

TD-560



9424

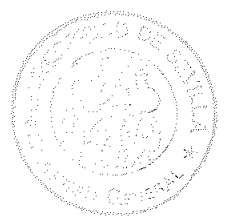
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 216 número 69 del libro
correspondiente.

Sevilla, 3 - OCT. 1990

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alvaro de J. de



PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS Y SU APLICACION EN EL ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL SISTEMA HLA.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en

de la

de esta Universidad desde el día

hasta el día

Sevilla

de

de 19

EL DIRECTOR DE

Tesis presentada por Berta Sánchez Sánchez para optar al grado
de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla.



Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

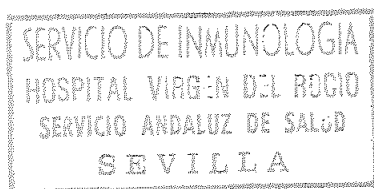
Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

D. ANTONIO NUÑEZ ROLDAN, JEFE DEL SERVICIO DE INMUNOLOGIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCIO DE SEVILLA, Y PROFESOR ASOCIADO DE INMUNOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe el Departamento Interfacultativo de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla Doña BERTA SANCHEZ SANCHEZ, sobre el tema: "PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS Y SU APLICACION EN EL ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL SISTEMA HLA", ha sido realizada bajo mi dirección durante los cursos 1987-88, 1988-89 y 1989-90, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedora al grado de Doctora en Biología, siempre que así lo considere el citado Tribunal.



Antonio Roldán

Dr. D. Antonio Núñez Roldán.

Sevilla, 10 de septiembre de 1990.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Antonio Núñez Roldán, que me ofreció la oportunidad de realizar esta Tesis, por su ayuda, constante estímulo y excelente disposición durante los años que duró la realización de este trabajo.

A la Dra. Vitalia Dessi de la Cátedra de Inmunología de la Universidad de Génova, por su valiosa ayuda, cuyas orientaciones han sido decisivas en la elaboración de este estudio.

A Marisa Garzón y Rosario Magariño por su inestimable colaboración técnica, interés constante y dedicación a nuestro trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Inmunología que con su amable actitud y permanente colaboración me hicieron agradable este trabajo.

Agradecer al Prof. Dr. José María Vega Piqueres, Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, su actuación como tutor de la presente Tesis.

Finalmente, mi agradecimiento al Dr. Robert J.

Winchester del Laboratorio de Inmunogenética del Hospital for Joint Diseases de Nueva York, por facilitarme mi introducción en las técnicas de cultivos celulares y análisis bioquímico del sistema HLA.

A mi familia.

INDICE.

	<u>Pág.</u>
ABREVIATURAS	12
I.- INTRODUCCION	14
1.- El Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano ...	15
1.1.- Estructura de las moléculas HLA de clase I .	17
1.2.- Organización genómica y polimorfismo de la región HLA de clase I	19
1.3.- Estructura de las moléculas HLA de clase II	22
1.4.- Organización genómica de la región HLA de clase II	25
1.4.1.- Polimorfismo DR	27
1.4.2.- Polimorfismo DQ	29
1.4.3.- Polimorfismo DP	31
1.5.- Mecanismos de generación de polimorfismo ...	33
1.6.- Función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad	35
2.- Desarrollo de la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales	39
2.1.- Los anticuerpos monoclonales murinos en el estudio del polimorfismo del sistema HLA	41
2.2.- Interés de la producción de anticuerpos monoclonales humanos anti-HLA	43
2.3.- Dificultades y problemas técnicos que conlleva la producción de anticuerpos monoclonales humanos.....	44
II.- OBJETIVOS	48

	<u>Pág.</u>
III.- MATERIAL Y METODOS	50
1.- Material	51
2.- Técnicas generales de cultivo de células	53
2.1.- Aislamiento de linfocitos de sangre periférica	53
2.2.- Criopreservación de células	54
2.3.- Obtención de líneas celulares B	56
2.4.- Cultivo de líneas celulares	59
2.4.1.- Cultivo de líneas B linfoblastoides .	59
2.4.2.- Cultivo de heteromielomas y heterohibridomas	61
3.- Obtención de líneas celulares B secretoras de anticuerpos antilinfocitarios.....	63
4.- Generación de heterohibridomas	67
4.1.- Preparación del polietilenglicol	67
4.2.- Fusión celular	68
4.3.- Selección de las células híbridas	70
4.4.- Clonaje de los heterohibridomas	71
5.- Estudio y caracterización de los anticuerpos de los sobrenadantes de los cultivos	75
5.1.- Determinación de actividad antilinfocitaria en los sobrenadantes	75
5.2.- Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales humanos	78
5.3.- Cuantificación de las inmunoglobulinas	

	<u>Pág.</u>
secretadas por los heterohíbridos	80
5.4.- Estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos	82
5.5.- Microcitotoxicidad en placa de Terasaki	85
5.6.- Técnica de MAILA	87
5.7.- Absorción de anticuerpos	90
5.8.- Titulación de los anticuerpos y cálculo del coeficiente de correlación	91
6.- Construcción de paneles celulares para el estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos. Determinación de antígenos HLA	94
6.1.- Método de microlinfocitotoxicidad estándar (NIH)	94
6.2.- Método inmunomagnético	97
6.3.- Tipaje HLA de líneas celulares B	99
6.4.- Determinación de especificidades HLA por inmunofluorescencia indirecta	101
IV.- RESULTADOS	103
1.- Producción de los anticuerpos monoclonales humanos	104
1.1.- Obtención de líneas B linfoblastoides para la fusión	104
1.2.- Producción de heterohíbridomas y clonaje ...	109
2.- Caracterización de los anticuerpos monoclonales humanos. Determinación del isotipo	113
3.- Especificidad de los anticuerpos monoclonales	

	<u>Pág.</u>
humanos	115
3.1.- Reactividad sobre un panel de células portadoras de distintas especificidades HLA	115
3.2.- Reactividad sobre un panel de líneas B linfoblastoides pertenecientes al X Taller Internacional de Histocompatibilidad	118
3.3.- Estudios de citotoxicidad	120
3.4.- Determinación del tipo de molécula HLA reconocida	122
3.5.- Estudios familiares de segregación de las moléculas reconocidas	129
3.7.- Titulación de los anticuerpos y cálculo del coeficiente de correlación	136
4.- Estudio de las extrarreacciones del anticuerpo monoclonal humano 2A2	139
4.1.- Absorción del anticuerpo 2A2	145
5.- Estudio de las reacciones negativas del anticuerpo monoclonal humano 91C2 sobre células A2 y A28	147
V.- DISCUSION	152
VI.- CONCLUSIONES	176
VII.- REFERENCIAS	179

ABREVIATURAS.

ABTS.	Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzimidazolina-6-sulfónico) diamonio.
AI.	Indio Americano.
BCL.	Línea celular B.
BMS.	Suplemento de medio basal.
BSA.	Seroalbúmina Bovina.
C.	Caucásico.
CELISA.	ELISA en células.
CSA.	Ciclosporina A.
DEA.	Dietanolamina.
DMSO.	Dimetilsulfóxido.
DO.	Densidad óptica.
EDTA.	Acido etilendiaminotetraacético.
EIA.	Enzimoimmunoensayo.
ELISA.	Ensayo de inmuoadsorción ligado a enzima.
FCS.	Suero fetal bovino.
HGPRT.	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa.
HLA.	Antígenos leucocitarios humanos.
HRP.	Peroxidasa de rábano.
IEF.	Isoelectroenfoque.
IFI.	Inmunofluorescencia indirecta.
Ig.	Inmunoglobulina.
% I.	Porcentaje de inclusión.

ICL. Línea celular linfoblastoide.
 LLC-B. Leucemia linfoide crónica de células B.
 M. Mongoloide.
 MAILA. Inmovilización específica con anticuerpos monoclonales
 de antígenos linfocitarios.
 MHC. Complejo mayor de histocompatibilidad.
 MLR. Reacción de linfocitos mezclados.
 N. Negroide.
 NP-40. Nonidet P-40.
 NT. No testado.
 OUA. Ouabaína.
 PBL. Linfocito de sangre periférica.
 PBMC. Células mononucleares de sangre periférica.
 PBS. Tampón fosfato salino.
 PEG. Polietilenglicol.
 PFA. Paraformaldehído.
 PLT. Tipaje con linfocitos sensibilizados.
 PNPP. Para-nitro-fenil-fosfato.
 r. Coeficiente de correlación.
 RFLP. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.
 SD. Desviación estándar.
 TBS. Tampón Tris salino.
 6-TG. 6-Tioguanina.
 TTBS. TBS-Tween 20.

I.- INTRODUCCION.

1.- EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO.

El complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC), también denominado sistema HLA, consiste en una serie de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6, que codifican moléculas proteicas responsables del reconocimiento entre células. El sistema HLA contiene tres grupos de genes, los que codifican los denominados antígenos de clase I, de clase II, y de clase III. Las moléculas HLA de clase I se expresan en la inmensa mayoría de las células del organismo; son los antígenos HLA-A, -B, y -C. La característica fundamental de los antígenos de clase I es su elevado grado de polimorfismo; se han definido 24 especificidades para el locus HLA-A, 50 para HLA-B, y 11 para HLA-C (tabla 1). Las moléculas de clase II constituyen otra familia de antígenos de histocompatibilidad con características funcionales, estructurales y genéticas diferentes de los antígenos de clase I. Se expresan casi exclusivamente en ciertas células del sistema inmune, principalmente en linfocitos B y en macrófagos. En el sistema humano existen al menos tres tipos de antígenos de clase II, que son los denominados HLA-DR, -DQ y -DP. El polimorfismo de los antígenos de clase II, aunque hasta el momento inferior al de las moléculas de clase I (ver tabla 1), es muy elevado en comparación con la mayoría de otras series alélicas conocidas. Las moléculas de clase III son componentes del sistema del complemento.

HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C
A1	B5	Bw50 (21)	Cw1
A2	B7	B51 (5)	Cw2
A3	B8	Bw52 (5)	Cw3
A9	B12	Bw53	Cw4
A10	B13	Bw54 (w22)	Cw5
A11	B14	Bw55 (w22)	Cw6
Aw19	B15	Bw56 (w22)	Cw7
A23 (9)	B16	Bw57 (17)	Cw8
A24 (9)	B17	Bw58 (17)	Cw9 (w3)
A25 (10)	B18	Bw59	Cw10 (w3)
A26 (10)	B21	Bw60 (40)	Cw11
A28	Bw22	Bw61 (40)	
A29 (w19)	B27	Bw62 (15)	
A30 (w19)	B35	Bw63 (15)	
A31 (w19)	B37	Bw64 (14)	
A32 (w19)	B38 (16)	Bw65 (14)	
Aw33 (w19)	B39 (16)	Bw67	
Aw34 (10)	B40	Bw70	
Aw36	Bw41	Bw71 (w70)	
Aw43	Bw42	Bw72 (w70)	
Aw66 (10)	B44 (12)	Bw73	
Aw68 (28)	B45 (12)	Bw75 (15)	
Aw69 (28)	Bw46	Bw76 (15)	
Aw74 (w19)	Bw47	Bw77 (15)	
	Bw48	Bw4	
	B49 (21)	Bw6	

HLA-D	HLA-D	HLA-DR	HLA-DQ
Dw1	Dw14	DR1	DQw1
Dw2	Dw15	DR2	DQw2
Dw3	Dw16	DR3	DQw3
Dw4	Dw17 (w7)	DR4	DQw4
Dw5	Dw18 (w6)	DR5	DQw5 (w1)
Dw6	Dw19 (w6)	DRw6	DQw6 (w1)
Dw7	Dw20	DR7	DQw7 (w3)
Dw8	Dw21	DRw8	DQw8 (w3)
Dw9	Dw22	DR9	DQw9 (w3)
Dw10	Dw23	DRw10	
Dw11 (w7)	Dw24	DRw11 (5)	
Dw12	Dw25	DRw12 (5)	
Dw13	Dw26	DRw13 (w6)	
		DRw14 (w6)	
		DRw15 (2)	
		DRw16 (2)	
		DRw17 (3)	
		DRw18 (3)	
		DRw52	
		DRw53	
			HLA-DP
			DPw1
			DPw2
			DPw3
			DPw4
			DPw5
			DPw6

Tabla 1.- Especificidades HLA reconocidas tras la celebración del X Taller Internacional de Histocompatibilidad.

1.1.- Estructura de las moléculas HLA de clase I.

En la figura 1 se representa esquemáticamente la estructura general de una molécula HLA de clase I; a grandes rasgos, los antígenos de clase I son proteínas heterodiméricas formadas por una cadena pesada de unos 45 kD de peso molecular, que está codificada en los genes del MHC, y una cadena ligera de un peso molecular aproximado de 12 kD, que es la β_2 -microglobulina. Esta es un polipéptido no polimórfico y no codificado en el MHC (1). Los antígenos de clase I son proteínas integrales de membrana, con una gran región extracelular, un segmento que atraviesa la membrana, y una pequeña porción que penetra en el citoplasma (2). La porción extracelular de la cadena pesada se halla glicosilada por un único residuo de carbohidrato, y contiene dos enlaces disulfuro intracatenarios de una extensión similar a los de los dominios de las inmunoglobulinas (Igs).

La estructura primaria de estos antígenos ha permitido establecer su organización en dominios estructurales, en base a la homología estructural de la porción que comprende los aminoácidos 183-274 (α_3), con los dominios constantes de las Igs y la β_2 -microglobulina, y a la homología interna existente entre las regiones 1-90 (α_1) y 91-182 (α_2). En base a esta organización, se ha incluido a las moléculas del MHC en la superfamilia de las Igs, que comprende un conjunto de proteínas

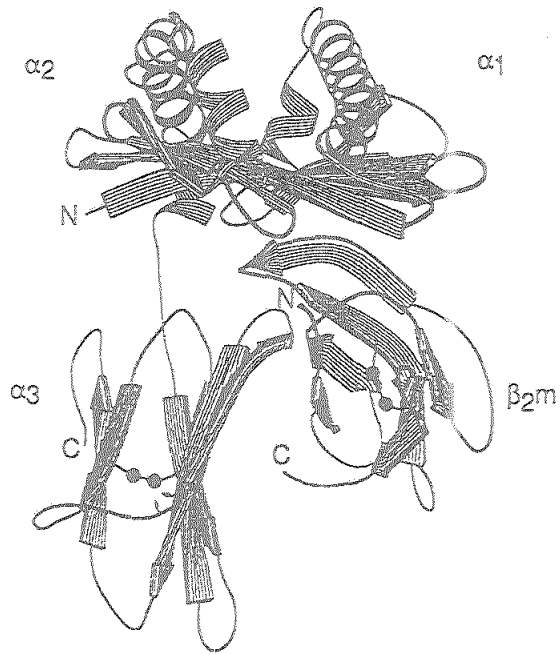


Figura 1.- Esquema general de la estructura de la molécula HLA-A2. La cadena pesada consta de 340 aminoácidos, con tres dominios extracelulares de aproximadamente 90 residuos cada uno, un segmento transmembrana de 40 aminoácidos, y un péptido intracelular de 30 residuos. Los dominios α_2 y α_3 poseen puentes disulfuro intracatenarios, formando bucles de 60 residuos. Las especificidades alotópicas se localizan en los dominios α_1 y α_2 ; α_3 es relativamente invariable.

que comparten una estructura común, cuya unidad básica es un dominio globular con las características de los dominios de las Igs (3). La interacción de la β_2 -microglobulina con la cadena pesada se acepta que se produce fundamentalmente con el dominio α_3 , mientras que la β_2 -microglobulina interacciona con los 3 dominios de la cadena pesada (4). Sin embargo, la interacción entre la β_2 -microglobulina con el dominio α_3 se lleva a cabo en una nueva disposición espacial que no se ha hallado en ninguna de las estructuras conocidas de moléculas de anticuerpos (4). El plegamiento de los dominios α_1 y α_2 no se parece al de las Igs, aunque α_2 contiene un puente disulfuro intracatenario, reminiscencia de los encontrados en aquellas.

1.2.- Organización genómica y polimorfismo de la región HLA de clase I.

La figura 2 muestra la disposición de los genes que codifican las moléculas HLA de clase I. Además de los tres genes que codifican los tres productos génicos definidos serológicamente, HLA-A, B, C, que codifican proteínas que se asocian a la β_2 -microglobulina y se expresan en la mayoría de los tejidos y tipos celulares, se hallan los genes de los antígenos HLA-E, F y G (5-7), que también codifican proteínas que se asocian a la β_2 -microglobulina, aunque poseen patrones de expresión diferentes de los de las moléculas HLA de clase I

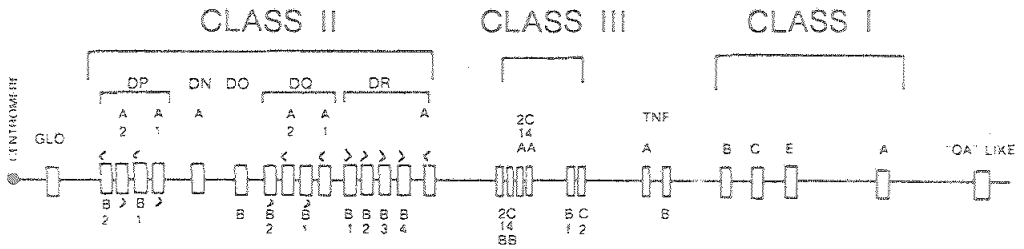


Figura 2.- Organización cromosómica de los genes que codifican las moléculas HLA de clase I.

"clásicas". El orden de estos genes, que se encuentran físicamente próximos en el mapa génico, no se ha establecido por el momento. Asimismo, se encuentra un número indeterminado de pseudogenes de clase I (8), los cuales no originan ningún producto asociado a la β 2-microglobulina, y que generalmente poseen una obvia mutación deletérea.

La secuenciación de algunos genes que codifican para los antígenos de clase I (9-14) ha permitido conocer su estructura. La distribución de exones e intrones que aparece en estos genes confirma la distribución en dominios estructurales que se había sugerido en base a las homologías de secuencia. Así, se observa que aparecen 8 exones separados por 7 intrones; el primer exón codifica para una secuencia de 21-24 aminoácidos que no está presente en la proteína expresada en la membrana. Los exones 2, 3 y 4 codifican, respectivamente, los dominios α 1, α 2 y α 3. El exón 5 contiene la información para el péptido que conecta la región extracelular con la parte que atraviesa la membrana y para este péptido transmembrana. La región intracitoplásmica está codificada en los exones 6, 7 y 8, conteniendo este último el segmento 3' del gen que no se traduce (9). Existe cierta evidencia de la posibilidad de procesamiento ("splicing") alternativo de los mRNA correspondientes a los antígenos de clase I, que puede originar moléculas con diferencias de longitud en su extremo carboxilo terminal e incluso formas solubles de estas moléculas que carecen de la

porción transmembrana (15).

Como ya se ha dicho, una de las características más sobresalientes de los productos del MHC es su extremado polimorfismo; la comparación de las secuencias conocidas de clase I muestra que la mayoría de las diferencias entre las distintas moléculas están agrupadas en 6 segmentos, 3 en el dominio $\alpha 1$, en las regiones que comprenden los aminoácidos 9-12, 40-45 y 62-83; otras dos en el dominio $\alpha 2$, en las regiones 94-116 y 137-167, y una en la zona entre $\alpha 2$ y $\alpha 3$, 177-194, lo que concuerda con los datos que indican que la mayoría de los determinantes aloantigénicos se encuentran localizados en los dos dominios N-terminales. Este hecho se ha interpretado en el sentido de que existen presiones evolutivas que, mientras tienden a mantener la estructura del dominio $\alpha 3$, favorecen la variabilidad en los otros dominios, siendo ésto probablemente un reflejo de la función que se supone a cada uno de los dominios: interacción con la β_2 -microglobulina para $\alpha 3$, y especificidad de reconocimiento y restricción para $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

1.3.- Estructura de las moléculas HLA de clase II.

Las moléculas de clase II codificadas en el MHC son proteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad α y una β , las cuales atraviesan la membrana plasmática (16, 17) (figura

3), y determinan la capacidad de un individuo dado para responder inmunológicamente frente a una amplia gama y variedad de antígenos extraños, por lo que se conocen también con el calificativo de genes de la respuesta inmune (18). Las diferencias en cuanto a tamaño entre las dos subunidades (α , 34 kD; β , 29 kD) son, principalmente, debidas a que las cadenas α de todos los subtipos se hallan sustituidas por dos cadenas de N-glicanos, mientras que las β poseen sólo una (19). Cada cadena polipeptídica consta de dos dominios extracelulares de 90-100 aminoácidos cada uno, una región transmembrana de 20-25 residuos, y una porción intracelular de 8-15 residuos. En cada caso, el dominio más próximo a la membrana, α_2 o β_2 , presenta una fuerte homología en su secuencia con los dominios de las Igs (20), por lo que se considera que las moléculas de clase II comparten un origen evolutivo común con las Igs y con otros miembros de la superfamilia de las Igs (por ejemplo, moléculas de clase I, receptor de la célula T, CD4 y CD8) (21). Los dominios situados en posición distal con respecto a la membrana plasmática, α_1 y β_1 , no presentan tal homología, aunque β_1 posee un puente disulfuro de aproximadamente el mismo tamaño que el encontrado en un dominio inmunoglobulínico. La estructura de las moléculas de clase II presenta una notable homología con respecto a la de los antígenos de clase I del MHC, difiriendo principalmente en el modo de unión de los dominios extracelulares, y en el hecho de que tan sólo la cadena α de los antígenos de clase I atraviesa la membrana plasmática.

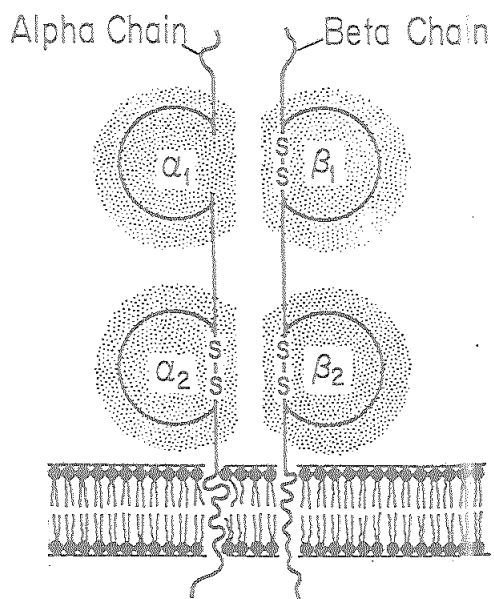


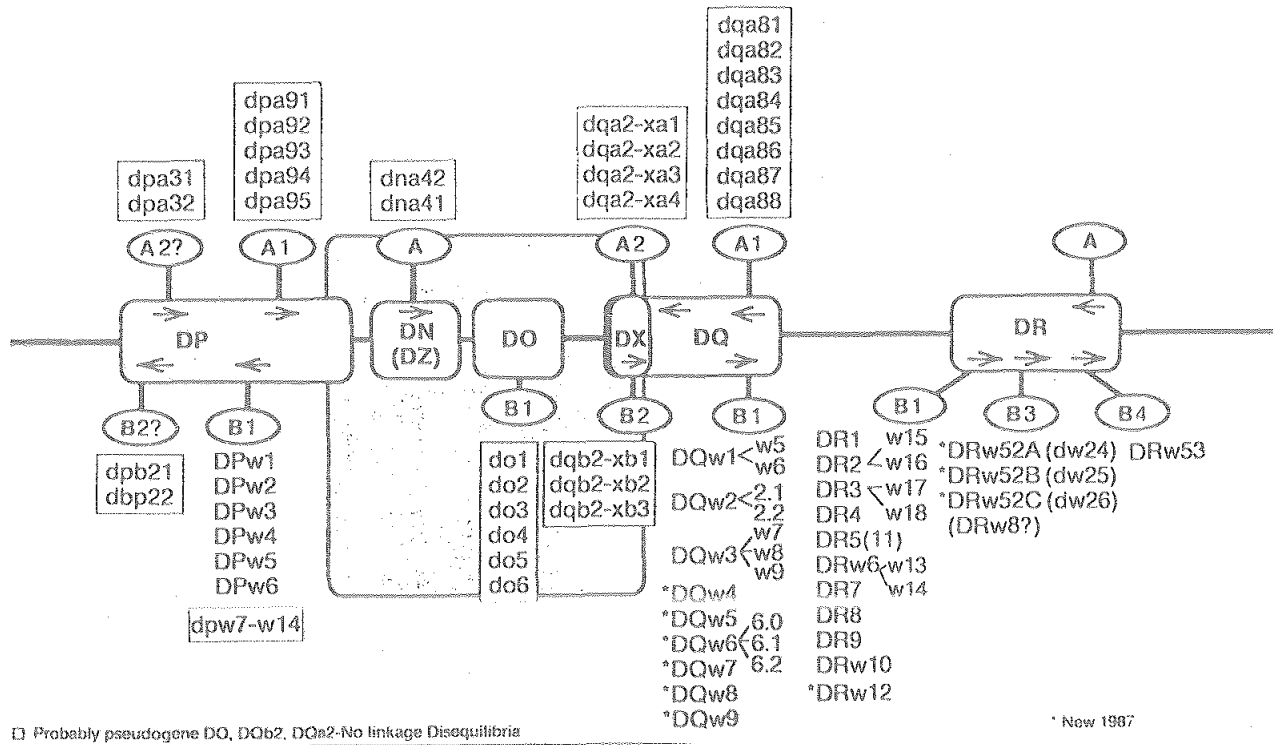
Figura 3.- Esquema general de la estructura de la molécula HLA de clase II.

La organización estructural en dominios de las moléculas de clase II se refleja, a su vez, en el DNA, en cuanto a la disposición de los genes (20). Los genes para las cadenas α contienen 5 exones que codifican, principalmente, (A) la secuencia señal, (B) el dominio extracelular $\alpha 1$, (C) el dominio extracelular $\alpha 2$, (D) la región transmembrana y la cola citoplásmica, y (E) la porción 3' UT. Los genes de las cadenas β están dispuestos de idéntico modo, excepto para la cola citoplásmica, que se halla codificada en el exón 5, mientras que la porción 3' UT constituye un sexto exón. Los genes para las cadenas α y β difieren significativamente en la longitud de sus intrones en los distintos subtipos de moléculas de clase II.

1.4.- Organización genómica de la región HLA de clase II.

Todos los genes HLA de clase II caracterizados hasta el momento se encuentran codificados en el MHC, en el brazo corto del cromosoma 6. Evolutiva y funcionalmente, los genes más íntimamente relacionados se agrupan en las denominadas subregiones, cuya disposición general en el cromosoma ha podido ser estudiada merced a una combinación de técnicas bioquímicas y genéticas (22-26) (figura 4). De esta forma, ha sido posible estimar que la región de clase II tiene un tamaño de, aproximadamente, 1000 kb. Las subregiones contienen tanto genes para cadenas α como para cadenas β , siendo esta disposición

Figura 4.- Organización cromosómica de los genes que codifican las moléculas HLA de clase II.



bastante insólita, puesto que los genes para las cadenas α y β de la mayoría de las proteínas heterodiméricas no se hallan ligados en el mismo segmento cromosómico. Estas subregiones se hallan dispuestas, en distancia creciente a partir del centrómero, en el siguiente orden (ver figura 4): DP, DN (contiene sólo un gen la para cadena α), DO (contiene sólo un gen para la cadena β), DQ y DR (27), y, con la excepción de DN y DO, para las que no se ha detectado ningún producto proteico, codifican las moléculas de clase II DP, DQ y DR respectivamente.

