



# Anticuerpos monoclonales de primera y segunda generación. Aplicaciones Biomédicas

Ramón Montaña<sup>1</sup>.

Flor Pujol de Freychet<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Virólogo [rmontano@ivic.ivic.ve](mailto:rmontano@ivic.ivic.ve)

<sup>2</sup>Virólogo [fpujol@pasteur.ivic.ve](mailto:fpujol@pasteur.ivic.ve)

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina -  
Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia  
Biomédica Digital.

## INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento, hacia finales del siglo pasado, los anticuerpos han cautivado la atención de médicos, bioquímicos y científicos en el área de las biociencias y la historia recoge testimonios de ello. Por ejemplo, el primer premio Nobel, otorgado en el área de Fisiología o Medicina, lo recibió Emil von Behring, precisamente, gracias al trabajo en el cual reportó el descubrimiento de los anticuerpos (4). Desde entonces y hasta el presente, quince premios Nobel han sido otorgados a individuos que han hecho aportes significativos en el ámbito de la inmunología. Siete de éstos fueron entregados a personas cuyo trabajo estuvo directamente relacionado con anticuerpos ([1W](#)). Sin duda, este interés surgió de la inmensa potencialidad que, desde un inicio, les fue reconocida a estas moléculas para ser usadas en aplicaciones diagnósticas y terapéutico-profilácticas. Los anticuerpos policlonales, o antisueros, fueron los protagonistas en la época de la serología y la seroterapia. Los anticuerpos monoclonales, de primera generación, aparecieron a mediados de los años setenta para convertirse en las

herramientas principales de poderosas técnicas analíticas como los radioinmunoensayos, los ensayos inmunoenzimáticos y la citometría de flujo. Más recientemente, avances importantes en el área de la biología molecular y el desarrollo de técnicas de ADN recombinante han hecho posible la creación de anticuerpos recombinantes, también llamados anticuerpos monoclonales de segunda generación. En esta revisión intentaremos resumir los hechos, conceptos y tendencias más importantes en este campo, remarcando los aspectos aplicados de mayor impacto para la biomedicina.

## NOCIONES BÁSICAS

En el ámbito de la respuesta inmune específica de los organismos vertebrados, las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos (Ac) juegan un papel central. Estas moléculas tienen la habilidad de reconocer específicamente y mediar la eliminación de sustancias y organismos extraños, tales como toxinas bacterianas y virus. Ello lo logran gracias a que, luego de ligar el antígeno (Ag), los Ac interactúan con receptores presentes en ciertas poblaciones celulares y con moléculas del sistema de complemento (Figura 1), conduciendo a la activación de mecanismos efectoros, los cuales finalmente, son los responsables de la mencionada eliminación.

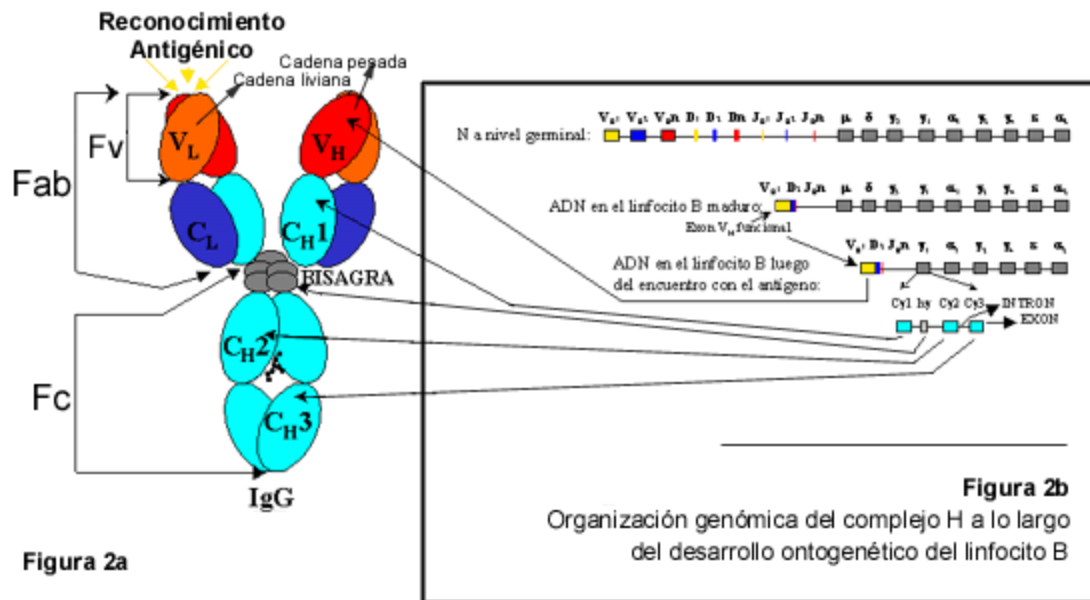


### Consideraciones estructurales y funcionales

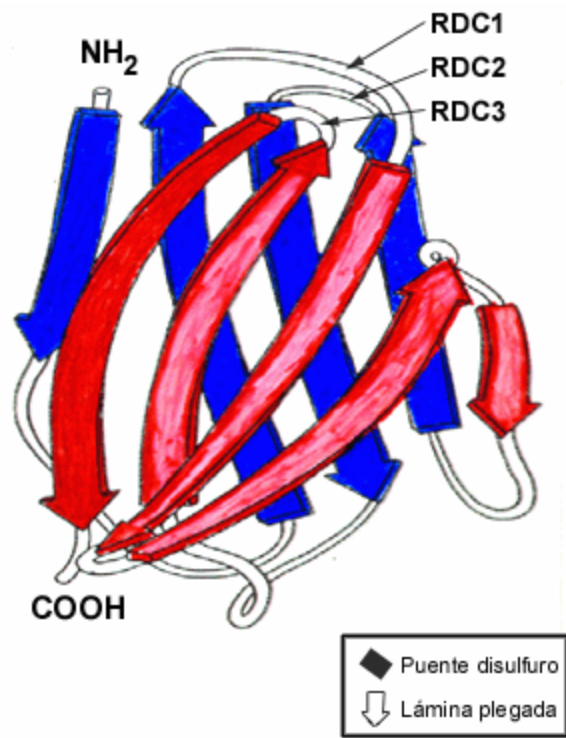
Los Ac son glicoproteínas solubles, sintetizadas y secretadas de manera exclusiva por un tipo particular de glóbulo blanco denominado linfocito B. Moléculas de Ac han sido encontradas, virtualmente, en todos los fluidos y cavidades corporales. En mamíferos se han descrito cinco clases de Ig a saber Ig M, G, A, D y E. Cada una de ellas posee, además de un metabolismo y fisiología característicos, rasgos estructurales y funcionales particulares. Sin embargo, todas comparten una estructura básica común que bien puede ser ejemplificada por la molécula IgG (Figura 2). Básicamente, la molécula de Ac consta de dos tipos de cadenas polipeptídicas, denominadas cadena liviana/ligera y cadena pesada, con pesos moleculares aparentes de unos 25 y 50 kD, respectivamente (Figura 2A y 2C). Se han identificado dos tipos de cadena liviana, kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), y cinco clases de cadena pesada, mu ( $\mu$ ), gamma ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) y epsilon ( $\epsilon$ ). Cada monómero de Ig, independientemente de la clase, consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas igualmente idénticas. Las cadenas pesadas establecen

abundantes interacciones no covalentes y cierto número de enlaces covalentes (del tipo puente disulfuro) entre sí y con las cadenas livianas.

**Figura 2**  
La molécula de Ac y los genes que la codifican



La característica bioquímica estructural más resaltante de las cadenas Ig es el "dominio Ig" (82). Muy resumidamente, un dominio Ig es una secuencia polipeptídica de unos 100-110 aminoácidos que presenta, de manera muy conservada, dos residuos de cisteína localizados hacia los extremos opuestos de la secuencia. Estos residuos permiten la formación de un puente disulfuro intracatenario importante para la estabilización de la estructura terciaria del dominio y, consecuentemente, de la molécula. La distribución de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos en la secuencia primaria del dominio trae como resultado la formación de lo que, en bioquímica de proteínas, se conoce con el nombre de hojas plegadas tipo  $\beta$ . Estas hojas  $\beta$  se organizan en forma antiparalela, se unen mediante segmentos relativamente cortos de secuencia llamados asas o "loops", en los cuales es usual encontrar la conformación tipo hélice  $\alpha$  y se arreglan a nivel tridimensional para formar un par de láminas (Figura 3).



**Figura 3**  
El dominio Ig

Estudios comparativos de la secuencia primaria de aminoácidos, en un número importante de moléculas de Ac, han permitido la identificación de dos tipos de dominio en las cadenas Ig: el dominio variable (V) y el dominio constante (C). Esta denominación obedece a la variabilidad encontrada en cada posición de la secuencia primaria. Tanto la cadena liviana como la pesada poseen un dominio variable designados VL y VH, respectivamente. La cadena liviana posee un único dominio constante (CL), mientras la cadena pesada posee tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3, CH4), dependiendo de la clase de Ig ([Figura 2A](#)). El dominio Ig tiene implicaciones importantes para la funcionalidad de la molécula de Ac. Por ejemplo, los dominios VL y VH se conjugan en un módulo funcional denominado Fv, en el cual se encuentra el sitio de reconocimiento del antígeno o paratopo ([Figura 2A](#)). Mediante la comparación de secuencias de aminoácidos disponibles para numerosos dominios VL y VH, ha sido posible identificar tres sitios en cada dominio V, denominados regiones hipervariables, en los que la variabilidad, en la secuencia primaria de aminoácidos, alcanza un máximo. Estas regiones contienen los residuos principales que conforman el paratopo y, por ello, también se les conoce con el nombre de regiones determinantes de complementariedad (RDC). Las RDC corresponden a las asas o "loops" de los dominios V ([Figura 3](#)), y se encuentran flanqueadas por regiones de menor variabilidad designadas marco (M).

El dominio Ig ha sido explotado más allá del ámbito de los Ac, de manera que hoy se acepta la existencia de una superfamilia de proteínas que contienen en su estructura dominios Ig. Entre estas proteínas se cuentan, además de los Ac, el receptor antigénico de linfocitos T, las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad, receptores para el fragmento Fc de las Ig, moléculas de adhesión intercelular, etc. (61).

Genética y repertorio de inmunoglobulinas.

Los genes que codifican las Ig están organizados en complejos genéticos. Existe un complejo genético en el que se encuentran los elementos codificantes de todas las cadenas pesadas (complejo H) y dos complejos para las cadenas livianas, uno para la cadena k (complejo k ) y otro para la cadena l (complejo l ). El complejo H se encuentra localizado en la región telomérica del cromosoma 14 humano y está formado por un número variable de elementos codificantes denominados VH, DH, JH, hH y CH [\(Figura 2B\)](#). En forma similar, los complejos k y l contienen elementos VL, JL y CL, pero no poseen segmentos D ni h y están ubicados en los cromosomas 2 y 22 humanos, respectivamente. Cada complejo posee un número significativo de elementos V y, en menor cuantía, elementos D (complejo H) y J. Los elementos codificantes h y C constituyen exones completos, los cuales contienen la información estructural para la síntesis de la región bisagra (cadena pesada) y de los diferentes dominios constantes, respectivamente [\(Figura 2B\)](#).

