

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Lucinda Villaescusa Castillo*

RESUMEN

Los anticuerpos monoclonales constituyen en el momento actual el principal grupo de medicamentos biotecnológicos. Un hito importante en relación con la obtención de estos fármacos fue la puesta a punto de la tecnología del hibridoma por Köhler y Milstein en 1975. Desde entonces, la naturaleza molecular de los anticuerpos monoclonales terapéuticos, así como los métodos de producción han evolucionado considerablemente. Actualmente, las estrategias para la producción de estos fármacos pasan inevitablemente por la selección de dianas terapéuticas de interés, hecho que entraña gran dificultad, ya que, a menudo no se conocen completamente las rutas bioquímicas implicadas en la génesis y desarrollo de muchas patologías. Su obtención puede llevarse a cabo utilizando ratones genéticamente modificados en los cuales se introducen los genes que codifican las inmunoglobulinas humanas, utilizando los vectores adecuados. También puede emplearse la tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos o Phage Display, que permite obtener anticuerpos monoclonales sin utilizar ratones. Mediante esta técnica se obtienen bibliotecas de anticuerpos, a partir de las cuales podrán seleccionarse aquellos que contengan la secuencia genética que codifica el anticuerpo con mayor afinidad y especificidad por la proteína diana. La tecnología de ADN recombinante también ha hecho posible la obtención de moléculas recombinantes derivadas de anticuerpos, como los fragmentos de anticuerpo y las proteínas de fusión, así como otros, llamados biespecíficos, en los cuales los dos sitios de unión al antígeno poseen especificidades diferentes.

INTRODUCCIÓN

Los medicamentos biotecnológicos constituyen en la actualidad la vanguardia en la innovación terapéutica farmacológica. En las últimas décadas, los grandes avances de la Biotecnología y la Biología Molecular han permitido el desarrollo de gran cantidad de medicamentos biotecnológicos innovadores destinados al tratamiento de enfermedades neoplásicas, autoinmunes, infecciosas, inflamatorias y cardiovasculares, entre otras. Estos medicamentos tienen un enorme potencial en el tratamiento de estas enfermedades graves para las cuales, hasta el momento de su introducción, no existían fármacos eficaces disponibles.

Pero, ¿qué es un medicamento biotecnológico?

Un medicamento biotecnológico es aquel cuyo principio activo, de origen biológico, ha sido obtenido utilizando tecnología de ADN recombinante. Y una sustancia biológica es aquella que se produce o se extrae a partir de una fuente biológica y que necesita, para su caracterización y determinación de su calidad, una combinación de ensayos fisicoquímicos y biológicos junto con el proceso de producción y su control.¹

* Profesora titular de Farmacología. Universidad de Alcalá.

Según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) un medicamento biológico es el que contiene uno o más principios activos sintetizados o derivados de una fuente biológica (como microorganismos, órganos y tejidos de origen vegetal o animal, células o fluidos de origen humano o animal y diseños celulares biotecnológicos). Es decir, aquel cuyo principio activo es producido por un organismo vivo o a partir de él.²

Actualmente se habla de fármacos biológicos o biofármacos para hacer referencia, en general, a todos los productos de origen biológico, ya que la mayor parte de ellos se obtienen mediante biotecnología, aunque existen algunas excepciones[†].

Si bien los medicamentos biológicos pueden ser de naturaleza química muy diversa, incluyendo polisacáridos, hoy en día la mayor parte de estos productos la constituyen las proteínas o, en general, moléculas con un importante componente peptídico. La incorporación de estos fármacos a la terapéutica se produjo paralelamente a la introducción de las técnicas de ADN recombinante. En 1953, Watson y Crick descubrieron la estructura de doble hélice del ADN y a partir de ahí se conoció la estructura de los genes y cómo la información que portaban se traducía en funciones o características.³ Entonces se comenzó a buscar la forma de aislarlos, analizarlos, modificarlos y hasta de transferirlos de un organismo a otro para conferirle una nueva característica. Básicamente, de eso trata la **ingeniería genética**, que se podría definir como un conjunto de metodologías que permite transferir genes de un organismo a otro y expresarlos (producir las proteínas para las cuales estos genes codifican) en organismos diferentes al de origen.