El polimorfismo alélico es una de las características intrínsecas de los productos de la región HLA-D; de hecho, su descubrimiento se realizó en virtud de que su polimorfismo es el responsable de la reacción de linfocitos mezclados (MLR) entre virtualmente todos los individuos no emparentados. Parece, pues, evidente que este polimorfismo posea un significado fundamental para la función de las moléculas de clase II en la "restricción" de las interacciones celulares en la respuesta inmune, por lo que se está dedicando un esfuerzo considerable a la determinación de la extensión del polimorfismo y a su localización intramolecular. La mayor parte de este polimorfismo alélico se concentra en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, que se hallan situados en posición distal con respecto a la membrana plasmática, aunque puede detectarse también, en menor grado, en otras partes de la molécula.

1.4.1- Polimorfismo DR.

La cadena α del locus DR es virtualmente invariable, por lo que resulta aparente que el polimorfismo alélico funcional exhibido por los antígenos DR está enteramente asociado con la subunidad β . Es necesario hacer constar, al hablar de los antígenos de histocompatibilidad, que el término alelo viene determinado por la secuencia del gen correspondiente, mientras que la especificidad se define con la ayuda de aloantisueros obtenidos, principalmente, de mujeres multíparas. De esta forma, se han identificado, hasta el momento presente, 18 especificidades DR o "alelos serológicos" (ver tabla 1), todos ellos definidos por la cadena β_1 , que se halla codificada en el gen B1 de la subregión DR. Las especificidades HLA-DR pueden ser subdivididas en base a sus especificidades HLA-Dw, que derivan del tipaje MLR. Así, por ejemplo, DR4 incorpora Dw4, Dw10, Dw13, Dw14 y Dw15 (y algunos subtipos minoritarios).

Las especificidades supertípicas DRw52 y DRw53 se asocian a las cadenas β_3 y β_4 respectivamente, codificadas en loci separados (B3 y B4) (28) encontrados en los haplotipos DR3, 5 y w6, y en los haplotipos DR4, 7 y 9, respectivamente, por lo que estos haplotipos expresan dos antígenos DR. Un nuevo alelo de clase II denominado DRB5, cuya situación en el mapa génico es similar a la del gen DRB3, codifica para 4 cadenas DR β (cadenas

β5) asociadas a las especificidades DR2; dos asociadas a DRw15, y otras dos a DRw16. Sin embargo, las secuencias DRB5 parecen estar estrechamente relacionadas a las secuencias DRB1, lo que sugiere que la duplicación de DRB1 puede ser un hecho relativamente reciente (29, 30).

La subregión DR es única entre las de clase II en que el número y la situación relativa de los genes de las cadenas β difieren de haplotipo en haplotipo (29). Así, por ejemplo, no existen evidencias de la existencia de cadenas DRβ secundarias que acompañen a las cadenas DRβ1 de los haplotipos DR1, DRw8 y DRw10 (31-33), por el contrario, se han identificado 2-3 genes DRβ para los haplotipos DR5, 3 para DR3 y DRw6 (todos ellos asociados a la especificidad DRw52), y 4 para DR4 y DR7 (asociados a la especificidad DRw53) (31, 34, 35). El haplotipo DR9, a pesar de hallarse asociado a DRw53, comparte el patrón de los haplotipos asociados a DRw52 (31), mientras que la, en cierto modo inesperada, expresión de tan sólo un gen DRβ en los haplotipos DRw8 podría ser reconciliada con su asociación a DRw52, si el producto expresado, DRw8, compartiera un epítipo común con esta especificidad supertípica (31).

1.4.2.- Polimorfismo DQ.

Las especificidades serológicas DQ se hallan en desequilibrio de ligamiento con los diferentes tipos de

antígenos DR. Al contrario que los antígenos DR, ambas cadenas DQ son polimórficas. En este sentido, existen 24 situaciones polimórficas en el primer dominio de la cadena DQ α , comprendiendo la región de máxima diversidad los residuos 47-53. Desde el punto de vista de su homología, las diferentes cadenas DQ α parecen agruparse en dos tipos principales (aunque dentro de cada uno de esos grupos tengan lugar variaciones menores), uno de ellos se encuentra ligado a los haplotipos DR1, 2 y w6, mientras que el otro lo está a DR3, 4, 7, y 9. Los haplotipos DR5 y DRw8 pueden asociarse a cadenas DQ α pertenecientes a ambos grupos. El polimorfismo de los genes DQA1 es notablemente menos extenso que el de los genes DRB1 y algo menor que el de los genes DQB1 (32).

En el caso de la cadena DQ β , existen 31 posiciones polimórficas dentro del primer dominio, aunque, sin embargo, el nivel de variación encontrado en esas posiciones es ligeramente mayor que el correspondiente para DQ α (hay un 50% más de posiciones en las que pueden tener lugar 3 o más residuos alternativos); existen 3 regiones de diversidad que comprenden los residuos 26-37, 52-57, y 70-74. Al igual que para DRB1, el intercambio de estas regiones de diversidad entre distintos alelos mediante mecanismos de recombinación múltiple o de conversión génica, es evidente. A partir de las relaciones de homología entre los aminoácidos componentes de las cadenas DQ β , éstas se pueden clasificar en 5 grupos principales: (a) DQw1 β

ligada a DR1, DRw16 y a algunos haplotipos DRw6; (b) DQw1 β ligada a DRw15; (c) DQw2 β ligada a DR3 y DR7; (d) DQw3 β ; y (e) DQw4 β ligada a DR4 y DRw8. El tipaje serológico DQ está relacionado con el polimorfismo de la cadena DQ β y no con la DQ α , con la excepción de la especificidad DQw1.

En las moléculas DQ, se puede generar una diversidad adicional mediante asociación en "trans" de cadenas DQ α y β pertenecientes a haplotipos diferentes, en células heterocigotas para la región HLA-D (33). También parece ser que la cadena DQ β puede formar una molécula híbrida con DR α , aunque el producto a la inversa, DR β /DQ α , no se ha detectado (36). Por tanto, el polimorfismo de los productos de la región DQ puede ser significativamente mayor que el detectado mediante estudios serológicos, y que diferentes combinaciones entre las cadenas α y β sean discriminadas por las células efectoras del sistema inmune.

1.4.3.- Polimorfismo DP.

Al contrario que con las especificidades DR y DQ, los antígenos DPw1-6 no se han definido serológicamente, sino que ha debido recurrirse a reacciones con linfocitos sensibilizados "in vitro" ("primed lymphocyte typing" o PLIT). Esta carencia de aloantisueros específicos para HLA-DP puede estar relacionada con el polimorfismo relativamente limitado exhibido por estos

antígenos o con su también relativamente bajo nivel de expresión. La cadena DP α es, virtualmente, invariable; los estudios de secuenciación de genes DPA1 indican la existencia de 4 formas diferentes, mientras que los análisis bioquímicos señalan la presencia de 2 formas, una de las cuales se asocia a los antígenos DPw2, w3, w4 y w6, mientras que la otra lo está con DPw1, w5 y DP"blanco" (37).

La cadena DP β es más polimórfica que la DP α , pero significativamente menos que las DR β o DQ β ; el análisis de las secuencias correspondientes a DPB1 indica la existencia de 14 posiciones polimórficas en el dominio β 1 (comparadas con 37 en DR β y 29 en DQ β).

El polimorfismo de los subtipos de antígenos de clase II expresados en la especie humana es, por tanto, bastante diferente: 1. extenso grado de polimorfismo en la cadena DR β con la cadena DR α conservada; 2. aparente conservación de la cadena β de uno de los subtipos de DR (DRw53) con limitado polimorfismo del otro (DRw52); 3. polimorfismo en ambas cadenas de la subregión DQ; y 4. polimorfismo muy limitado de ambas cadenas DP. A la vista de estos resultados, nos podemos hacer varias preguntas; por ejemplo, ¿por qué se halla conservada la cadena DR α ?, ¿tienen los diferentes tipos de antígenos de clase II diferente función en el reconocimiento inmunológico?. Estas y otras cuestiones, tales como si el incremento en el número de

antígenos de clase II en el hombre tiene consecuencia en la función inmune, permanecen hasta ahora sin ser resueltas.

1.5.- Mecanismos de generación de polimorfismo.

El polimorfismo de los antígenos HLA tiene lugar a varios niveles: a) existencia de múltiples loci muy relacionados, b) cada locus presenta un elevado número de alelos, y c) las diferentes moléculas se diferencian unas de otras estructuralmente en múltiples posiciones, normalmente agrupadas en zonas variables y con la peculiaridad de que, en general, la variabilidad de cada posición está restringida a unos pocos aminoácidos diferentes. Esta complejidad estructural no puede ser explicada más que implicando diversos mecanismos genéticos para la generación del polimorfismo. En este sentido, se han propuesto al menos tres mecanismos básicos para la generación del polimorfismo de los antígenos HLA: 1) Mutación puntual. 2) Conversión génica o mecanismos análogos. 3) Recombinación.

La variabilidad de ciertas posiciones en la molécula tiene su explicación más lógica por mecanismos de mutación puntual. La variabilidad en otras posiciones es, sin embargo, difícil de explicar implicando solamente mecanismos de mutación puntual, ya que existen hechos como la acumulación de posiciones

variables en ciertas regiones (38), cuya generación exigiría un elevado número de mutaciones en un segmento reducido de DNA, que no podría explicarse en base a este tipo de mecanismo.

La conversión génica se describió originalmente como un mecanismo genético que tiende a mantener la homogeneidad en familias multigénicas (39), y que consiste en la transmisión no recíproca de información genética de un gen "donador" a otro "aceptor" mediante mecanismos moleculares aún no bien entendidos. Este mecanismo, operando en familias multigénicas como los genes de clase I y clase II del sistema HLA puede, a la vez que mantiene la homogeneidad, generar polimorfismo (40).

Los mecanismos de recombinación pueden ser también responsables del hecho de que en diferentes haplotipos exista distinto número de genes, aunque otros mecanismos como duplicaciones y deleciones podrían dar cuenta también de estos fenómenos.

Por tanto, podemos concluir que la generación del polimorfismo en los antígenos del MHC es el resultado de la actuación de diversos mecanismos genéticos, probablemente bajo fuertes restricciones funcionales, estructurales y genéticas, aún no comprendidas totalmente.

1.6.- Función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Un hecho de capital importancia en la actividad funcional de los linfocitos y en su participación en la respuesta inmune es el reconocimiento del antígeno de manera específica. Aunque en determinadas condiciones un antígeno libre, en solución, puede estimular a los linfocitos capaces de reconocerlo específicamente, la regla más general para la mayor parte de los antígenos es que éstos deben ser presentados al linfocito específico por otra célula (célula accesoria de la respuesta, que actúa en este caso como presentadora de antígeno), de tal manera que el linfocito que va a responder no vea el antígeno aislado, sino en el contexto de otra estructura presente en la membrana de la célula presentadora y codificada por genes pertenecientes al MHC (41). La estructura que debe ser reconocida junto con el inmunógeno es generalmente un antígeno de clase I en el caso de la generación de linfocitos T citotóxicos y un antígeno de clase II en el caso de cualquier otra modalidad de respuesta inmune. Naturalmente, esto exige por parte de la célula que haya de actuar como presentadora de antígeno, la propiedad de expresar en su superficie antígenos de histocompatibilidad de la clase adecuada. Cambios cuantitativos o cualitativos en la expresión de estos antígenos pueden modificar consiguientemente la capacidad de presentación de antígeno (inmunógeno) y por tanto regular la calidad o la intensidad de la respuesta inmune (42). Asimismo, la capacidad

de los antígenos HLA de un individuo de combinar adecuadamente las sustancias extrañas, determinan su capacidad de responder frente a las mismas. Obviamente, este fenómeno (que depende del fenotipo HLA de cada individuo) es el responsable de la diversidad de respuestas inmunes entre individuos.

En paralelo con los avances obtenidos en la comprensión de las moléculas presentadoras de antígeno de clase I y clase II del MHC, la naturaleza del antígeno presentado cada vez se vislumbra de forma más clara. Resulta ahora evidente que lo que es presentado a las células T en el contexto de MHC es un pequeño, y usualmente linearizado, fragmento peptídico de la molécula antigénica (43, 44), que se une a ciertos residuos específicos para péptidos en el interior de una especie de hendidura que forma la estructura de la molécula del MHC para la unión y presentación del péptido antigénico, y, de esta forma, es reconocido por el linfocito T.

La entrada de un antígeno foráneo provoca una alteración en el sistema inmune y produce una serie de interacciones celulares. Las células presentadoras de antígeno, entre las que se encuentran los macrófagos, intervienen en los estadios iniciales de este proceso, dada su capacidad para captar y procesar el antígeno. La etapa de procesamiento da como resultado la destrucción de la estructura terciaria de la molécula antigénica, dejando pequeños péptidos que pueden

retener su estructura secundaria en hélice α , o simplemente formar estructuras al azar ("random coils") (45). Hay cada vez más evidencias de que las células T reconocen porciones internas anfipáticas o hidrofóbicas de la molécula del antígeno, insolubilizadas en la superficie de las moléculas del MHC a través de las ya típicas interacciones carga-carga e hidrofóbicas, que gobiernan los sistemas de interacción de proteínas (46-48). En relación a los mecanismos moleculares implicados en la asociación entre antígenos extraños y moléculas de histocompatibilidad, se ha demostrado que éstos se unen a antígenos distintos; las moléculas de clase II se unen a antígenos que han sido endocitados desde el exterior, en tanto las moléculas de clase I se unirían con moléculas endógenas, es decir, del interior de la célula (49). Un ejemplo de moléculas endógenas lo constituyen las proteínas codificadas por los genomas de los virus que infectan células. El hecho de que las moléculas de histocompatibilidad se unan a antígenos de distinta procedencia implica, a su vez, que los mecanismos de procesamiento de los antígenos han de ser diferentes para poder ser reconocidos por las dos diversas clases de antígenos de histocompatibilidad.

Todos estos hechos sugieren que tan sólo una pequeña región de la molécula HLA se halla directamente implicada en la interacción con el antígeno, el receptor de la célula T o con ambos. La restricción y función de la molécula HLA puede

entonces venir determinada por pequeñas estructuras con una cierta conformación, codificadas por las regiones de diversidad, y no necesariamente y tan sólo por la existencia de los diferentes alelos.

2.- DESARROLLO DE LA TECNOLOGIA DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

La tecnología de hibridomas es la culminación de un gran número de avances en áreas de investigación no necesariamente relacionadas. Mientras que las técnicas de cultivo celular, en primer lugar, y más adelante las de fusión celular y genética de células somáticas se iban desarrollando y consolidando, tenían lugar importantes progresos en el campo de la inmunología, específicamente en el área de la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Durante este período, Potter y Boyce (50) describieron el paso de tumores de mieloma en ratones, y algunos años más tarde, algunos de esos tumores fueron establecidos en cultivo celular y mutagenizados, resultando en líneas celulares deficientes en algún enzima. Cotton y Milstein (51) demostraron que la fusión de dos líneas de mieloma de ratón productoras de anticuerpos, resultaba en híbridos que expresaban los productos de ambas líneas parentales. En ese mismo año, Schwaber y Cohen (52) mostraron que la fusión de linfocitos humanos con células de mieloma murinas daba como resultado híbridos secretores de Igs derivadas tanto del mieloma como de los linfocitos. De esta forma, el camino se preparaba para la ya clásica observación de Köhler y Milstein (53), en la que demostraban que la fusión de células de bazo de un ratón previamente inmunizado frente a un determinado

antígeno, con células de mieloma murino, resultaba en la obtención de células híbridas inmortalizadas que secretaban anticuerpos cuya especificidad venía determinada por el antígeno empleado en la inmunización previa. Durante los años siguientes, se añadieron numerosos refinamientos a esta técnica básica. Sin embargo, no fue sino hasta 1980 cuando Olsson y Kaplan (54), y Croce y cols. (55), de forma independiente y por métodos muy diferentes, obtuvieron hibridomas humanos.

La tecnología de hibridomas ha tenido y sigue teniendo un claro impacto en muchas facetas de las ciencias básicas y en la medicina clínica. No obstante, paralelamente al gran número de ventajas y beneficios de esta tecnología, permanecen aún por resolverse ciertas dificultades y problemas técnicos que acarrea la producción de anticuerpos monoclonales, especialmente los de origen humano.

2.1.- Los anticuerpos monoclonales murinos en el estudio del polimorfismo del sistema HLA.

Los anticuerpos monoclonales murinos han contribuido significativamente al estudio del MHC humano, especialmente en su análisis bioquímico (para una revisión ver 56). No obstante, desde la producción de los primeros anticuerpos monoclonales de ratón frente al sistema HLA (57), se ha planteado la posibilidad

de emplear anticuerpos monoclonales polimórficos para el estudio del sistema HLA y como reactivos de tipaje. No obstante, y a pesar de que la mayoría de los problemas técnicos inherentes al empleo de anticuerpos monoclonales para los estudios HLA a nivel serológico, están prácticamente resueltos (58), se puede concluir que los anticuerpos monoclonales pueden contribuir significativa, pero no exclusivamente, al tipaje HLA (59). El principal problema lo constituye el hecho de que no hay anticuerpos monoclonales murinos disponibles que reconozcan todas las especificidades del sistema HLA; en este sentido, y según una reciente estimación (59), alrededor de un tercio de las especificidades HLA pueden ser definidas actualmente con la ayuda de anticuerpos monoclonales.

Independientemente de lo expuesto antes, desafortunadamente, la mayoría de los anticuerpos monoclonales anti-HLA producidos, predominantemente de origen murino, reaccionan frente a epítomos monomórficos. Los anticuerpos monoclonales que reconocen las especificidades A2+A28 son los más frecuentemente producidos de entre los monoclonales frente a antígenos de clase I (59). Esto se debe, probablemente, al hecho de que muchas fusiones se ha llevado a cabo tras inmunización con células portadoras de la especificidad A2 (que es el antígeno de clase I que se presenta con más alta frecuencia); también sugiere que A2 puede ser un buen inmunógeno tanto para ratones como para humanos. En este sentido, los anticuerpos

anti-HLA-A2+A28 se producen más frecuentemente que los anticuerpos monoclonales restringidos para A2, y no se han descrito todavía anticuerpos monoclonales exclusivamente frente a A28. Por otra parte, la variante Aw69 de la especificidad HLA-A28 se describió gracias a anticuerpos monoclonales de ratón (60), mientras que otros monoclonales pueden reconocer ciertos subtipos de la especificidad A2 (60, 61). Todas estas observaciones ilustran el hecho de que los anticuerpos monoclonales son una herramienta muy importante para el análisis del polimorfismo HLA.

Es interesante resaltar que los anticuerpos monoclonales polimórficos producidos hasta el momento actual, no parecen distribuirse al azar de acuerdo con las series alélicas (59); las especificidades HLA-DQ son frecuentemente reconocidas por distintos anticuerpos monoclonales, mientras que tan sólo una minoría de especificidades B, y ninguna especificidad Cw son reconocidas por ellos. Se sabe que los aloantisueros frente a HLA-Cw son raros, posiblemente a causa de una débil expresión y/o una baja inmunogenicidad de las moléculas Cw. Una explicación similar puede plantearse para la escasez de sueros y anticuerpos monoclonales anti-DP.

2.2.- Interés de la producción de anticuerpos monoclonales humanos anti-HLA.

Los anticuerpos monoclonales murinos anti-HLA son poderosos reactivos para el análisis estructural de los antígenos codificados por los diferentes loci del sistema HLA, pero no resultan demasiado útiles a la hora de analizar el polimorfismo HLA. De hecho, es posible la generación de anticuerpos monoclonales murinos que definan nuevas especificidades inoculando ratones con células completas humanas, pero la probabilidad de obtener los anticuerpos con la especificidad deseada no es muy alta debido a que la mayoría de los anticuerpos se hallan dirigidos frente a determinantes estructurales (monomórficos), comunes a todas o a una serie de moléculas HLA. Para evitar este problema deben considerarse nuevas aproximaciones al problema consistentes en la inmunización de ratones tanto con células transfectantes murinas que expresen un solo producto humano de la región HLA (62), o con antígenos HLA purificados.

La situación es del todo diferente en el caso de los anticuerpos monoclonales humanos anti-HLA, puesto que están dirigidos siempre frente a determinantes polimórficos y pueden ser capaces, incluso, de detectar alodeterminantes HLA que no hayan sido identificados por antisueros policlonales ni por anticuerpos monoclonales murinos anti-HLA. Por esta razón, es

altamente probable que los anticuerpos monoclonales humanos hagan posible, en un futuro no muy lejano, el tipaje serológico así como los estudios funcionales de los antígenos HLA.

Otro significado de la producción de anticuerpos monoclonales humanos anti-HLA, es la posibilidad de identificar anticuerpos dirigidos frente a moléculas HLA de clase II híbridas. Estas moléculas híbridas se forman por el fenómeno conocido con la denominación de complementación génica, esto es, por la asociación en "trans" de cadenas α y β del locus DQ codificadas en diferentes haplotipos (33). Es posible que tal formación de híbridos suceda no sólo por asociación en "trans", sino también en "cis", incluso entre diferentes productos de las subregiones de clase II bajo ciertas condiciones en las que tenga lugar un control anormal de su expresión génica.

2.3.- Dificultades y problemas técnicos que conlleva la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

Por razones prácticas, la fuente de linfocitos más comúnmente disponible para la producción de anticuerpos monoclonales humanos es la de sangre periférica, que probablemente es, además, la menos adecuada. Ciertos estudios indican que las células de tejidos linfoides sólidos son mejor fuente que las procedentes de sangre periférica, para la

producción de anticuerpos monoclonales humanos, ya que los linfocitos B están pobremente representados en esta última si se compara tanto con el bazo o los nódulos linfáticos, y, además, muy pocas células B productoras de anticuerpos específicos se hallan representadas en sangre periférica, incluso a pesar de que el suero contenga un título alto de esos mismos anticuerpos.

Existen básicamente dos métodos para producir anticuerpos monoclonales humanos: (A) fusión celular y (B) transformación viral. La fusión celular puede dividirse en dos subcategorías: (a) híbridos ratón-humano y (b) híbridos humano-humano. Los híbridos enteramente humanos pueden ser producidos fusionando linfocitos B inmunizados, con una línea de mieloma humana no infectada con el virus de Epstein-Barr (EBV), o con líneas de células B linfoblastoides humanas (EBV-positivas). El segundo método para producir anticuerpos monoclonales humanos es mediante transformación viral in vitro con SV40 o EBV de linfocitos sensibilizados, para la obtención de líneas celulares permanentes productoras de anticuerpos monoclonales.

El principal problema encontrado en la fusión de mielomas de ratón con linfocitos humanos sensibilizados, es la inestabilidad de estos híbridos. Durante años, se ha venido observando que en los híbridos humano-ratón los cromosomas humanos se eliminan preferencialmente, por lo que se requiere un

subclonaje exhaustivo para llegar a obtener híbridos estables productores de anticuerpos. Por otra parte, la principal limitación a la hora de fusionar líneas de mieloma humanas con linfocitos sensibilizados, puede resumirse en una frase: existe una carencia severa de líneas de mieloma humano adecuadas. En este sentido, se está dedicando un considerable esfuerzo al desarrollo de líneas de mieloma humano que puedan ser utilizadas como parejas tumorales en las fusiones encaminadas a la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Para tratar de obviar estos inconvenientes, algunos grupos de investigación han fusionado líneas de mieloma humanas y murinas en un intento de seleccionar mejores compañeros de fusión para su empleo en la producción de anticuerpos monoclonales humanos (63-65). Estos heteromielomas presentan mejores propiedades a la hora de fusionar, junto con mejores tasas de crecimiento que las líneas originales, y algunos de ellos poseen la ventaja adicional de no ser secretores de Igs.

Algunos investigadores en el terreno de los hibridomas, no obstante, creen que se ha prestado demasiada atención a la búsqueda de líneas celulares tumorales humanas adecuadas (66), y proponen una vía diferente que consiste en aislar linfocitos inmunizados a partir de un donante o sensibilizados in vitro, con el propósito de eternizar las células productoras de anticuerpos mediante infección con EBV. Aunque, en teoría, parece una buena idea, existen algunas

limitaciones, entre las que se incluyen: (a) las células inmortalizadas producen bajas cantidades de anticuerpos comparadas con las híbridas, (b) las células pierden, a menudo, la capacidad de producir anticuerpos; (c) el anticuerpo secretado es, frecuentemente, de clase IgM; y (d) las BCLs resultantes presentan una eficiencia de clonaje bastante baja.

Para tratar de solventar los problemas expuestos con anterioridad, se recurre a la combinación de las técnicas de transformación y fusión para producir hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales humanos (67-69), que parece solucionar los problemas inherentes a cada uno de los dos métodos por separado. Así pues, transformando con EBV los linfocitos B humanos antes de la fusión, la frecuencia de formación de células híbridas aumenta drásticamente, puesto que las células en división activa fusionan con una frecuencia más elevada, por lo que cuando se emplean células estimuladas con EBV en lugar de linfocitos aislados de sangre periférica (PBLs), la frecuencia de formación de células híbridas se incrementa de 5 a 10 veces (68, 69). Por otra parte, una población de células de estirpe B en activa proliferación también permite que puedan seleccionarse las especificidades más relevantes antes de tener lugar la fusión, si las células productoras del anticuerpo de la especificidad deseada están pobremente representadas.

II.- OBJETIVOS.

Para poder determinar el mecanismo de funcionamiento del sistema HLA humano, es preciso estudiar su característica más primordial, esto es su elevado grado de polimorfismo, tanto a nivel genético como bioquímico. Una etapa fundamental en la consecución de este objetivo consiste en la obtención de reactivos que, de esta forma, nos permitan diseccionar de una forma más precisa la compleja red de epitopos que componen una determinada molécula de este sistema, y, de igual modo, establecer relaciones entre ellas, para tratar de esclarecer los mecanismos que originaron la diversificación de estas moléculas.

Con la finalidad de abordar el análisis del polimorfismo a nivel bioquímico del sistema HLA, se plantearon los siguientes objetivos:

(1) Optimización de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra antígenos pertenecientes al sistema HLA, adaptándola a nuestros objetivos de trabajo y a las condiciones de nuestro laboratorio.

(2) Obtención de anticuerpos monoclonales humanos que reconozcan epitopos polimórficos de antígenos HLA, y que permitan no sólo la tipificación celular dentro de la especie humana, sino el hallazgo de nuevos polimorfismos, siempre a nivel bioquímico, de dicho sistema, que desempeñan un papel fundamental dentro del funcionamiento del sistema inmune.

III.- MATERIAL Y METODOS.

1.- MATERIAL.

Para la obtención de los tres anticuerpos monoclonales humanos utilizados en este estudio, se escogió a una paciente en lista de espera para trasplante renal, que había alcanzado un grado de hiperinmunización después de 4 transfusiones de sangre, puesto que al cabo de ese período de tiempo su suero mostraba una intensa actividad citotóxica (más del 90%) frente a un panel de células que cubrían la mayoría de las especificidades HLA conocidas. El suero de esta paciente no mostró, en ningún caso, autorreactividad.

Por otra parte, se emplearon líneas celulares B (BCLs) inmortalizadas mediante transformación con el virus de Epstein-Barr (EBV) procedentes del panel de líneas celulares del X Taller Internacional de Histocompatibilidad, que fueron cedidas generosamente por el Dr. R. J. Winchester del Hospital for Joint Diseases de Nueva York, así como BCLs procedentes de un panel de células local y de los diferentes miembros de distintas familias, que se construyeron expresamente para la realización de este trabajo. Las líneas B KNE y DK1 fueron amablemente cedidas por el Dr. J. A. López de Castro de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. La línea celular empleada en las fusiones fue el heteromiéloma SHM-D33, que se describirá con más detalle en el apartado 2.4.2.