Por otro lado, los dominios V son producidos a partir de la combinación de los elementos V, D y J. Durante la ontogenia del linfocito B estos complejos génicos sufren un interesante proceso de reordenamiento, o rearreglo, cuyos detalles mecanísticos no han sido del todo entendidos. Un sofisticado sistema de recombinación somática actúa sobre los elementos V, D y J, permitiendo en cada linfocito B el rearreglo funcional de un segmento VL con un segmento JL, para así generar un exón VL, el cual codifica el dominio VL de la cadena liviana. Algo similar ocurre con los segmentos VH, DH, y JH del complejo H [\(Figura 2B\)](#). Luego de que, en un linfocito B particular, ocurre el rearreglo funcional de estos segmentos y se genera un exón VL y uno VH, el proceso se detiene de manera que cada linfocito B despliega una única especificidad y es capaz de secretar, luego de la estimulación antigénica, únicamente Ac con esa especificidad. En humanos, se ha estimado que el proceso de rearreglo génico de los segmentos V, D, y J, en el cual se ven además involucrados fenómenos de adición de nuevos nucleótidos e inversión y uso simultáneo de varios segmentos D, tiene la potencialidad de generar 104 dominios VL y 108 dominios VH diferentes, pudiendo combinarse aleatoriamente para generar hasta 1012 moléculas de anticuerpo con especificidades diferentes. Este gigantesco repertorio permite al sistema inmune humoral disponer de la capacidad para reconocer y responder prácticamente ante cualquier reto antigénico.

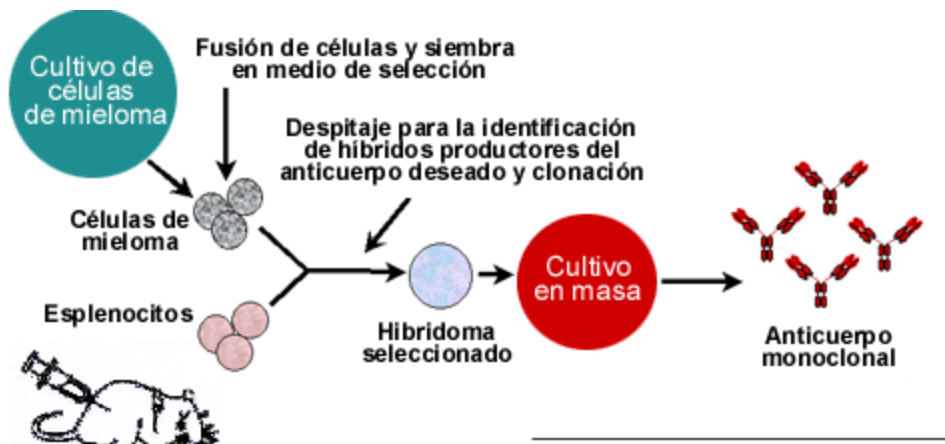
## ANTICUERPOS MONOCLONALES DE PRIMERA GENERACIÓN

Los anticuerpos policlonales, o antisueros, son poblaciones complejas de Ac, formadas por distintas clases de Ig en las que está presente una variedad de especificidades. Por el contrario, el término anticuerpo monoclonal (AcMo) se usa para referirse a una población de moléculas de Ac, todas idénticas, las cuales consecuentemente, poseen todas la misma especificidad. De lo anterior se desprende que, en una prueba analítica, el chance de obtener falsos positivos, es decir, "reconocer lo que no es como si lo fuera" es mucho menor cuando se usan reactivos monoclonales.

En 1975, en un trabajo que posteriormente les valió el premio Nobel, G. Kohler y C. Milstein demostraron la posibilidad de producir AcMo mediante la fusión de linfocitos B con células mielomatosas (células tumorales inmortales). Ellos demostraron que los híbridos resultantes de tal fusión heredan la capacidad para crecer indefinidamente en cultivo y para producir anticuerpos, y que, además, es posible aislar del producto heterogéneo de fusión aquellos híbridos secretores del anticuerpo en el cual se está interesado (56). Así nacieron los AcMo, posteriormente denominados de primera generación, para distinguirlos de los anticuerpos

producidos mediante técnicas de biología molecular y ADN recombinante, que han sido llamados de segunda generación.

La técnica original descrita por Kohler y Milstein (Figura 4) permite la obtención de AcMo de ratón. De manera resumida, el proceso se inicia con la inmunización de ratones de laboratorio (cepa Balb/c) con el antígeno para el cual se desea producir los anticuerpos. Una vez que se tiene la certeza del status inmune de estos animales (por lo general esto se establece tomando muestras de sangre y examinando y/o cuantificando la presencia de anticuerpos específicos en el suero inmune), los mismos son sacrificados y se obtiene el bazo, en el cual se encuentra una población numerosa de linfocitos B. A continuación, los esplenocitos se fusionan con células mielomatosas inmortales que son mantenidas en el laboratorio en la forma de líneas celulares gracias a su capacidad para crecer indefinidamente en cultivo. La fusión, fenómeno poco común en células somáticas, es facilitada mediante la adición de agentes virales (virus Sendai), químicos (polietilenglicol) o físicos (electricidad), de los cuales el más usado es la sustancia química denominada polietilenglicol (PEG). El producto de la fusión entre un esplenocito y una célula mielomatosa es denominado hibridoma. Los hibridomas heredan características fenotípicas de ambas células parentales de manera tal que son capaces de crecer indefinidamente y de producir el anticuerpo codificado en los genes del esplenocito pariente. Obviamente, la población de hibridomas obtenida mediante una fusión, como la descrita anteriormente, es heterogénea en cuanto a los anticuerpos secretados por ella. Con el objeto de seleccionar los híbridos productores del anticuerpo de interés se realiza clonación celular. Esta clonación consiste en sembrar los hibridomas en microcultivos a una densidad celular tan baja que se garantiza que las células integrantes de la población obtenida en cada microcultivo sean todas idénticas, es decir, conformen un clon. Los anticuerpos secretados por estas poblaciones clonales de hibridomas son anticuerpos monoclonales. Utilizando un principio, similar al antes descrito, se han preparado reactivos monoclonales provenientes de otras especies, inclusive humanos. Numerosas revisiones han sido publicadas en las cuales se examina la producción y uso de estos reactivos (22; 31; 50; 71; 107).



Ahora bien, además de su altísima especificidad, es necesario reconocer otros dos atributos que han contribuido al éxito de los AcMo como reactivos analíticos. En primer lugar, los AcMo son sustancias químicamente bien definidas, su naturaleza y estructura se conoce en detalle y ello permite la formulación de preparaciones estables y facilita enormemente los procedimientos para su conjugación a trazadores tales como sustancias fluorescentes, enzimas, radioisótopos,

oro coloidal, moléculas electrón-densas (ferritina), etc. En segundo lugar, son reactivos susceptibles de ser preparados en forma pura, en condiciones muy controladas y en grandes cantidades.

En lo concerniente a aplicaciones biomédicas, los AcMo de primera generación han desplazado de muchas aplicaciones a los anticuerpos policlonales, han permitido el desarrollo y avance de numerosas y nuevas pruebas diagnósticas y son, en la actualidad, los reactivos de elección para aplicaciones analíticas, tanto en el ámbito de lo médico-clínico como en distintas áreas de la investigación en biociencias. Lo anterior es cierto para todo aquello relacionado con pruebas de laboratorio "in vitro", tanto en clínica como en investigación.

Por razones de espacio, mencionaremos solo algunos ejemplos de AcMo de primera generación, los cuales han encontrado aplicaciones de interés en biomedicina, no sin antes advertir que se trata de una muestra pequeña tomada de un universo mucho más amplio y, por tanto, imposible de cubrir en su totalidad en el presente contexto. Comenzaré por mencionar las numerosas pruebas diagnósticas para fenotipificación de tumores sanguíneos que actualmente hacen uso de AcMo de primera generación. Aun cuando algunas de estas enfermedades pueden diagnosticarse claramente, mediante criterios clínicos e histológicos bien establecidos, hay otros casos, como las leucemias linfoblásticas agudas y los linfomas del tipo no-Hodgkin, donde es imprescindible la inmunofenotipificación para el establecimiento inequívoco del diagnóstico, la clasificación, la prognosis y el tratamiento (13; 114). La forma rutinaria, tomadas por estas pruebas de tipificación, es la citometría de flujo con paneles de AcMo fluorescentes. Estos Ac fluorescentes reconocen moléculas marcadoras de las poblaciones sanguíneas en estudio y las tiñen, permitiendo su identificación diferencial por medios electrónicos.

Otro ejemplo ilustrativo, lo constituyen los AcMo con especificidad por la molécula CD4, la cual se expresa en la superficie de un subset de linfocitos T humanos. Uno de los mejores indicadores de la progresión de la infección por el virus HIV, hacia la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en los pacientes infectados, es precisamente una caída sustancial en el número de linfocitos T circulantes en la sangre que portan este marcador de superficie CD4. La prueba de rutina empleada para la estimación del número de linfocitos T CD4+ utiliza AcMo fluorescentes anti-CD4 humano para teñir y luego examinar, por citometría de flujo o en el microscopio de fluorescencia, las muestras de sangre de los individuos seropositivos.

La tipificación de grupos sanguíneos humanos, como el ABO, de crucial importancia en transfusiones y transplantes, se realiza en la actualidad mediante pruebas de aglutinación en las que se utilizan AcMo.

Pero los AcMo no han servido, únicamente, para el estudio de moléculas asociadas a la superficie de células. Existe además un sinnúmero de moléculas solubles cuya detección en fluidos biológicos (sangre, orina, etc.) es de interés médico-clínico. Algunos ejemplos son : drogas o metabolitos de drogas como la marihuana ([2W](#)), la cocaína ([3W](#)), la ciclosporina ([4W](#)), hormonas como la hCG (test de embarazo; [3W](#)), proteínas asociadas a ciertos tipos de cáncer como el PSA (cáncer de prostata; [5W](#)) y el CEA (adenocarcinoma de colon; [6W](#)) o proteínas indicadoras de infecciones por virus como Hepatitis B ([7W](#)) y CMV ([4W](#)). En la actualidad, los tests para la detección, y/o cuantificación de estas moléculas, utilizan AcMo y, en su mayoría, toman la forma

de inmunoensayos en los que una enzima (ELISA), un radioisótopo (RIA) o un colorante ("dipstick") sirven como medio de detección.

Virtualmente, todos los ejemplos de AcMo referidos se han obtenido mediante la generación de hibridomas de origen mívrido (ratón o rata). Por desgracia, el uso de este tipo de AcMo, con intenciones profilácticas o terapéuticas, en humanos ha encontrado obstáculos importantes. El primero de ellos es que se trata de proteínas extrañas para el ser humano. Consecuentemente, su administración conduce a la aparición de una respuesta inmune humana anti-AcMo, con la cual se obstaculiza la eficacia del tratamiento. Además, la mediación de funciones efectoras necesarias o deseables en ciertas situaciones, y el catabolismo de estos anticuerpos de ratón o rata en el cuerpo humano, es diferente al de los correspondientes anticuerpos humanos. Por último, hay moléculas humanas, como los aloantígenos del complejo principal de histocompatibilidad y los antígenos del sistema sanguíneo Rh, que no son distinguidos apropiadamente por el sistema inmune de los roedores y, en consecuencia, no es posible producir AcMo de utilidad práctica, con especificidad, por estos antígenos. De esta manera, una de las razones más importantes que ha impulsado el desarrollo de los AcMo de segunda generación es precisamente esta imposibilidad de utilizar Ac de roedores en humanos con fines profilácticos o terapéuticos.

