

Obtención de un heteromiéloma de cultivo (CB-F7) con alta eficiencia para la inmortalización de células B.

Al editor:

Los anticuerpos monoclonales (AcM) murinos se emplean con éxito en la actualidad para el desarrollo de reactivos diagnósticos altamente sensibles, para la purificación de biomoléculas y el estudio de la regulación de la cadena idiotipo-antiidiotipo, entre otras aplicaciones (Gavilondo, 1987). Aun así, la aplicación de estos AcM en el hombre, con propósitos diagnósticos y especialmente terapéuticos, puede ser afectada por los efectos colaterales provocados en el organismo humano por la naturaleza xenogénica de estas proteínas. Esta es precisamente una de las razones fundamentales que ha llevado a que varios grupos de investigadores estén tratando de obtener anticuerpos monoclonales humanos (AcMh) (Dorfmann, 1985).

Entre las diferentes vías que se han explotado con este fin se encuentran: a) la inmortalización de células B humanas mediante la infección con el virus de Epstein-Barr (EBV) (Kozbor y Roder, 1981), y b) la hibridación somática de linfocitos B humanos con mielomas humanos (Croce *et al.*, 1980) y de ratón (Butler *et al.*, 1983).

Aun cuando existe ya una considerable literatura al respecto, algunos problemas tecnológicos están todavía por resolver. Las células B transformadas por el EBV resultan inestables respecto a su crecimiento y producción de inmunoglobulinas, y las cantidades de estas detectadas en los sobrenadantes de los cultivos de estas líneas celulares linfoblastoides son habitualmente bajas (Brown, 1982). Por otra parte, la creación de hibridomas humano-humano tiene serias complicaciones tecnológicas a causa de la ausencia de una línea celular humana "pareja de fusión", de comportamiento óptimo (secretan inmunoglobulinas propias, tienen inestabilidad cromosómica, hibridizan a muy bajas frecuencias, crecen lentamente) y comparable con las murinas. En el caso de la construcción de heterohibridomas humano x ratón - basados en líneas de mielomas de ratón -, también se ha descrito la pérdida progresiva de cromosomas humanos, específicamente aquellos que tienen que ver con la producción de inmunoglobulinas.

No obstante, nosotros hemos podido demostrar la aparición de heterohibridomas, obtenidos luego de la fusión del mieloma P3/x63.Ag8.653 y linfocitos humanos de bazo, que produjeron establemente altas cantidades de IgM humana (más de 100 $\mu\text{g}/48$ horas/millón de células) por más de un año en cultivo (Jahn *et al.*, 1987). En estos experimentos, independientemente de la fuente de los linfocitos humanos - sangre periférica, bazo, ganglio linfático, médula ósea, fluido sinovial -, y de diferentes esquemas de preestimulación, las eficiencias de fusión fueron bajas en este sistema (un híbrido por 5 millones de linfocitos) (Jahn *et al.*, 1987a). Aun cuando se tenga en cuenta que la frecuencia de células B precursoras específicas pueda ser baja en todos estos compartimientos, este método no parece ser el ideal para la producción efectiva de AcMh.

Ha sido propuesto que la presencia de cromosomas humanos en el genoma de una línea de mieloma murino puede contribuir a la "aceptación" de otros cromosomas humanos y estabilizar las construcciones derivadas de fusiones interespecies (Ostberg y Pursch, 1983). Basado en este principio, hemos trabajado en la construcción de heteromiéomas para ser empleados como "parejas de fusión" con vistas a la inmortalización de células B humanas.

Para ello fundimos linfocitos humanos de un donante sano con las células P3/x63.Ag8.653 y seleccionamos heterohibridomas que no producían inmunoglobulinas. Estas células fueron

entonces sometidas a tratamiento con 8-azaguanina y luego de 6 meses pudimos seleccionar algunos subclones revertantes, sensibles al medio HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina).

Las propiedades de una de las líneas derivadas, denominada CB-F7, la señalan como una potente "pareja de fusión" (tabla 1) para la producción de AcMh. Esta línea fue empleada para hibridaciones (humano-ratón) x humano, fundiendo linfocitos humanos de diferentes órganos mediante un método sencillo basado en la adición de polietilenglicol. Los resultados de estas fusiones fueron comparados con los datos obtenidos por nosotros de fusiones humano x ratón y, tal como se aprecia en la tabla 2, con aquellos derivados del empleo de otros heteromiomas análogos. Los datos sugieren que la CB-F7 es mucho más eficiente, con frecuencias de fusión de hasta un híbrido por 50 000 linfocitos, lo que es comparable a la obtenida con las clásicas técnicas de hibridación ratón x ratón.