El ADN que combina fragmentos de organismos diferentes se denomina ADN recombinante. En consecuencia, las técnicas que emplea la ingeniería genética se denominan **técnicas de ADN recombinante** y los organismos que reciben un gen que les aporta una nueva característica se denominan **organismos genéticamente modificados o transgénicos**.

Gracias a la aplicación de estas técnicas, que permiten la manipulación del ADN, ha sido posible la obtención de **proteínas recombinantes**, es decir, proteínas obtenidas a partir de una especie o una línea celular distinta a la original; combinando material genético de diferente origen.

Los **biofármacos** son proteínas o glicoproteínas de elevado peso molecular, con una estructura tridimensional compleja, que contienen un número elevado de aminoácidos con una secuencia determinada y con especificidad en el número y localización de puentes disulfuro que unen las cadenas proteicas. En ocasiones, contienen moléculas de carbohidratos que matizan su actividad biológica. Además, la cadena proteica puede presentar hélices en número, tamaño y configuración variados. Todo ello les hace poseer determinadas propiedades inherentes a las cadenas peptídicas que las forman y a la estructura tridimensional en que se constituyen tras los diferentes plegamientos y configuraciones espaciales que se pueden producir. En definitiva, son estructuras de tal complejidad que sólo los organismos vivos las pueden producir y cuya obtención por los métodos convencionales de síntesis química sería inabordable.

Los fármacos biológicos son, por tanto, fármacos muy complejos que han sufrido una gran evolución. El primer paso se dio con la identificación de los fragmentos de ADN responsables de la producción de determinadas hormonas, enzimas, factores de crecimiento, etc. Así se obtuvieron los biofármacos más simples, que componen la primera generación de medicamentos biológicos, como la insulina, la hormona de crecimiento, las gonadotropinas, los factores de la coagulación o los factores estimuladores de colonias, cuyo “mecanismo de acción” consistía únicamente en suplir a un factor que se encontraba

[†] El condroitín sulfato o las heparinas de bajo peso molecular son medicamentos **biológicos**, pero no son **biotecnológicos**, puesto que para su obtención no se emplea tecnología de ADN recombinante.

deficitario en el organismo. Casi inmediatamente después, de forma paralela al avance en el conocimiento de los procesos fisiopatológicos, se realizaron observaciones de las que se extrajeron consecuencias provechosas, de tal manera que, en la actualidad, gracias a la introducción de los biofármacos de segunda generación, los **anticuerpos monoclonales**, los posibles mecanismos de actuación de los medicamentos biológicos son, teóricamente, ilimitados. En el momento actual los anticuerpos monoclonales se han establecido como el principal grupo de fármacos biotecnológicos.

LOS ANTICUERPOS Y EL SISTEMA INMUNE

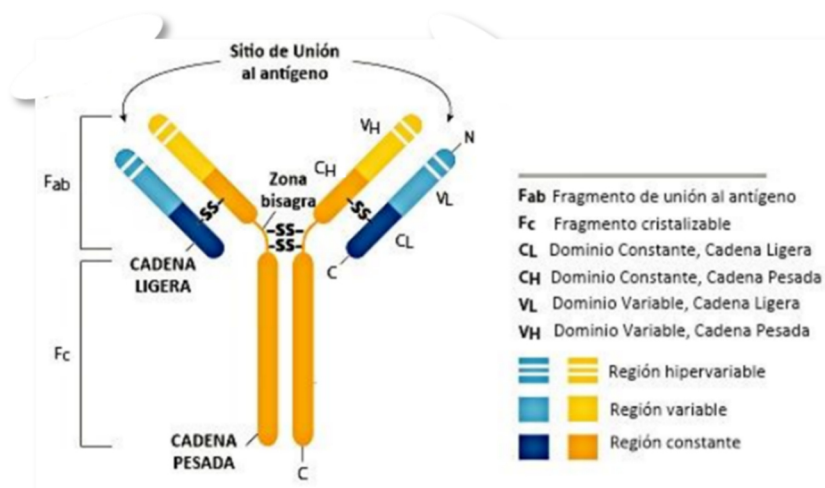
A modo de apunte histórico cabe recordar que en 1900, Ehrlich expuso su teoría de las “cadenas laterales” aplicada a la inmunología.⁴ Afirmaba que las células del organismo producían unos receptores, unas cadenas laterales, que eran capaces de unirse a las toxinas bacterianas por complementariedad molecular; de tal manera que cuando una célula está en peligro elabora un exceso de tales cadenas, que se separan de la célula y se convierten en antitoxinas circulantes, capaces de actuar frente a las toxinas bacterianas. Es decir, lo que hoy llamamos anticuerpos. Años más tarde, en 1972, Edelman y Porter, obtuvieron el premio Nobel por sus descubrimientos relativos a la estructura química de los anticuerpos.^{5,6}