## ANTICUERPOS MONOCLONALES DE SEGUNDA GENERACIÓN

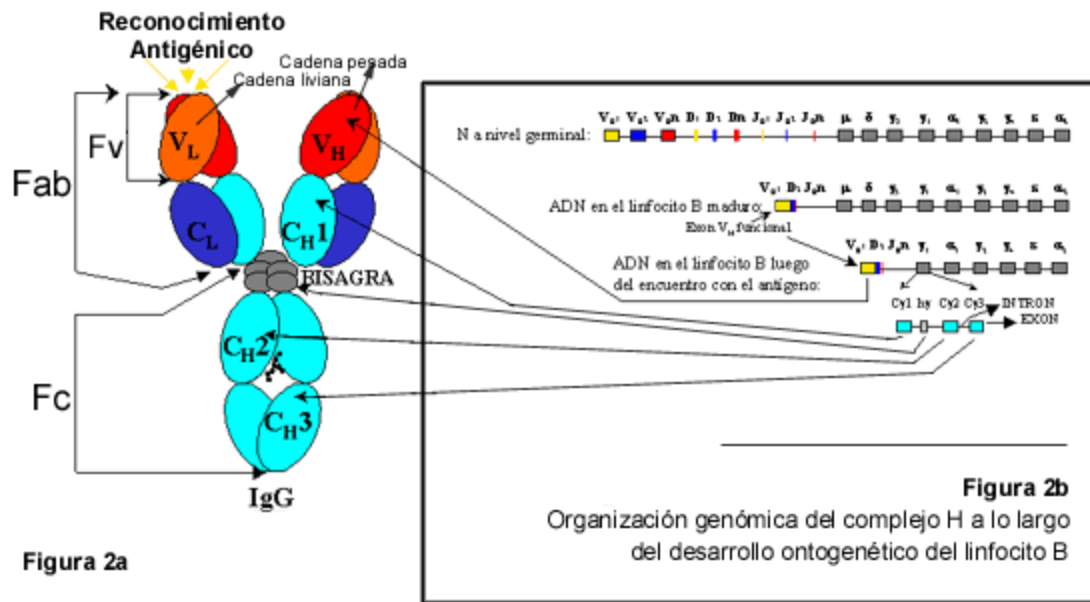
[Anticuerpos quiméricos](#) | [Anticuerpos humanizados](#) | [Moléculas recombinantes derivadas de Ac](#) | [Fragmentos de Ac](#) | [Single chain Fv \(scFv\)](#) | [Expresión de repertorios de Ac en fago lambda](#) | [Desplegamiento de repertorios de Ac en fagos filamentosos](#) | ["Diabodies", anticuerpos biespecíficos y "triabodies"](#) | [Minibodies](#) | [Anticuerpos "camélidos"](#) | [Proteínas de fusión](#)

Como se mencionó, los AcMo de segunda generación, o anticuerpos recombinantes (AcR), son moléculas producidas empleando técnicas de biología molecular y ADN recombinante. Dicho de otra manera, los AcR son generados a través de la inmortalización de los genes que codifican a la molécula de Ig, en lugar de inmortalizar la célula productora del Ac, como es el caso para los AcMo de primera generación.

La concepción, el diseño y la ingeniería de moléculas artificiales, basadas en Ig, se ha facilitado enormemente gracias a dos características de estas proteínas. A nivel genético, los genes estructurales que codifican las Ig se prestan para hacer el trabajo de biología molecular. Estos genes se organizan en la forma de exones discretos, los cuales corresponden a dominios completos en la proteína (Figura 2B), encontrándose separados por regiones intrónicas. Resulta así, por ejemplo, relativamente fácil manipular las secuencias intrónicas para añadir cambios que permitan la introducción en el gen de nuevas secuencias en lugares específicos, seleccionados previamente, sin implicar riesgo alguno de alterar la secuencia codificadora presente en los exones. De igual manera, a nivel proteico, la organización estructural-funcional de las Ig en la forma de estos módulos discretos, llamados dominios, en donde se encuentra almacenada la información necesaria para realizar una función específica, ha facilitado enormemente el logro de estos objetivos. Sin embargo, un elemento adicional, que no se puede dejar de mencionar y que ha tenido un impacto tremendo en el desarrollo de los AcR, lo constituyen, sin lugar a dudas, los avances ocurridos en el campo de la biología molecular, especialmente en lo relacionado con

el desarrollo de métodos para la creación de moléculas de ADN recombinante basados en la reacción, en cadena, de polimerasa (PCR).

**Figura 2**  
La molécula de Ac y los genes que la codifican



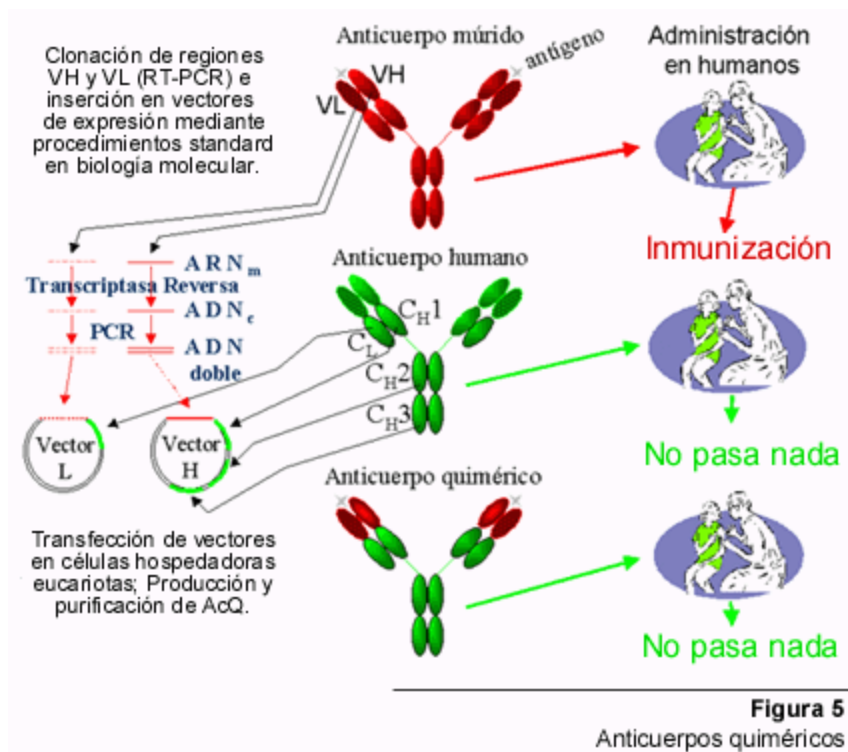
De esta forma, es hoy posible clonar una pareja de regiones VH y VL, responsables de una especificidad de interés, y ensamblarla en la forma de un anticuerpo funcional en el contexto de, prácticamente, cualquier clase o subclase de Ig humana (72). Un número considerable de sistemas de expresión están actualmente disponibles para este fin (18). Varias líneas celulares eucariotas soportan apropiadamente los procesos asociados a la expresión, síntesis, ensamblaje y modificaciones post-traducción de los AcR (103). En el ámbito de los organismos procariotas, es digno de mencionar cómo el conocimiento detallado que poseemos del genoma, arquitectura y ciclo de vida de bacteriófagos filamentosos (89, 92) y del fago lambda (11, 24) ha permitido la expresión eficiente de ADN codificante de Ac en *E. coli* (48, 68). Esto, a su vez, ha permitido el desplegamiento, en estos fagos, de repertorios gigantescos de Ac (88, 105) y con ello, la posibilidad de imitar artificialmente la estrategia de selección empleada por el sistema inmune humoral. En la actualidad, esta tecnología de desplegamiento de Ac en fagos filamentosos ofrece una de las vías más poderosas para la creación de Ac humanos artificiales con inmunogenicidad reducida y para la creación de repertorios de Ac en la forma de genotecas combinatorias con una talla similar o igual a la de los repertorios naturales.

Los AcR constituyen, entonces, un conjunto bastante heterogéneo de proteínas artificiales en el que se pueden distinguir dos grandes grupos. El primero incluye moléculas completas de Ac, similares a las conseguidas en forma natural, en las cuales están presentes los dos elementos estructurales, permitiendo así la funcionalidad de la molécula; esto es, las porciones Fab y Fc (Figura 2A). Los Ac quiméricos y humanizados son ejemplos representativos de este grupo. El otro grupo está formado por un conjunto más heterogéneo de proteínas noveles, basadas en la estructura de las Ig. Éstas pueden encontrarse en la forma de entidades recombinantes autónomas (fragmentos tipo Fab, Fv de cadena sencilla -scFv-, "diabodies", "triabodies", etc.), o

como proteínas de fusión (moléculas en las que se combina la porción Fc o Fab con propiedades nuevas provistas por una toxina, una enzima, un receptor celular, una citoquina, etc.).

### Anticuerpos quiméricos

Un anticuerpo quimérico (AcQ) es una molécula artificial en la cual, las porciones constantes de las cadenas pesada y liviana provienen de una Ig humana y las regiones variables VH y VL son obtenidas de un AcMo murino (Figura 5). El objetivo perseguido con la construcción de un AcQ es reducir la inmunogenicidad para el humano de los AcMo de ratón o rata, pero sin afectar la especificidad del Ac. Es conocido que las porciones más inmunogénicas de la molécula de Ig están asociadas a la porción constante de la molécula, en particular a la región Fc (115). Al reemplazar estas regiones por las equivalentes de origen humano se busca que la molécula resultante sea menos "extraña" para los seres humanos y así facilitar su uso *in vivo* para la profilaxis y tratamiento de enfermedades humanas (Figura 5). Adicionalmente, ya que la fisiología, catabolismo y las funciones efectoras de un Ac están asociadas al fragmento Fc, los AcQ debieran comportarse en forma óptima al ser administrados en humanos.



La técnica de "quimerización" fue desarrollada por Morrison y col. (73) y Boulliane (7) a mediados de los años 80. El procedimiento implica la clonación de los genes VH y VL murinos y la inserción de los genes clonados en vectores de expresión eucariota a los que, previamente, se ha incorporado los genes codificadores de la porción constante de las cadenas pesada y liviana humanas. Estos vectores son finalmente transfectados en forma estable en una línea celular seleccionada. La clonación de los genes VH y VL se realiza mediante RT-PCR (Figura 5) utilizando como molde ARN total o ARN mensajero (ARN<sub>m</sub>) obtenido de un hibridoma secretor de la especificidad de interés y oligonucleótidos complementarios a los extremos 3' y 5' de cada gen como iniciadores. En la actualidad, se encuentran disponibles familias de oligonucleótidos para la clonación de los genes VH y VL del ratón, del humano y otras especies. Estas familias son capaces de amplificar la mayoría, sino la totalidad, de los genes V funcionales de estas especies y,

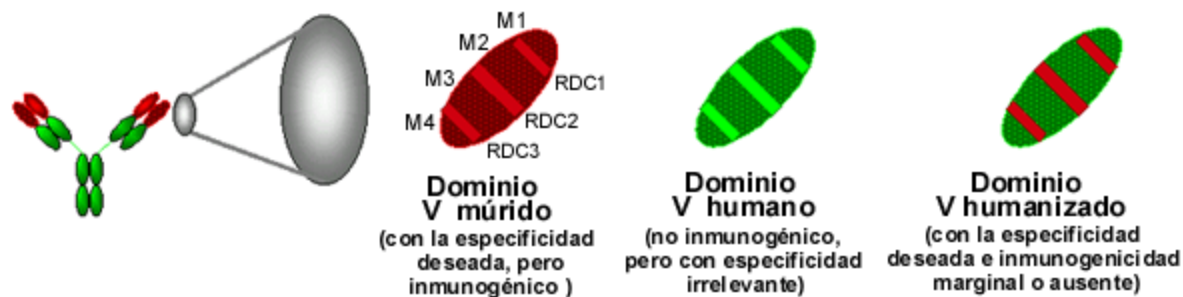
usualmente, contienen sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, las cuales facilitan la identificación, manipulación e inserción en los vectores de expresión de los genes V amplificados por PCR (2, 12, 19, 30, 58-60, 66, 80, 93, 95, 111, Montaña y Morrison). Una serie de vectores tipo "cassette" están disponibles donde los genes V pueden ser fácilmente clonados en el contexto de cualquier isotipo de cadena liviana y pesada humana (18, Montaña y Morrison). De forma similar, avances en el campo de la tecnología de transferencia de genes también han facilitado, y hecho más eficiente, el proceso de inserción de ADN foráneo en diferentes líneas celulares eucariotas.