Tabla 1
PROPIEDADES DEL HETEROMIELOMA (HUMANO x RATON) CB-F7

Tiempo de doblaje en cultivo	16 horas
Producción de Igs humanas y de ratón	ninguna
Cariotipo	78 cromosomas humanos y de ratón
Sensible a	Ouabaina, HAT
Eficiencia de clonaje	alta, una célula por pozo, sin "capa alimentadora"
Eficiencia de fusión	2-10 híbridos por 100 000 linfocitos humanos: 1/800-1/1200 para células transformadas por EBV

Tabla 2
COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE HIBRIDIZACIONES HUMANO x RATON, Y (HUMANO x RATON) x HUMANO

<i>Parámetros a comparar</i>	<i>Línea empleada como pareja de fusión</i>	
	<i>P3/653</i>	<i>CB-F7</i>
No. de fusiones	42	31
Pozos sembrados	9 036	8 178
Porcentajes de pozos con crecimiento de híbridos	17%	82%
Porcentajes de productores de IgM	39%	79%
Porcentajes de productores de IgG	4%	12%
Relación IgG:IgM	1:9	1:6,5

Nota: P3/653= mieloma de ratón P3/x63.Ag8.653.

Una característica importante de esta nueva línea es su resistencia a la ouabaina, lo que permite realizar experimentos de estabilización de clones específicos de células B humanas transformadas por el EBV, mediante su fusión con este heteromioma. Nosotros también hemos encontrado que en este caso las nuevas construcciones secretan más inmunoglobulinas que las líneas linfoblastoides parentales, transformadas por el EBV

Los hibridomas obtenidos con la línea CB-F7 producen establemente inmunoglobulinas específicas por al menos varios meses *in vitro* (figura 1). De especial interés han resultado los hibridomas que secretan anticuerpos contra proteínas estructurales del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV). Uno de estos hibridomas secreta un AcMh del tipo IgM específico para la p25 (proteína del "core") mientras que un segundo produce IgG1 contra la gp41 (proteína transmembranaria) (Grunow *et al.*, 1987).

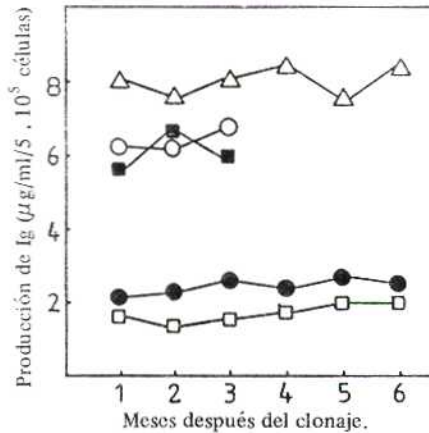


FIG. 1. Producción de inmunoglobulinas humanas por hibridomas derivados de fusiones de células B humanas con células CB-F7. Antes de este estudio, los híbridos fueron clonados de 2 a 4 veces y entonces cultivados sin clonaje ulterior. *Abscisa:* Producción de Ig (microgramos/ml/ 500,00 células); *Ordenada:* meses luego del clonaje. Se presentan los resultados de las siguientes líneas de hibridomas: CB-TTB (IgM, anti toxina tetánica △-△), CB-HIVI (IgG, anti HIV gp41 ○-○), CB-HIV2 (IgM, anti HIV p25 ■-■), CB-RF1 (IgM, factor reumatoide ●-●), CB-NA78 (IgM, anticuerpo tipo natural, □-□).

De estos datos experimentales nosotros podemos sugerir que la línea CB-F7 puede ser de importancia para una efectiva producción de AcMh de especificidad predeterminada.