Los anticuerpos monoclonales murinos W6/32, L243, TU22, B7/21, GSP88.2, IVD12, PLM2 y IIB3 fueron cedidos por el Dr. R. J. Winchester, mientras que el anticuerpo monoclonal de ratón SG157 fue un regalo de la Dra. S. Goyert, perteneciente, también, al Laboratorio de Immunogenética del Hospital for Joint Diseases de Nueva York. El anticuerpo monoclonal murino BB7.2 fue cedido por el Dr. S. Marsh del Laboratorio de Tipaje de Tejidos del Imperial Cancer Research Fundation de Londres.

2.- TECNICAS GENERALES DE CULTIVO DE CELULAS.

2.1.- Aislamiento de linfocitos de sangre periférica (PBLs).

La muestra de sangre se extrae por venipuntura (normalmente se extrajeron entre 10-20 ml) y se recoge directamente en tubos estériles con anticoagulante (heparin-litio), o bien en un matraz erlenmeyer que contenga bolitas de vidrio para desfibrinar (el proceso de desfibrinación consiste en agitar enérgicamente el erlenmeyer durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente).

La heparinización o la desfibrinación se emplean alternativamente, según la finalidad con la que se haya hecho la extracción; la heparinización es preferible si todo el proceso posterior ha de realizarse en condiciones estériles, siendo además mayor la obtención de células. La desfibrinación es mejor si se desea reducir al máximo la contaminación plaquetaria (como por ejemplo en las técnicas de tipaje HLA).

La sangre, una vez heparinizada o desfibrinada, se mezcla con tampón fosfato salino (PBS) (BioMérieux) en proporción 1:1. La mezcla se deposita cuidadosamente sobre ficoll-plenigraf (Pharmacia, Juste) ($d=1.077$) y se centrifuga durante 20 min a 800 g y a 18°C (70). Después de la

centrifugación, se extrae la fase de células mononucleares (PBMC) y se lava 3 veces mediante centrifugaciones durante 10 min a 700 g y resuspensiones sucesivas en PBS del botón celular. Las células, una vez lavadas, se cuentan en una cámara de Neubauer.

2.2.- Criopreservación de células.

La congelación de células y su conservación indefinida en nitrógeno líquido son dos técnicas fundamentales, porque permiten el almacenaje de seguridad de las mismas. Existen numerosas descripciones de técnicas empleadas en la congelación-descongelación; aquí describiremos la empleada en el presente estudio. Las células a congelar se resuspenden en RPMI-FCS+BMS (ver apartado 2.4.1) a una concentración que oscila entre $5-50 \times 10^6$ células/ml (lo ideal son alrededor de 10×10^6 células/ml), y se distribuyen en alícuotas de 1 ml en criotubos de 1.8 ml (Nunc), que se introducen en un baño de hielo.

Sobre esta suspensión celular se añaden, gota a gota, 0.5 ml de una solución de DMSO (Merck) al 30% en RPMI-FCS+BMS, previamente enfriada a 4°C. Tras ello, se cierran los criotubos y se agitan suavemente para mezclar el contenido, situándose, inmediatamente, en un congelador a -70°C dentro de una caja de corcho blanco cuyas paredes posean 1 cm de espesor, que se deja

a esa temperatura durante toda la noche. Al día siguiente, los criotubos se pueden almacenar en el contenedor de nitrógeno líquido.

La dilución del DMSO en el medio de cultivo, así como la adición de esta misma solución sobre las células, debe efectuarse a 4°C, debido a que se produce una liberación de calor importante. La función del DMSO en la criopreservación celular consiste en evitar la formación de cristales de hielo en el citoplasma celular.

La descongelación de los tubos se realiza por inmersión en baño a 37°C agitando con suavidad. A continuación, se pasa el contenido de cada criotubo a un tubo cónico de 50 ml (Nunc), y se añaden, gota a gota a cada tubo, 2.5 ml de medio de lavado (RPMI 1640, Biochrom, tamponado con 0.2 g/l de CO_2HNa y suplementado con un 10% de BMS, Biochrom) calentado previamente en baño a 37°C, en 2.5 min. En los 2.5 min restantes (el proceso dura en total 5 min), se continúa añadiendo medio de lavado hasta un volumen final de aproximadamente 15-20 ml, seguido de tres lavados por centrifugación-resuspensión en RPMI-BMS.

En este momento, es conveniente determinar el porcentaje de células vivas; para ello, se incuba la suspensión celular durante 1 h a 37°C, y se tiñe con una solución de azul

tripán al 0.4% en PBS, diluida a 1/2 con la suspensión. Contando el número de células teñidas con el azul tripán podremos determinar el porcentaje de células muertas. La viabilidad celular después de la descongelación es, en general, superior al 90%, lo que indica una buena recuperación celular.

2.3.- Obtención de líneas celulares B.

El EBV es un herpesvirus que se aisló por vez primera en 1964 de una línea celular en cultivo derivada de una biopsia de un linfoma de Burkitt africano (71), siendo el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa. La infección in vitro de los linfocitos B conduce a una situación permanente de crecimiento celular, fenómeno denominado immortalización o transformación. Esta immortalización preserva las características de la célula B original, incluyendo los receptores para el EBV, complemento, Igs de superficie e Igs secretadas. Aquellas células que portan DNA del EBV y crecen in vitro se denominan líneas celulares linfoblastoides (LCLs), o líneas celulares B (BCLs).

El EBV recomendado en trabajos con hibridomas y en todos los procesos de obtención de LCLs en general, es el derivado de la línea celular de marmoseta B95-8, por ser defectivo (72), esto es, es capaz de inducir la transformación



de linfocitos B humanos sin inducir la síntesis de las proteínas virales tempranas; como consecuencia, la replicación viral está bloqueada (73).

La línea celular B95-8 crece mejor en medios ricos, por lo que se cultiva en medio HT, compuesto de DMEM (Biochrom) tamponado con hepes (Biochrom) 20 mM, y suplementado con 10% NCTC 135 (Flow), 10% FCS (Biochrom), 10% BMS, L-glutamina 4 mM (Sigma), gentamicina (Biochrom) 50 $\mu\text{g/ml}$, hipoxantina 100 μM (Sigma), y timidina 16 μM (Sigma), a una densidad celular de $0.3-0.5 \times 10^6$ c/ml, cambiando el medio cada 2-3 días. Para la obtención de sobrenadantes de la línea B95-8 ricos en EBV, la línea celular se cultiva a una concentración de 0.15×10^6 células/ml (por ejemplo, se resuspenden un total de 7.5×10^6 células en 50 ml de HT), y se dejan crecer durante 7 días sin cambiar el medio. Pasado este tiempo, se recoge el sobrenadante centrifugando a 700 g durante 10 min y se filtra a través de 0.45 μm (el empleo de filtros de tamaño de poro menor provoca la retención del virus). Los sobrenadantes se pueden almacenar a 4°C hasta un máximo de 3 meses, aunque también pueden congelarse a -70°C. Una vez descongelado un sobrenadante, no se debe recongelar.

Para la transformación, los sobrenadantes suelen emplearse a una dilución de 1:3 o 1:4 en medio de cultivo, siendo necesario, pues, un ensayo previo para determinar la

dilución óptima. Es muy importante asegurarse de que el sobrenadante rico en virus se encuentre libre de micoplasma o de cualquier otra infección.

La obtención de BCLs se lleva a cabo a partir de PBLs aislados mediante ficoll-plenigraf tal y como se describe en el apartado 2.1. A continuación, se resuspenden los PBLs a una densidad de 0.75×10^6 células/ml en medio HT suplementado con 2 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina (CSA, Sandoz) y sobrenadante rico en EBV a la dilución apropiada, sembrándose en una placa de 24 pocillos (Costar), a razón de 1.5×10^6 células/2 ml/pocillo.

Las placas se incuban durante 24 h a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y condiciones saturantes de humedad. Pasado este tiempo, se aspira la mitad del medio aproximadamente de cada pocillo, cuidando de no arrastrar la capa de células del fondo, y se reemplaza con 1 ml de HT+CSA fresco, incubando a continuación la suspensión celular durante 7 días en idénticas condiciones a las descritas anteriormente.

Una vez transcurridos los 7 días, se cambia el medio (HT+CSA) cada 3-4 días, observando en microscopio invertido de contraste de fases la formación y el posterior crecimiento de las colonias de células B transformadas. Cuando aparezcan colonias de buen tamaño (se pueden apreciar a simple vista en el fondo del pocillo), se resuspenden las células del pocillo y se

transfiere la mitad del volumen total del mismo a uno nuevo, añadiendo 1 ml de medio fresco a cada pocillo. Cuando 8 o más pocillos de la placa de 24 se hallen repletos de colonias abundantes y de buen tamaño, se transfiere la suspensión celular a un frasco de cultivo de 25cm² (Nunc).

La ciclosporina se ha de mantener en el medio de cultivo hasta la desaparición total de los linfocitos pequeños en la suspensión celular, ya que, de otra forma, la línea sería suprimida. En determinadas ocasiones, pueden observarse células tipo monocito/macrófago adheridas al fondo de los pocillos. Estas células deben ser eliminadas para que no destruyan las colonias de LCLs en formación; para ello, se transfiere el contenido del pocillo a uno nuevo, los monocitos quedarán adheridos al pocillo antiguo y no pasarán al nuevo. Este proceso se repite todas las veces que sea necesario. De la BCL así obtenida deben congelarse al menos 10 viales para su almacenamiento en nitrógeno líquido.

2.4.- Cultivo de líneas celulares.

2.4.1.- Cultivo de líneas B linfoblastoides.

Para la caracterización de la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos producidos, se emplearon,

además de PELs, líneas celulares B mantenidas en cultivo in vitro procedentes de:

(a) Panel local de BCLs.

(b) Panel de BCLs procedentes del X Taller Internacional de Histocompatibilidad.

(c) Panel de BCLs de los diferentes miembros de distintas familias.

Estas líneas celulares difieren entre sí en los antígenos HLA que expresan en su superficie, y vienen a cubrir casi todas las especificidades HLA conocidas.

Todas estas BCLs se conservan congeladas en nitrógeno líquido, y deben descongelarse unos días antes de su utilización para que puedan ser utilizadas en perfectas condiciones de viabilidad. Las líneas se cultivan a una temperatura de 37°C, en incubador con atmósfera de CO₂ al 5% y condiciones saturantes de humedad, empleando como medio de cultivo RPMI 1640 (Biochrom) tamponado con 0.2 g/l de CO₃HNa₂ (BDH) y suplementado con 2 mM L-glutamina (Sigma), 10% FCS (Biochrom), 10% BMS (Biochrom) y 50 µg/ml de gentamicina (Biochrom) (RPMI-FCS+BMS), a una densidad que oscila entre 0.25 y 0.5x10⁶ células/ml, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

2.4.2.- Cultivo de heteromiomas y heterohibridomas.

En este apartado se hará referencia, en primer lugar, a las condiciones de cultivo de la línea mielomatosa híbrida ratón-humana SHM-D33 (74), que se utiliza para la generación de heterohibridomas humanos productores de anticuerpos monoclonales. Esta línea fue cedida generosamente por la Dra. Vitalia Dessi de la Cátedra de Inmunología de la Universidad de Génova, y procede originalmente del laboratorio de H. S. Kaplan.

Con esta línea celular se han realizado todas las fusiones para la obtención de anticuerpos monoclonales humanos. Este heteromioma no secretor de ningún tipo de anticuerpo o cadena componente del mismo, se conserva congelado en nitrógeno líquido, descongelándose, aproximadamente, una semana antes de ser utilizado para las fusiones, con el objeto de que se encuentre en fase de crecimiento exponencial. Estas células cuando se cultivan en frascos presentan la propiedad de adherirse ligeramente a la base de plástico, por lo que para ser recogidas deben ser despegadas mediante pipeteo enérgico de la superficie de plástico del frasco de cultivo.

La línea SHM-D33 posee la propiedad de ser resistente a 6-tioguanina (6-TG), por lo que es capaz de crecer en un medio que contenga este análogo de las purinas. Las células normales mueren al ser cultivadas en este medio, ya que poseen la enzima

denominada hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT) e incorporan 6-TG a su DNA, por lo que mueren. Las células SHM-D33 carecen de esta enzima, por lo que son incapaces de incorporar la 6-TG del medio. Por otra parte, las células humanas presentan una sensibilidad 1000 veces mayor que las murinas al inhibidor de la bomba Na-K de la membrana plasmática denominado ouabaína (OUA). La línea celular híbrida SHM-D33 es capaz de crecer a concentraciones de OUA letales para las células de origen humano. Ambas propiedades, la de carecer de la enzima HGPRT, así como la de ser resistente a OUA, son el fundamento del método de selección de los heterohibridomas.

Cuando las células del heteromioma SHM-D33 se mantienen durante mucho tiempo en cultivo, pueden aparecer revertientes HGPRT⁺, por lo que es aconsejable mantenerlas en cultivo en presencia de una concentración de 20 µg/ml de 6-TG, así como de OUA 10 µM, para asegurar que las células supervivientes sean resistentes a ambas drogas. No obstante, al menos 48 h horas antes de la fusión es recomendable eliminar ambas sustancias del medio de cultivo.

Tanto el heteromioma SHM-D33 como los heterohibridomas derivados del mismo, se cultivan en idénticas condiciones de humedad y temperatura que las líneas descritas en el apartado anterior, empleando como medio de cultivo RPMI 1640 (Biochrom) tamponado con 0.2 g/l de CO₂HNa₂ (BDH) y suplementado

con 2 mM L-glutamina (Sigma), 10% FCS (Biochrom), 10% BMS (Biochrom) y 50 µg/ml de gentamicina (Biochrom) (RPMI-FCS+BMS), a una densidad que oscila entre 0.05 y 0.1×10^6 células/ml, y cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

3.- OBTENCION DE LINEAS CELULARES B SECRETORAS DE ANTICUERPOS ANTILINFOCITARIOS.

A partir de 20 ml de sangre periférica de la paciente RR, se aislaron 10×10^6 PBLs, que se resuspendieron en medio HT+CSA (ver apartado 2.3) conteniendo sobrenadante rico en EBV, sembrándose, seguidamente, a razón de 100.000 células por pocillo, en 1 placa de 96 pocillos, y siguiendo las pautas para la obtención de BCLs expuestas en el apartado 2.3. Bajo estas condiciones de cultivo, todos los pocillos presentaron crecimiento celular al cabo de 15-20 días, momento en el que se procedió a los primeros ensayos de la actividad antilinfocitaria de los sobrenadantes de los cultivos de los pocillos, sobre un pequeño panel de líneas B representativas de diferentes especificidades HLA. Para ello, se escogió una técnica de ELISA que empleaba células enteras fijadas con glutaraldehído como antígeno (CELISA), y que se halla descrita detalladamente en el apartado 5.1.

Una vez seleccionados los pocillos de los cultivos cuyos sobrenadantes presenten actividad antilinfocitaria, éstos deben clonarse lo antes posible, puesto que dado que la frecuencia de transformación es relativamente alta, estos cultivos primarios habitualmente están compuestos por más de un clon, de los que tal vez uno sólo esté produciendo el anticuerpo

de interés. El clonaje se efectúa a baja dilución; para ello se resuspenden todas las células del pocillo con el cultivo a clonar, se cuentan y, en función del número de células obtenido, se diluyen en medio de cultivo HT (ver apartado 4.3) mezclado en proporción 1:1 con medio condicionado procedente de una BCL, y se resiembran en placas de 96 pocillos de fondo en "U" a razón de 100-50 células por pocillo en un volumen de 100 μ l.

Cuando se siembran las líneas B a diluciones muy bajas (menos de 50 células en cada pocillo de la placa de cultivo de 96 pocillos), no son capaces de proliferar y mueren a los pocos días. Para evitar ésto, el clonaje se efectúa empleando medio condicionado y sobre una capa de células nutritoras ("feeder layer"). Para la preparación del medio condicionado se resuspenden 10^8 células de una BCL cualquiera, que deben hallarse en fase de crecimiento exponencial, en 400 ml de RPMI-FCS+BMS, y se cultivan durante 4-5 días sin cambiar el medio. Una vez transcurrido este tiempo, se pasa el contenido de la botella de cultivo a tubos de fondo cónico de 50 ml (Nunc) que se centrifugan durante 10 min a 700 g, recogiendo el sobrenadante, que se pasa a través de un filtro de 0.45 μ m (Costar) de diámetro de poro, para ser posteriormente dividido en alícuotas de 50 ml cada una de ellas, que se almacenan a -70°C hasta su uso.

Como células nutritoras se ensayaron PBLs alogénicos

previamente irradiados a una dosis de 3000 rads. Las células nutridoras se siembran a razón de 2×10^4 células en cada pocillo de una placa de 96 de fondo en "U", 24 h antes de la inoculación del heterohibridoma que se desea clonar, y en un volumen de 100 μ l de medio HT.

Las placas así sembradas se incuban a 37°C, en condiciones de humedad saturante y en atmósfera de CO₂ al 5%, durante 2-3 semanas, cambiando el medio cada 3-4 días. Al cabo de este tiempo, se puede observar crecimiento celular en algunos pocillos, por lo que será preciso volver a ensayar por CELISA los sobrenadantes correspondientes para seleccionar aquellos que presenten un actividad más elevada. Esta etapa de clonaje a baja dilución se repite varias veces con los cultivos de aquellos pocillos cuyos sobrenadantes posean la actividad antilinfocitaria más elevada.

Una vez completada esta etapa de enriquecimiento, las BCLs se crecen y expanden en RPMI-FCS+BMS a volúmenes mayores; primero a pocillos de 1 ml (placas de 48 pocillos, Costar), a continuación a pocillos de 2 ml de placas de 24 pocillos (Costar), después a frascos pequeños de 25 cm² (Costar o Nunc), y así sucesivamente, cambiando entonces el medio cada 2-3 días, hasta que se alcanza un número de células suficiente para la fusión ($5-10 \times 10^6$ células). Es importante congelar algunos viales de estas BCLs, para poder repetir la fusión si es necesario.

4.- GENERACION DE HETEROHIBRIDOMAS.

Las fusiones se llevaron a cabo entre líneas B linfoblastoides secretoras de anticuerpos antilinfocitarios procedentes de una paciente hiperinmunizada en lista de espera para trasplante renal, y el heteromieloma SHM-D33. La generación de las células híbridas se llevó a cabo mediante la técnica descrita por A. M. Campbell (75), con una serie de pequeñas modificaciones introducidas para conseguir un mejor rendimiento en la obtención de híbridos.

4.1.- Preparación del polietilenglicol.

Pesar 10 g de polietilenglicol 1500 (PEG) (Merck) en un frasco de vidrio color ámbar y esterilizarlo en el autoclave durante 15 min a 120°C. Se puede dejar solidificar y volverlo a fundir calentándolo en baño a 60°C. Mientras el PEG permanece líquido, se añaden 12.5 ml de RPMI 1640 sin suero precalentado a 37°C y 2.5 ml de DMSO, mezclando bien (concentración final: PEG 40%, DMSO 10%, en RPMI). El pH se ajusta, si es necesario, a 7.5 con una solución de NaOH 0.1 N estéril. Esta solución se puede almacenar a temperatura ambiente protegida de la luz durante 2-3 semanas.

4.2.- Fusión celular.

Se mezclan 5×10^6 células procedentes de la línea B linfoblastoide con 5×10^6 células del heteromiéloma SHM-D33 (proporción 1:1), en un tubo de 50 ml de fondo cónico (Nunc), centrifugando, a continuación, a 500 g durante 10 min. El botón celular se resuspende y se lava 2 veces con RPMI sin suero; la centrifugación correspondiente al último lavado se realiza a 500 g durante 5 min, tras la cual se elimina el sobrenadante lo mejor posible y se resuspende el botón celular con suavidad para que las células se queden recogidas en el fondo del tubo. Sobre el sedimento celular se añaden gota a gota en la secuencia y tiempos que se indican seguidamente:

1.- Usando una pipeta de 2 ml, 2 ml de solución de PEG, previamente calentada a 37°C , durante 30 s, agitando suavemente la suspensión celular durante todo el tiempo.

2.- Continuar agitando suave y lentamente el botón celular durante 30 s más (debe evitarse pipetear la suspensión, ya que ésto rompería las células). El objetivo consiste en exponer las células a la solución de PEG mientras se trata de mantener el mayor contacto celular posible.

3.- Dejar reposar la mezcla otros 30 s y, a continuación, añadir 5 ml de RPMI sin suero, previamente calentado a 37°C , durante 2

min, agitando las células suavemente durante todo el tiempo con la punta de la pipeta. La adición lenta del medio sirve para diluir gradualmente el PEG sin lisar las células.

4.- Añadir otros 5 ml de RPMI sin suero de una vez, y dejar reposar la suspensión celular durante 6 min.

Una vez terminado el proceso de fusión, se centrifugan suavemente las células a 300 g durante 5 min, tras lo cual se elimina completamente el sobrenadante. Las células se resuspenden muy suavemente en 20 ml de medio de cultivo HATO, compuesto de DMEM (Biochrom) tamponado con hepes (Biochrom) 20 mM, y suplementado con 10% NCTC 135 (Flow), 10% FCS, 10% BMS, 1% de solución de aminoácidos no esenciales (Biochrom), L-glutamina 4 mM, gentamicina 50 µg/ml, 2-mercaptoetanol 10 µM (Sigma), hipoxantina 100 µM (Sigma), aminopterina 0.4 µM (Sigma), timidina 16 µM (Sigma), y OUA 0.5 µM (Sigma), precalentado a 37°C.

La suspensión celular se siembra, entonces, en una placa de 96 pocillos de fondo plano (Nunc), evitando pipetear excesivamente, a razón de 0.2 ml/pocillo (10^5 células/pocillo). Paralelamente, se siembran como controles 10^5 células de cada célula parental en sendos pocillos de la misma placa.

4.3.- Selección de las células híbridas.

La placa con la suspensión celular se incuba durante una semana a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y en condiciones de saturación de humedad. A partir de la primera semana, se aspira la mitad del medio (HATO) de cada uno de los pocillos y se sustituye por medio fresco cada 3-4 días; de esta forma se eliminan parte de los detritus celulares que se generan por el tratamiento con PEG y por la mortalidad celular que se produce como consecuencia de la inclusión de aminopterina y OUA en el medio de cultivo. Paralelamente, debe observarse en microscopio invertido de contraste de fases la aparición de colonias de células híbridas.

De esta forma, las únicas células que podrán crecer en el medio HATO, serán los heterohíbridos entre SHM-D33 y la BCL, ya que gracias a la información genética de esta última podrán sintetizar la enzima HPGRT, mientras que el heteromieloma le aporta la resistencia a OUA y su "maquinaria" celular para la síntesis eficiente y continua de anticuerpos, cuya especificidad vendrá determinada por la BCL humana.

Los primeros híbridos pueden detectarse a los 7-12 días después de la fusión. En los pocillos control, las células parentales deben estar muertas a los 8-10 días después de la fusión. En general, al cabo de 20-25 días los clones de células

híbridas se hallan lo suficientemente crecidos como para comenzar a estudiar la presencia de anticuerpos en sus sobrenadantes mediante CELISA (ver apartado 5.1). Cuando las células de las dos líneas parentales sin fusionar aparezcan muertas en los pocillos de control, podemos eliminar la aminopterina y ouabaina del medio de cultivo, lo cual suele suceder, aproximadamente, a las 2 semanas después de la fusión; el medio de cultivo sin estas 2 drogas se denomina HT. Es conveniente repetir, al cabo de unas 2 semanas, aproximadamente, en ensayo de la actividad antilinfocitaria de aquellos sobrenadantes positivos, con el objeto de confirmar la estabilidad de la producción de anticuerpos por las células híbridas.

4.4.- Clonaje de los heterohíbridomas.

Una vez seleccionados los pocillos de los cultivos cuyos sobrenadantes presenten actividad antilinfocitaria, deben clonarse, puesto que estos cultivos primarios pueden estar compuestos por más de un clon, de los que tal vez uno sólo esté produciendo el anticuerpo monoclonal humano de interés. El clonaje se efectúa mediante la técnica de dilución límite; para ello se resuspenden todas las células del pocillo con el cultivo a clonar, se cuentan, y, en función del número de células obtenido, se diluyen en medio de cultivo HT mezclado en

proporción 1:1 con medio condicionado procedente del mieloma parental, y se resiembran en placas de 96 pocillos de fondo en "U" a razón de 5-1 células por pocillo en un volumen de 100 μ l.

Cuando se siembran los heterohibridomas a diluciones muy bajas (menos de 20 células en cada pocillo de la placa de cultivo de 96 pocillos), no son capaces de proliferar y mueren a los pocos días. Para evitar ésto, el clonaje se efectúa empleando medio condicionado y sobre una capa de células nutritoras. Para la preparación del medio condicionado se resuspenden 2×10^7 células del heteromieloma SHM-D33, que deben hallarse en fase de crecimiento exponencial, en 400 ml de RPMI-FCS+BMS, y se cultivan durante 4-5 días sin cambiar el medio. Una vez transcurrido este tiempo, se pasa el contenido de la botella de cultivo a tubos de fondo cónico de 50 ml (Nunc) que se centrifugan durante 10 min a 400 g, recogién dose el sobrenadante, que se pasa a través de un filtro de 0.45 μ m (Costar) de diámetro de poro, para ser posteriormente dividido en alícuotas de 50 ml cada una de ellas, que se almacenan congeladas a -70°C hasta su uso.

Como células nutritoras se ensayaron PBLs alogénicos previamente irradiados a una dosis de 3000 rads, y células linfoides aisladas de pacientes diagnosticados de leucemia linfoide crónica de células B (LLC-B) que presentaban más de un 90% de células leucémicas en sangre periférica, y cuyo estudio

fenotípico de superficie había demostrado su carencia de receptor para EBV (CD21). Dichas células de LLC-B se emplearon sin irradiar, dado que en nuestra experiencia previa al tratar de establecer líneas celulares espontáneas procedentes de células de sangre periférica de pacientes con distintos tipos de síndromes linfoproliferativos, habíamos observado que las células de LLC-B morían, sin excepción, al cabo de una semana de su puesta en cultivo. Las células nutridoras se siembran a razón de 2×10^4 células en cada pocillo de una placa de 96 de fondo en "U", 24 h antes de la inoculación del heterohibridoma que se desea clonar, y en un volumen de 100 μ l de medio HT.

Las placas así sembradas se incuban a 37°C, en condiciones de humedad saturante y en atmósfera de CO₂ al 5%, durante 2-3 semanas, cambiando el medio cada 3-4 días. Al cabo de este tiempo en algunos pocillos se habrán generado clones aislados de heterohibridomas, por lo que será preciso volver a ensayar por CELISA los sobrenadantes correspondientes para verificar si están constituidos por el clon productor de los anticuerpos que nos interesan. Esta etapa de clonaje se repite con los cultivos de aquellos pocillos procedentes del primer clonaje cuyos sobrenadantes hallan vuelto a dar prueba de poseer anticuerpos con actividad antilinfocitaria.

Los heterohibridomas ya clonados se crecen y expanden en RPMI-FCS+BMS a volúmenes mayores; primero a pocillos de 1 ml

(placas de 48 pocillos, Costar), a continuación a pocillos de 2 ml de placas de 24 pocillos (Costar), después a frascos pequeños de 25 cm² (Costar o Nunc), y así sucesivamente, cambiando entonces el medio cada 2-3 días. Es muy importante congelar y almacenar en nitrógeno líquido, conforme vayan creciendo los hibridomas, un mínimo de 10 viales de cada clona, para tener copias de seguridad en caso de contaminación u otro accidente.