En los trabajos pioneros antes citados, se demostró que los AcQ, ensamblados apropiadamente, son capaces de reconocer y ligar el antígeno y median, eficientemente, funciones efectoras como activación de complemento y reconocimiento de receptores Fc (7, 73). Más aún, al compararse con los monoclonales equivalentes, se pudo documentar una reducción de la inmunogenicidad (63). A partir de allí, AcQ con una gran variedad de especificidades han sido preparados (72). Algunos ejemplos exitosos en el ámbito clínico lo constituyen los productos ReoPro o abciximab (desarrollado por las compañías Centocor y Eli Lilly), IDEC-CD28 o rituximab (desarrollado por IDEC Pharmaceuticals y Genentech), e infliximab (desarrollado por Centocor). ReoPro es el fragmento Fab de un AcQ ratón-humano con especificidad por la glicoproteína GPIIb/IIIa de plaquetas y es usado en la prevención de la isquemia cardíaca aguda que puede ocurrir luego de una angioplastia coronaria. IDEC-CD28 es un AcQ ratón-humano anti-CD20, el cual se utiliza para el tratamiento de linfomas de células B del tipo no-Hodgkin. Finalmente, Infliximab es un AcQ anti-TNFa que ha mostrado efectividad en el tratamiento de la enfermedad de Crohn (75).

### Anticuerpos humanizados

En los AcQ las regiones V múridas se mantienen inalteradas de forma que la especificidad y la afinidad de la molécula resultante no se afectan. Desgraciadamente, algunas moléculas quiméricas aún son capaces de inducir una respuesta inmune humoral cuando son administradas en humanos. Esta inmunogenicidad "residual" ha sido atribuida a la presencia de epitopos foráneos presentes en las RDC y en las regiones M de los dominios V múridos del AcQ (1,10).

Un paso adelante en los esfuerzos para reducir la inmunogenicidad de los AcMo múridos, lo constituyó la creación de los Ac humanizados (AcH). La tecnología para la producción de AcH fue desarrollada en el laboratorio de G. Winter en Inglaterra poco después de la invención de los AcQ (52) y, en la actualidad, engloba un conjunto de procedimientos (47) tales como "CDR grafting" (transplante de CDR), "Ab reshaping" (106) y "Ab resurfacing/veneering" (81). El argumento que la soporta se basa en el supuesto de que el sitio de combinación al antígeno, el paratopo, se forma a partir de la combinación espacial de las asas hipervariables que corresponden a las RDC, mientras que las regiones M sólo funcionan como un andamio cuya única función es servir de soporte estructural al paratopo. Asumiendo esto como cierto en la elaboración de un AcH, las RDC de un anticuerpo múrido son transplantados en el contexto de regiones M humanas (Figura 6A), formándose así una región V híbrida ratón-humano y confiriéndole la especificidad deseada a una molécula que en el resto de su estructura es completamente humana. La ventaja de esto es que los epitopos asociados a las regiones M múridas, los cuales están presentes en los AcQ, no se encuentran en los AcH.



**Figura 6a**  
Anticuerpos humanizados

Para producir un AcH es necesario conocer la secuencia entera de los dominios V m¿ridos y la localizaci3n de las secuencias de ADN correspondientes a las 3 RDC m¿ridas. Esta informaci3n se usa para dise±ar y crear genes V sint3ticos en los cuales, las RDC m¿ridas son combinadas con regiones M humanas seleccionadas, cuidadosamente, en funci3n de su parecido con las correspondientes regiones M m¿ridas. A continuaci3n, los genes V "humanizados" se insertan en vectores de expresi3n adecuados que contienen el resto de la informaci3n estructural necesaria para la s¿ntesis de una cadena Ig humana liviana o pesada. El resto de la t3cnica es similar, a lo ya descrito, para los AcQ.

Hay dos aspectos que pudieran considerarse desventajosos en la producci3n de un AcH. En primer lugar, la manipulaci3n de las RDC m¿ridas y su inserci3n en el contexto de regiones M humanas, por lo general, conlleva a una disminuci3n de la afinidad del Ac. (47,115). Ello se debe a que las regiones M no son s3lo andamios; ellas juegan un rol determinante en el arreglo tridimensional de las RDC (28, 54, 94). Adem3s, en algunos casos se ha demostrado la participaci3n directa de ciertos residuos de amino3cido de las regiones M en la combinaci3n con el epitopo (87). El otro aspecto tiene que ver con la complejidad de la t3cnica. Mientras que producir un AcQ es un procedimiento relativamente expedito, la creaci3n de un AcH es, comparativamente, m3s laborioso, consume un tiempo considerable y es un proceso en el cual el mantenimiento de la afinidad depende, en 3ltimo t3rmino, del ensayo y error (86). En todo caso, el objetivo fundamental perseguido por la producci3n de un AcH (eliminar la inmunogenicidad del Ac m¿rido) no siempre es alcanzado. Se ha reportado cierta inmunogenicidad "residual" en mol3culas de Ac completamente humanizadas, ello debido, aparentemente, a epitopos asociados con el idiotipo del Ac (36).

No obstante, un n3mero sustancial de regiones V m¿ridas han sido humanizadas (47, 115). Entre ellas mencionaremos a los Ac daclizumab y basiliximab, dos AcH con especificidad por la cadena  $\alpha$  del receptor de la citoquina humana IL-2. Ambos han sido probados exitosamente en la prevenci3n del rechazo agudo de alotransplantes de riñ3n (25, 79). Estos Ac se encuentran actualmente en el mercado bajo los nombres Zenapax (dacliximab de Roche) y Simulect (basiliximab de Novartis Pharmaceuticals Corp). Otro ejemplo es trastuzumab (disponible comercialmente bajo el nombre de Herceptin de Genentech, USA), el cual es un AcH anti-HER2-Neu que ha mostrado efectividad en el tratamiento de c3ncer de mama en los cuales se sobreexpresa la oncoproteína HER2-Neu (96).

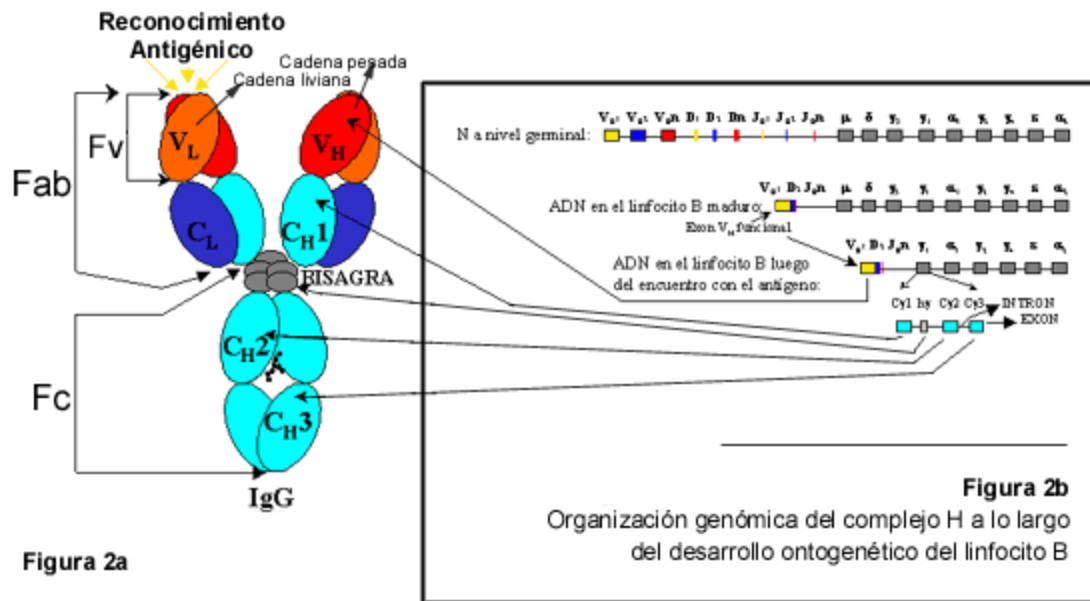
**Mol3culas recombinantes derivadas de Ac**

Hasta este punto, hemos tratado la producción de moléculas completas de anticuerpos recombinantes. Adicionalmente, la biología molecular ha sido utilizada para desarrollar moléculas novedosas, basadas en la estructura de Ac, ya sea como entidades recombinantes autónomas o como proteínas de fusión. A continuación, revisaremos los ejemplos más significativos de este tipo de moléculas, las maneras como ellas fueron creadas y sus aplicaciones potenciales.

## Fragmentos de Ac

Mientras la expresión de AcQ y AcH se logra más fácilmente en hospedadores eucariotas, tales como células de mamífero (74) o de plantas (65), la bacteria es el huésped preferido para la producción de fragmentos recombinantes de Ac (84). En virtud de las ventajas indiscutibles que ofrece en cuanto a manipulación, transformación, cinética de crecimiento y condiciones de fermentación, *E. coli* es en la actualidad el sistema de expresión más accesible y amigable para la producción de fragmentos de Ac.