REFERENCIAS

- BROWN, N. A. (1982). *Prospects for Human Monoclonal Antibodies: A Critical Perspective*. Yale J. Biol. Med. 55: 297-303.
- BUTLER, J. L.; H. C. LANE y A. S. FAUCI (1983). *Delineation of Optimal Conditions for Producing Mouse-Human Heterohybridomas from Human Peripheral Blood B Cells of Immunized Subjects*. J. Immunol. 130: 165-168.
- CROCE, C. H.; A. LINNENBACH; W. HALL; Z. STEPLEWSKI; H. KOPROWSKI (1980). *Production of Human Hybridomas Secreting Antibodies to Measle Virus*. Nature 288: 488-489.
- DORFMAN, N. A. (1985). *The optimal technological approach to the development of human hybridomas*. J. Biol. Resp. Mod. 4: 213-239.
- GAVILONDO, J. (1987). *Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales*. Interferón y Biotecnología 4: 1-16.
- GRUNOW, R.; S. JAHN; T. PORSTMANN; S. T. KIESSIG; H. STEIN-KELLNER; F. STEINDL; L. GURTNER; F. DEINHARDT; H. KATINGER y R. VON BAEHR (1987). *A High Efficient Human B Cell Immortalizing Heteromyeloma CB-F7. Production of Human Monoclonal Antibodies to Human Immunodeficiency Virus*. J. Immunol. Meth. (en prensa).
- JAHN, S.; R. GRUNOW; S. T. KIESSIG; G. T. BOGACHEVA; E. L. ARSENJEVA; A. HLINAK; O. V. ROKLIN y R. VON BAEHR (1987). *Cell Biology of Human IgM Producing Hybridomas derived from a Fusion of Human Spleen Lymphocytes with Mouse Myeloma Cells*. Hybridoma (en prensa).

- JAHN, S.; R. GRUNOW; S. T. KIESSIG; U. SPECHT; H. MATTHES; F. HIEPE; A. HLINAK y R. VON BAEHR (1987a). *Establishment of Human Ig Producing Heterohybridomas by Fusion of Mouse Myeloma Cells with Human Lymphocytes Derived from Peripheral Blood, Bone Marrow, Spleen, Lymph Node, and Synovial Fluid*. J. Immunol. Meth. (en prensa).
- KOZBOR, D. y L. RODER (1981). *Requirements for the Establishment of High-titred Human Monoclonal Antibodies Against Tetanus Toxoid using Epstein-Barr Virus Technique*. Immunobiol. 159: 67-72.
- OSTBERG, L. y E. PURSCH (1983). *Human x (Mouse x Human) Hybridomas Stably Producing Human Antibodies*. Hybridoma 2: 361-365.

Roland Grunow, Siegbert Jahn y Rudiger von Baehr
Institute for Medical Immunology
Department of Medicine (Charité) of the
Humboldt University, Berlin, GDR

* * *

Hibridomas contra la toxina tetánica, construidos con linfocitos humanos tomados de donantes a diferentes tiempos después del Booster in vivo

Al editor:

En un estudio reciente describimos el desarrollo de una línea celular (CB-F7) con alta efectividad como pareja de fusión para la creación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales humanos (AcMh). Esta línea, derivada de un clon heterohíbrido producido en una fusión humano-ratón, es sensible al HAT, resistente a la ouabaina y no secreta inmunoglobulinas propias; con ella es posible producir hibridomas humano x (humano-ratón) estables en su secreción de inmunoglobulinas específicas (Grunow *et al.*, 1987).

A pesar de que la alta eficiencia de generación de híbridos que exhibe esta línea luego de la fusión (hasta un híbrido por cada 50 000 linfocitos humanos), viene a resolver uno de los problemas fundamentales que limitan en la actualidad la producción de AcMh, en los experimentos mencionados la proporción de hibridomas específicos luego de las fusiones fue muy baja.

Esta situación puede ser resuelta, al menos, por tres vías: 1) mediante el enriquecimiento de las células precursoras específicas, por métodos de separación ("panning", FACS) o cultivo transitorio (luego de la transformación con el virus de Epstein-Barr); 2) mediante el uso de técnicas de inmunización *in vitro* o protocolos de pre-estimulación *in vitro*, y 3) mediante la inmunización booster de donantes de sangre (si fuera posible para el antígeno en cuestión).

Como nosotros no hemos podido desarrollar una forma efectiva y repetible para la inmunización *in vitro* de linfocitos humanos (Jahn *et al.*, 1987), y tampoco encontramos influencias beneficiosas de la estimulación policlonal de los linfocitos sobre los resultados de fusión (Jahn *et al.*, 1987a), decidimos ensayar el aspecto 3) para la obtención de hibridomas con especificidad antigénica contra la toxina tetánica (TT).

En algunos estudios de regulación *in vitro* nosotros pudimos demostrar una dependencia de la secreción de anticuerpos específicos por los linfocitos en cultivo, a diferentes tiempos luego