El último paso consiste en la obtención de sobrenadantes ricos en anticuerpo monoclonal humano para su posterior estudio y completa caracterización; para ello se cultivan las células a una concentración de 0.05×10^6 c/ml durante 5-7 días en frascos de cultivo, sin cambiar el medio. Una vez transcurrido este tiempo, se pasa el contenido de la botella de cultivo a tubos de fondo cónico de 50 ml (Nunc) que se centrifugan durante 10 min a 700 g, recogiendo el sobrenadante, que se pasa a través de un filtro de 0.45 μ m (Costar) de diámetro de poro, para ser posteriormente dividido en alícuotas de 4 ml cada una de ellas, que se almacenan a -70°C hasta su uso.

5.- ESTUDIO Y CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS DE LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS.

5.1.- Determinación de actividad antilinfocitaria en los sobrenadantes.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima sobre células (CELISA), es el método de elección para el primer estudio ("screening") de la actividad antilinfocitaria de los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de los cultivos de BCLs y de heterohibridomas. Para ello, es necesaria la construcción de un panel que comprenda un número reducido de células que sean representativas de las especificidades HLA frente a las cuales el suero de la paciente mostró reacciones de citotoxicidad.

La primera etapa consiste en adherir una suspensión de BCLs a placas de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech), previamente tratadas con poli-L-lisina: se añaden 100 μ l de una solución de Poli-L-Lys (Sigma) a 5 mg/l en PBS, a cada pocillo de una placa de 96. La placa con la preparación se cubre con parafilm para prevenir la evaporación y se incuba durante 1h a 37°C o durante 2 h a temperatura ambiente. Mientras tanto, se lavan las BCLs del panel 3 veces con PBS, resuspendiéndose tras la última etapa de lavado en este mismo tampón a una

concentración de 2×10^6 células/ml.

Una vez transcurrido el correspondiente tiempo de incubación, se elimina la Poli-L-Lys de los pocillos para añadir, a continuación, 100 μ l de suspensión celular (2×10^6 células) a cada pocillo, centrifugando las placas durante 5 min a 700 g. Se añaden 50 μ l/pocillo de solución de glutaraldehído (glutaraldehído 25% BDH) al 0.5% en PBS, y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente.

Se realizan 2 lavados por inmersión de las placas en PBS y se secan invirtiendo la placa sobre celulosa. Para prevenir uniones no específicas y bloquear los lugares activos remanentes del glutaraldehído, se llenan todos los pocillos de la placa con 200 μ l de una solución de glicina 1 mM (Sigma), BSA 1% (Sigma) en PBS, y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. En este momento pueden congelarse las placas y conservarse a -80°C hasta su utilización.

La siguiente etapa, tanto si las placas han sido descongeladas o no, son 3 lavados con TTBS (Tris 20 mM, ClNa 500 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.5), y secado de las placas por inversión sobre celulosa. A continuación, se añaden 100 μ l del sobrenadante a ensayar en cada pocillo (los sobrenadantes se extraen directamente de la placa de cultivo), y las placas se incuban durante 2 h a temperatura ambiente. Asimismo, deberán

incluirse controles positivos y negativos por triplicado; como control negativo se emplea medio de cultivo fresco, y como control positivo el suero de algún paciente hiperinmunizado.

Después de lavar 3 veces con TBS, la placa se deja secar como antes, y a cada pocillo se añaden 100 μ l de un antisuero de conejo frente a IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina (Dako) diluido 1/1000 en tampón de anticuerpo (suero normal de cabra al 2% en TBS), incubando las placas durante 2 h a temperatura ambiente. Se llevan a cabo 3 lavados con TBS y las placas se dejan secar invertidas sobre papel absorbente.

A cada pocillo se añaden, entonces, 100 μ l de solución de sustrato. Como sustrato se emplea PNPP (para-nitro-fenil-fosfato, Sigma) a 1 mg/ml en tampón dietanolamina (DEA, Sigma) (DEA 1M, Cl_2Mg 0.5 mM, pH 9.8). Las placas se incuban durante 30-60 min aproximadamente (es necesario vigilar la reacción para evitar un desarrollo excesivo de color) a temperatura ambiente. La reacción se frena con 50 μ l de una solución de NaOH (Fluka) 1 N, tras lo cual se procede a transferir con una pipeta multicanal 100 μ l de cada pocillo a una placa nueva. La densidad óptica (DO) de las muestras se lee a 405 nm en un lector automático de placas de ELISA (Bio-Tek). El color es estable durante algunas horas.

5.2.- Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales humanos.

Es importante conocer el tipo de cadena ligera y la subclase de IgG de cada uno de los anticuerpos monoclonales, porque algunas de las propiedades del anticuerpo dependerán de ello; entre éstas cabe destacar la capacidad del anticuerpo de fijar proteínas del complemento, es decir su citotoxicidad, y la unión a proteína A que nos informa acerca de sus posibilidades de purificación mediante cromatografía de afinidad.

El método empleado para la determinación del tipo de cadena ligera y del subtipo de IgG de los tres anticuerpos monoclonales humanos, es el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). El primer paso consiste en la adsorción de las antiinmunoglobulinas específicas para los distintos tipos de cadena ligera y los subtipos de IgG a placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Costar 3590). Para ello se disuelven los antisueros correspondientes (ver más adelante) en tampón de adsorción carbonato-bicarbonato pH 9.6 (1.59 g/l de CO_3Na_2 , 2.93 g/l de CO_3HNa , y 0.2 g/l N_3Na), a una concentración final, aproximada, de 2 $\mu\text{g/ml}$, añadiendo 100 μl de esta solución a cada pocillo de la placa (concentración final aproximada: 200 ng/pocillo).

Los antisueros empleados para la determinación del

tipo de cadena ligera, tanto en su forma simple como conjugada a peroxidasa (HRP), se adquirieron de la marca comercial Dako. La determinación de la subclase de Igs se llevó a cabo utilizando anticuerpos monoclonales murinos sin conjugar frente a IgG₁-IgG₄, y un anticuerpo monoclonal murino frente a cadenas τ conjugado a HRP, todos ellos de Sigma.

La placa con la preparación se cubre con parafilm para prevenir la evaporación y se incuba durante 1h a 37°C. A continuación, se procede a la eliminación del anticuerpo no adsorbido, lavando los pocillos de la placa de ensayo con PBS-Tween (Tween-20, Sigma, al 0.05% en PBS). Finalmente, las placas se dejan secar invertidas sobre papel absorbente. Para prevenir uniones no específicas, se llenan todos los pocillos con 200 μ l de solución de bloqueo (BSA al 3% en PBS), incubando durante 1 h a temperatura ambiente, lavando entonces los pocillos tres veces con PBS-Tween. Dejar secar las placas invertidas sobre papel absorbente.

La siguiente etapa consiste en la fijación de las muestras al antisuero adsorbido, para lo cual se añaden a cada serie de pocillos correspondientes 100 μ l de sobrenadante a analizar (por triplicado) para cada determinación. Como controles negativo y positivo se emplean también por triplicado, respectivamente, 100 μ l/pocillo de medio de cultivo fresco y 100 μ l/pocillo de un aloantisuero procedente de un individuo

hiperinmunizado. Las placas se incuban durante 1 h a temperatura ambiente.

A continuación, se lavan los pocillos 5 veces con PBS-Tween y se dejan secar las placas invertidas sobre papel absorbente. A cada pocillo se añaden después 100 μ l de anticuerpo conjugado con peroxidasa diluida a 1/3000 en tampón de anticuerpo (suero normal de cabra al 2% en PBS-Tween), incubando durante 1 h a temperatura ambiente y lavando, a continuación, las placas 5 veces con PBS-Tween de idéntica manera que en el paso anterior. Se añaden 100 μ l/pocillo de solución de sustrato recién preparada (10 mg ABTS, Sigma, 60 μ l de H₂O₂ al 10% en 100 ml de tampón citrato 24 mM, PO₄HNa₂ 51 mM, pH 5.0), y se incuba durante 30-60 min, aproximadamente, (es necesario vigilar la reacción para evitar un desarrollo excesivo de color) a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se frena con 50 μ l de SO₄H₂ 3N. La lectura de la DO de los sobrenadantes se efectúa a 405 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek).

5.3.- Cuantificación de las Igs secretadas por los heterohíbridos.

Se realiza de forma esencialmente idéntica al método descrito en el apartado anterior, utilizando el mismo tipo de

placas y tampones. El primer paso consiste en la adsorción de un antisuero de conejo dirigido frente a IgG humana (Dako) a placas de 96 pocillos de fondo plano, a una concentración de unos 2 $\mu\text{g/ml}$ en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6, añadiendo 100 μl de esta solución a cada pocillo de la placa (concentración final aproximada: 200 ng/pocillo).

La placa con la preparación se incuba durante 1h a 37°C. A continuación, se procede a la eliminación del anticuerpo no adsorbido, lavando los pocillos de la placa de ensayo con PBS-Tween. Finalmente, las placas se dejan secar, llenándose todos los pocillos con 200 μl de solución de bloqueo, incubando durante 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual se lava tres veces con PBS-Tween.

La siguiente etapa consiste en la fijación de las muestras al antisuero adsorbido, para lo cual se añaden a cada serie de pocillos correspondientes 100 μl de cada una de las siguientes concentraciones (por triplicado) de IgG humana purificada estándar (Nordic) disuelta en PBS:

1.5 ng/ml; 3.0 ng/ml; 6.0 ng/ml; 12.0 ng/ml; 25.0 ng/ml; 50.0 ng/ml; 100 ng/ml; 200 ng/ml; y 400 ng/ml.

También se añaden 100 μl , por triplicado, de cada uno de los sobrenadantes del cultivo diluidos al 1/100-1/500.

Asimismo, se incluyen 100 μ l, por triplicado, de medio fresco y de un aloantisuero procedente de un individuo hiperinmunizado como controles negativo y positivo, respectivamente. Las placas se incuban durante 1 h a temperatura ambiente, lavando a continuación 5 veces con PBS-Tween. A cada pocillo se añaden después 100 μ l de un antisuero de conejo frente a IgG humana conjugado con peroxidasa (Dako) diluído 1/3000 en tampón de anticuerpo, y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente, lavando, a continuación, las placas 5 veces con PBS-Tween.

Se añaden 100 μ l/pocillo de solución de sustrato recién preparada, y se incuba durante 30-60 min, aproximadamente, vigilando la reacción para evitar un desarrollo excesivo de color, a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se frena con 50 μ l de SO_4H_2 3N. La lectura de la DO de los sobrenadantes se efectúa a 405 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek). Con los valores de DO obtenidos para las diferentes concentraciones de la solución de IgG estándar, se construye una curva de calibrado de IgG, de la que se extrapolan los valores obtenidos con las muestras a cuantificar.

5.4.- Estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) se ha utilizado

en la determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos obtenidos. Esta técnica se realiza en tubos de polipropileno de 5 ml aptos para el citofluorímetro (FACScan, Becton Dickinson), en los que se dispensan $3-5 \times 10^5$ células/100 μ l de PBS/BSA (0.1% BSA, 0.02% Na_2Na en PBS) y 50 μ l del sobrenadante conteniendo el anticuerpo monoclonal que corresponda sin diluir (primer anticuerpo), y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente.

Para evitar interferencias o falsos positivos, las Igs de superficie de las BCLs empleadas en el estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos se bloquearon previamente, mediante incubación de la suspensión celular con 10 μ l de un antisuero de conejo frente a Igs totales humanas (Dako), durante 10 min a temperatura ambiente, seguida de un lavado en PBS/BSA (700 g durante 5 min).

Tras la incubación con el primer anticuerpo, la suspensión celular se lava 3 veces por centrifugación-resuspensión en PBS/BSA. En la segunda etapa se añaden a la suspensión celular 10 μ l de un antisuero de conejo (porción F(ab')_2) frente a IgG humana (Dako) conjugado a isotiocianato de fluoresceína, a la dilución recomendada por el fabricante, y se incuba durante 20 min a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, se realizan 3 lavados por centrifugación-resuspensión en PBS/BSA.

A continuación, se procede al análisis de la muestra, bien en microscopio o en el citofluorímetro. Si no es posible analizar las células en ese día, se pueden fijar en 1 ml de solución de paraformaldehído (PFA, Kodak) al 1% en suero fisiológico y mantenerse a 4°C durante una semana. Las células pueden volver a ser analizadas o visualizadas previo lavado con PBS/BSA. Para realizar la lectura al microscopio, se resuspende el botón celular, tras el último lavado, en 30 μ l de PBS/glicerol (Merck) 1:1, y se toman 3 μ l de esta suspensión, que se sitúan sobre un porta, colocando a continuación un cubre circular de 12 mm de diámetro. La muestra se examina en microscopio de epifluorescencia (Leitz).

Los datos obtenidos de la observación de las células teñidas en el microscopio de fluorescencia se confirman en el citofluorímetro. Para ello, se lavan las células resuspendidas en glicerol con PBS/BSA, se resuspenden a su vez en 200 μ l de PBS y se analizan en el FACScan. Para cada célula examinada se ajustan los niveles de ganancia de los fotomultiplicadores con el propósito de maximizar la intensidad del control positivo y reducir la intensidad del control negativo. El análisis de las células teñidas se efectuó mediante histogramas en los que se examinaba el número de células frente a intensidad de fluorescencia (que nos da idea de la densidad de los antígenos de superficie reconocidos por el anticuerpo monoclonal en cuestión).

La intensidad de fluorescencia se puntuó como -, +, ++, o +++, basándose en la posición del canal del pico de intensidad de fluorescencia, dividiendo la escala logarítmica de intensidades en 4 segmentos de igual tamaño. Como control negativo se empleó el tampón de lavado PBS/BSA sin ningún anticuerpo, mientras que como control positivo se utilizó un suero humano procedente de un enfermo renal politransfundido, fuertemente citotóxico frente a la mayoría de las especificidades HLA conocidas.

5.5.- Microcitotoxicidad en placa de Terasaki.

Esta técnica se emplea con una finalidad muy concreta, consistente en determinar si los anticuerpos monoclonales humanos secretados por los heterohibridomas son capaces de provocar la lisis celular mediada por complemento. De esta forma, podemos analizar un determinado sobrenadante sobre un panel seleccionado de células previamente tipadas que cubran todo el espectro de especificidades HLA, y confirmar o descartar su validez como reactivo de tipaje mediante la técnica estándar de microlinfocitotoxicidad del NIH.

Para este tipo de estudio se emplean placas de Terasaki de 60 pocillos (Greiner), en los que se dispensa 1 μ l de la dilución (en PBS) correspondiente del anticuerpo

monoclonal a ensayar (1:1, 1:10, 1:50 1:100, 1:500 y 1:1000) y 1 μ l de una suspensión celular, a una concentración de 5×10^6 células/ml en PBS (5000 células por pocillo). Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente se añaden 6 μ l/pocillo de complemento de conejo (Behring). Al término de otra incubación, esta vez de 1 h, a temperatura ambiente, se añaden 3 μ l por pocillo de una solución de eosina (Merck) al 5% pH 7.2; y al cabo de 3 min, 6 μ l/pocillo de formol (Quimón) a pH 7.2.

Se dejan sedimentar las células durante 1 h, aproximadamente, y la lectura de los resultados se realiza en microscopio invertido de contraste de fases. Esta lectura consiste en efectuar una estimación visual del porcentaje de mortalidad celular producida por cada uno de los anticuerpos monoclonales humanos sobre cada una de las células estudiadas, de acuerdo a la siguiente escala:

<u>% mortalidad celular</u>	<u>puntuación</u>
80-100	8
60-80	6
40-60	4
20-40	2
0-20	-

5.6.- Técnica de MAILLA.

El análisis del tipo de molécula HLA reconocida por los anticuerpos monoclonales humanos se efectuó mediante una modificación de la técnica denominada MAILLA (76), que consiste, esencialmente, en incubar simultáneamente ECLs fijadas en PFA con un anticuerpo monoclonal murino específico para un tipo de molécula HLA (ver tabla 1), y el anticuerpo monoclonal humano objeto de estudio. Después de eliminar todo el material particulado mediante centrifugación, los lisados de células se transfieren a placas de microtiter recubiertas con un antisuero

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	DILUCION	REFERENCIAS
W6/32	HLA-A, B, C	NO	77
L243	HLA-DR	1:200	78
TU22	HLA-DQ	1:100	79
B7/21	HLA-DP	1:100	80

Tabla 1.- Anticuerpos monoclonales murinos monomórficos empleados para la inmovilización específica de moléculas HLA. El anticuerpo W6/32 procedía de sobrenadante de cultivo del hibridoma, mientras que los demás provenían de fluido ascítico.

de cabra frente a IgG de ratón. Tras la inmovilización de los complejos formados entre el anticuerpo monoclonal murino y el antígeno, los anticuerpos monoclonales humanos pueden detectarse añadiendo un antisuero de cabra frente a IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina.

La disponibilidad de BCLs bien tipadas para las especificidades HLA de clase I y clase II, es una de las condiciones de partida para este ensayo. Las BCLs se recogen después de un tiempo adecuado de cultivo, se lavan 3 veces con PBS y se cuentan. Tras ello, se dispensan 2×10^6 células en cada tubo eppendorf de 1.5 ml para cada anticuerpo monoclonal humano a ensayar, incluyendo asimismo controles negativos y positivos. Las células se centrifugan en microfuga (Beckman, microfuge 12) y se resuspenden en 800 μ l de PBS-PFA (PFA, Kodak, al 1% en PBS con N_3Na al 0.1%), incubando durante 5 min a 4°C. A continuación, las células fijadas se lavan 3 veces con PBS y se resuspenden en 200 μ l de PBS-BSA (BSA al 2% en PBS con N_3Na al 0.1%), pudiendo almacenarse a 4°C durante algunas semanas.

Para realizar el ensayo, se añaden 100 μ l de una solución de anticuerpos de cabra frente a la porción Fc de IgG de ratón (Sigma), a una concentración aproximada de 3 μ g/ml en tampón carbonato 0.05 M pH 9.6, a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano (Costar), incubando durante toda la noche a 4°C. Antes de usarse, las placas se lavan 3 veces con

tampón TTBS (ver apartado 5.1) y se dejan secar invertidas sobre papel absorbente. El bloqueo se efectúa añadiendo 200 μ l/pocillo de una solución de BSA al 3% en PBS e incubando durante 15-30 min a 4°C.

Las BCLs fijadas se centrifugan y resuspenden en 50 μ l de PBS-BSA, añadiendo a continuación 200 μ l de anticuerpo monoclonal murino a la dilución adecuada y 100 μ l del anticuerpo monoclonal humano a ensayar, para su incubación simultánea a 37°C durante 30 min. Tras ello, la suspensión celular se lava 3 veces con 500 μ l de solución salina isotónica (ClNa al 0.9%), procediéndose a su lisis en 100 μ l de tampón de lisis (NP-40, Sigma, al 0.5%, Cl_2Ca , Merck, 0.5 mM, en TTBS) durante 30 min a 4°C y posterior tratamiento en baño ultrasónico durante 5 min. Después de centrifugar a 13000 g durante 30 min a 4°C en una microfuga, se recoge el sobrenadante (lisado celular) que se diluye en 150 μ l en TTBS, pipeteándose 100 μ l de esta dilución por duplicado en cada pocillo de la placa recubierta con anti-IgG de ratón.

Después de incubar durante 2-16 h, dependiendo del anticuerpo humano a ensayar, a 4°C, se lavan las placas 4 veces con TTBS, y se añaden 100 μ l/pocillo de un antisuero de cabra diluido 1:1000 en TTBS frente a IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad), incubando, a su vez, durante 2 h a 4°C, seguido de 5 lavados en TTBS. A continuación, se añaden a

cada pocillo 100 μ l de una solución de PNPP (Sigma) a 5 mg/ml en tampón DEA (DEA 1 M, Sigma; Cl_2Mg 0.5 mM, Merck, pH 9.8), incubándose las placas durante 30-60 min a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo 50 μ l/pocillo de una solución de NaOH 3N (Fluka), y la densidad óptica de las muestras se lee a 405 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek).

Los resultados (DO) se expresan como los valores medios de extinción de las muestras por duplicado, menos la media de al menos dos blancos conteniendo tampón de lavado TTBS en lugar del lisado celular. En cada ensayo se utilizó medio de cultivo fresco como control negativo y el suero de un individuo hiperinmunizado como control positivo.

5.7.- Absorción de anticuerpos.

Cuando un anticuerpo monoclonal presenta más de una especificidad, es necesario asegurarse de que verdaderamente procede de un solo clon de células y descartar la posible presencia de un segundo anticuerpo contaminante, responsable de este hecho. Para ello, los sobrenadantes de los clones correspondientes se absorben con determinadas BCLs de un fenotipo HLA seleccionado.

Las células de la línea B se cultivan y crecen hasta

obtener un número total de $100-200 \times 10^6$ células. Una vez conseguida esta cantidad de células, éstas se lavan dos veces con PBS centrifugando durante 5 min a 700 g, mezclándose, a continuación, con un volumen igual del sobrenadante que contiene el anticuerpo monoclonal correspondiente. Tras 1 h de incubación a 4°C, resuspendiendo las células a intervalos de 10 min, la mezcla se centrifuga durante 2 min a 9000 g en microfuga (Beckman microfuge 12), recogándose el sobrenadante.

La actividad de los sobrenadantes absorbidos se determina mediante IFI tanto sobre la BCL empleada en la absorción como control de eficiencia del proceso, como sobre la línea celular portadora de la segunda especificidad de ese anticuerpo.

5.8.- Titulación de los anticuerpos. Cálculo del coeficiente de correlación.

La titulación de los 3 anticuerpos monoclonales de origen humano obtenidos se llevó a cabo mediante IFI (ver apartado 4.4), empleando diluciones seriadas de los sobrenadantes de los clones 91C2, 34F11 y 2A2. El análisis de las células teñidas con cada uno de los anticuerpos a la dilución correspondiente se efectuó en el citofluorímetro, mediante histogramas en los que se examinaba el número de

células frente a intensidad de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia límite para la positividad de una reacción se fijó en la posición del canal del pico de intensidad de fluorescencia entre las regiones - y +, al dividir la escala logarítmica de intensidades en 4 segmentos de igual tamaño, y al inverso de la dilución correspondiente a la reacción positiva límite, se consideró como título del anticuerpo.

El estudio estadístico de la especificidad de los 3 anticuerpos se llevó a cabo mediante los programas de ordenador IAB.EXE e IDR.EXE, diseñados por el Dr. Florentino Sánchez García del Servicio de Inmunología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, y aplicados en los estudios serológicos correspondientes al Taller Nacional de Histocompatibilidad 1989 (81). El programa IAB.EXE está concebido para la determinación de las especificidades A y B, mientras que IDR.EXE lo es para los antígenos de clase II DR y DQ. El programa considera como especificidad de un sobrenadante (o un suero), aquella que ha conseguido el mayor valor de Chi^2 en un primer barrido de especificidades.

Cada sobrenadante es analizado para todas las especificidades que se hallan en las células para las que presenta una reacción positiva. Para asignar una especificidad determinada a un sobrenadante, es necesario que el valor de Chi^2 sea superior a 6.635, que es el que presenta una significación

estadística de 0.01, con 1 grado de libertad. La especificidad seleccionada en primer lugar es la que presenta un valor de Chi^2 mayor. Una vez seleccionada una determinada especificidad, se eliminan las reacciones positivas para las células que contienen dicho antígeno HLA, y se reanaliza el sobrenadante en estudio para comprobar si contiene alguna otra especificidad. El límite de análisis de especificidades viene determinado por los siguientes factores: (a) la desaparición de todas las reacciones positivas del sobrenadante en estudio; (b) la presencia de una sola o de múltiples reacciones positivas que no superan el valor de Chi^2 antes indicado. El cálculo de Chi^2 se realiza en base a una tabla de 2×2 .

Para cada especificidad en particular se calcula el coeficiente de correlación (r), cuyo valor viene determinado por la raíz cuadrada del cociente entre el valor de Chi^2 y el número de células positivas para dicha especificidad. Asimismo, para cada especificidad presente en un sobrenadante, se calcula el porcentaje de inclusión, que se define como el número de células que presentan el antígeno HLA reconocido por el sobrenadante, de todas las portadoras de dicha especificidad.

6.- CONSTRUCCION DE PANELES CELULARES PARA EL ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS. DETERMINACION DE ANTIGENOS HLA.

El estudio de la especificidad de anticuerpos dirigidos frente a determinantes polimórficos de antígenos pertenecientes al sistema HLA requiere la disponibilidad de paneles celulares bien caracterizados para los antígenos de este sistema, tanto de clase I como de clase II. Estos paneles de estudio se hallaban compuestos en un principio por PBLs, aunque, por razones prácticas, se procedió a la construcción de un panel de BCLs, mediante transformación con EBV (ver apartado 2.3), representativas de un amplio espectro de especificidades HLA, que incluía, asimismo, familias completas para poder seguir la segregación de las especificidades reconocidas por dichos anticuerpos monoclonales humanos.

6.1.- Método de microlinfocitotoxicidad estándar (NIH).

Los antígenos HLA de clase I que se expresan en la superficie celular pueden ser determinados serológicamente a partir de PBLs aislados de unos 10 ml de sangre desfibrinada, mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad estándar del NIH. De esta forma, los PBLs son enfrentados a un panel de

aloantisueros que cubren las especificidades HLA-A y B descritas hasta ahora.

Para ello, se siembra 1 μ l de una suspensión de PBLs a una concentración de 5×10^6 células/ml en PBS, en cada pocillo de una placa de Terasaki, que contiene el panel de antisueros, y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente, añadiendo, a continuación, 6 μ l/pocillo de complemento de conejo no citotóxico (Behring). Al cabo de 1 h adicional de incubación a temperatura ambiente, se procede a la tinción de las células añadiendo 3 μ l/pocillo de una solución de eosina al 5% (Merck) pH 7.2, y después de 3 min, la suspensión celular en cada pocillo se fija con formol (Quimón) pH 7.2.

El estudio serológico de las especificidades HLA de clase II se efectuó sobre suspensiones celulares enriquecidas de linfocitos B. De 20 ml de sangre desfibrinada, se obtuvieron PBLs, tal y como se describe en el apartado 2.1, que se resuspendieron en 0.8 ml de medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 10% de FCS. La suspensión se depositó en una paja corriente de beber flexible que contenía 100 mg de fibra de nylon (Leukopak, Fenwall), cerrada por el extremo inferior mediante calor, dejándose sólo un orificio de 2 mm. La fibra había sido previamente saturada del mismo medio de cultivo e incubada durante 30 min a 37°C.

Una vez añadida la suspensión celular, la columna se incuba a 37°C durante 45 min, al término de los cuales se dejan caer, gota a gota, 10 ml de medio de cultivo a través de la pajita, de manera que las células no adherentes (linfocitos T) son eluidas en un tubo de centrifuga. La columna se lava con unos 20 ml de medio de cultivo, y, a continuación, se añaden otros 10 ml de medio, arrastrándose las células adherentes (linfocitos B) por escurridos enérgicos de la columna. El método da una pureza de linfocitos B del 90-95%.

Las células B son enfrentadas por medio de la técnica clásica de microlinfocitotoxicidad del NIH, a un panel de aloantisueros que definen las especificidades serológicas HLA-DR y DQ conocidas actualmente. Para ello, se procede de idéntico modo al descrito en el caso de especificidades de clase I, salvo que la incubación con el anticuerpo se prolonga hasta 45 min y el tiempo de incubación con el complemento es de 90 min.

La evaluación de resultados se lleva a cabo en un microscopio invertido de contraste de fases; las células vivas aparecen refringentes, mientras que las células muertas no excluyen el colorante y presentan una coloración roja oscura. La valoración de la citotoxicidad se realiza tal y como se describe en el apartado 4.5.

6.2.- Método inmunomagnético.