**Figura 2**  
La molécula de Ac y los genes que la codifican

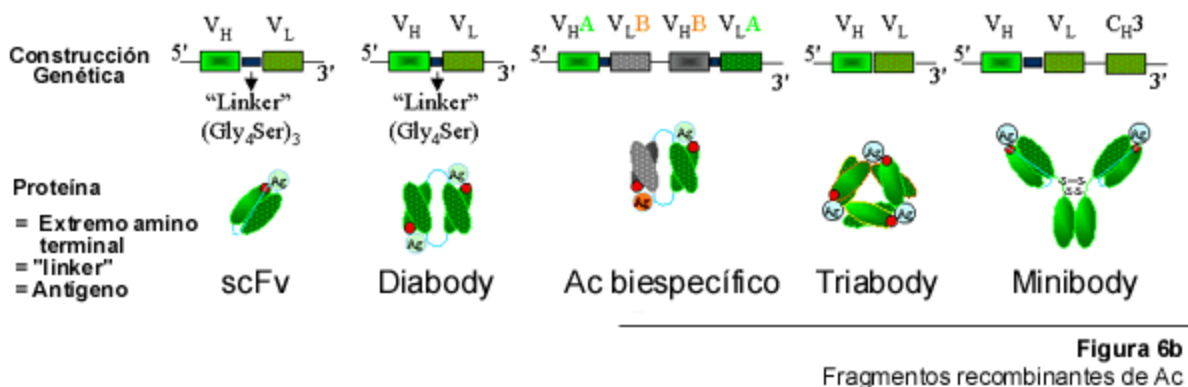


Existen dos tipos de fragmentos con la capacidad de combinarse al Ag, éstos son el Fv y el Fab (Figura 2A). Versiones funcionales de Fv y Fab fueron producidos en forma recombinante, por vez primera, en *E. coli* en 1988 (5, 97). Estos trabajos marcaron un hito en la producción de AcR, pues en ellos se demostró que la expresión en el espacio periplásmico de la bacteria permite la obtención, en forma relativamente sencilla, de moléculas de Ac completamente funcionales y con un alto rendimiento. Hasta ese momento, la mayor parte de los intentos persiguieron la expresión intra-citoplasmática, enfrentándose al problema del microambiente intracelular de la bacteria, el cual no es apropiado para el procesamiento post-traducción [plegamiento, formación de puentes disulfuro y glicosilación asociada a residuos de asparagina ("N-lynked") o serina-treonina ("O-lynked")] de las cadenas polipeptídicas nacientes. Esto trae como consecuencia la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma de la bacteria que contienen la proteína en una forma no funcional y de los cuales la recuperación es bastante ineficiente. La expresión de fragmentos de Ac en el periplasma de la bacteria, por el contrario, sigue una vía de ensamblaje

similar a la que ocurre durante la producción de Ac convencionales en el retículo endoplásmico de una célula B (84). Ello permite producir moléculas activas en un pequeño volumen y en un compartimiento subcelular, el cual está relativamente libre de enzimas proteolíticas activas.

### Single chain Fv (scFv)

1988 fue un año importante para la producción de AcR, no sólo por la aparición de los trabajos en los que se describió la expresión periplásmica como una vía eficiente para la producción de AcR en bacterias. Dos artículos fueron publicados ese mismo año en los cuales se reportó la producción en *E. coli* de una versión recombinante del fragmento Fv en la que los dominios VH y VL se encontraban unidos físicamente a través de un "linker" peptídico, pequeño y flexible (6, 49). Este "linker" (~ 15 aminoácidos) tiene la longitud y flexibilidad necesarias para permitir el arreglo espacial adecuado de los dominios VH y VL, generándose un Fv funcional (Figura 6B). Tales construcciones fueron denominadas Fv de cadena sencilla (del inglés single chain Fv, scFv), son más estables, en comparación con el Fv convencional, y conservan la capacidad de reconocer y ligar Ag. Posteriormente, scFv han sido expresados en otros hospedadores además de *E. coli*, como la levadura *P. pastoris* (64), hongos filamentosos (29), células de insecto (43) y células de mamífero (91), convirtiéndose en uno de los formatos preferidos para producir fragmentos recombinantes de Ac con capacidad para ligar Ag (116), para preparar proteínas de fusión en las que se desea especificidad antigénica (39) y para construir genotecas de Ac (88).



La construcción de genotecas de Ac es un aspecto que merece atención especial, pues ha permitido la generación de repertorios de Ac cuya talla y diversidad hace presumir que la totalidad del repertorio natural se encuentra contenida en ellas. La utilización del bacteriófago  $\lambda$  y, posteriormente, de bacteriófagos filamentosos como vectores ha sido la clave en la construcción de estas gigantescas y versátiles genotecas.

### Expresión de repertorios de Ac en fago lambda

En 1989 fue publicado el primer artículo donde se describe la construcción de una genoteca de ADNc conteniendo el repertorio completo de Ig del ratón (48). Para ello se utilizó como formato el fragmento Fab y un sistema de expresión que combinaba el bacteriófago lambda ( $\lambda$ ) como vector y la bacteria *E. coli* como hospedador. La estrategia ideada utilizó ARNm obtenido del bazo de un ratón inmunizado. Este ARNm sirvió de materia prima para la preparación, mediante amplificación por RT-PCR, de dos genotecas separadas, una de genes codificantes de cadenas livianas y la otra compuesta por segmentos génicos codificantes de fragmentos Fd (VHCH1).

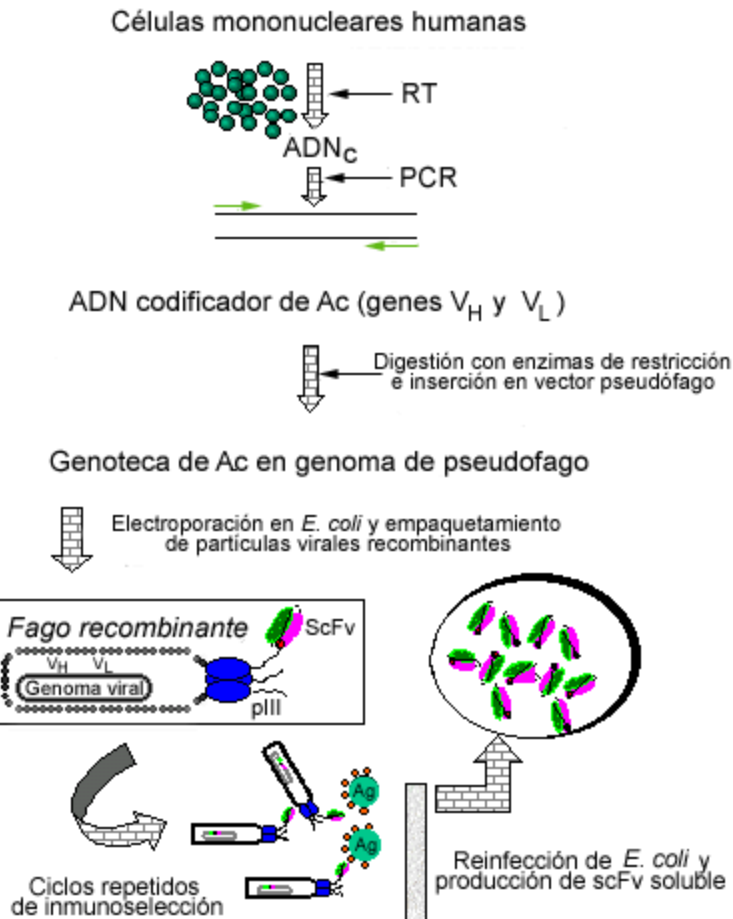
Cada genoteca fue clonada por separado en vectores de fago I diferentes y luego el ADN de estos fagos fue combinado en forma aleatoria para así construir una genoteca combinatoria de fragmentos Fab compuesta por  $10^7$  clones aproximadamente, entre los cuales fue posible demostrar la presencia de numerosos clones Ag-específicos. En una forma similar, se ha logrado construir genotecas de Ac humanos de las cuales se han aislado fragmentos de Ac con especificidad por la hemaglutinina del virus influenza (14), el toxoide tetánico (76), la peroxidasa tiroidea (85) y el antígeno de grupo sanguíneo Rh(D) (112), entre otros.

Ya que posee una alta eficiencia de ensamblaje y una elevada rata de infección, el bacteriófago I ofrece ventajas para la construcción de genotecas de Ac en comparación con otros vectores tales como plásmidos convencionales. No obstante, no pasó mucho tiempo antes de encontrarse una forma más conveniente de explotar estas y otras propiedades de los fagos. Dicha forma involucra la utilización de fagos filamentosos, en lugar del fago I, en la construcción de las genotecas de Ac.

### Desplegamiento de repertorios de Ac en fagos filamentosos

Los fragmentos de Ac, obtenidos a partir de una genoteca basada en el fago I, se encuentran en forma soluble en el medio de cultivo en el cual crecen las bacterias infectadas por el fago. Aunque la identificación y selección de fagos productores de una especificidad determinada se puede lograr mediante repetidos procesos de clonamiento y "screening", esto constituye un trabajo arduo que puede tomar un tiempo considerable.

Cuando la tecnología de despliegamiento de proteínas en la superficie de fagos filamentosos recombinantes (98) se aplicó a la expresión de fragmentos de Ac (68) ocurrió una auténtica revolución en el campo de los AcR. La expresión de sitios de combinación con el antígeno (en la forma de scFv o Fab) en la superficie de un fago filamentoso le confiere al fago recombinante la capacidad de ligar el Ag en cuestión. Esto implica que en una población heterogénea, los escasos fagos que expresen la especificidad deseada pueden ser seleccionados y aislados mediante un procedimiento sencillo de "panning" o inmunopurificación (Figura 7), utilizando el Ag de interés como elemento de captura. Como se trata de partículas virales infectivas, los fagos así obtenidos pueden utilizarse para reinfectar nuevas bacterias y producir poblaciones de fagos cada vez más clonales.



**Figura 7**  
Construcción y uso de genotecas de Ac en fagos filamentosos

Luego de un número reducido de ciclos de inmunopurificación-infección es posible obtener una población, virtualmente clonal, de fagos expresando una única especificidad. De esta forma, es relativamente fácil pasar de una población altamente heterogénea (una genoteca que alberga el repertorio de Ig de una especie, por ejemplo) a una población virtualmente homogénea que expresa una única especificidad. En consecuencia, las genotecas de Ac basadas en fagos filamentosos son superiores a las basadas en el fago I porque ofrecen una mayor facilidad para la realización del despistaje y aislamiento de especificidades de interés. La clave del éxito está en que el sistema de expresión en fagos filamentosos permite la asociación física entre la proteína (el fenotipo) y la información genética que la codifica (el genotipo).

Los fagos utilizados en esta tecnología son los colifagos filamentosos M13, fd y f1. Éstos son virus de ADN circular de cadena sencilla, capaces de infectar bacterias *E. coli* macho, las cuales el episoma F $\phi$ . Dichos fagos poseen una cubierta proteica en la que destacan dos proteínas, la pVIII y la pIII. Ambas han sido utilizadas para la expresión de fragmentos de Ac. pVIII es la subunidad estructural más importante de la cubierta (más de 2000 copias por partícula viral). Mientras tanto, pIII es bastante menos numerosa (3-5 subunidades por virión), pero es la responsable de la infectividad del fago (70). Fragmentos de Ac (tipo scFv y Fab), con una especificidad determinada, así como repertorios provenientes de distintas especies (humanos, ratón, conejo, gallina y macacos) han sido fusionados genéticamente a pVIII (16, 53, 108) y a pIII (44). La expresión asociada a pVIII conduce a partículas virales multivalentes; en contraste, la expresión

ligada a pIII es usualmente monomérica, es decir, un sitio de combinación al Ag por virión. En consecuencia, el formato pIII es usualmente el que se escoge cuando se desea seleccionar fragmentos de Ac con una alta afinidad intrínseca (Figura 7).

La tecnología de desplegamiento en fagos filamentosos ha adoptado numerosas variantes. En el contexto de la producción de genotecas de Ac, merece la pena mencionar la técnica conocida como "combinatorial infection/*in vivo* recombination" (109), la cual ha permitido construir repertorios gigantescos (estimados en el orden de  $10^{11}$  distintas especificidades) a partir de los cuales se han podido aislar fragmentos de Ac con afinidad en el rango nanomolar (34) y subnanomolar (105). Entre las especificidades de interés biomédico-clínico, que se han aislado mediante la aplicación de esta tecnología, se cuentan fragmentos de Ac con especificidad por diferentes patógenos virales como herpes simplex (tipos 1 y 2), CMV, varicella zoster, rubéola, HIV tipo 1 y RSV (113).

