan fagos, lo que permite manejar RNA de alto peso molecular. Se pueden clonar las regiones variables de las dos cadenas de inmunoglobulinas (pesada y ligera) por separado y después combinar la información en un mismo vector para que la molécula de anticuerpo completa se autoensamble en la bacteria. Este nuevo método, aunque todavía muy inexplorado, es más sencillo que el tradicional ya que se manejan bacterias y no células, permite la generación de miles de regiones variables de anticuerpos en vez de cientos y aumentará la pureza de la producción a gran escala.

Obtención de anticuerpos monoclonales por fusión de células

Los anticuerpos monoclonales se producen por cultivo *in vitro* de una célula híbrida, originada mediante la fusión *in vitro* de los linfocitos productores de anticuerpos y células de mieloma. Esta célula híbrida llamada hibridoma, origina al crecer una población de células idénticas, llamadas clon, que produce un único tipo de anticuerpo, por lo que este anticuerpo se denomina monoclonal. Cada anticuerpo tiene regiones variables (Fab) y regiones comunes o constantes (Fc).

Los anticuerpos monoclonales se utilizan ya en diagnósticos en hospitales y en medicina veterinaria, sustituyendo a los anticuerpos policlonales o antiseros, que se venían utilizando tradicionalmente en diagnóstico clínico. Así mismo, se están aplicando en otras áreas, debido principalmente a que son más reproducibles que los anticuerpos policlonales

producidos por el método convencional, que depende de la variabilidad del animal, son más específicos y de mayor pureza que las mezclas de anticuerpos que se producen según los métodos convencionales, y no es necesario obtener o purificar el antígeno cada vez que se quiere preparar un anticuerpo monoclonal, al contrario que en los métodos convencionales. El hibridoma puede conservarse por congelación.

Aunque bien experimentado y refinado durante los últimos 15 años, el método de obtención de anticuerpos monoclonales sigue constituyendo una inversión importante de esfuerzo debido principalmente a que el manejo de células, en especial su clonaje, es trabajoso y lleva bastante tiempo. Además, no se vislumbra la posibilidad tecnológica de un escalado sencillo basándose el actual en la producción de ascites en ratón, método que además no contribuye a mantener la pureza tan costosamente obtenida.

Los métodos actuales para la generación de anticuerpos con espe-

cificidad monoclonal son capaces de producir unos pocos cientos de anticuerpos contra un relativamente pequeño determinante, tal como el dinitrofenol; mientras que se estima en unos 10^4 los diferentes clones de linfocitos B existentes con esa especificidad en el animal hiperinmunizado.

Teóricamente se podría clonar y expresar cualquier anticuerpo a partir del RNA mensajero de un bazo de un animal hiperinmunizado si no fuera por el hecho de que los anticuerpos están formados por dos cadenas codificadas en genes separados, siendo este el principal obstáculo para esta tecnología.

Actualmente se está desarrollando un método para construir librerías genómicas humanas, de ratón, o de cualquier especie conteniendo las regiones variables de los anticuerpos mediante el uso de vectores de fago. Cada placa de la librería puede expresar las cadenas pesadas o ligeras de los fragmentos Fab. Cuando se coexpresan en una única bacteria, la cadena pesada y la ligera forman

fragmentos Fab completos que pueden seleccionarse de los clones por su capacidad de reconocimiento de los antígenos adecuados.

Obtención de anticuerpos monoclonales por DNA recombinante

Inicialmente los esfuerzos se han dedicado a clonar y expresar las regiones variables de los anticuerpos. Para ello se han generado fragmentos de DNA con sitios de restricción incorporados a cada extremo para que los fragmentos puedan ser luego insertados en un vector de expresión en *E. coli* con su correcta orientación de lectura y posición de tripletas. El clonaje de los fragmentos de DNA de la región variable a partir del RNA de hibridomas a través de las polimerasas termoestables de DNA (PCR) introduciendo sitios de restricción se había ya efectuado cuando se abordó la misma tecnología a partir del RNA mensajero de células de bazo. La diversidad de estos RNA mensajeros planteó numerosos problemas para el diseño de los *primers* específicos, aunque finalmente se pudieron resolver utilizando mezclas de *primers* correspondientes a las regiones constantes que flanquean las regiones variables de varias clases de inmunoglobulinas cuyas secuencias se conocen para el ratón y el hombre.