En aquellos casos en que no fue posible el tipaje por la técnica clásica de microlinfocitotoxicidad descrita en el apartado precedente, debido tanto a la escasa viabilidad celular, o a un bajo rendimiento en número de células de los linfocitos B aislados mediante fibra de nylon, se recurrió a una modificación del método inmunomagnético (82), empleando como material de partida sangre extraída en tubos con EDTA (Venoject), o PBLs congelados (aproximadamente a una concentración de 10^7 células/vial).

En el primer caso, se extrajeron, en 2 tubos de 5 ml con EDTA, 10 ml de sangre de cada individuo a tipar, de los que se separó la capa de células mononucleares ("buffy coat") mediante centrifugación, a temperatura ambiente, a 700 g durante 5 min. Tras descartar el plasma, se recogió la capa de células mononucleares, pasándola a un tubo limpio y enfriado previamente a 4°C, añadiendo a continuación 4 ml de una solución de PBS-citrato (citrato sódico, Merck, al 0.6% en PBS), enfriada previamente, y 100 μ l de Dynabeads específicas para el aislamiento de linfocitos T o B (Dyna1).

La suspensión se incubó, con rotación suave, durante 5 minutos a 4°C, tras lo cual se añadieron 5 ml de PBS-citrato, y se procedió a la separación magnética de los linfocitos T y B.

Para ello, se sitúan los tubos con la suspensión celular y de bolas magnéticas en el imán separador (DynaI MPC-1) durante 3 min, decantando, a continuación, las células no adheridas a las bolas magnéticas. Las partículas magnéticas se lavaron tres veces con PBS situándolas durante 2 min en el imán y decantando el sobrenadante, para, finalmente, resuspender los linfocitos T o B así separados en 200 μ l y 100 μ l de PBS-FCS (FCS al 10% en PBS) respectivamente.

Quando el material de partida consistió en células (PBL) congeladas, se procedió en primer lugar a su descongelación tal y como se describe en el apartado 2.2 de esta sección, tras la cual se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo previamente enfriado, a los que se añadieron los correspondientes 100 μ l de suspensión de partículas magnéticas y procediendo de idéntica manera que en el caso anterior.

Para realizar la prueba de microlinfocitotoxicidad, se sembró 1 μ l de suspensión celular-bolas magnéticas en cada pocillo de una placa de Terasaki, conteniendo un panel de antisueros dirigidos frente a las especificidades HLA de clase I y clase II definidas actualmente (ver apartado anterior), y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, añadiendo, a continuación, 6 μ l/pocillo de complemento de conejo no citotóxico (Behring).

Al cabo de otros 30 min de incubación a temperatura ambiente, se procedió a la tinción de las células, añadiendo 3 μ l/pocillo de una solución de bromuro de etidio al 2.5% y naranja de acridina al 0.75% en PBS e incubando durante 10 min. Pasado este tiempo, se añadieron 6 μ l/pocillo de una solución de tinta china negra no citotóxica (Aerocolox, Schmincke) al 2.5% (v/v) en PBS, y fijando, seguidamente, las células con 3 μ l/pocillo de una solución de PFA (Kodak) al 1% en PBS.

La evaluación de resultados se lleva a cabo en un microscopio invertido de fluorescencia, presentando las células vivas una coloración verde y las células muertas una coloración anaranjada. La valoración de la citotoxicidad se realiza tal y como se describe en el apartado 4.5.

6.3.- Tipaje HLA de líneas celulares B.

En los casos en que no hay disponibilidad de PBLs de un individuo dado, existe la posibilidad de realizar el tipaje HLA de clase II en la BCL empleando la técnica clásica de microlinfocitotoxicidad del NIH, con las modificaciones que se introducen a continuación.

En primer lugar debe procederse a la absorción del complemento de conejo para eliminar la citotoxicidad natural

del mismo frente a las líneas B. Para ello, se cultiva y crece la línea celular hasta un total de 100×10^6 células (la absorción del complemento se puede realizar tanto de forma específica, con la propia línea que va a ser tipada, o inespecíficamente, con una línea diferente). La suspensión celular se lava 3 veces con PBS, separándose, a continuación, del orden de $1-3 \times 10^6$ células, que se resuspenderán en PBS-EDTA 0.2% a una concentración entre 3.5 y 4×10^6 c/ml para el tipaje.

Las células restantes se resuspenden en 1 ml de complemento de conejo (Behring) en un tubo eppendorf de 1.5 ml. La mezcla se agita suavemente en un vórtex y se incuba durante 30 min, aproximadamente, a 4°C . Pasado este tiempo, se centrifuga la suspensión en microfuga durante 2 min a 12000 rpm (Beckman, Microfuge 12), separándose el sobrenadante para utilizarlo como fuente de complemento para el tipaje de la BCL.

El tipaje se realiza acortando los tiempos de incubación; 30 min para la línea celular y el antisuero, y 60 min para el complemento previamente absorbido.



6.4.- Determinación de especificidades HLA mediante inmunofluorescencia indirecta.

Además de su utilidad en el estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos producidos, la IFI se puede asimismo emplear en la determinación de ciertas especificidades HLA tanto de clase I como de clase II difíciles de detectar por los métodos descritos anteriormente; en concreto, se ha usado en la discriminación de las variantes

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	DILUCION	REFERENCIAS
SG157	HLA clase II	1:400	83
GSP88.2	HLA-DRw11	1:100	84
IVD12	HLA-DQw3	1:200	85
PLM2	HLA-DQw7	1:400	86
IIB3	HLA-DQw8+9+1	1:400	86
BB7.2	HLA-A2+Aw69	NO	77

Tabla 2.- Anticuerpos monoclonales murinos, procedentes de fluido ascítico, a excepción del anticuerpo BB7.2 que procedía de sobrenadante de cultivo del hibridoma, empleados para el tipaje, empleando una técnica de IFI, de las especificidades HLA-Aw69, DRw11, DQw7 y DQw8.

de las especificidades serológicas de clase II DR5 y DQw3, así como del subtipo de la especificidad HLA de clase I A28 denominado Aw69, con la ayuda de los anticuerpos monoclonales murinos polimórficos que se detallan en la tabla 2.

Esta técnica se realiza esencialmente tal y como se describe en el apartado 4.4, con las modificaciones que se detallan a continuación. La suspensión celular se incuba con 50 μ l de la dilución del anticuerpo monoclonal correspondiente durante 30 min a temperatura ambiente. En la segunda etapa se añaden a la suspensión celular 10 μ l de un antisuero de cabra (porción F(ab')₂) frente a IgG de ratón (Kallestad) conjugado a isotiocianato de fluoresceína, a la dilución recomendada por el fabricante, y se incuba durante 20 min a 4°C.

Como control negativo, se empleó el tampón de lavado PBS/BSA sin ningún anticuerpo, mientras que como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón SG157, dirigido frente a un determinante monomórfico presente en moléculas HLA de clase II. El análisis de la fluorescencia de la muestra se lleva a cabo de idéntica manera al descrito en el apartado dedicado al estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos.

IV.- RESULTADOS.

1.- PRODUCCION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS.

1.1.- Obtención de líneas B linfoblastoides para la fusión.

La paciente RR (HLA: A1, A9, B35, B37, DR3, DR4, DRw52, DRw53, DQw2, DQw3) mientras se hallaba en la lista de espera para trasplante renal, alcanzó un grado de hiperinmunización después de 4 transfusiones de sangre, mostrando su suero una intensa actividad citotóxica (ver figura 1) frente a la mayoría de los componentes de un panel compuesto por 25 PBLs procedentes de diferentes individuos, que cubrían la mayoría de las especificidades serológicas HLA conocidas. En ningún caso el suero de la paciente fue autorreactivo.

Se aislaron 10^7 PBLs a partir de 20 ml de sangre heparinizada de la paciente RR, que, tras exposición a EBV, se sembraron en 1 placa de microcultivo de 96 pocillos de fondo plano a razón de 10^5 células por pocillo. Las colonias de células B transformadas aparecieron en el 100% de los pocillos al cabo de 2-3 semanas en cultivo. A partir de la tercera semana, aproximadamente, el crecimiento de las colonias de BCLs en los pocillos ya permite el ensayo de la actividad antilinfocitaria de los correspondientes sobrenadantes frente a un reducido panel compuesto por un total de 6 BCLs, obtenidas de sujetos cuyos linfocitos habían sido reconocidos por el suero de

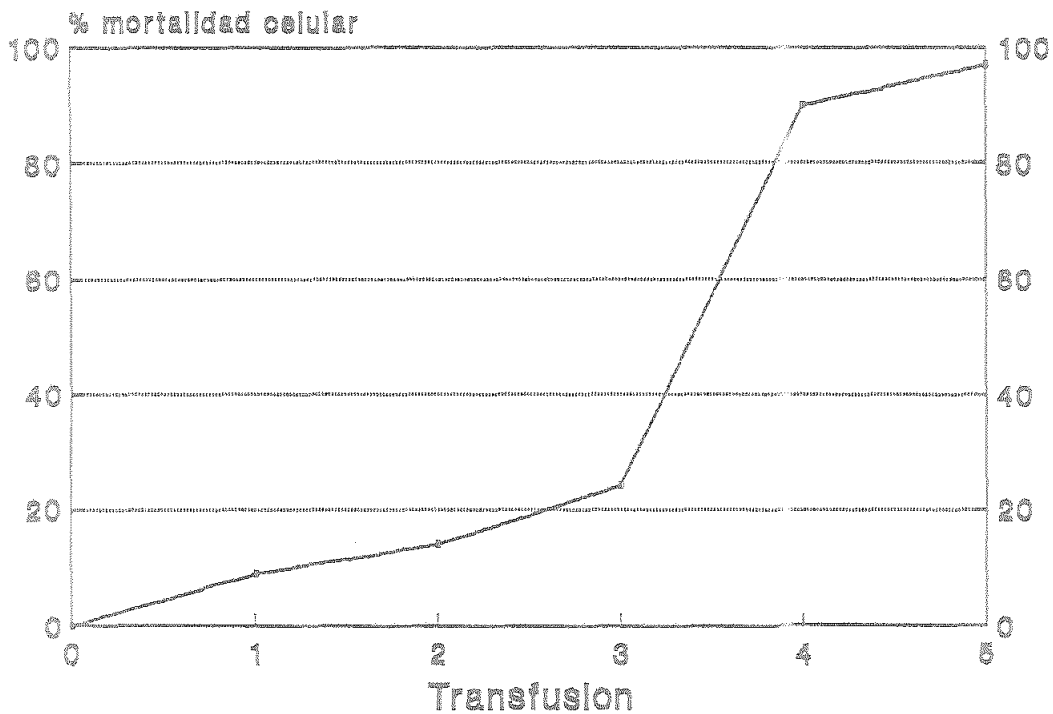


Figura 1.- Reactividad del suero de la paciente RR en ensayos de citotoxicidad frente a paneles de PBLs, durante el intervalo comprendido entre la primera y la última transfusión de sangre recibida.

la paciente (ver tabla 1), más la línea KT-14 perteneciente al X Taller Internacional de Histocompatibilidad. Esta etapa hizo necesaria, en algunos casos, la expansión de los cultivos a placas de 48 pocillos, debido a que nuestro ritmo de estudio no siempre se puede sincronizar con el de crecimiento de algunos de los cultivos de los pocillos.

BCL	HLA				
	A	B	DR	DRw	DQw
DN-22	2	8,15	1,2		1
ARG	30	18,55	3,w8	52	2,4
RF-22	1,32	27,37	4,w10	53	1,3
PV-23	26,28	44,35	5,7	52,53	2,3
PV-25	1,3	17,38	2,w6	52	1
KT-14	24,26	51,61	9	53	9

Tabla 1.- Panel celular empleado para el estudio preliminar de los sobrenadantes procedentes de la transformación de linfocitos B aislados a partir de sangre periférica de la paciente hiperinmunizada RR.

Como resultado del ensayo mediante CELISA de la actividad antilinfocitaria de los sobrenadantes, se detectaron

un total de 4 pocillos (4.5%) positivos frente a las células del panel DN-22 y PV-25. Con las células de estos pocillos positivos se comenzaron una serie de etapas de clonaje a baja dilución, cuya finalidad era el enriquecimiento del cultivo en aquellas BCLs responsables de la secreción de los anticuerpos antilinfocitarios, puesto que todos los intentos de clonaje a dilución límite de las líneas B fueron infructuosos; de un total de 186 pocillos sembrados a 10 células/pocillo y de 203 pocillos a 5 células/pocillo, tan sólo se obtuvo una sola colonia en cada caso, cuyos sobrenadantes carecían de la actividad inicial. Este hecho, que nos hizo tal vez perder la posibilidad de haber generado un cuarto anticuerpo, nos decidió a optar por el método de clonaje a baja dilución.

El clonaje a baja dilución de las células procedentes de los tres pocillos seleccionados restantes, se efectuó sobre una capa de células nutridoras compuesta por PBLs alogénicos irradiados, a una densidad que osciló entre 50 y 100 células por pocillo, en placas de microcultivo de 96 pocillos de fondo redondo. Los nuevos cultivos, al cabo de 2-4 semanas, se ensayaron de nuevo para detectar la presencia de anticuerpos antilinfocitarios en sus sobrenadantes de idéntica manera que en las etapas previas. Aquéllos 5 subcultivos, procedentes de cada una de las BCLs sometidas a clonaje, que presentaron una mayor actividad (traducida en una DO más elevada en el método CELISA), se sometieron a una nueva etapa de enriquecimiento, así hasta un

total de 3 clonajes sucesivos a baja dilución. Durante todo el proceso de enriquecimiento, se escogieron, de cada BCL inicial, los 5 pocillos con una actividad más alta, que se sometieron a un posterior subclonaje. Los resultados de esta etapa de enriquecimiento se hallan expresados en la tabla 2. Finalmente, se seleccionaron 3 subcultivos de cada BCL inicial, todos ellos con una actividad antilinfocitaria elevada, para ser propagados primero a pocillos individuales de placas de 48 pocillos, 24, 12

CLONAJE	Células/ pocillo	% Pocillos con células	% Pocillos positivos
1	100	74	18
	50	44	16
2	100	67	26
	50	32	15
3	100	70	35
	50	43	22

Tabla 2.- Resumen del rendimiento de las etapas de clonaje a baja dilución efectuadas con aquellas BCLs secretoras de anticuerpos con actividad antilinfocitaria.

y, por último, a frascos de cultivo de 25 cm².

1.2.- Producción de heterohibridomas y clonaje.

Una vez obtenidas las BCLs secretoras de anticuerpos humanos con actividad antilinfocitaria y propagadas hasta conseguir un número suficiente de células (5-10 millones), se seleccionaron tres cultivos, congelándose los restantes, que se denominaron RR1, RR2 y RR3, procedentes de cada una de las líneas B iniciales, que se fusionaron con un número igual de células del heteromiéloma SHM-D33. Los productos de estas 3 fusiones se dividieron en un total de 264 (88x3) cultivos primarios de selección de híbridos, en placas de microcultivo de 96 pocillos de fondo plano, en medio HATC; en 190 de éstos se produjo crecimiento de células híbridas, lo que da un promedio de un 65% de crecimiento de heterohibridomas en las tres fusiones. Estos datos se exponen con más detalle en la tabla 2.

Una vez muertas las células procedentes de las dos líneas parentales, lo cual viene a suceder al cabo de dos semanas desde la incorporación de aminoptericina y ouabaina al medio de cultivo, los heterohíbridos se mantuvieron en medio de cultivo ya sin las dos mencionadas drogas. A partir de la tercera semana, aproximadamente, el crecimiento de los hibridomas es tal, que permite el estudio mediante CELISA de la

actividad de los sobrenadantes de los pocillos con células híbridas en crecimiento, frente a aquella(s) BCL(s) con la que había reaccionado de forma positiva la BCL parental. Mediante esta técnica se detectaron un total de 49 sobrenadantes con anticuerpos antilinfocitarios (tabla 3).

	BCLs fusionadas		
	RR1	RR2	RR3
Pocillos con híbridos/ pocillos sembrados	47/88	81/88	44/88
Porcentaje	54%	92%	50%

Pocillos con actividad/ pocillos con híbridos	14/47	23/81	12/44
Porcentaje	30%	28%	27%

Tabla 3.- Producción y ensayo de los heterohíbridomas obtenidos a partir de BCLs de la paciente RR.

De aquellos cultivos que contenían híbridomas productores de anticuerpos con actividad antilinfocitaria, se seleccionaron aquellos que eran dominantes, es decir, aquellos que mantenidos durante 2 semanas más en cultivo, seguían produciendo anticuerpos en sus sobrenadantes en cantidades

iguales o superiores a las encontradas en el primer estudio. De estas clonas dominantes así seleccionadas, se escogieron, por razones prácticas, los cultivos que se consideraron interesantes (en función de la mayor DO obtenida en el ensayo CELISA de sus sobrenadantes). De esta forma, se optó por la selección de un cultivo procedente de cada una de las BCLs RR1, RR2 y RR3, para su posterior clonaje mediante el método de dilución límite. El resto de los cultivos positivos se congeló por motivos de seguridad.

Con respecto a esta etapa de clonaje, hemos de señalar que, si bien se comenzó el clonaje de los heterohibridomas sobre una capa de células nutridoras compuesta por PBLs alogénicos irradiados, los mejores resultados se obtuvieron al sustituir éstos por células con fenotipo de LLC-B CD21-, sin irradiar. Este tipo de células además presenta la ventaja adicional de poderse obtener en gran número a partir de un sólo paciente (de unos 10 ml de sangre hemos llegado a aislar hasta 1000×10^6 células), y de ser muy tolerantes al proceso de congelación-descongelación, lo que permite tener almacenados gran número de viales con células congeladas dispuestas para ser usadas en el momento más conveniente.

Finalmente, y como resultado del subclonaje de los heterohibridomas, se aislaron 3 clones secretores de anticuerpos monoclonales humanos de clase IgG dirigidos contra antígenos de

superficie presentes en la membrana linfocitaria. La secreción de anticuerpos, por parte de estos heterohibridomas, ha sido estable por un período de tiempo superior a 15 meses, y han soportado, asimismo, etapas de congelación-descongelación sin perder tampoco su capacidad secretora.

2.- CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS. DETERMINACION DEL ISOTIPO.

Los sobrenadantes procedentes de los tres clones aislados por presentar actividad antilinfocitaria de tipo IgG, se enfrentaron a un panel de anticuerpos monoclonales murinos dirigidos frente a los distintos subtipos de IgG (IgG1-IgG4), así como a antisueros frente a los dos tipos de cadenas ligeras humanas (κ y λ), empleando una técnica de ELISA.

Posteriormente, se procedió, también mediante ELISA, a la cuantificación de las inmunoglobulinas secretadas por los tres clones. Para ello se cultivaron los heterohibridomas a una densidad inicial de 5×10^5 células por ml de medio de cultivo, manteniéndose durante 1 semana sin cambiar el medio, tras lo cual, se recogieron los correspondientes sobrenadantes y se determinó la concentración de IgG tal y como se indica en el apartado 5.3 de "Material y Métodos".

Los resultados de todas estas determinaciones quedan reflejados en la tabla 4, que se muestra a continuación.

ANTICUERPO	CADENA H	CADENA L	µg/ml
91C2	IgG1	LAMBDA	10
34F11	IgG1	LAMBDA	11
2A2	IgG1	KAPPA	14

Tabla 4.- Caracterización de tres anticuerpos monoclonales humanos obtenidos a partir de linfocitos B de una paciente politransfundida en lista de espera para trasplante renal.

3.- ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS.

3.1.- reactividad sobre un panel de células portadoras de distintas especificidades HLA.

Los sobrenadantes procedentes del crecimiento del clon 91C2 en medio de cultivo durante una semana, se analizaron mediante IFI sobre un panel de células de diversa procedencia (BCLs, PBLs, etc.) que cubrían gran parte de las especificidades HLA de clase I conocidas (ver tabla 5).

Para determinar la especificidad anti-HLA de los anticuerpos monoclonales humanos 2A2 y 34F11, los sobrenadantes procedentes de los clones correspondientes se sometieron a análisis mediante IFI frente a un panel de líneas celulares transformadas con EBV, representativas de las especificidades serológicas HLA de clase II más comunes. Estos resultados se muestran también en la tabla 5, en la que puede observarse asimismo que las células T fueron negativas con estos dos anticuerpos.

CELULA DIANA		HLA				REACTIVIDAD		
		A	B	DR	DQw	91C2	34F11	2A2
ERROL	T	30	17,35			-	-	-
JOAN	T	1,24	17,35			-	-	-
HERB	T	3,30	14,18			-	-	-
BONILLA	T	3,30	51,57			-	-	-
REGINA	T	2	38,62			+	-	-
RENITA	T	2	38,62			+	-	-
CRUZ	T	2,23	14,44			++	-	-
VELAZQUEZ	T	28,33	44,70			++	-	-
SHARON	PBL	2	14,44			++	NT	NT
39-11	PBL	28,30	13,35			+	NT	NT
45-22	PBL	28,32	44,35			+	NT	NT
PS-15	PBL	28,32	49,51	2	1	+	+	+
3104	BCL	3	35	1	1	-	+++	+++
3105	BCL	28,26	18,38	5	3	+	-	-
3160	BCL	2	14,35	w9	3	++/+++	-	-
3162	BCL	2	8,35			+++	NT	NT
6815	BCL	24	60	9	3	-	-	-
6817	BCL	1	60	w6,1	1	-	++	++
6819	BCL	2	18			++	NT	NT
6823	BCL	1	8	3	2	-	-	-
6826	BCL	32	27			-	NT	NT
Al10	BCL	26	38	4	8	-	-	-
TS10	BCL	26	38	4	8	-	-	-
BURKHARDT	BCL			7	2	NT	-	-
DHI	BCL			5	3	NT	-	-
60T	BCL			w6	1	NT	++	++
SID4	BCL	2	44,62	4	3	+++	-	-
MJ4	BCL	2	35,62	4	8	++	-	-
HAS15	BCL	2	54,62	4	3	++	-	-
KT-13	BCL	24,31	7,51	4	3	-	-	-
LS40	BCL	1,26	27,60	4	8	-	-	-
CHOP40	BCL	31,32	60	4	3	-	-	-
RAJI	BCL			3,w10	1,2	NT	++	+
SL	BCL			2,3	1,2	NT	+++	++/+++

Tabla 5a.- Reactividad de tres anticuerpos monoclonales humanos frente a un panel de células portadoras de distintas especificidades HLA. (continúa en la página siguiente)

CELULA DIANA		HLA				REACTIVIDAD		
		A	B	DR	DQw	91C2	34F11	2A2
KL	BCL			4,w10	1,3	NT	++	++
ARMALP	BCL	3,24	50,35			-	NT	NT
FRARAN	BCL	26,31	41,57	3,4	2,3	-	-	-
NERGON	BCL	24,30	18,41	4	3	-	-	-
APTIKAN	BCL			4,5	3	NT	-	-
VIRELLE	BCL			4,w6	1,3	NT	+	+
CE-6	BCL	28,1	35,50	2,3	1,2	+	++	++
2-23	BCL	28,1	51	2,3	1,2	+	++	+ / ++
FMH-IW	BCL	1,29	8,41	3,w10	1,2	-	++	++
JPZ-IW	BCL	2	27,45	w10	1	++	+++	+++
HR-11	BCL	24,29	44,45	2,w10	1	-	+++	+++
HR-21	BCL	24,26	41,45	w8,w10	1	-	++	++
HR-22	BCL	24,26	44,45	7,w10	1,2	-	++	++
JV-11	BCL	1,11	40,49	5,w6	1,3	-	++	++
JV-12	BCL	2,24	7,40	1,3	1,2	++	+ / ++	++
QB-11	BCL	2,31	51	2,4	1,3	++	++	++
QB-12	BCL	1,30	18,35	3,5	1,2	-	++	++
26-11	BCL	24,30	15,17	3,5	3	-	-	+
26-12	BCL	2,11	35,44	5,w6	1,3	++	++	++
CZ-11	BCL	1,26	8,49	3,5	2,3	-	-	-
CZ-12	BCL	2,3	38,44	4,w6	1,3	++	++	++
FV-11	BCL	1,26	17,44	2,7	1,2	-	+	+ / ++
FV-12	BCL	3,28	35,38	w6,5	1,3	+ / ++	++	++
LZ-11	BCL	28	65	1	1	++	++	++
LZ-12	BCL	26,30	18,38	3,5	2,3	-	-	-
62-12	BCL	1,24	15,35	5	3	-	-	-
PB-23	BCL	2,24	14,35	2,5	1,3	+ / ++	++	+
ANITA	T	2,1	7,70			-	-	-
ASPGAR	BCL	2,33	18,45			-	NT	NT
3T	T	28,29	21,44			-	-	-
JMM	PBL	28,32	14,18	3,w6	1,2	-	+	+
MARIPI	BCL	28,3	14,39			-	NT	NT
SHIFUC	BCL	28	14	1,5	1,3	-	+	+
AR-51	BCL	28,33	14,51	1,5	1,3	-	++	++

Tabla 5b.- Reactividad de tres anticuerpos monoclonales humanos frente a un panel de células portadoras de distintas especificidades HLA. (continuación)

3.2.- Reactividad sobre un panel de líneas B linfoblastoides pertenecientes al X Taller Internacional de Histocompatibilidad.

Con el propósito de apoyar mejor la conclusión, obtenida tras este primer estudio, de que el anticuerpo monoclonal humano 91C2 reconoce un determinante asociado con las especificidades A2 y A28 (a pesar de haber unas cuantas excepciones cuyo significado se discutirá más adelante), se efectuó un análisis de las reacciones de dicho anticuerpo frente a un panel de BCLs procedentes del X Taller Internacional de Histocompatibilidad, mediante IFI; la tabla 6 nos muestra que todas las líneas celulares ensayadas portadoras de las especificidades A2 o A28, dieron reacciones positivas con el anticuerpo 91C2, mientras que no se encontraron reacciones positivas en BCLs negativas para estos antígenos HLA.

Al igual que con el monoclonal 91C2, los anticuerpos 2A2 y 34F11 fueron sometidos a una serie de tinciones inmunofluorescentes adicionales con células pertenecientes al panel del X Taller Internacional de Histocompatibilidad. Estos datos se hallan expuestos también en la tabla 6, en la que puede apreciarse la existencia de algunas extrarreacciones del anticuerpo 2A2 con 5 BCLs negativas para la especificidad DQw1, y con la característica común de ser portadoras, en cambio, de la especificidad DQw7 (BM-16, LUY, LZL, RML y JVM).

BCL	HLA					REACTIVIDAD		
	A	B	DR	DRw	DQw	91C2	34F11	2A2
ABO31227	2	18	w14	52	5	++	+ / ++	+ / ++
BM-9	2	35	w8	52	4	++	-	-
BM-14	3	7	4	53	8	-	-	-
BRIP	24	51,63	w11	52	7	-	-	-
BSM	2	62	4	53	8	++	-	-
DBB	2	57	7	53	9	+	-	-
DEM	2	57	4,w16	53	5,8	++	++	++
FPAF	1	35	w11	52	6	-	++	++
HHKB	3	7	w13	52	6	-	+	+ / ++
HOM-2	3	27	1		5	-	++	+ / ++
IBw9	33	65	7	53	2	-	-	-
JBUSH	32	38	w11	52	7	-	-	-
JES-THOM	2	27	1		5	++	++	++
JHAF	31	51	4	53	7	-	-	-
JO528239	1	35	w11	52	7	-	-	-
KT-14	24,26	51,61	9	53	9	-	-	-
KT-17	2,11	62,35	4	53	8	++	-	-
LBUF	30	13	7	53	2	-	-	-
MADURA	2	60	w8	52	4	++	-	-
OMW	2	45	w13	52	6	++	++	++
OBL	26	18	3	52	2	-	-	-
RSH	w68,30	42	3	52	4	+	-	-
SAVC	3	7	4	53	8	-	-	-
SWEIG007	29	61	w11	52	7	-	-	-
TISI	24	35	w11	52	7	-	-	-
VAVY	1	8	3	52	2	-	-	-
WT-24	2	27	w16		5	++	+ / ++	++
WT-47	32	44	w13	52	6	-	++	++
WT-51	23	65	4	53	8	-	-	-
WT-100	11	35	1		5	-	++	++
BM-16	2	18	w12	52	7	++	-	+
JVM	2	18	w11	52	7	++	-	++
LUY	2	51	w8	52	7	++	-	+
LZL	2	62	w14	52	7	++	-	+
RML	2	51	w16		7	++	-	+

Tabla 6.- Reactividad de los anticuerpos monoclonales humanos 91C2, 34F11 y 2A2, frente a un panel de BCLs procedentes del X Taller Internacional de Histocompatibilidad.