### "Diabodies", anticuerpos biespecíficos y "triabodies"

Como se trata de moléculas que poseen un solo sitio de combinación al Ag (monovalentes), los fragmentos Fab y scFv pudieran ser de uso limitado para ciertas aplicaciones en las cuales se requiere una afinidad elevada. Versiones multivalentes de estos fragmentos debieran presentar una afinidad funcional o avidéz mayor. Además, AcR que combinen dos especificidades distintas lucen particularmente atractivos para ciertas aplicaciones como inmunodiagnóstico e inmunoterapia. Diversas estrategias han sido evaluadas para producir dímeros o polímeros de AcR. En muchas de ellas se utiliza el entrecruzamiento por medios químicos de dos fragmentos individuales, anteriormente, preparados y purificados por separado (8; 32). Esto tiene obvios problemas en cuanto a rendimiento, purificación del fragmento deseado y cantidad de tiempo y trabajo empleado.

Una estrategia más efectiva, basada en técnicas de ADN recombinante, ha sido desarrollada recientemente. Esta estrategia se basa en la construcción scFv descrita en una sección anterior, sólo que la longitud del "linker" es menor en comparación la del scFv original. Esta reducción del "linker" (a tan solo 5 aminoácidos) imposibilita la formación de un Fv funcional entre dos dominios VH y VL en una misma molécula. Ello conduce a la interacción de dos moléculas de scFv, formándose un dímero, el cual posee dos sitios de combinación con el antígeno ([Figura 6B](#)). Si la especificidad de los dominios VH y VL es la misma, el producto obtenido es un homodímero bivalente conocido como "diabody" (42) (la traducción más apropiada de "diabody" pudiera ser "fragmento bivalente").

Ahora bien, utilizando el mismo formato, es posible producir moléculas recombinantes con dos especificidades diferentes. Por ejemplo, si se desea combinar en una misma molécula las especificidades A y B de dos anticuerpos diferentes, se diseñan dos construcciones tipo scFv. Una de ellas tendrá la forma VHA-VLB y la otra VHB-VLA (ambas pueden encontrarse en el mismo vector). En forma similar a como ocurre con los "diabodies", los polipéptidos producidos a partir de estas construcciones son incapaces de formar scFv funcionales de manera individual. No obstante, sí son capaces de aparearse apropiadamente para generar heterodímeros en donde ambas especificidades A y B son restauradas y se encuentran físicamente asociadas (41, [Figura 6B](#)). Estas moléculas artificiales han sido bautizadas con el nombre de anticuerpos biespecíficos.

Si el péptido que sirve de "linker" entre los dominios VH y VL es eliminado completamente y ambas regiones son expresadas como un polipéptido continuo, entonces, el resultado es la formación de un trímero funcional con capacidad para ligar tres determinantes antigénicos ([Figura 6B](#)). A estos fragmentos se les ha designado "triabodies" (46, 57). De manera análoga al "diabody", quizás la mejor traducción de "triabody" sea "fragmento trivalente".

### Minibodies

Los "minibodies" constituyen un caso interesante en el que dos grupos de moléculas artificiales, completamente diferentes, han sido designados con el mismo nombre. En 1994, Tramontano y col. (102) describieron el diseño de un polipéptido artificial cuya estructura se basa en el dominio V de Ig (17), al cual bautizaron "minibody". Este péptido tiene una longitud de 61 residuos de aminoácido, adopta una conformación tipo hoja beta plegada con dos asas que corresponden a regiones hipervariables y exhibe capacidad para ligar determinantes antigénicos. Además, retiene otras características deseables del dominio V de la molécula de Ac, como tolerancia a variabilidad de la secuencia en regiones específicas de la proteína y, en consecuencia, la capacidad para "evolucionar". Genotecas de este tipo de "minibodies" han sido preparadas y se ha podido seleccionar de ellas especificidades que ligan Ag con una alta afinidad (67). Es este el caso de un minibody con especificidad por la molécula IL-6 humana (una citoquina conocida por sus propiedades proinflamatorias), el cual es capaz de inhibir la acción de IL-6 y, en consecuencia, pudiera ser de interés práctico (67).

Un tipo diferente de "minibody", a los que también se ha llamado proteínas inmunes pequeñas (SIP, "small immune proteins"), fue descrito en 1996. Esta construcción es una variante del fragmento scFv en el que un dominio CH3 está asociado físicamente, en una misma cadena polipeptídica, a un scFv a través de un "linker" que contiene residuos de cisteína en su secuencia ([Figura 6B](#)). Homodímeros bivalentes de estos polipéptidos recombinantes se han producido en células CHO y mielomatosas. Se ha comprobado, además, que presentan excelentes propiedades farmacocinéticas y para imagenología de tumores (45, 62). La reciente descripción de la tecnología "botón en ojal" ("knobs into hole", 90), la cual permite inducir la interacción entre dos cadenas polipeptídicas no relacionadas, abre la posibilidad para la preparación de heterodímeros biespecíficos de estos interesantes péptidos.

### Anticuerpos "camélidos"

Recientemente, se descubrió en la sangre de los camellos la presencia de moléculas de Ac constituidas por dímeros de cadena H, desprovistos de cadena L (37,77). Esta y otras observaciones motivaron a un grupo de investigadores a crear AcR humanos constituidos por un único dominio VH. Para simular la estructura de los Ac de camello, se introdujeron mutaciones en los residuos 44 (Gly44Glu), 45 (Leu45Arg) y 47 (Trp47Gly) en un dominio VH humano preseleccionado. Estos cambios fueron suficientes para prevenir la interacción del VH mutado con el VL humano homólogo. A continuación, la secuencia correspondiente a la tercera asa hipervariable del dominio VH fue "randomizada" y el repertorio obtenido se expresó como una genoteca de fagos filamentosos recombinantes en *E. coli*. En esta forma, fue posible obtener dominios VH solubles con la capacidad para combinar Ag con una alta afinidad (20).

### Proteínas de fusión

La tecnología de ADN recombinante ha hecho posible la concepción, diseño y elaboración de moléculas artificiales llamadas proteínas de fusión, en las cuales, motivos estructurales y/o funcionales, provenientes de dos o más proteínas naturales, son combinados. Varias características hacen a la molécula de Ac un candidato ideal para la elaboración de proteínas de fusión. En primer lugar, su diversidad y exquisita especificidad es deseable para la detección de un número virtualmente ilimitado de moléculas "target" con un riesgo marginal de reacciones cruzadas o no específicas. En segundo lugar, sus propiedades biológicas son atractivas para ciertas aplicaciones en las que se requieren moléculas recombinantes con propiedades específicas tales como vida media, talla y funciones efectoras. Finalmente, y como ya hemos mencionado, la organización modular de los anticuerpos, y los genes que los codifican, facilita grandemente el diseño y elaboración de moléculas recombinantes híbridas.

De esta manera, no sorprende que exista un importante número de proteínas de fusión donde se combinan porciones de moléculas de Ac diferentes (100; 118), o con toxinas (21, 104), interleuquinas (83), moléculas de adhesión (3), componentes de la matriz extracelular (78), hormonas (51), factores de crecimiento (69), superantígenos (110), moléculas CD (33), receptores celulares (15, 26, 27) y hasta lípidos (55). Algunos ejemplos atractivos, con potencial clínico práctico, se resumen en la tabla 1.

Proteína de fusión	Manipulación genética	Propósito	Ref
IgG polimérica	Fusión de la pieza caudal de la cadena pesada m al extremo carboxi-terminal de la cadena pesada g	Incrementar las funciones efectoras de la IgG como activación de Complemento, aglutinación, etc.	100
"T-bodies" molécula de Ac asociada a un linfocito T	Fusión de un scFv al dominio citosólico de una tirosina quinasa ZAP-70 (Syk) a través del dominio transmembrana de la molécula CD8	Redirigir la especificidad de células T citotóxicas.	25 26
"Ab-enzyme" (ADEPT)	Fusión de un scFv específico por la molécula CD20 a la enzima b - glucuronidasa.	Dirigir terapia enzimática (enzimas en la forma de zimógenos) a células de linfoma que porten el antígeno CD20.	35
"Ab-enzyme" (Inmunotoxina binaria)	Fusión de las dos subunidades de la RNAsa A humana a dos scFv diferentes.	Generar un anticuerpo biespecífico conjugado a una actividad RNAsa, para detección y destrucción de células tumorales.	23

Tabla 1 Ejemplos de proteínas de fusión Ig

## CONSIDERACIONES FINALES

Los AcMo de primera generación "llegaron para quedarse". En el ámbito biomédico, estos reactivos abarcan la mayoría de las aplicaciones analíticas en las que se desea detectar moléculas ya sea en forma soluble, o asociadas a la superficie celular o en forma intracelular y ello se ha traducido en un mayor y mejor diagnóstico de distintas enfermedades. Toda la tecnología asociada a su producción constituye, hoy en día, un conjunto de procedimientos estándar y numerosas compañías en Norteamérica y Europa se dedican, casi de manera exclusiva, a producir y comercializar AcMo de primera generación. En ellas, el desarrollo de nuevos productos es permanente.

Por otra parte, las expectativas creadas alrededor de los AcR son considerables. Este es un campo que está en constante progreso e innovación. Se espera que estas moléculas sean capaces de llenar el vacío dejado por los AcMo de primera generación en lo concerniente al desarrollo de herramientas efectivas para el diagnóstico *in vivo*, profilaxis y tratamiento de enfermedades humanas. Una muestra de ello es que para el año 1998 más de 30% de las proteínas en proceso de ensayos clínicos fueron AcR (46). Aunque el uso de moléculas basadas en AcR en el ámbito médico/industrial es aún incipiente, numerosas aplicaciones potenciales son evaluadas en la actualidad tanto en centros académicos como en compañías de biotecnología.

Viendo un poco más hacia el futuro, nuevas tecnologías asociadas a la generación de Ac se están desarrollando y afinando. Ejemplo de ello son los ratones transgénicos humanizados o "xenomouse" (9,101, [9W](#)), la producción de Ac con aplicación médica en animales transgénicos como la vaca (117), el sistema "Trimera" ([8W](#)), las técnicas de desplegamiento de Ac en ribosoma "ribosome display" (38,40) y la así llamada ingeniería de parches "patch engineering" (99).

Es de esta manera muy probable que, más pronto que tarde, seamos testigos de la aparición en nuestras vidas de un nuevo conjunto de herramientas terapéutico-profilácticas con una altísima versatilidad, basadas en moléculas de Ac, que puedan ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer y otras patologías humanas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adair J.R. Engineering antibodies for therapy. Immunol. Rev. 1992. 130: 5-40.
2. Andersen, P.S., H. Orum y J. Engberg. One-step cloning of murine Fab gene fragments independent of IgH isotype for phage display libraries. BioTechniques. 1996. 20: 340-2.
3. Ashkenazi, A. y S.M. Chamow. Immunoadhesins as research tools and therapeutic agents. Curr. Opin. Immunol. 1997. 9: 195-200.
4. Behring, E. von S. Kitasato. Über das Zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. Dtsch. Med. Wochenschr. 1890. 16: 1113-4.
5. Better M., C.P. Chang, R.R. Robinson y A.H. Horwitz. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. Science. 1988. 240: 1041-3.
6. Bird R.E., K.D. Hardman, J.W. Jacobson, S. Johnson, B.M. Kaufman, S.M. Lee, T. Lee, S.H. Pope, G.S. Riordan y M. Whitlow. Single-chain antigen-binding proteins. Science. 1988. 242: 423-6.
7. Boulianne, G.L., N. Hozumi y M.J. Schulman. Production of functional chimeric mouse/human antibody. Nature. 1984. 312: 643-6.