Las ventajas del clonaje en *E. coli* comparado con el clonaje en mielomas pueden resumirse así:

- Gran conocimiento de su genética y existencia de multitud de cepas distintas.
- Crecimiento rápido, sencillo, económico y escalable por fermentación. Eliminación del uso de ratones para el escalado.
- Existencia de operones fácilmente inducibles.
- Capaz de secretar proteínas al medio de cultivo, facilitando su recuperación.
- Capacidad de expresar y ensamblar las proteínas eucarióticas inclu-

yendo la formación de puentes disulfuro.

- Eliminación de los cultivos celulares siempre laboriosos y problemáticos.

El fago lambda se eligió como vector debido a que el empaquetado *in vitro* del DNA es el medio más eficiente para luego reintroducir DNA en las bacterias, es posible detectar la expresión de proteínas en las placas producidas por el fago y la selección tiene menos dificultades con fondos no específicos. Otros vectores alternativos, tales como los plásmidos, tienen la ventaja de una mayor facilidad de análisis de los clones una vez identificados. Esta ventaja no se pierde debido al uso de un vector especial (lambda ZapII) que es capaz de escindir un plásmido interno después de la infección con fagos rescatadores.

Para producir librerías de expresión de anticuerpos en fagos se dan los siguientes pasos (Fig. 1):

1. Aislamiento del RNA mensajero de linfocitos de bazo o ganglios de animales hiperinmunizados con el antígeno de interés.

2. Amplificación de los segmentos variables con PCR y transformación del RNA en cDNA con transcriptasa reversa y en DNA de doble banda con DNA polimerasa.

3. Clonaje en fago de los segmentos variables de las cadenas pesada y ligera por separado.

4. Construcción de DNA llevado cadenas pesada y ligera.

5. Infección de *E. coli* con fagos llevando cadenas pesada y ligera y aislamiento de fagos expresando ambas cadenas.

Detalles de la construcción de los vectores

Los vectores se construyeron para clonar eficientemente los productos de la amplificación PCR de las regiones variables con sitios de restricción incorporados a cada uno de los extremos. Las secuencias usadas para construir los vectores incluyen elementos para la construcción, expresión y secreción de los fragmentos Fab clonados (Fig. 2). Estos oligonucleótidos introducen sitios asimétri-

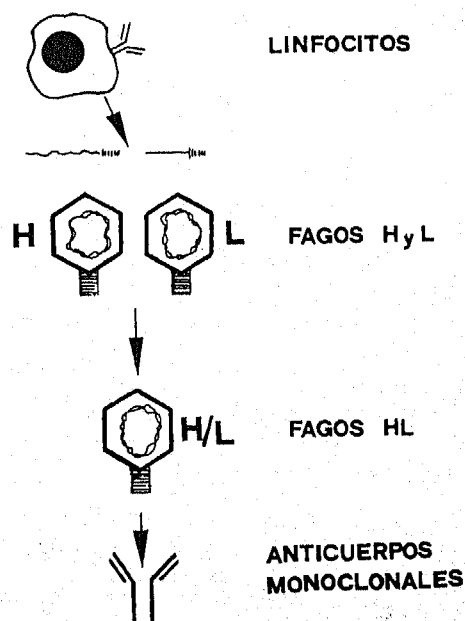


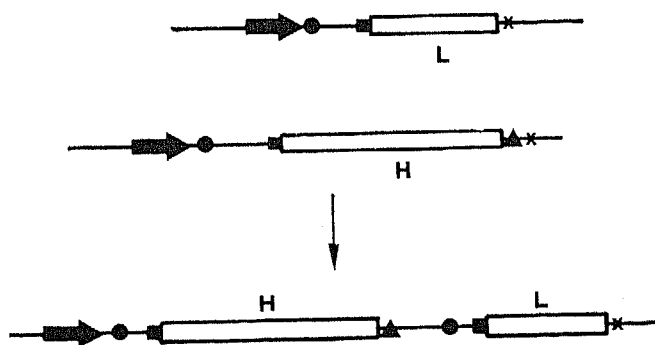
Fig. 1 Esquema de la obtención de anticuerpos monoclonales por clonaje de los RNA mensajeros procedentes de linfocitos hiperinmunizados utilizando fagos como vectores

cos de restricción para facilitar la incorporación en la orientación de lectura correcta, un péptido con la información necesaria para que *E. coli* secrete la proteína clonada, un sitio de ligamiento del ribosoma colocado a la distancia óptima para la expresión del gen clonado, sitios de restricción para introducir los productos de amplificación del PCR y además se puede incorporar un fragmento marcador (deca péptido) para el cual existan anticuerpos monoclonales que faciliten la purificación de la proteína de fusión por columnas de inmutafinidad.