3.3.- Estudios de citotoxicidad.

Con el propósito de valorar la idoneidad de los tres anticuerpos monoclonales obtenidos como reactivos para el tipaje serológico HLA mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad estándar (NIH), se procedió al estudio de la actividad citotóxica de los mismos frente a un panel de linfocitos T y totales, en el caso del monoclonal 91C2, mientras que para los anticuerpos 34F11 y 2A2 se utilizó un panel compuesto por linfocitos B y por células procedentes de pacientes diagnosticados de LLC-B, que presentaban más de un 90% de células linfoides de tipo B en sangre periférica.

Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo monoclonal humano 34F11, sin diluir, puede considerarse como un excelente reactivo para el tipaje serológico de la especificidad HLA-DQw1 (ver tabla 7); los cálculos estadísticos permiten asignar los valores que se expresan a continuación para cada uno de los siguientes parámetros: $\chi^2 = 27.00$, $r = 1.00$, con un porcentaje de inclusión del 100%, poseyendo este anticuerpo una fuerza en ensayos de citotoxicidad de 7.3. Por el contrario, los otros dos anticuerpos producidos, 91C2 y 2A2, no exhibieron tal patrón de reacción; 91C2 fue incapaz de reconocer célula alguna del amplio panel sobre el cual se ensayó, mientras que el anticuerpo 2A2 mostró tan sólo reacciones citotóxicas no excesivamente fuertes (50-60% mortalidad) e inconsistentes

HLA		DILUCION 34F11					
DR	DQw	1:1	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1000
1,2	1	8	2	0	0	0	0
1,w8	1	8	2	0	0	0	0
2	1	8	2	2	0	0	0
2	1	8	0	0	0	0	0
2	1	6	4	0	0	0	0
2	1	8	2	0	0	0	0
2	1	8	2	0	0	0	0
2,w6	1	8	6	2	0	0	0
2,7	1,2	6	2	0	0	0	0
2,7	1,2	8	0	0	0	0	0
w6,7	1,2	4	0	0	0	0	0
1,5	1,3	4	0	0	0	0	0
2,4	1,3	8	6	0	0	0	0
2,5	1,3	8	6	0	0	0	0
w6,4	1,3	8	6	2	2	0	0
w6,4	1,3	8	0	0	0	0	0
3,7	2	0	0	0	0	0	0
3,7	2	0	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0
4,7	2,3	0	0	0	0	0	0
4,5	3	0	0	0	0	0	0
4,5	3	0	0	0	0	0	0
5	3	0	0	0	0	0	0
5	3	0	0	0	0	0	0

Tabla 7.- Reacciones citotóxicas del anticuerpo monoclonal humano 34F11 frente a un panel de linfocitos B y células procedentes de LLC-B, portadores de distintas especificidades serológicas HLA de clase II.

frente a su respectivo panel de estudio. Estos últimos resultados se exponen de forma resumida en la tabla 8.

	91C2+	91C2-		2A2+	2A2-
A2+28 +	0	32	DQw1 +	4	12
A2+28 -	0	31	DQw1 -	0	11

Tabla 8.- Estudio de la citotoxicidad del anticuerpo monoclonal 91C2 sobre un panel compuesto por un total de 63 PBLs y células T con diferentes combinaciones de antígenos HLA de clase I, y de 34F11 sobre un panel de un total de 27 linfocitos B y células procedentes de LLC-B, portadores de distintas especificidades serológicas de clase II.

3.4.- Determinación del tipo de molécula HLA reconocida.

La localización del epitopo reconocido por cada uno de los tres anticuerpos monoclonales producidos se efectuó mediante la inmovilización específica de los diferentes tipos de moléculas HLA, utilizando, para ello, anticuerpos monoclonales murinos monomórficos generados frente a moléculas HLA específicas de cada locus.

El empleo de cantidades adecuadas tanto de anticuerpo monoclonal murino para la inmovilización específica, de anticuerpo monoclonal humano en la etapa de detección, así como el tiempo invertido en la primera incubación, son los tres parámetros críticos para la correcta realización de este ensayo. En este sentido, queremos resaltar el hecho de que para la detección de las actividades anti-A28 y anti-DQw7 de los anticuerpos monoclonales humanos 91C2 y 2A2, respectivamente, fue necesario prolongar el tiempo de la primera incubación hasta un total de 16 h, mientras que el resto de las actividades pudieron ser detectadas, sin problema alguno, tras 2 h de incubación.

Por otra parte, para comprobar el rango de valores de densidad óptica obtenidos con los controles negativos, es necesario llevar a cabo previamente un número suficiente de ensayos (al menos 10) utilizando medio de cultivo fresco, con diferentes anticuerpos monoclonales murinos y células. En la tabla 9 quedan expresados los valores de densidad óptica obtenidos para cada anticuerpo monoclonal murino empleado en la inmovilización específica de moléculas HLA. Los valores de DO de los anticuerpos monoclonales ensayados mayores que la media \pm SD (desviación estándar) de los correspondientes controles negativos para cada anticuerpo monoclonal murino, fueron considerados positivos.

Las figuras 2, 3 y 4 muestran el análisis efectuado por MAILA de los tres anticuerpos monoclonales humanos producidos. El estudio de la especificidad de estos anticuerpos había revelado una reactividad frente a los antígenos HLA-A2 y A28

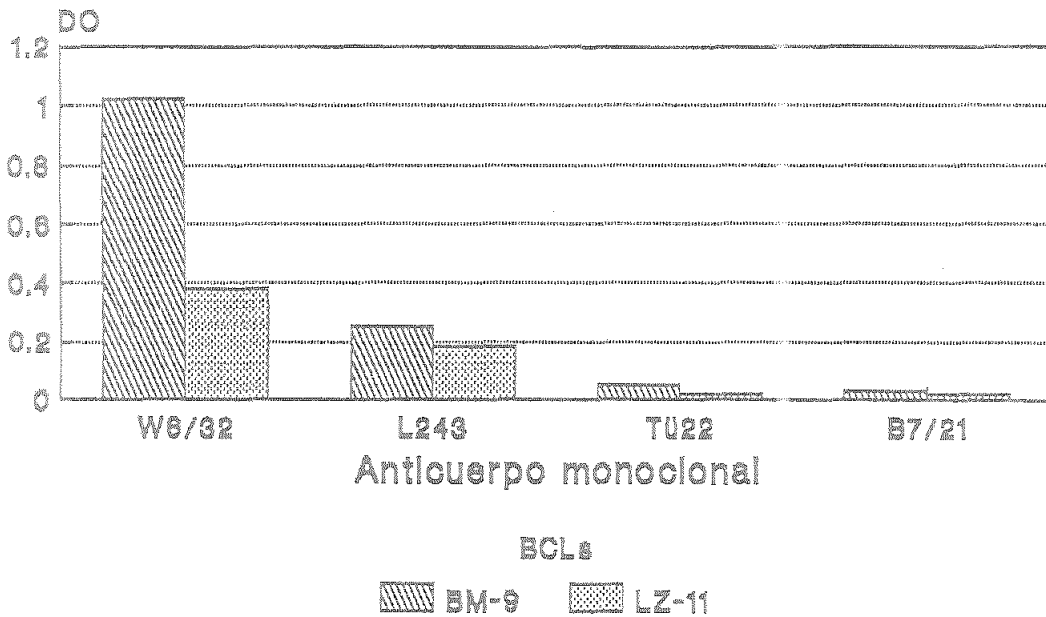
ANTICUERPO MONOCLONAL	DO	
	ME DIA	±SD
W6/32 (A, B, C)	0.04	0.02
L243 (DR)	0.22	0.05
TU22 (DQ)	0.03	0.02
B7/21 (DP)	0.04	0.02

Tabla 9.- Rango de DO encontrado en el ensayo MAILA para los controles negativos de cada uno de los anticuerpos monoclonales murinos empleados para la inmovilización específica de antígenos HLA.

para el monoclonal 91C2, anti-DQw1 para 34F11 así como para 2A2, presentando este último algunas extrarreacciones con células portadoras de la especificidad DQw7. Por medio de la técnica MAILA, se puede demostrar que el epítipo reconocido por el anticuerpo 91C2 en las líneas celulares BM-9 (A2) y LZ-11 (A28), se halla localizado en una molécula de clase I, mientras

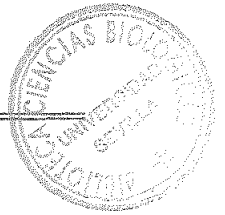
que los determinantes antigénicos responsables de las reacciones de los monoclonales humanos 34F11 y 2A2 con la línea B homocigota JES-THOM (DQw1), se encuentran situados en la molécula DQ. Por otra parte, el método es lo suficientemente sensible como para informarnos, asimismo, de que las extrarreacciones de 2A2 con algunas células DQw7, se deben al reconocimiento de un epitopo presente en la molécula DQ de la BCL BM-16 (DQw7) por parte de este anticuerpo.

91c2

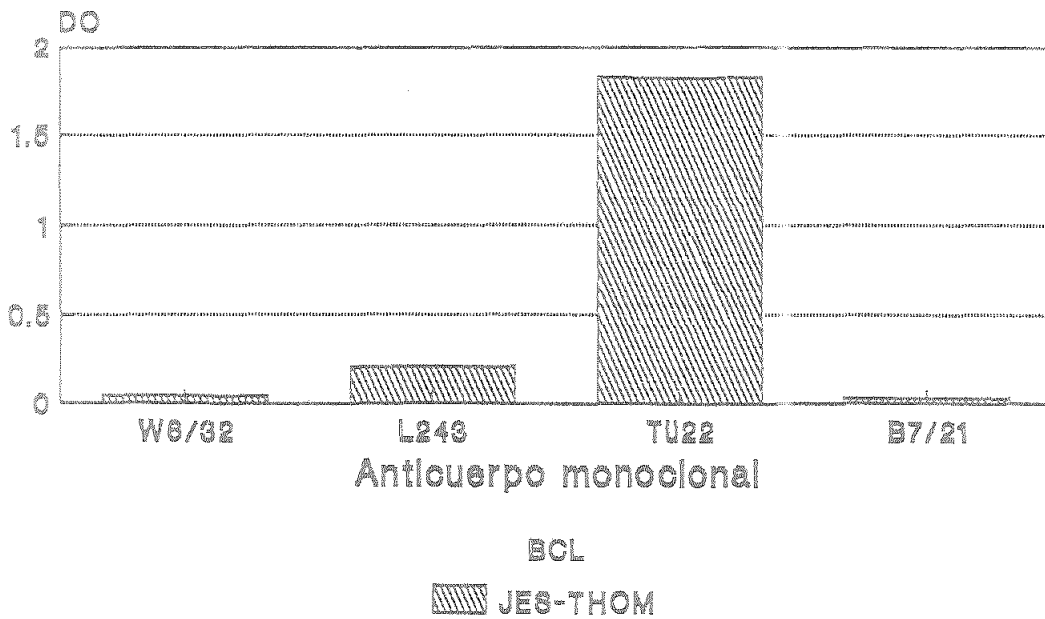


W6/32: HLA-A,B,C. L243: HLA-DR. TU22: HLA-DQ. B7/21: HLA-DP.

Figura 2.- Análisis mediante MAILA del tipo de molécula HLA reconocida por el anticuerpo monoclonal humano 91C2 sobre las líneas celulares BM-9: A2, B35, DRw8, DQw4, DPw2, y LZ-11: A28, Bw65, DR1, DQw1.



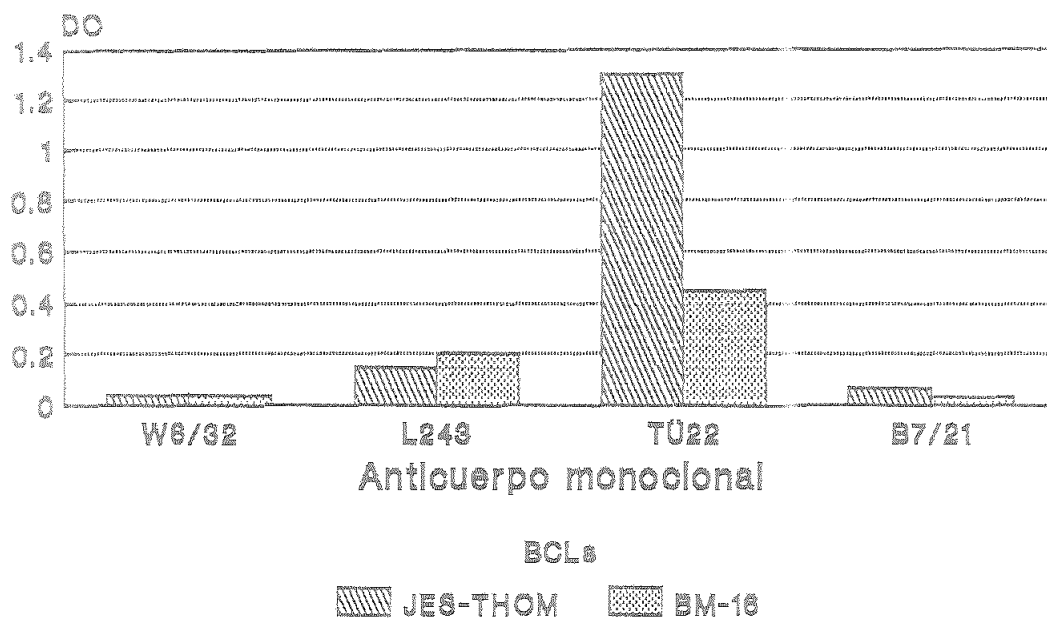
34f11



W6/32: HLA-A,B,C. L249: HLA-DR. TU22: HLA-DQ. B7/21: HLA-DP.

Figura 3.- Análisis mediante MAILA del tipo de molécula HLA reconocida por el anticuerpo monoclonal humano 34F11 sobre la línea celular JES-THOM: A2, B27, DR1, DQw1, DPw4.

2A2



W6/32: HLA-A,B,C. L249: HLA-DR. T022: HLA-DQ. B7/21: HLA-DP.

Figura 4.- Análisis mediante MAILA del tipo de molécula HLA reconocida por el anticuerpo monoclonal humano 2A2 sobre las líneas celulares JES-THOM: A2, B27, DR1, DQw5, DPw4, y BM-16: A2, B18, DRw12, DQw7, DPw2.

3.5.- Estudios familiares de segregación de las moléculas reconocidas.

Los estudios de la segregación de las especificidades reconocidas por los anticuerpos monoclonales humanos producidos en este trabajo, fueron llevados a cabo en individuos procedentes de familias completas, procedentes de las consultas del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, a las que se efectuó la determinación de su genotipo HLA, con vista a la realización de trasplante de médula ósea de alguno de sus miembros afecto de algún tipo de síndrome linfoproliferativo. Paralelamente, y cuando hubo posibilidad de ello, se obtuvieron BCLs de estos individuos.

La determinación del patrón de segregación de las especificidades reconocidas por el monoclonal humano 91C2, se llevó a cabo mediante tinción inmunofluorescente de BCLs procedentes de diferentes familias portadoras, en alguno o algunos de sus haplotipos, de las especificidades HLA-A2 o A28. Como se desprende de los datos mostrados en las tablas 10 a 13, el determinante reconocido por 91C2 segrega con el complejo HLA como un carácter genético codominante en un total de 4 familias informativas portadoras de los haplotipos A2 o A28.

Para apoyar mejor la conclusión obtenida tras el primer estudio de que los anticuerpos monoclonales humanos 34F11

y 2A2 reconocen un determinante antigénico asociado con la especificidad HLA-DQw1, se analizó también la segregación de ambos anticuerpos en estudios de familias (tablas 10-13). Estos dos anticuerpos segregan con el complejo HLA como caracteres codominantes en 4 familias informativas poseyendo haplotipos portadores de la especificidad DQw1, incluyendo, una de ellas, un miembro con un haplotipo recombinante (tabla 13).

Asimismo, la denominada en un principio "extrarreacción" del monoclonal 2A2 frente a determinadas células positivas para DQw7, muestra, tal y como se aprecia en la tinción inmunofluorescente de la familia 62 expuesta en la tabla 14, un patrón de segregación compatible con el reconocimiento de un carácter genético codominante dentro del complejo HLA y presente en ciertos haplotipos portadores de la especificidad DQw7.

BCL	HAPLOTIPOS HLA	REACTIVIDAD		
		91C2	2A2	34F11
CZ-11	a/b	-	-	-
CZ-12	c/d	++	++	++
CZ-23	a/c	-	++	++
CZ-21	a/d	++	-	-
CZ-22	b/c	-	++	++
CZ-24	b/c	-	++	++
CZ-25	b/d	+ / ++	-	-

HAPLOTIPOS HLA:

a:	A26	B49	DR5	DRw52	DQw3.
b:	A1	B8	DR3	DRw52	DQw2.
c:	A3	B38	DRw6	DRw52	DQw1.
d:	A2	B44	DR4	DRw53	DQw3.

Tabla 10.- Tinción inmunofluorescente de BCLs de la familia CZ con tres anticuerpos monoclonales humanos.

BCL	HAPLOTIPOS HLA	REACTIVIDAD		
		91C2	2A2	34F11
PV-11	a/b	-	++	++
PV-12	c/d	+	++	++
PV-25	a/c	-	++	++
PV-24	a/d	+	+ / ++	+ / ++
PV-22	b/c	-	++	++
PV-26	b/c	-	++	++
PV-21	b/d	+	-	-
PV-23	b/d	+	+	+

HAPLOTIPOS HLA:

a:	A1	B17	DR2	-	DQw1.
b:	A26	B44	DR7	DRw53	DQw2.
c:	A3	B38	DRw6	DRw52	DQw1.
d:	A28	B35	DR5	DRw52	DQw3.

Tabla 11.- Tinción inmunofluorescente de BCLs de la familia PV con tres anticuerpos monoclonales humanos.

BCL	HAPLOTIPOS HLA	REACTIVIDAD		
		91C2	2A2	34F11
JV-11	a/b	-	++	+ / ++
JV-12	c/d	++	++	++
JV-21	a/c	+ / ++	++	++
JV-22	a/d	-	-	-
JV-23	b/d	-	++	++

HAPLOTIPOS HLA:

a:	A1	B40	DR5	DRw52	DQw3.
b:	A11	B49	DRw6	DRw52	DQw1.
c:	A2	B40	DR1	-	DQw1.
d:	A24	B7	DR3	DRw52	DQw2.

Tabla 12.- Tinción inmunofluorescente de BCLs de la familia JV con tres anticuerpos monoclonales humanos.

BCL	HAPLOTIPOS HLA	REACTIVIDAD		
		91C2	2A2	34F11
QB-11	a/b	+ / ++	++	++
QB-12	c/d	-	++	++
QB-23	a/c	++	++	++
QB-21	a/c/d	++	-	-
QB-22	b/c	-	++	++
QB-24	b/d	-	++	++

HAPLOTIPOS HLA:

a:	A2	B51	DR4	DRw53	DQw3.
b:	A31	B51	DR2	-	DQw1.
c:	A1	B35	DR5	DRw52	DQw1.
d:	A30	B18	DR3	DRw52	DQw2.
c/d:	A1	B18	DR3	DRw52	DQw2.

Tabla 13.- Tinción inmunofluorescente de BCLs de la familia QB con los anticuerpos monoclonales humanos 91C2, 34F11 y 2A2.

BCL	HAPLOTIPOS HLA	REACTIVIDAD 2A2
62-11	a/b	+
62-12	c/d	-
62-27	a/c	+
62-25	a/d	+
62-28	a/d	+
62-21	b/d	-
62-22	b/d	-
62-23	b/d	-
62-24	b/d	-
62-26	b/d	-

HAPLOTIPOS HLA:

a: A2, B18, DRw12, DRw52, DQw7.

b: A24, B8, DR3, DRw52, DQw2.

c: A1, B15, DRw11, DRw52, DQw7.

d: A24, B35, DRw11, DRw52, DQw7.

Tabla 14.- Tinción inmunofluorescente de BCLs obtenidas de la familia 62, con el anticuerpo monoclonal humano 2A2.

3.6.- Título de anticuerpos y cálculo del coeficiente de correlación.

La tabla 15 muestra los resultados correspondientes a la determinación, mediante una técnica de IFI, del título de los 3 anticuerpos monoclonales humanos frente a diferentes subtipos y combinaciones DR-DQ de las especificidades reconocidas por

BCL	HLA				TITULO		
	A	B	DR	DQw	91C2	34F11	2A2
RSH	w68,30	42	3	4	1	NT	NT
JES-THOM	2	27	1	5	80	40	80
WT-24	2	27	w16	6	NT	40	80
HHKB	3	7	w13	6	NT	20	40
ABO 31227	2	18	w14	5	NT	40	40
JPZ-IW	2	45,27	w10	1	NT	40	80
BM-16	2	18	w12	7	NT	NT	2
LUY	2	51	w8	7	NT	NT	2

Tabla 15.- Determinación mediante IFI del título de anticuerpo frente a diferentes subtipos y combinaciones DR-DQ de las especificidades HLA reconocidas por tres anticuerpos monoclonales humanos.

ellos. El título de estos anticuerpos nos da una idea aproximada de su reactividad frente a la especificidad HLA reconocida.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, podemos confirmar, sin lugar a dudas, que el anticuerpo monoclonal humano 91C2 se halla dirigido frente a un epitopo presente en los antígenos HLA-A2 y A28. El coeficiente de correlación (r) y el porcentaje de inclusión para A2+A28 de este anticuerpo se hallan expuestos en la tabla 16.

El patrón de reacción obtenido con los otros dos anticuerpos monoclonales humanos se asemeja al de los alcantisueros que definen la especificidad HLA-DQw1, que se halla estrechamente asociada a los antígenos HLA de clase II DR1, DR2 y DRw6. Por tanto, 2A2 y 34F11 parecen reconocer un epitopo presente en el antígeno DQw1 con una significativa correlación estadística (ver de nuevo la tabla 16).

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	Chi ²	r	% I
91C2	A2+A28	70.63	0.86	85
34F11	DQw1	84.00	1.00	100
2A2	DQw1	63.08	0.87	100

Tabla 16.- Cálculo del coeficiente de correlación y del porcentaje de inclusión para cada una de las especificidades HLA reconocidas por los anticuerpos monoclonales humanos 91C2, 34F11 y 2A2.

4.- ESTUDIO DE LAS EXTRARREACCIONES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL HUMANO 2A2.

Tras la celebración del último Taller Internacional de Histocompatibilidad en 1987, la especificidad DQw3 quedó subdividida en 3 subtipos: DQw7, DQw8 y DQw9 (87). Todas las líneas celulares procedentes del X Taller Internacional de Histocompatibilidad, negativas para la especificidad serológica DQw1 que habían exhibido reacciones positivas, determinadas mediante IFI, con el anticuerpo monoclonal humano 2A2, eran portadoras de la variante DQw7, siendo éste el único antígeno HLA de clase II común a todas ellas. En la tabla 17 queda reflejado este hecho, aunque no todas las células DQw7 reaccionaron positivamente con el monoclonal 2A2. Este hecho nos animó a intentar analizar la reactividad del monoclonal 2A2 sobre otras líneas celulares portadoras del antígeno DQw7, con el propósito de tratar de esclarecer si las extrarreacciones de 2A2 eran debidas a la existencia de reactividad cruzada con la especificidad DQw7.

El análisis de la posible segunda especificidad del anticuerpo 2A2 se amplió mediante la construcción de un panel de BCLs positivas para la especificidad DQw7, definida, así como los subtipos DRw11 y DRw12 de la especificidad serológica DR5, mediante el empleo en inmunofluorescencia indirecta de los

BCL	HLA				Cadenas DQ		
	DR	DQw	Dw	DP	α	β	2A2
* LZL	w14	7	16	-	-	-	+
* BM16	w12	7	DB6	2	2	3.1	+ / ++
LUY	w8	7	8.4	1,4	3.8	3.1	+
* RML	w16	7	22	-	2	3.1	+
* JVM	w11	7	New	2	-	-	++
SWEIG 007	w11	7	5	-	2	3.1	-
* BRIP	w11	7	5	2	2	3.1	-
TISI	w11	7	New	-	2	3.1	-
* JBUSH	w11	7	5	4	2	3.1	-
* JO 528239	w11	7	5	-	-	-	-
* JHAF	4	7	13	3	3.1	3.1	-

* Consanguíneas.

Tabla 17.- Patrón de reacción del anticuerpo monoclonal humano 2A2 frente a un panel de BCLs portadoras de la especificidad HLA de clase II DQw7, procedentes del X Taller Internacional de Histocompatibilidad.

anticuerpos monoclonales murinos GSP88.2 (anti-DRw11), IVD12 (anti-DQw3), PLM2 (anti-DQw7) y IIB3 (anti-DQw8 + DQw9 + DQw4 + algunos DQw1). Los resultados de la tabla 18 muestran el patrón de reacción del anticuerpo 2A2 frente a las células de este panel, consistente con la posible discriminación de dos subtipos de la relativamente recién descrita especificidad DQw7, por parte de este anticuerpo monoclonal humano.

En la tabla 19, que se expone en la página 143, se ofrece un resumen de la reactividad del anticuerpo 2A2 frente al panel de líneas B portadoras del antígeno DQw7.

BCL	ETINIA*	HLA				2A2
		A	B	DR	DQw	
SWEIG007	C	29	61	w11	7	-
BRIP	C	24	51,63	w11	7	-
TISI	C	24	35	w11	7	-
JBUSH	C	32	38	w11	7	-
JO528239	C	1	35	w11	7	-
62-12	C	1,24	15,35	w11	7	-
LZ-12	C	26,30	18,38	w11,3	7,2	-
JV-22	C	1,24	7,40	w11,3	7,2	-
LC-11	C	3,30	18,38	w11,3	7,2	-
CZ-11	C	1,26	8,49	w11,3	7,2	-
PV-21	C	26,28	44,35	w11,7	7,2	-
AAG-IW	C	3,32	40,49	w11,4	7,8	-
AR-78	C	1,11	7,17	w11,4	7,8	-
MG-23	C	31,32	15,35	w11,4	7,8	-
AR-9	C	3	18,35	w11,4	7	-
JVM	C	2	35	w11	7	++
41-21	C	2	18	w11	7	++
26-24	C	2,30	17,35	w11,3	7	+
2-12	C	2,28	17,51	w11,3	7,2	+
NP-12	C	24,32	15,18	w11,4	7,8	+
H3-3	C	2	50,51	w11,4	7,8	++
RS-11	C	2	17,44	w11,7	7,2	+
VG-24	C	2,3	7,44	w11,7	7,2	+
EM-16	C	2	18	w12	7	+ / ++
AR-86	C	1	8,35	w12,3	7,2	+
26-11	C	24,30	15,17	w12,3	7	+ / ++
62-11	C	2,24	8,18	w12,3	7,2	+
FMS-IW	C	2	35,49	w12,4	7,8	+
AR-93	C	2	35,49	w12,4	7,8	+
RS-29	C	2	15,17	w12,w8	7,4	+

Tabla 18a.- Patrón de reacción del anticuerpo monoclonal humano 2A2 frente a un panel de BCLs DQw1-negativas y portadoras de la especificidad DQw7. (continúa en la página siguiente)

BCL	ETNIA*	HLA				2A2
		A	B	DR	DQw	
JHAF	C	31	51	4	7	-
GA-11	C	1,24	8,45	4,3	7,2	-
QB-21	C	1,2	18,51	4,3	7,2	-
MG-11	C	2,31	35,51	4	7,8	+
AR-89	C	2,30	41,51	4,3	7,2	+
CZ-25	C	1,2	8,44	4,3	7,2	+
AR-84	C	2,24	37,51	4,7	7,2	+
AR-61	C	26,29	15,44	w6,7	7,2	-
MC-27	C	23,30	35,44	w6,7	7,2	+
LZL	AI	2	75	w14	7	+
LUY	C	2	51	w8	7	+
RML	AI	2	51	w16	7	+

* C: caucásico.