8. Brennan M., F.P. Davidson y H. Paulus. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*. 1985. 229: 81-3.
9. Brüggenmann, M., H.M. Caskey, C. Teale, H. Waldmann, G.T. Williams, M.A. Surani y M.S. Neuberger. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989. 86: 6709-13.
10. Brüggenmann, M., G. Winter, H. Waldmann y M.S. Neuberger. The immunogenicity of chimeric antibodies. *J. Exp. Med*. 1989. 170: 2153-7.
11. Buchwald, M, H. Murialdo, y L. Siminovitch. The morphogenesis of bacteriophage lambda. II. Identification of the principal structural proteins. *Virology*. 1970. 42: 390-400.
12. Campbell, M.J., A.D. Zelenetz, S. Levy y R. Levy. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol. Immunol*. 1992. 29: 193-203.
13. Campbell A.C. Cellular investigations in the diagnosis of lymphoid malignancy. p. 139-74. En *Clinical Immunology, a practical approach*. H. C. Gooi y H Chapel, Eds. IRL Press 1990.
14. Caton, A.J. y H. Koprowski. Influenza virus hemagglutinin-specific antibodies isolated from a combinatorial expression library are closely related to the immune response of the donor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. 87: 6450-64.
15. Challita-Eid, P.M., M.L. Penichet, S.U. Shin, T. Poles, N. Mosammaparast, K. Mahmood, D.J. Slamon, S.L. Morrison y J.D. Rosenblatt. A B7.1-antibody fusion protein retains antibody specificity and ability to activate via the T cell costimulatory pathway. *J. Immunol*. 1998. 160: 3419-26.
16. Chang, C.N., N.F. Landolfi y C. Queen. Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection. *J. Immunol*. 1991. 147: 3610-4.
17. Chotia, C., A.M. Lesk, E. Gherardi, I.M. Tomlinson, G. Walter, J.D. Marks, M.B. Llewelyn y G. Winter. Structural repertoire of the human VH segments. *J. Mol. Biol*. 1992. 227: 799-817.
18. Coloma, M.J., A. Hastings, L.A. Wims y S.L. Morrison. Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *J. Immunol. Meth*. 1992. 152: 89-104.
19. Coloma, M.J., J.A. Larrick, M. Ayala y J.Gavilondo. Primer design for the cloning of immunoglobulin heavy-chain leader-variable regions from mouse hybridoma cells using the PCR. *Biotechniques*. 1991. 7: 152-6.
20. Davies, J. y L. Riechmann. Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology*. 1995. 13: 475-479.
21. Deonarain, M.P. y A.A. Epenetos. Design, characterization and anti-tumour cytotoxicity of a panel of recombinant, mammalian ribonuclease-based immunotoxins. *Br-J-Cancer*. 1998. 77: 537-46.
22. Diamond B.A., D.E. Yelton y M.D. Scharff. Monoclonal antibodies: A new technology for producing serologic reagents. *New Eng. J. Med*. 1981. 304: 1344-9.
23. Dubel, S. Reconstitution of human pancreatic RNase from two separate fragments fused to different single chain antibody fragments: on the way to binary immunotoxins. *Tumor targeting*. 1999. 4: 37-46.
24. Earnshaw, W.C. y S.R.Casjens. DNA packaging by the double-stranded DNA bacteriophages. *Cell*. 1980. 27: 319-31.
25. Ekberg, H., L. Bäckman, G. Tufveson G. Tydén; on behalf of the No 14874 and No 14393 Zenapax Study Groups. Zenapax (Daclizumab) reduces the incidence of acute rejection

- episodes and improves patient survival following renal transplantation. *Transp. Proc.* 1999. 37: 267-8.
26. Eshhar, Z. Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immunol. Immunother.* 1997. 45: 131-6.
  27. Fitzer-Attas, C.J., D.G. Schindler, T. Waks y Z. Eshhar. Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation. *J. Immunol.* 1998. 160: 145-54.
  28. Foote, J. y G. Winter. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 1992. 224: 487-99.
  29. Frenken, L.G.J., J.G.M. Hessing, C.A.M.J.J. Van den Hondel y C.T. Verrips. Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms. *Res. Immunol.* 1998. 149: 589-99.
  30. Gavilondo-Cowley, J.V., M.J. Coloma, J. Vazquez, M. Ayala, A. Macias, K.E. Fry y J.W. Larrick. Specific amplification of rearranged immunoglobulin variable region genes from mouse hybridoma cells. *Hybridoma.* 1990. 9: 407-17.
  31. Glassy M.C. Production methods for generating human monoclonal antibodies. *Hum. Antibod. Hybridomas.* 1993. 4: 154-65.
  32. Glennie M.J., H.M. McBride, A.T. Worth y G.T. Stevenson. Preparation and performance of bispecific F(ab'g)<sub>2</sub> antibody containing thioether linked Fab'g fragments. *J. Immunol.* 1987. 139: 2367-75.
  33. Gregersen, J., S. Mehdi, H. Gelderblom y G. Zettlmeissl. A CD4: immunoglobulin fusion protein with antiviral effects against HIV. *Arch. Virol.* 1990. 111: 29-43.
  34. Griffiths, A.D., S.C. Williams, O. Hartley, I.M. Tomlinson, P. Waterhouse, W.L. Crosby, R.E. Kontermann, P.T. Jones, N.M. Low, T.J. Allison, T.D. Prospero, H.R. Hoogenboom, A. Nissim, J.P.L. Cox, J.L. Harrison, M. Zaccolo, E. Gherardi y G. Winter. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 1994. 13: 3245-60.
  35. Haisma, H.J., M.F. Sernee, E. Hooijberg, R.H. Brakenhoff, I.H. v d Meulen-Muileman, H.M. Pinedo y E. Boven Construction and characterization of a fusion protein of single-chain anti-CD20 antibody and human beta-glucuronidase for antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Blood.* 1998. 92: 184-90.
  36. Hakimi, J., R. Chizzonite, D.R. Luke, P.C. Familletti, P. Bailon, J.A. Kondas, R.S. Pilon, P. Lin, D.V. Weber, C. Spence y col. Reduced immunogenicity and improved pharmacokinetics of humanized anti-Tac in cynomolgus monkeys. *J Immunol.* 1991. 147: 1352-9.
  37. Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E.B. Songa, N. Bendahman y R. Hamers. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993. 363: 446-8.
  38. Hanes, J. y A. Plückthun. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. 94: 4937-42.
  39. Hayden, M.S., L.K. Gilliland y J.A. Ledbetter. Antibody engineering. *Current Opin. Immunol.* 1997. 9: 201-12.
  40. He, M. M.J. Taussig. Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25: 5132-4.
  41. Holliger, P., T. Prospero y G. Winter. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1993. 90: 6444-8.

42. Holliger, P. y G. Winter. Diabodies: small bispecific antibody fragments. *Cancer Immunol. Immunother.* 1997. 45: 128-30.
43. Holvoet, P. Laroche, H.R. Lijnen, R. Van Cauwenberge, E. Demarsin, E. Brouwers, G. Matthyssens y D. Collen. Characterization of a chimeric plasminogen activator consisting of a single chain Fv fragment derived from a fibrin fragment D-dimer-specific antibody and a truncated single chain urokinase. *J. Biol. Chem.* 1991. 266: 19717-24.
44. Hoogenboom, H.R., A.P. de Bruine, S.E. Hufton, R.M. Hoet, J.W. Arends, y R.C. Roovers. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology.* 1998. 4: 1-20.
45. Hu, S., L. Shively, A. Raubitschek, M. Sherman, L.E. Williams, J.Y. Wong, J.E. Shively y A.M. Wu. Minibody: a novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 1996. 56: 3055-61.
46. Hudson, P.J. Recombinant antibody fragments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998. 9: 395-402.
47. Hurle, M.R. y M. Gross. Protein engineering techniques for antibody humanization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1994. 5: 428-33.
48. Huse, W.D., L. Sastry, S.A. Iverson, A.S. Kang, M. Alting-Mees, D.R. Burton, S.J. Benkovic y R.A. Lerner. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science.* 1989. 246: 1275-81.
49. Huston J.S., D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M. Tai, J. Novotny, M.N. Margolies, R.J. Ridge, R.E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea y H. Oppermann. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry.* 1988. 85: 5879-83.
50. James, K. y G.T. Bell. Human monoclonal antibody production, current status and future prospects. *J. Immunol. Meth.* 1987. 100: 5-40.
51. Johnson G.A., T.R. Hansen, K.J. Austin, E.A. Van Kirk y W.J. Murdoch. Baculovirus-insect cell production of bioactive choriogonadotropin-immunoglobulin G heavy-chain fusion proteins in sheep. *Biol. Reprod.* 1995. 52: 68-73.
52. Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger y G. Winter. Replacing the complementary determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 1986. 321: 522-5.
53. Kang, A.S., C.F. Barbas, K.D. Janda, S.J. Benkovic y R.A. Lerner. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991. 88: 4363-4366.
54. Kettleborough, C.A., J. Saldanha, V.J. Heath, C.J. Morrison y M.M. Bendig. Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. *Protein Eng.* 1991. 4: 773-83.
55. Kobatake, E., H. Sasakura, T. Haruyama, M.L. Laukkanen, K. Keinänen y M.A. Aizawa. Fluoroimmunoassay based on immunoliposomes containing genetically engineered lipid-tagged antibody. *Anal. Chem.* 1997. 69: 1295-8.
56. Kohler, G. y C. Milstein. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature.* 1975. 256: 495-7.
57. Kortt, A.A., M. Lah, G.W. Oddie, L.C. Gruen, J.E. Burns, L.A. Pearce, J.A. Atwell, A.J. McCoy, G.J. Howlett, D.W. Metzger, R.G. Webster y P.J. Hudson. Single chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five and ten residue linkers form dimers and with zero residue linker a trimer. *Protein Eng.* 1997. 10: 423-33.