La librería se construye en dos pasos. En el primer paso se construyen librerías independientes para la cadena pesada y ligera, respectivamente. En el segundo paso, las dos librerías se combinan al azar utilizando sitios de restricción antisimétricos situados en cada vector. La librería resultante coexpresa una cadena pesada y otra ligera con combinaciones al azar no necesariamente reflejando las combinaciones existentes en el repertorio de linfocitos B. El tamaño de las librerías de cadenas pesadas fue de unos 10^6 clones, de los que el 80% expresaban el deca péptido utilizado como marcador. La librería de cadenas ligeras contenía unos 2×10^6 clones de los que el 60% expresaban cadenas ligeras. La librería obtenida a partir de DNA conteniendo cadenas H y L (solo los fagos que reciben las dos cadenas son viables) contenía unos 3×10^7 clones. Del examen de 500 de estos últimos fagos recombinantes aproximadamente el 60% coexpresaron H y L.

Para ver si las librerías contenían fagos expresando fragmentos con capacidad ligadora del antígeno, se seleccionaron 90.000 clones de H ó de L y se confirmó que no eran capaces de ligar antígeno, mientras que de 10^6 clones con H + L, 100 clones específicamente ligaban antígeno con constantes de afinidad en el rango nM. Para caracterizar los productos proteicos se utiliza un fago rescatador que escinde los genes conteniendo H

Fig.2 Vectores de expresión de cadenas ligeras (L) y pesadas (H) y su combinación (H, L). (→, promotor Lac Z; ●, secuencia de ligamiento del ribosoma; ▲, secuencia marcadora; X, codón de terminación; ■, secuencia del péptido secretor)



+ L. El producto obtenido tenía un peso molecular de 50 KDa (2 bandas de 25 KDa) y era reconocido en ELISA e inmunoblotting como Fab.

El tamaño de la librería depende del limitado número de *primers* que se utilizan para la PCR; lo que no es una limitación del método ya que la utilización de un mayor número de *primers* puede amplificar las regiones variables de los anticuerpos de cualquier clase o subclase.

Es posible aumentar estos rendimientos si se usa el método una segunda vez, es decir, recombinar el DNA de un clon que ligue antígeno con las librerías H ó L.

Los métodos de selección actuales, tal y como se encuentra esta tecnología, son ya bastante poderosos, permitiendo la selección de productos génicos de unos 50.000 clones por placa, por lo que 10^6 - 10^7 anticuerpos pueden ser examinados en un día. Sin embargo, métodos aún más poderosos podrían llegar a desarrollarse por medio de selecciones positivas. Por ejemplo, incorporando en el antígeno grupos necesarios para la replicación de cepas auxotróficas o utilizando sustancias tóxicas susceptibles de inactivación por los clones recombinantes.

Conclusiones

Hasta ahora solo se han puesto a punto métodos para obtener las regiones variables en forma de Fab monoclonales. Mientras que para algunas aplicaciones estos Fab pueden ser suficientes e incluso mejores que el anticuerpo completo (biosensores, diagnóstico, etc.) para otros se necesitará la parte Fc. La tecnología para extender la zona variable de la cadena H y expresar su glicosilación en células ya existe, aunque está todavía en desarrollo. Los datos hasta ahora publicados invitan incluso a especular que en un futuro, quizá no tan lejano, los anticuerpos puedan diseñarse y fabricarse sin el uso de animales vivos, a través de los métodos de síntesis de oligonucleótidos y de la ingeniería genética. ¿Sustituirá esta tecnología a los hibridomas? Es muy probable, pero solo el tiempo lo dirá. ■

- Huse, WD et al. 1989. Science, 246: 1275-1281.

- Sastry, L et al. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 5728-5732.

- Sobrino et al. 1989. Biotecnología, 5: 8-10.