AI: indio americano.

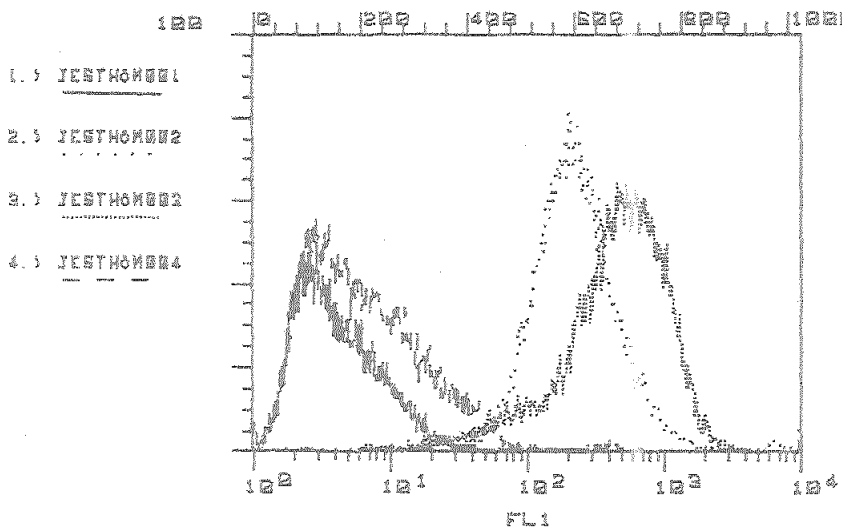
Tabla 18b.- Patrón de reacción del anticuerpo monoclonal humano 2A2 frente a un panel de BCLs DQw1-negativas y portadoras de la especificidad DQw7. (continuación)

HLA	TOTAL	2A2+		2A2-	
		N	%	N	%
DR4/DQw7	8	4	50	4	50
DRw6/DQw7	3	2	-	1	-
DRw8/DQw7	1	1	-	0	-
DRw11/DQw7	23	8	35	15	65
DRw12/DQw7	7	7	100	0	0
DRw16/DQw7	1	1	-	0	-

Tabla 19.- Resumen del patrón de reacción obtenido mediante inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal humano 2A2, frente a un panel de BCLs portadoras de la especificidad HLA de clase II DQw7.

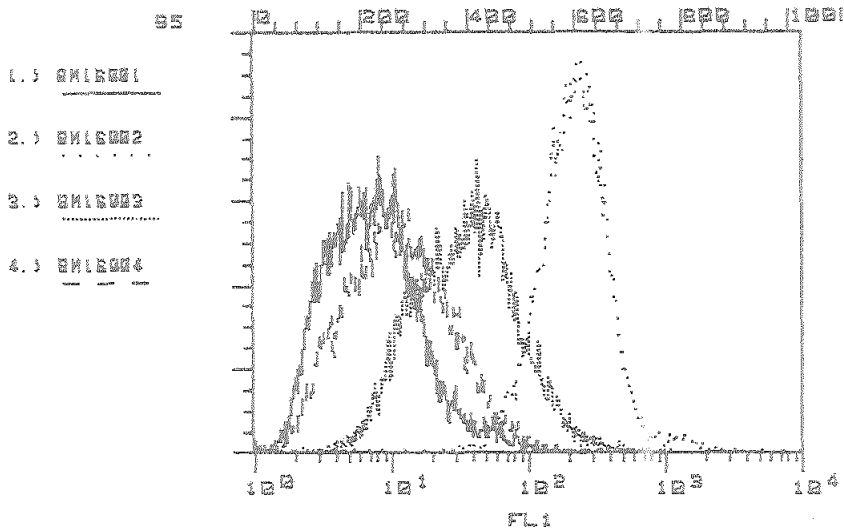
4.1.- Absorción del anticuerpo 2A2.

La absorción del sobrenadante procedente del clon 2A2 con la BCL portadora de la especificidad HLA-DQw1 JES-THOM, elimina la reactividad posterior de éste al enfrentarlo tanto a células DQw1 (figura 5) como aquellas líneas celulares DQw7 que habían sido reconocidas por el sobrenadante sin absorber (figura 6); con lo que se descarta la posible existencia en el sobrenadante de un segundo anticuerpo con actividad específica frente a algunas células DQw7. Por tanto, las reacciones positivas frente a células portadoras de la especificidad DQw1, así como frente a ciertas líneas celulares DQw7, se deben a la presencia de un único anticuerpo.



- | | |
|----------------------|-------------------|
| 1) Control negativo. | 3) 2A2. |
| 2) Control positivo. | 4) 2A2 absorbido. |

Figura 5.- Análisis mediante histograma representando intensidad de fluorescencia frente a número de células, de la reactividad del anticuerpo 2A2 frente a la línea celular JESTHOM, portadora de la especificidad DQw1, previa y tras la absorción de la actividad anti-DQw1 mediante incubación con la BCL JES-THOM.



- | | |
|----------------------|-------------------|
| 1) Control negativo. | 3) 2A2. |
| 2) Control positivo. | 4) 2A2 absorbido. |

Figura 6.- Análisis mediante histograma representando intensidad de fluorescencia frente a número de células, de la reactividad del anticuerpo 2A2 frente a la línea celular BM-16, portadora de la especificidad DQw7, previa y tras la absorción de la actividad anti-DQw1 mediante incubación con la BCL JES-THOM.

5.- ESTUDIO DE LAS REACCIONES NEGATIVAS DEL ANTICUERPO MONOCLONAL HUMANO 91C2 SOBRE CELULAS A2 y A28.

Las especificidades A2 y A28, al igual que casi todos los antígenos HLA definidos mediante los métodos de la serología clásica, no constituyen un todo homogéneo, sino que se ha demostrado, empleando diversas técnicas que permiten diseccionar de una forma más precisa las moléculas HLA, que engloban un determinado número de variantes ya sea a nivel genético o bioquímico. Así, por ejemplo, empleando técnicas de IEF, se ha podido subdividir la especificidad A2 en las variantes denominadas A2.1, A2.2, A2.3, A2.4 y A2.5 (88), definidas por su diferente patrón de migración a lo largo de un gel de IEF. En la tabla 20 se muestra la reactividad del anticuerpo monoclonal 91C2 frente a diferentes líneas celulares procedentes del X Taller Internacional de Histocompatibilidad portadoras de distintos subtipos definidos por IEF del antígeno A2. En vista de estos resultados, podemos descartar a los subtipos A2.2, A2.3 y A2.4 como responsables de las dos reacciones negativas sobre células A2 observadas en el anticuerpo 91C2.

Por otra parte, la especificidad serológica denominada A28 se ha podido dividir, en los subtipos Aw68 y Aw69 (60, 89). A su vez, el antígeno Aw68 se subdivide en las variantes conocidas como Aw68.1 y Aw 68.2. Con el propósito de ahondar un

BCL	SUBTIPO A2	ETNIA*	91C2
JES-THOM	A2.2	C	++
BM-16	A2.2	C	+
ABO 31227	A2.2	C	+
DEM	A2.2	C	++
WT-24	A2.2	C	++
BSM	A2.2	C	++
JVM	A2.2	C	++
DBB	A2.2	C	+
BM-9	A2.2	C	++
MADURA	A2.2	C	++
LUY	A2.2	C	++
OMW	A2.2	N	++
DK1	A2.3	M	+ / ++
RML	A2.4	AI	+
LZL	A2.4	AI	++
KT-17	A2.4	M	++
KNE	A2.4b	M	++

* C: caucásico.

AI: indio americano.

M: mongoloide.

N: negroide.

Tabla 20.- Variantes, definidas mediante IHF, de la especificidad A2 reconocidas por el anticuerpo monoclonal humano 2A2, determinadas mediante el empleo de una técnica de IFI.

poco más en las causas subyacentes a las reacciones negativas presentadas por el anticuerpo humano 91C2 sobre determinadas células del panel de estudio portadoras de la especificidad A28, se procedió a la tinción fluorescente con el anticuerpo monoclonal murino BB7.2, que reconoce un epítipo localizado tanto en moléculas A2 como en el subtipo Aw69 (77), de un pequeño panel de células portadoras de la especificidad A28. Los resultados que se muestran en la tabla 21 nos permiten excluir al subtipo Aw69 como responsable de las reacciones negativas observadas con el monoclonal 91C2, y permiten asignar a alguno de los subtipos de Aw68 la responsabilidad del patrón de reacción negativo, en concreto Aw68.2 parece el candidato más plausible como se discutirá más adelante.

BCL	HLA		MONOCLONAL		SUBTIPO A28
	A	B	91C2	BB7.2	
JMM	28,32	14,18	-	-	Aw68
AR-51	28,33	14,51	-	-	Aw68
128-12	28,33	14,35	-	-	Aw68
RSH	w68,30	42	+	-	Aw68.1
CE-6	28,1	35,50	+	-	Aw68
2-23	28,1	51	+	-	Aw68
FV-12	28,3	35,38	+ / ++	-	Aw68
LZ-11	28	w65	++	-	Aw68
45-22	28,32	44,35	+	-	Aw68
PS-15	28,32	49,51	+	-	Aw68
91-12	28,24	49,35	+	-	Aw68

Tabla 21.- Definición mediante IFI con el anticuerpo monoclonal murino BB7.2, que reconoce las especificidades HLA-A2+Aw69, de los subtipos de la especificidad A28 reconocidos por el anticuerpo monoclonal humano 91C2. Todas las BCLs empleadas procedían de individuos caucásicos.

V.- DISCUSSION.

Los datos presentados en este trabajo constituyen una descripción de la producción y aplicación de los anticuerpos monoclonales secretados por tres heterohibridomas estables humanos, en el estudio del polimorfismo del sistema HLA. Por tanto, parece quedar de manifiesto que el método consistente en la fusión de BCLs transformadas con EBV con un heteromieloma, desarrollado por Teng y col. (63, 74), tiene una amplia aplicación en la producción de anticuerpos monoclonales humanos dirigidos frente a antígenos celulares codificados por genes polimórficos. Así, por ejemplo, Foung y col. (125) han empleado también con éxito este procedimiento para producir anticuerpos humanos frente a antígenos eritrocitarios, mientras que el grupo de Hancock (126) lo ha aplicado a la producción de un heterohibridoma estable productor de anticuerpos monoclonales humanos específicos frente al antígeno HLA-DRw11.

A pesar de haberse conseguido algunos éxitos (90, 91), el empleo de la técnica de transformación con EBV para la producción de anticuerpos monoclonales humanos sigue siendo de uso limitado, principalmente a causa de una inestabilidad inherente de la producción de anticuerpos por parte de las LCLs. Las razones subyacentes a esta desaparición de la capacidad productora de Igs aún no se comprenden del todo; aparte de la pérdida de los cromosomas responsables de la síntesis de las cadenas que componen la molécula del anticuerpo, se piensa que el cese de la producción de Igs es una consecuencia de la propia

heterogeneidad de las líneas B, que da como resultado la invasión del cultivo por células no deseadas. En este sentido, incluso una pequeña aceleración en el ciclo celular conduciría, eventualmente, al dominio en el cultivo de uno o de algunos clones, a menudo con desventaja para el clon productor del anticuerpo específico. La solución obvia sería el clonaje de las células productoras de anticuerpos, pero, desafortunadamente, los procedimientos tradicionales de clonaje: dilución límite en cultivo líquido y crecimiento en colonias en medio semisólido ("cluster picking"), no son aplicables a las células transformadas con EBV con la misma eficiencia que cuando se emplean para los hibridomas murinos (92, 93). En general, resulta muy difícil crecer células linfoblastoides a concentraciones menores de 10 células por pocillo en cultivos líquidos. Aunque algunos autores han descrito éxitos esporádicos, las líneas linfoblastoides productoras de anticuerpos específicos fueron obtenidas usualmente a partir de cultivos con más de 10 células por pocillo (94, 95), por lo que no se pueden considerar clonadas en un sentido estricto, y tal vez requirieron etapas de reclonaje adicionales o resultaron clonadas de forma "espontánea" durante el cultivo a largo plazo. En el método alternativo de "cluster picking", el crecimiento celular se obtiene también a razón de más de 1 célula por pocillo; sin embargo, mediante sucesivas transferencias, se produce un enriquecimiento de las células productoras del anticuerpo deseado.

Otro obstáculo para la producción a largo plazo de anticuerpos monoclonales humanos mediante transformación con EBV, radica en el fenómeno denominado "senescencia clonal", que es probablemente una característica de muchas BCLs transformadas con este virus (96). Algunas líneas celulares muestran una capacidad declinante para crecer en cultivo (senescencia), y se convierten en células que no proliferan, con una morfología plasmacitoide, lo que sugiere poderosamente que la infección con EBV pueda inducir una activación inmunológica de las células B que las conduzca a su diferenciación terminal. Como consecuencia de esta diferenciación, las células podrían perder receptores para factores de crecimiento y, por tanto, dejar de responder a factores autocrinos.

A pesar de todos los problemas que existen con la técnica de transformación por EBV, no es por ello menos cierto que este virus transforma muy eficientemente a los linfocitos B humanos y genera un gran número de células productoras de anticuerpos, de modo que se incrementa la probabilidad de aislar con éxito aquellos clones secretores del anticuerpo de la especificidad requerida.

El desarrollo de una célula para la fusión que proporcione híbridos estables, es la segunda parte de la solución al problema que constituye la producción eficaz de anticuerpos monoclonales humanos. Resulta obvio que la

transformación por EBV de linfocitos B de sangre periférica de individuos inmunizados, puede ofrecer las células ideales para la generación de híbridos. En este sentido, seleccionamos una paciente en lista de espera para trasplante renal, inmunizada frente a distintas especificidades HLA como consecuencia de recibir un total de cinco transfusiones de sangre. Después de exponer los PBLs aislados de dicha paciente a EBV transformante, las células se sembraron en placas de microcultivo, en las que, al cabo de unas 3 semanas, aparecieron colonias de células B transformadas. El sobrenadante de los cultivos de cada pocillo se ensayó, entonces, mediante una técnica de ELISA que utiliza células enteras fijadas como antígeno, detectándose actividad antilinfocitaria en, aproximadamente, el 4% de los pocillos. Los cultivos positivos se diluyeron y sembraron de nuevo, ensayándose otra vez, al cabo de otras 3 semanas para detectar actividad antilinfocitaria. Este subcultivo se repitió algunas veces, seleccionándose durante todo el proceso los cultivos cuyos sobrenadantes presentaban una actividad más elevada.

Este procedimiento se desarrolló como un método de enriquecimiento y propagación de aquellas células secretoras de anticuerpos con actividad antilinfocitaria, y puesto que se basa en un proceso de selección de las células productoras de determinados anticuerpos y la eliminación de las células no específicas, demuestra poseer un efecto significativo de clonaje, incrementando, de esta forma, la probabilidad de que

algunos subcultivos productores de anticuerpos antilinfocitarios se conviertan en sublíneas estables. Las sublíneas así establecidas, se hallan enriquecidas de células productoras de anticuerpos específicos e, indudablemente, aumentan la posibilidad de formación y aislamiento de híbridos secretores de anticuerpos con actividad antilinfocitaria tras su fusión con el heteromiéloma SHM-D33.

Las células resultantes del proceso de fusión fueron fraccionadas y sometidas a un proceso de selección en medio HATO. En este medio selectivo se puede observar una gran mortalidad durante los primeros días siguientes a la fusión, observándose tan sólo unas pocas células supervivientes sobre lo que podríamos calificar de una escena de devastación. Estas células híbridas que logran sobrevivir, que morfológicamente parecen células del heteromiéloma parental, comienzan a dividirse y generan clones de células que se hacen visibles al microscopio invertido de contraste de fases entre los 7-15 días posteriores a la fusión, aunque, en algunos casos, su crecimiento se retrasa hasta 20 días. Habitualmente, estas clonas llegan a recubrir toda la superficie del pocillo a los 15-30 días. Dado que no todos los cultivos en los que se subdivide una fusión crecen al mismo tiempo, debe adoptarse un compromiso para fijar la fecha del estudio de los sobrenadantes y detectar los cultivos productores de anticuerpos antilinfocitarios. La fecha de estudio de sobrenadantes osciló

entre los 20 y 30 días después de la fusión.

Debido a que nuestro objetivo era la producción de anticuerpos monoclonales, los cultivos que presentaron actividad antilinfocitaria se clonaron por dilución límite. A pesar de que en la mayoría de las descripciones de la metodología de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales bien sean murinos o humanos, se recomienda el clonaje de los híbridos productores lo antes posible, dado que partimos de una población de BCLs altamente enriquecida en aquellas células responsables de la producción y secreción al medio de los anticuerpos con actividad antilinfocitaria, no creemos que esta etapa de clonación deba realizarse tan prematuramente cuando se están obteniendo anticuerpos monoclonales humanos mediante el método de fusión de una BCL con un heteromiéloma.

Con relación a este tema, resulta de interés el señalar que el heteromiéloma SHM-D33 empleado en este trabajo debido a sus buenas propiedades de fusión y elevada tasa de crecimiento, en nuestra opinión, dista un tanto de ser la solución ideal al problema de la búsqueda de un compañero de fusión efectivo para la generación de heterohíbridos estables secretores de anticuerpos monoclonales humanos. El cariotipo de este heteromiéloma indica que posee un total de 83 cromosomas, de los que 75 son murinos y tan sólo 8 humanos (63). Algunas fusiones de células humanas efectuadas con SHM-D33 indican que,

aunque hay una mayor retención de cromosomas humanos que en las correspondientes con mielomas murinos, la pérdida, no obstante, existe (63). En estas condiciones, no sería adecuado proceder al clonaje de todos los cultivos positivos obtenidos después de la fusión, ya que puede sucedernos que después de invertir mucho tiempo en el clonaje de un heterohíbrido, que es además harto engorroso, y en el supuesto de que éste tuviera éxito, podríamos encontrarnos con que las células hubieran perdido prematuramente su capacidad secretoria de anticuerpos. Por este motivo, creemos que para la producción de anticuerpos monoclonales humanos empleando el sistema descrito en este trabajo, es conveniente postergar el clonaje de 1 a 2 semanas después del primer ensayo de la actividad de los sobrenadantes, y asegurarnos de que el cultivo continúa secretando anticuerpos frente a estructuras presentes en la superficie linfocitaria.

La estrategia de clonaje seguida en el caso de los heterohíbridomas es, pues, la siguiente: después del primer estudio de los sobrenadantes, el contenido de los pocillos positivos se pasa a cultivar en pocillos cada vez mayores, y se mantienen de esta forma durante 2 semanas. Tras este período de tiempo, se reanalizan los sobrenadantes; aquellos cultivos que mantienen su actividad o la aumentan se conservan, y los que no se eliminan. De esta forma averiguamos si estos cultivos secundarios positivos contienen clones que, o bien son dominantes, o por lo menos no se hallan en situación de clara

inferioridad con respecto a otros clones. Estos cultivos interesantes serán alicuotados; unas alicuotas serán congeladas, mientras que las tres, procedentes de cada una de las líneas B parentales (RR1, RR2 y RR3), que hayan presentado la actividad antilinfocitaria más elevada, pasarán a ser clonadas por dilución límite. La congelación de los cultivos en este momento solamente se realiza por motivos de seguridad de la clona productora.

El clonaje en este momento tiene unas elevadas posibilidades de éxito, y de hecho todos nuestros cultivos tratados de este modo, pudieron ser clonados. Una vez llevados a cabo dos clonajes sucesivos en estas condiciones, se congelaron un mínimo de 10 viales de cada uno de los heterohibridomas en nitrógeno líquido, y sus productos pasaron a ser analizados para la determinación precisa de la especificidad de cada uno de ellos.

La especificidad de los anticuerpos secretados por los tres clones de células híbridas aislados, se definió al ensayar su reactividad sobre paneles de células que se componían de PBLs y BCLs aislados de diferentes individuos, y de líneas B homocigotas para los antígenos HLA procedentes de Talleres Internacionales de Histocompatibilidad, así como al realizar análisis de segregación de la especificidad reconocida en líneas celulares procedentes de los diferentes miembros de familias

informativas para las especificidades HLA reconocidas.

El análisis de la especificidad de los anticuerpos monoclonales objeto de este estudio, muestra que los procedentes del clon 91C2 reaccionan con células que portan las especificidades HLA-A2 o A28 de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, la correlación entre A2+A28 y nuestro anticuerpo, no fue del todo completa, encontrándose algunas discrepancias en un panel local de células elegidas al azar, no observadas en líneas celulares homocigotas para los antígenos HLA. Una explicación simplista de este hecho podría apoyarse en la existencia de una diferencia en la concentración de determinantes antigénicos expresados por estas células; los determinantes serían más numerosos en células homocigotas para una determinada combinación de antígenos HLA, que para las heterocigotas. No obstante, otra explicación, tal vez más aproximada al problema real, estriba en que tanto los antígenos A2 como A28 expresados por las células negativas para 91C2, representan subtipos de dichas especificidades que carecen del epitopo reconocido por este anticuerpo, indistinguibles de las positivas mediante tipificación estándar con aloantisueros convencionales.

Durante estos últimos años se ha avanzado en el estudio del polimorfismo de los antígenos de clase I mediante el uso de diversos métodos, entre los que se incluyen clones de

células T citotóxicas, IEF, anticuerpos monoclonales y enzimas de restricción, además de los antisueros convencionales, de forma que ha sido posible subdividir algunas de las especificidades HLA "clásicas", siendo HLA-A2 y A28 un buen ejemplo de ello. Hasta la fecha, se han caracterizado hasta 10 alelos diferentes de HLA-A2 (97) mediante determinación de su secuencia proteica o de DNA (tabla 1), que difieren entre sí en sustituciones de ciertos aminoácidos cuyo número oscila entre 1 y 6. Estos subtipos de A2 pueden ser clasificados en 4 grupos, en concordancia con la naturaleza de sus diferencias con el antígeno prototipo A2.1; así pues, existe un primer grupo que incluye A2.2F, A2.2Y y A2.4c; un segundo grupo que comprende exclusivamente a la variante A2.3; el tercer grupo consta de los subtipos A2.4a, A2.4b y A2-OZB, mientras que el cuarto grupo está formado por A2-LEE (97). Aunque los datos concernientes a la distribución étnica de los subtipos de A2 no abundan, parece ser que el subtipo A2.1 (equivalente a la variante A2.2 definida mediante IEF) comprende el 89% de los alotipos de la especificidad A2 en la población caucásica (98), pudiéndose adscribir el resto a las variantes A2.4a/b/c, A2.2F, A2.2Y y A2-OZB. Los subtipos A2.3 y A2.LEE parecen estar restringidos a individuos de procedencia oriental (61, 99, 100).

La mayoría de los aloantisueros humanos no distinguen entre los diferentes subtipos de la especificidad A2, lo que sugiere que tal vez la mayoría de los determinantes

ALELO	ESPECIFICIDAD	EQUIVALENTE PREVIO	REFERENCIAS
A*0201	HLA-A2	A2.1	100, 101
A*0202	HLA-A2	A2.2F	102
A*0203	HLA-A2	A2.3	102, 103
A*0204	HLA-A2	-	104
A*0205	HLA-A2	A2.2Y	103
A*0206	HLA-A2	A2.4a	105-107
A*0207	HLA-A2	A2.4b	108
A*0208	HLA-A2	A2.4c	109
A*0209	HLA-A2	A2-OZB	110
A*0210	HLA-A2	A2-LEE	111
A*6801	HLA-Aw68	Aw68.1	112
A*6802	HLA-Aw68	Aw68.2	103
A*6901	HLA-Aw69	-	12

Tabla 1.- Designación de los alelos HLA de clase I A2 y A28.

aloespecíficos no resultan afectados por el polimorfismo de los diferentes subtipos. Esto puede explicarse por el hecho de que muchos residuos polimórficos se hallan localizados en el fondo de la hendidura o tienen sus cadenas laterales apuntando al interior de dicha hendidura a la que se liga el péptido

antigénico para ser presentado, y por tanto, no son fácilmente accesibles a la unión directa del anticuerpo. No obstante, pueden distinguirse algunos subtipos mediante el uso de anticuerpos, lo que se ha aprovechado para el mapeo serológico de ciertos epítopos. Entre estas excepciones se encuentran los anticuerpos monoclonales murinos CR11-351 y BB7.2.

El anticuerpo monoclonal CR11-351, específico para los antígenos A2+A28, no reacciona frente al subtipo A2.3; el epítopo reconocido por este anticuerpo resulta críticamente afectado por un cambio en la posición 149 de su cadena peptídica, pero no en los residuos 152 o 156 de la molécula A2.3 (113, 114). A su vez, el anticuerpo monoclonal BB7.2, específico para los antígenos A2+Aw69, no es capaz de reconocer la variante A2-LEE (61), y el correspondiente epítopo implica de forma crítica al residuo 107 (114, 115).

Por su parte, la especificidad A28 se ha dividido en dos subtipos Aw68 y Aw69 (ver tabla 1). El antígeno HLA-Aw69 se identificó como un subtipo menor de A28, que podía discriminarse de Aw68 en virtud de una inesperada reacción con los anticuerpos monoclonales murinos PA2.1 y BB7.2, que son, por otra parte, enteramente específicos para A2 (116, 117). Estudios posteriores han confirmado que Aw69 es, en realidad, una molécula recombinante que presenta identidad con Aw68 en el primer dominio extracelular ($\alpha 1$), e identidad con A2 en el segundo y

tercer dominios extracelulares ($\alpha 2$ y $\alpha 3$) (117). El antígeno Aw68 puede ser subdividido, a su vez, mediante IEF en dos subgrupos con diferentes puntos isoelectricos: Aw68a y Aw68b (118), mientras que los datos de secuenciación obtenidos por Holmes y col. (104) dividen Aw68 en las subvariantes Aw68.1 y Aw68.2, que difieren entre sí en la sustitución de 6 nucleótidos. Las sustituciones encontradas en Aw68.2 conducen a que el producto proteico posea un carácter más básico, y pueden ser responsables de las diferencias en el punto isoelectrico encontradas en los estudios realizados mediante IEF; así, es posible que la variante Aw68b corresponda al mismo producto génico que Aw68.2.