58. Larrick, J.W., L. Danielsson, C.A. Brenner, M. Abrahamson, K.E. Fry y C.A.K. Borrebaeck. Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers y the polymerase chain reaction. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 1989. 160: 1250-6.
59. Larrick, J.W., L. Danielsson, C.A. Brenner, E.F. Wallace, M. Abrahamson, K.E. Fry y C.A.K. Borrebaeck. Polymerase chain reaction using mixed primers: cloning of human monoclonal antibody variable region genes from single hybridoma cells. *Bio/Technology.* 1989. 7: 934-8.
60. Larrick, J.W., E.F. Wallace, M.J. Coloma, U. Bruderer, A.B. Lang y K.E. Fry. Therapeutic human antibodies derived from PCR amplification of B-cell variable regions. *Immunol. Rev.* 1992. 130: 69-85.
61. Leffell M.S. An overview of the immune system: the molecular basis for immune responses Cap. 1. p. 1-45. En *Handbook of human immunology*. M. S. Leffel, A.D. Donnenberg, y N. R. Rose Eds. CRC Press 1997.
62. Li, E., A. Pedraza, M. Bestagno, S. Mancardi, R. Sanchez y O. Burrone. Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins. *Protein Eng.* 1997. 10: 731-6.
63. Lobuglio, A.F., R.H. Wheeler, J. Trang, A. Haynes, K. Rogers, E.B. Harvey, L. Sun, J. Chrayeb y M.B. Khazaeli. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. 86: 4220-4.
64. Luo, D., N. Mah, M. Krantz, D. Wishart, F. Jacobs, and L. Martin. 1997. High level secretion of single-chain antibody in *Pichia* expression system. *Biotechnol. Techn.* 11: 759-61.
65. Ma, J.K.C. y M.B. Hein. Antibody production and engineering in plants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996. 792: 72-81.
66. Marks, J.D., M. Tristem, A. Karpas y G. Winter. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur. J. Immunol.* 1991. 21: 985-91.
67. Martin F., C. Toniatti, A.L. Salvati, S. Venturini, G. Ciliberto, R. Cortese y M. Sollazzo. The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. *EMBO J.* 1994. 13: 5303-9.
68. McCafferty, J., A.D. Griffiths, G. Winter y D.J. Chiswell. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 1990. 348: 552-4.
69. McGrath, J.P., X. Cao, A. Schutz, P. Lynch, T. Ebendal, M.J. Coloma, S.L. Morrison y S.D. Putney. Bifunctional fusion between nerve growth factor and a transferrin receptor antibody. *J. Neurosci. Res.* 1997. 47: 123-33.
70. Model, P. y M. Russel. Filamentous bacteriophage. En *The bacteriophages*, vol.2. Valdner R. ed. Plenum Press. 1988.
71. Montaña R.F. y E.L. Romano. Anticuerpos monoclonales y su aplicación en hematología. *Interciencia.* 1995. 20: 194-203.
72. Morrison, S.L. In vitro antibodies: strategies for production and application. *Ann. Rev. Immunol.* 1992. 10: 239-65.
73. Morrison S.L., M.J. Johnson, L.A. Herzenberg y V.T. Oi. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. 81: 6851-5.
74. Morrison, S.L. y V.T. Oi. Genetically engineered antibody molecules. *Adv. Immunol.* 1989. 44: 65-92.

75. Mouser J.F. y J.S. Hyams. Infliximab: a novel chimeric monoclonal antibody for the treatment of Crohn's disease. *Clin. Ther.* 1999. 27: 932-42.
76. Mullinax, R.L., E.A. Gross, J.R. Amberg, B.N. Hay, H.H. Hogrefe, M.M. Kubitz, A. Greener, M. Alting-Mees, D. Ardourel, J.M. Short, J.A. Sorge y B. Shopes. Identification of human antibody fragment clones specific for Tetanus Toxoid in a bacteriophage  $\lambda$  immunoexpression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990. 87: 8095-9.
77. Nguyen, V.K., R. Hamers, L. Wyns y S. Muyldermans. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IgG2A heavy-chain antibodies. *Mol. Immunol.* 1999. 36: 515-24.
78. Oritani, K. Kanakura, K. Aoyama, T. Yokota, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, Y. Tomiyama. Matsuzawa y P.W. Kincade. Matrix glycoprotein SC1/ECM2 augments B lymphopoiesis. *Blood.* 1997. 90: 3404-13.
79. Onrust, S.V. y L.R. Wiseman. Basiliximab. *Drugs.* 1999. 57: 207-13.
80. Orlandi, R., D.H. Güssow, P.T. Jones y G. Winter. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. 86: 3833-7.
81. Padlan, E.A. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol.* 1991. 28: 489-98.
82. Padlan E.A. Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 1994. 37:169-217.
83. Penichet, M.L., E.T. Harvill y S.L. Morrison. An IgG3-IL-2 fusion protein recognizing a murine B cell lymphoma exhibits effective tumor imaging and antitumor activity. *J. Interferon. Cytokine Res.* 1998. 18: 597-607.
84. Plückthun A., A. Krebber, C. Krebber, U. Horn, U. Knüpfer, R. Wenderoth, L. Nieba, K. Proba y D. Riesenberger. Producing antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation. p. 203-52. En *Antibody Engineering: a practical approach*. H. Hoogenboom, J. McCafferty y D. Chiswell Eds. Oxford. IRL Press. 1996.
85. Portolano, S., P. Seto, G.D. Chazenbalk, Y. Nagayama, S.M. Mclachlan y B. Rapoport. A human Fab fragment specific for Thyroid Peroxidase generated by cloning Thyroid lymphocyte-derived immunoglobulin genes in a bacteriophage  $\lambda$  library. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. 179: 372-6.
86. Presta, L. Antibody engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1992. 3: 394-8.
87. Queen, C., W.P. Schneider, H.E. Selick, P.W. Paine, N.F. Landolfi, J.F. Duncan, N.M. Avdalovic, M. Levitt, R.P. Hungans y T.A. Waldman. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. 86: 10029-33.
88. Rader, C. y C.F. Barbas III. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997. 8: 503-8.
89. Rasched, I. y E. Overer. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microb. Rev.* 1986. 50: 401-27.
90. Ridgway, J.B.B., L.G. Presta y P. Carter: 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* 1996. 9: 617-21.
91. Rode, H.J., M. Little, P. Fuchs, H. Dorsam, H. Schooltink, C. de Ines, S. Dubel y F. Breiling. Cell surface display of a single-chain antibody for attaching polypeptides. *BioTechniques.* 1996. 27: 652-9.
92. Russel, M. Filamentous phage assembly. *Mol. Microbiol.* 1991. 5: 1607-13.
93. Sastry, L., M. Alting-Mees, W.D. Huse, J.M. Short, J.A. Sorge, B.N. Hay, K.D. Janda, S.J. Benkovic y R.A. Lerner. Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for

- generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. 86: 5728-32.
94. Saul, F.A. y R.J. Poljak. Structural patterns at residue positions 9, 18, 67 and 82 in the VH framework regions of human and murine immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 1993. 230: 15-20.
  95. Sblattero D. y A. Bradbury. A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions. *Immunotechnology*. 1998. 3: 271-8.
  96. Shak, S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin. Oncol.* 1999. 26: 71-7.
  97. Skerra, A. y A. Pluckthun. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*. 1988. 240: 1038-41.
  98. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion. *Science*. 1985. 228: 1315-17.
  99. Smith, G.P. Patch engineering: a general approach for creating proteins that have new binding activities. *Trends Biochem. Sci.* 1998. 23: 457-60.
  100. Smith, R.I.F. y S.L. Morrison. Recombinant polymeric IgG: an approach to engineering more potent antibodies. *Bio/technology*. 1994. 12: 683-88.
  101. Taylor, L.D., C.E. Carmack, S.R. Schramm, R. Mashayekh, K.M. Higgins, C.C. Kuo, C. Woodhouse, R.M. Kay y N. Lonberg. A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic Acids Res.* 1992. 20: 6287-95.
  102. Tramontano A, E. Bianchi, S. Venturini, F. Martin, A. Pessi, M. Sollazzo M The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. *J. Mol. Recognit.* 1994. 7: 9-24.
  103. Trill, J.J., A.R. Shatzman y S. Ganguly. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995. 6: 553-60.
  104. Vallera, D.A., A. Panoskaltis-Mortari y B.R. Blazar. Renal dysfunction accounts for the dose limiting toxicity of DT390anti-CD3sFv, a potential new recombinant anti-GVHD immunotoxin. *Protein-Eng.* 1997. 10: 1071-6.
  105. Vaughan, T.J., A.J. Williams, K. Pritchard, J.K. Osbourn, A.R. Pope, J.C. Earnshaw, J. McCafferty, R.A. Hodits, J. Wilton y K.S. Johnson. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.* 1996. 14: 309-14.
  106. Verhoeyen M, C. Milstein y G. Winter. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science*, 1988. 230: 1534-6.
  107. Waldmann, T.A. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science*. 1991. 252: 1657-62.
  108. Wang, L., M.Z. Radic, D. Siegel, T. Chang, J. Bracy y U. Galili. Cloning of anti-Gal Fabs from combinatorial phage display libraries: structural analysis and comparison of Fab expression in pComb3H and pComb8 phage. *Mol. Immunol.* 1997. 34: 609-18.
  109. Waterhouse, P., A.D. Griffiths, K.S. Johnson y G. Winter. Combinatorial infection and in vivo recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21: 2265-6.
  110. Weiner, L.M., R.K. Alpaugh y M. von Mehren. Redirected cellular cytotoxicity employing bispecific antibodies and other multifunctional binding proteins. *Cancer Immunol. Immunother.* 1997. 45: 190-2.

111. Welschof, M., P. Terness, F. Kolbinger, M. Zewe, S. Dübel, H. Dörsam, C. Hain, M. Finger, M. Jung, G. Moldenhauer, N. Hayashi, M. Little y G. Opelz. Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes. *J. Immunol. Meth.* 1995. 179: 203-14.
112. Williamson, R.A., M.A.A. Persson y D.R. Burton. Expression of a human monoclonal anti-(rhesus D) Fab fragment in *Escherichia coli* with the use of bacteriophage  $\lambda$  vectors. *Biochem J.* 1991. 277: 561-3.
113. Williamson, R.A., R. Burioni, P.P. Sanna, L.J. Partridge, C.F. Barbas III y D.R. Burton. Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. 90: 4141-5.
114. Winkelstein A. y A.D. Donnenberg. Clinical applications of flow cytometry. Cap. 11, p.381-476. *En Handbook of human immunology.* M. S. Leffel, A.D. Donnenberg N. R. Rose Eds. CRC Press 1997.
115. Winter, G. y W.J. Harris. Humanized antibodies. *Immunol. Today* 1993. 14: 243-6.
116. Wright, A., Seung-Uon Shin y S.L. Morrison. Genetically engineered antibodies: progress and prospects. *Crit. Rev. Immunol.* 1992. 12: 125-68.
117. Young, M.W., H. Meade, J.M. Curling, C.A. Ziomek y M. Harvey. Production of recombinant antibodies in the milk of transgenic animals. *Res. Immunol.* 1998. 149: 609-10.
118. Zhu, Z., G.D. Lewis y P Carter. Engineering high affinity humanized anti-p185<sup>HER2</sup>/anti-CD3 bispecific F(ab')<sub>2</sub> for efficient lysis of p185<sup>HER2</sup> overexpressing tumor cells. *Int. J. Cancer.* 1995. 62: 319-24.

#### Sitios Web

- (1w) <http://www.nobel.se/prize>
- (2w) <http://www.craigmedical.com/marijuan.htm>
- (3w) <http://www.vancouverbiotech.com/vbl98/diagnostic.htm>
- (4w) <http://www.advimmuno.com>
- (5w) <http://www.vancouverbiotech.com/vbl98/psa.htm>
- (6w) [http://www.dbc-labs.com/3\\_eiasy.htm#cea](http://www.dbc-labs.com/3_eiasy.htm#cea)
- (7w) <http://www.biodesign.com/new/hepatitis.asp>
- (8w) <http://www.xtlbio.com/home.html>
- (9w) [http://www.abgenix.com/abgenix\\_solution.htm](http://www.abgenix.com/abgenix_solution.htm)