Retomando el hilo de nuestra discusión acerca de las reacciones negativas del anticuerpo monoclonal 91C2 con ciertas células portadoras de las especificidades HLA-A2 o A28, hemos de decir que aunque no encontramos explicación para las reacciones negativas con las dos células A2, puesto que las variantes de A2 definidas por IEF y representadas en las células del panel del X Taller Internacional de Histocompatibilidad, así como en las líneas celulares KNE, portadora de una variante del subtipo A2.4, y DK1, que representa el subtipo A2.3 presente en individuos orientales, analizadas en la tabla 18 del capítulo dedicado a la exposición de resultados, reaccionaron positivamente con este anticuerpo, es de destacar, no obstante, el hecho de que una de las células A2 negativas con 2A2 (ANITA), fue aislada de un individuo hindú, mientras que las demás

células A2 del panel de testaje, procedentes de individuos europeos caucásicos, no ofrecieron tal anomalía. Se desconoce el grupo étnico del individuo del que se aisló la otra célula portadora de la especificidad A2 que presentó una reacción negativa con el anticuerpo 91C2 (ASPGAR). Desafortunadamente, no se pudieron obtener BCLs de estos dos individuos para un posterior análisis de la posible variante o variantes de la especificidad A2 expresada por estas células. En los estudios serológicos llevados a cabo durante el último Taller Internacional de Histocompatibilidad, se hallaron diferentes patrones séricos de reactividad para A2 en células procedentes de individuos caucásicos así como en orientales (89); este hecho unido a la existencia de hasta 10 subtipos de la especificidad A2 (118), nos induce a pensar que estas diferencias en el antígeno A2 puedan ser las responsables del patrón de reacción del anticuerpo monoclonal 91C2.

Considerando ahora el comportamiento del anticuerpo monoclonal 91C2 frente a células portadoras de la especificidad serológica A28, en el que se observan también reacciones negativas de 5 células HLA-A28, llama poderosamente la atención el hecho de que 5 de las 6 células negativas poseen además el antígeno B14. Hace ya algunos años, Holmes y col. (119), utilizando un aloantisuero, describieron una variante de la especificidad A28 que denominaron en un principio A28.2 (actualmente Aw68.2), y que se hallaba en desequilibrio de

ligamiento con el antígeno B14. Sus resultados, en combinación con los de Belvedere y col. (120), sugerían que este subtipo era de origen mediterráneo, en contraste con Aw68.1, que predomina en las poblaciones del norte de Europa. De esta forma, ciertas variantes de A28, en concreto pensamos que se trata de Aw68.2, contribuirían, al igual que en el caso anterior, a las reacciones negativas observadas.

Los anticuerpos 34F11 y 2A2 se hallaban compuestos por diferente tipo de cadena ligera y exhibían especificidad anti-DQw1. Este dato, unido al diferente patrón de reacción de estos dos monoclonales humanos, constituye una evidencia a favor del concepto de que reconocen dos determinantes antigénicos diferentes presentes en la misma especificidad.

El aspecto más interesante acerca del anticuerpo monoclonal de origen humano 34F11, radica en el hecho de presentar reacciones citotóxicas frente a células portadoras de la especificidad serológica DQw1. Por tanto, 34F11 puede ser empleado como reactivo de tipaje serológico mediante la técnica de la microlinfocitotoxicidad estándar del NIH.

El anticuerpo monoclonal humano 2A2 reacciona de manera similar a 34F11 excepto en las líneas celulares portadoras del antígeno DQw7 indicadas. La especificidad DQw7 es una de las tres variantes en que se subdivide DQw3, un antígeno

HLA de clase II codificado en el locus DQ que se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con DR4, DR5 y DR9, aunque también puede estar presente, si bien de forma esporádica y como asociación DR-DQ no habitual, en ciertos haplotipos, entre los que se incluyen DRw6, DRw8, DRw16, y el haplotipo Bw57-DR7 (88). Tras la celebración del último Taller Internacional de Histocompatibilidad en 1987, se reconocieron y designaron de forma oficial tres subtipos de la especificidad DQw3: DQw7, DQw8 y DQw9. Casi todos los haplotipos DR5 de etnia caucásica se hallan asociados a DQw7, lo que también sucede en aproximadamente el 40% de los haplotipos DR4; en particular, DQw7 parece hallarse en desequilibrio de ligamiento con B44-DR4, el resto de los haplotipos DR4 se asocia a la variante denominada DQw8, que se halla, a su vez, en desequilibrio con Bw60-DR4 y Bw62-DR4. Una población de haplotipos DR7, concretamente Bw57-DR7, se halla asociada a DQw9, también presente en los haplotipos DR9 (88).

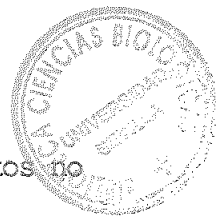
Existen diferentes ejemplos de anticuerpos monoclonales murinos y humanos que presentan reacciones cruzadas entre distintos antígenos DQ; el anticuerpo de ratón IIB3, por ejemplo, reacciona no sólo con células portadoras de la especificidad DQw1, exceptuando algunas DQw5, sino que reconoce también las especificidades DQw4, DQw8 y DQw9 (86). El anticuerpo monoclonal humano TrB12, por su parte, presenta un patrón de reconocimiento antigénico bastante similar al de IIB3,

ya que reacciona con los haplotipos DQw6, DQw8 y DQw9 (121).

El anticuerpo monoclonal 2A2 posee un patrón de reacción muy interesante, puesto que, además de la especificidad descrita anti-DQw1, el análisis de las reacciones obtenidas frente al panel de BCLs portadoras de la especificidad DQw7, sugiere la existencia de dos variantes de este antígeno; el subtipo 2A2-negativo, que parece asociarse preferencialmente a la especificidad HLA-DRw11, mientras que la variante DQw7 2A2-positiva se ha detectado en todas las células DRw12 ensayadas, así como en ciertas asociaciones DR-DQ infrecuentes. La especificidad DR4 no parece, a la vista de los resultados, tener preferencia alguna por asociarse con una u otra variante. Por otra parte, los datos que se poseen acerca del tipo de cadena α y β de aquellas BCLs pertenecientes al panel del X Taller Internacional de Histocompatibilidad, apuntan a la cadena DQ β como la responsable de las reacciones positivas de ciertas células portadoras de la especificidad DQw7, con el anticuerpo 2A2, ya que las cadenas DQ α difieren entre todas estas BCLs y se hallan presentes en otras células de este panel asociadas a distintas cadenas DQ β .

Los análisis serológicos así como los efectuados empleando RFLPs efectuados en el transcurso del X Taller Internacional de Histocompatibilidad en 1987, apuntan a la existencia de una cierta heterogeneidad en la especificidad DQw7

(88); de esta forma, parece haber diferencias en RFLPs dentro de DQw7, dependiendo de su localización en un haplotipo DR5 o DR4. La existencia de dos fragmentos, Kpn I de 12.8 kb y Eco RV de 14.5 kb, visualizados mediante hibridación con una sonda específica para el gen DQB, y que se encuentran presentes en células DR4-DQw7 pero no en células DR5-DQw7, sugiere tal heterogeneidad. Otro dato a tener en cuenta es el patrón de reacción de dos aloantisueros estudiados en dicho Taller (en concreto 5360 y 5361), que parecen también discriminar dos subtipos del antígeno DQw7, que se han denominado, en un principio, DQw7.1 y DQw7.2; estos sueros eran capaces de reaccionar con la mayoría de las células portadoras del haplotipo DR5-DQw7 (DQw7.1), pero eran claramente negativas con una subpoblación (10-15%, DQw7.2), y reaccionaban de igual manera con, aproximadamente, el 20% de las células DR4 ensayadas (88). Por otra parte, el clon de células T denominado EM.C3, (122) parece tener también especificidad para la misma población de células DR4-DQw7 y ausencia de reactividad con DR5-DQw7, mostrando, de esta forma, correlación con los datos obtenidos de los patrones de RFLP. Todas estas observaciones apoyan la interpretación de la existencia de dos subtipos de la especificidad DQw7. Nuestro anticuerpo monoclonal humano 2A2, pues, parece poseer un patrón de reacción opuesto al del clon de células T EM.C3 y al de los dos aloantisueros mencionados antes, ya que es negativo con la mayoría de las BCLs ensayadas portadoras del haplotipo DRw11-DQw7, que comprende, según



nuestros estudios el 85.7% de las células DR5 (datos no publicados), mientras que las células DRw12-DQw7, todas ellas positivas con 2A2, comprenden el 14.3%. Asimismo, los estudios de distribución de las especificidades DQw7 y DQw8 en células DR4 (123), permiten asignar un valor del 40.9% a la presencia del haplotipo DR4-DQw7 en la población local, mientras que el 63.6% posee la combinación DR4-DQw8. Todos estos datos parecen apuntar a la posibilidad de que la variante de DQw7 2A2-negativa se corresponda con el subtipo DQw7.1, mientras que la variante DQw7 2A2-positiva se correspondería con el subtipo DQw7.2.

La técnica de inmovilización específica mediante anticuerpos monoclonales de glicoproteínas de la superficie celular se desarrolló originalmente para plaquetas (MAIPA) (124), y posteriormente para estudios serológicos empleando células linfoides como diana (76). El ensayo requiere la disponibilidad de anticuerpos monoclonales murinos específicos para epítomos monomórficos diferentes de los determinantes antigénicos alogénicos frente a los que van dirigidos los anticuerpos humanos, puesto que si no se cumple este requisito, puede tener lugar una inhibición competitiva entre los anticuerpos monoclonales murino y humano, que ocasionaría falsos negativos.

En nuestro laboratorio hemos adaptado este ensayo para la determinación del tipo de producto, procedente de diferentes

loci HLA, frente al que van dirigidos los anticuerpos monoclonales humanos obtenidos. En este sentido, el ensayo MAILA resulta superior con respecto a otros métodos tradicionales tales como radioinmunoprecipitación o "Western blot" ("immunoblotting"), ya que no requiere la utilización de radiactividad, es menos tedioso y no consume tanto tiempo, y, sobre todo, porque nos proporciona información precisa, en el caso de los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos frente a moléculas HLA de clase II, del tipo de molécula reconocida (DR, DQ o DP), lo cual no es posible por ninguno de los métodos mencionados antes, puesto que el peso molecular de todos estos productos HLA de clase II es el mismo, y habría que recurrir a técnicas de electroforesis bidimensional o de inmunoprecipitación secuencial para este tipo de determinación.

Si se comparan los datos y resultados mostrados en el presente estudio con los de algunos otros en los que se persiguió idéntico objetivo al nuestro, es decir, la producción de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer determinantes polimórficos de antígenos HLA, inmunizando ratones con células linfoides humanas (127), nos llama poderosamente la atención el hecho de que, a pesar de ser los antígenos HLA buenos inmunógenos en ratones, puesto que son las moléculas de superficie más expresadas en valores absolutos, tan sólo se consiguen un 2-3% de fusiones que resulten en células híbridas productoras de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a

determinantes polimórficos presentes en moléculas HLA (127). La explicación de esto radica en el hecho de que el número de determinantes monomórficos expresados por las diferentes cadenas que componen un cierto tipo de molécula HLA, es muy superior al de determinantes polimórficos, que se concentran, en un número reducido, en determinados puntos de las cadenas de los antígenos HLA. El predominio de los determinantes monomórficos explicaría el hecho de que, en la práctica, se obtenga un número muy reducido de anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes polimórficos en el modelo murino.

La obtención de anticuerpos monoclonales humanos que reconozcan determinantes polimórficos en moléculas HLA, a pesar de requerir, en principio, un esfuerzo adicional y la solución de los problemas que plantea el clonaje de los heterohíbridos, etc., resulta, no obstante, más adecuada para la consecución de este objetivo. Resulta relativamente fácil obtener líneas B transformadas con EBV secretoras de anticuerpos con actividad antilinfocitaria, aunque su estabilización es la etapa más ardua y laboriosa de todo el proceso. El hecho de que de un solo individuo inmunizado se hallan podido obtener 3 anticuerpos monoclonales diferentes dirigidos frente a determinantes HLA polimórficos nos hace concebir grandes esperanzas con respecto a la utilidad de este método.

No obstante y a pesar de lo expuesto anteriormente, la

investigación en el terreno de los anticuerpos monoclonales humanos está todavía, con mucho, en su infancia. Mientras que los esfuerzos encaminados a encontrar la línea celular compañera en la fusión del linfocito B o de la BCL, más idónea continúan, los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar como más prometedores a los heteromiomas, al menos en ciertas aplicaciones. Se preve que en un futuro no muy lejano, los anticuerpos monoclonales humanos contribuirán de forma importante al estudio del polimorfismo de la región HLA; una respuesta inmune humana frente a antígenos HLA tenderá, al contrario que una murina, a evitar los epitopos monomórficos compartidos por todas las moléculas HLA o bien por grupos de ellas. Por tanto, los anticuerpos anti-HLA producidos en una respuesta de estas características estarán dirigidos, primordialmente, frente a determinantes polimórficos, haciéndolos, de esta forma, herramientas inapreciables para la disección fina de la trama o red de diferentes epitopos que componen una determinada molécula HLA, y permitiendo, asimismo, el establecimiento de relaciones entre las diferentes moléculas que comparten un determinante antigénico dado. Este último punto es muy interesante desde el punto de vista evolutivo, puesto que nos puede dar luz acerca del posible mecanismo genético implicado en la generación de los diferentes alelos de los genes que componen el sistema HLA.

Para ciertas enfermedades autoinmunes, existen

epitopos polimórficos de clase II asociados a la enfermedad en particular, que contribuyen directamente a la susceptibilidad (128). Por tanto, sería extremadamente importante cerciorarse qué alelo codificaría el epitopo de clase II responsable, directamente, de la susceptibilidad o resistencia a una enfermedad asociada al sistema HLA en particular. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos para tales epitopos sería de importancia capital para la identificación de individuos predispuestos a padecer tales enfermedades autoinmunes.

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- Hemos producido y caracterizado tres nuevos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos frente a determinantes polimórficos presentes en moléculas HLA de clase I y clase II.
- 2.- Los estudios de distribución celular y bioquímicos demuestran que el anticuerpo monoclonal humano 91C2, reconoce un epítipo presente en los antígenos HLA A2+A28.
- 3.- El anticuerpo 91C2 no parece reconocer alguna variante de la especificidad A2, ni el subtipo de A28 conocido como Aw68.2, con prevalencia en la población mediterránea y que se halla en desequilibrio de ligamiento con el antígeno B14.
- 4.- Los estudios de distribución celular y bioquímicos demuestran que el anticuerpo monoclonal humano 34F11 reconoce un epítipo presente en la especificidad HLA-DQw1.
- 5.- El anticuerpo monoclonal humano 34F11 es un excelente reactivo para el tipaje de la especificidad serológica DQw1, mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad estándar del NIH.

- 6.- Los estudios de distribución celular y bioquímicos demuestran que el anticuerpo monoclonal humano 2A2 reconoce un epítipo presente en la especificidad HLA-DQw1, que presenta reactividad cruzada con otro determinante antigénico localizado en un subtipo de la especificidad HLA-DQw7.

- 7.- El anticuerpo 2A2 permite la discriminación de dos variantes de la especificidad HLA-DQw7; la variante 2A2- que se halla en desequilibrio de ligamiento con el antígeno HLA-DRw11, mientras que la variante 2A2+ se asocia preferencialmente al antígeno HLA-DRw12 y a ciertas combinaciones DR-DQ infrecuentes en la población caucásica. La especificidad serológica HLA-DR4 no parece hallarse en desequilibrio de ligamiento con ninguna de las dos variantes de DQw7 definidas por este anticuerpo.

- 8.- Los humanos, al contrario que los ratones u otras especies comúnmente empleadas en la generación de células híbridas secretoras de anticuerpos monoclonales, presentan tolerancia a las porciones monomórficas de las moléculas HLA, por lo que los anticuerpos monoclonales derivados de humanos definen sólo epítopos HLA polimórficos.

VII.- REFERENCIAS.

- 1.- Goodfellow PN, Jones EA, van Heyningen V et al. 1975. Nature 254: 267-69.
- 2.- Strominger JL, Engelhard VH, Fuks A et al. 1981. The role of the Major Histocompatibility Complex in immunobiology, pp. 115-72. Wiley & Sons.
- 3.- Orr HT, López de Castro JA, Lancel D & Strominger JL. 1979. Biochemistry 18: 5711-19.
- 4.- Bjorkman PJ & Parham P. 1990. Annu. Rev. Biochem. 59: 253-88.
- 5.- Shimizu Y, Geraghty DE, Koller BH et al. 1988. PNAS 85: 227-31.
- 6.- Koller BH, Geraghty DE, DeMars R et al. 1989. J. Exp. Med. 169: 469-80.
- 7.- Geraghty DE, Koller BH & Orr HT. 1987. PNAS 84: 9145-49.
- 8.- Malissen M, Malissen B & Jordan BR. 1982. PNAS 79: 893-97.
- 9.- Sodoyer R, Damotte M, Delovitch TL et al. 1984. EMBO

- J. 3: 879-85.
- 10.- Strachan T, Sodoyer R, Damotte M & Jordan BR. 1984.
EMBO J. 3: 887-94.
- 11.- Koller BH & Orr HT. 1985. J. Immunol. 134: 2727-33.
- 12.- Holmes N & Parham P. 1985. EMBO J. 4: 2849-54.
- 13.- Ways JP, Coppin HL & Parham P. 1985. J. Biol. Chem.
260: 11924-33.
- 14.- Pober JS, Guild BC & Strominger JL. 1978. PNAS 75:
6002-06.
- 15.- Krangel MS. 1985. 4th MHC Cloning Workshop, Stanford
CA. Abstract p. 43.
- 16.- Springer TA, Kaufman JF, Terhorst C & Strominger JL.
1977. Nature 268: 213-18.
- 17.- Snary D, Barnstable C, Bodmer WF et al. 1976. Cold
Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41: 379-86.
- 18.- Benacerraf B. 1981. Science 212: 1229-38.

- 19.- Shackelford DA & Strominger JL. 1983. J. Immunol. 130:
274-82.
- 20.- Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ et al. 1984. Cell 36:
1-13.
- 21.- Williams AF. 1987. Immunol. Today 8: 298-303.
- 22.- Kavathas P, DeMars R, Bach FH & Shaw S. 1981. Nature
293: 747-49.
- 23.- DeMars R, Chang C & Rudersdorf RA. 1983. Hum. Immunol.
8: 123.
- 24.- Levine F, Ehrlich H, Mach B et al. 1985. PNAS 82:
3741-45.
- 25.- Auffray C, Kuo J, DeMars R & Strominger JL. 1983.
Nature 304: 174-77.
- 26.- Hardy DA, Bell JI, Long EO et al. 1986. Nature 323:
453-55.
- 27.- Bodmer JG. 1988. Vox Sang. 55: 119-126.
- 28.- Kappes D & Strominger JL. 1988. Annu. Rev. Biochem.

57: 991-1028.

- 29.- Bodmer JG, Marsh SGE & Albert E. 1990. *Immunol. Today* 11: 3-10.
- 30.- Kawai J, Ando A, Sato T et al. 1989. *J. Immunol.* 142: 312-17.
- 31.- Bodmer J & Bodmer W. 1984. *Immunol. Today.* 5: 251-54.
- 32.- Bodmer JG, Marsh SGE, Parham P et al. 1990. *Tissue Antigens* 35: 1-8.
- 33.- Charron DJ, Lotteau V & Turmel P. 1984. *Nature* 312: 157-59.
- 34.- Sorrentino R, Lillie J & Strominger JL. 1985. *PNAS* 82: 3794-98.
- 35.- Bohme J, Andersson M, Andersson G et al. 1985. *J. Immunol.* 135: 2149-55.
- 36.- Lotteau V, Teyton L, Burroughs D & Charron D. 1987. *Nature* 329: 339-41.
- 37.- Lotteau V, Teyton L, Tongio M-M et al. 1987.

Immunogenetics 25: 403-7.

- 38.- López de Castro JA, Bragado R, Ezquerria A & Vega MA.
1984. Histocompatibility Testing 1984, pp. 499-504.
Springer-Verlag.
- 39.- Egel R. 1981. Nature 290: 191-92.
- 40.- Coligan JE. 1984. Surv. Immunol. Res. 3: 176-78.
- 41.- Schwartz RH. 1985. Annu. Rev. Immunol. 3: 237-61.
- 42.- Janeway CA, Bottomly K, Babich J et al. 1984. Immunol.
Today 4: 99-105.
- 43.- Buus S, Colon S, Smith C et al. 1987. PNAS 83: 3968.
- 44.- Unanue ER & Allen PM. 1987. Science 236: 554.
- 45.- Sacha JA & Kirwan JR. 1986. Dis. Markers 4: 13.
- 46.- Cease KB, Berkower I, York-Jolley & Berzofsky JA.
1986. J. Exp. Med. 164: 1779.
- 47.- Cease KB, Buckenmeyer G, Berkower I et al. 1986. J.
Exp. Med. 164: 1440.

- 48.- Merryman P, Gregersen PK, Lee S et al. 1988. J. Immunol. 140: 2447-52.
- 49.- Harding CV, Leyva-Cobian F & Unanue ER. 1988. Immunol. Rev. 106: 77-92.
- 50.- Potter M & Boyce CR. 1962. Nature 193: 1086-87.
- 51.- Cotton RGH & Milstein C. 1973. Nature 244: 42-43.
- 52.- Schwaber J & Cohen EP. 1973. Nature 244: 444-47.
- 53.- Köhler G & Milstein C. 1975. Nature 256: 495-97.
- 54.- Olsson L & Kaplan HS. 1980. PNAS 77: 5429-31.
- 55.- Croce CM, Linnenbach A, Hall W. 1980. Nature 288: 488-89.
- 56.- Bodmer JG & Bodmer WF. 1984. Br. Med. Bull. 40: 267-75.
- 57.- Möller G. 1979. Immunol. Rev. vol. 47.
- 58.- Kennedy LJ, Bourel D, Dejour G et al. 1987. Tissue Antigens 29, 43-54.

- 59.- Colombani J, Lepage V, Raffoux C & Colombani M. 1989. Tissue Antigens 34: 97-110.
- 60.- Parham P & Brodsky F. 1981. Hum. Immunol. 3: 277-99.
- 61.- Kennedy LJ, Wallace LE, Madrigal JA et al. 1987. Immunogenetics 26: 155-60.
- 62.- Heyes J, Austin P, Bodmer J et al. 1986. PNAS 83: 3417.
- 63.- Teng NNH, Reyes GR, Bieber M et al. 1985. Human hybridomas and monoclonal antibodies, pp. 71-87. Plenum Press.
- 64.- Fong SKH, Perkins S, Arvin A e SGE, Madrigal JA et al. 1989. Immunobiology of HLA vol. I, pp. 340-41. Springer-Verlag.
- 89.- Curtoni ES, Lawlor SD, Kennedy LJ et al. 1984. Histocompatibility Testing, pp. 125. Springer-Verlag.
- 90.- Pistillo MP, Hammerling U, Dupont B & Ferrara GB. 1986. Hum. Immunol. 15: 109-17.
- 91.- Pistillo MP, Tanigaki N, Mazzoleni O et al. 1987.

Immunogenetics 25: 145.

- 92.- Steinitz M, Klein G, Koskimes S & Makela R. 1977.
Nature 269: 420-22.
- 93.- Zurawski VR, Spedden SE, Black PH & Haber E. 1978.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 152-55.
- 94.- Lungren K, Walgren M, Troye-Blomberg M et al. 1983. J.
Immunol. 4: 2000-03.
- 95.- Tiebout RF, Stricker EAM, Hagensars R & Zeijlemaker
WP. 1984. Eur. J. Immunol. 14: 399-404.
- 96.- Melamed MD, Gordon J, Ley SJ et al. 1985. Eur. J.
Immunol. 15: 742-46.
- 97.- López de Castro JA. 1989. Immunol. Today 7: 239-46.
- 98.- Van der Poel KJ, Pool J, Goulmy E & van Rood JJ. 1983.
Immunogenetics 17: 599-608.
- 99.- Van der Poel JJ, Mölders H, Thompson A & Ploegh HL.
1983. Immunogenetics 17: 609-21.
- 100.- Fauchet R, Bodmer JG, Kennedy LJ et al. 1984.

Histocompatibility testing, pp. 211-17. Springer-Verlag.

- 101.- Koller BH & Orr HT. 1985. J. Immunol. 134: 2727-33.
- 102.- Cianetti L, Testa U, Scotto L et al. 1989. Immunogenetics 29: 80-91.
- 103.- Mattson DH, Handy DE, Bradley DA et al. 1987. Immunogenetics 26: 190-92.
- 104.- Holmes N, Ennis P, Wan AM et al. 1987. J. Immunol. 139: 936-41.
- 105.- Yang SY. 1989. Immunobiology of HLA, vol. I, pp. 43-44. Springer-Verlag.
- 106.- Ezquerria A, Doménech N, van der Poel J et al. 1986. J. Immunol. 137: 1642-49.
- 107.- Parham P, Lawlor DA, Salter RD et al. 1989. Immunobiology of HLA, vol. II, pp. 10-33. Springer-Verlag.
- 108.- Parham P, Lawlor DA, Lomen CE & Ennis PD. 1989. J. Immunol. 142: 3937-50.

- 109.- Doménech N, Ezquerria A, Castaño R & López de Castro JA. 1988. Immunogenetics 27: 196-202.
- 110.- Doménech N, Castaño R, Goulmy E & López de Castro JA. 1988. Immunogenetics 28: 143-52.
- 111.- Castaño R, Ezquerria A, Doménech N & López de Castro. 1988. Immunogenetics 27: 345-55.
- 112.- Epstein H, Kennedy LJ & Holmes N. 1989. Immunogenetics. 29: 112-16.
- 113.- Hogan KT, Clayberger C, Bernhard EJ et al. 1988. J. Immunol. 141: 2519-25.
- 114.- Santos-Aguado J, Barbosa JA, Biro PA & Strominger JL. 1988. J. Immunol. 141: 2811-18.
- 115.- Salter RD, Clayberger C, Lomen CE et al. 1987. J. Exp. Med. 166: 283-88.
- 116.- Curtoni ES, Lawler SD, Kennedy LJ et al. 1984. Histocompatibility testing. Springer-Verlag.
- 117.- Wallace LE, Kennedy LJ, Landon C et al. 1986. Tissue Antigens 27: 298-307.

- 118.- Madrigal JA, Kennedy LJ, Marsh SGE & Bodmer JG. 1989. Immunobiology of HLA, vol. I, pp. 341-43. Springer-Verlag.
- 119.- Holmes DJ, Miller Wv & Rodey GE. 1982. Tissue Antigens 19: 161-67.
- 120.- Belvedere M, Richiardi P, Luciani G & Curtoni ES. 1975. Tissue Antigens 19: 161.
- 121.- Kolstad E, Hansen T & Hannestad K. 1987. Hum. Immunol. 20: 219-31.
- 122.- Mickleson E, Sterkers G, Zeevi A et al. 1990. Histocompatibility Testing, vol. I, pp. 513-15. Springer-Verlag.
- 123.- Sánchez B, Moreno I, Magariño R et al. 1990. Tissue Antigens (en prensa).
- 124.- Kiefel V, Santoso S, Weisheit M & Mieller-Eckhardt C. 1987. Blood 70: 1722-26.
- 125.- Foung SKH, Engleman EC & Grumet FC. 1986. Methods Enzymol. 121: 168-72.

- 126.- Hancock RJT, Martin, A, Laundy, GJ et al. 1988. Human Immunol. 22: 135-42.
- 127.- Vilella R. Tesis Doctoral. Barcelona, Facultad de Biología.
- 128.- Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, et al. 1988. Science 240: 1003-08.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Berta Sanchez Sanchez
Unidad Productiva de Anticuerpos monoclonales tumorales y su aplicación en el estudio del pémorfismo del Sistema HLA.

acordó otorgarle la calificación de Apto con laude

Sevilla, 8 de noviembre 1980

El Vocal,



El Presidente

A. Goberna

El Vocal,



El Secretario,

Elisa B

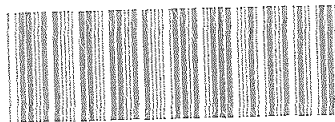
El Vocal,



El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672389