Como sabemos, los anticuerpos naturales o inmunoglobulinas (Ig) son los principales efectores de la respuesta humoral del sistema inmune. Como parte del sistema inmunológico normal, los linfocitos B y las células plasmáticas derivadas de ellos, producen cientos de miles de anticuerpos (policlonales) que son capaces de reconocer de manera específica componentes antigénicos presentes en bacterias, virus u otros agentes invasores y formar con ellos complejos estables (inmunocomplejos). Las inmunoglobulinas pueden encontrarse en forma soluble (anticuerpos), o bien, tal como decía Ehrlich, ancladas a la membrana de los linfocitos B constituyendo el receptor para antígeno (BCR) de estas células.

En el organismo humano existen cinco tipos diferentes de inmunoglobulinas, G, E, D, M y A. Si bien la estructura general de todas ellas es muy similar, cada tipo de inmunoglobulina tiene una función diferente en el sistema inmunológico. De todas las inmunoglobulinas, las IgG son las que desempeñan un papel preponderante en la respuesta inmunológica, siendo el tipo más abundante en el organismo.⁷

ESTRUCTURA BÁSICA DE UNA INMUNOGLOBULINA

La estructura más sencilla de inmunoglobulina tiene la forma característica de una “Y” (Figura 1). Está constituida por dos cadenas peptídicas largas (*H*, pesadas) e iguales y dos cadenas peptídicas cortas e iguales (*L*, ligeras), interconectadas por varios puentes disulfuro en una región conocida como región



bisagra.

Aproximadamente, los primeros cien aminoácidos de la secuencia de cada cadena son distintos, de ahí el nombre de variable (V) para esta región, mientras que el resto de la cadena es idéntico en cada anticuerpo de una determinada clase (C).

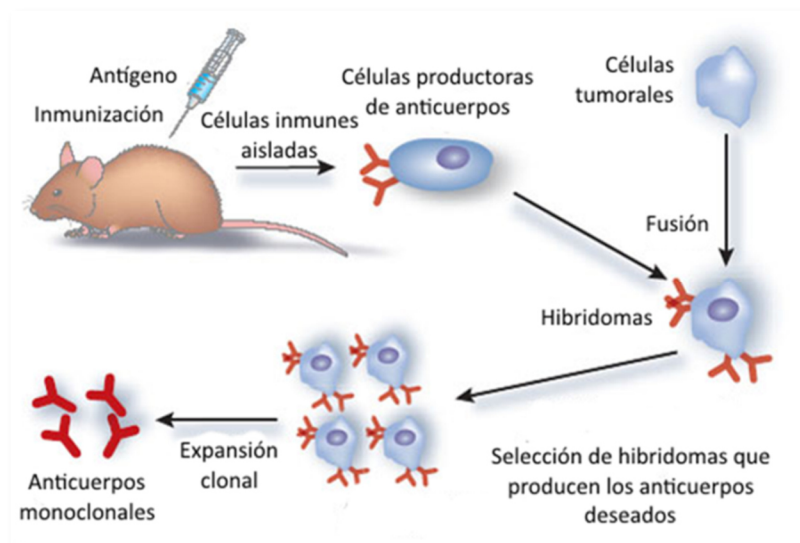
Figura 1. Estructura básica de una inmunoglobulina

El fragmento *F_{ab}* (*Fragment antigen binding*) comprende la región variable de las cadenas H y L y una parte de la región constante. Esta región determina su “especificidad” ya que en ella se encuentra la zona de unión al antígeno, mientras que en la región *F_c* (*Fragment crystallizable*) residen las llamadas “propiedades efectoras” de la reacción inmune, que convierten la unión inicial parátopo-epítipo en una reacción biológica en la que participan otras células y moléculas solubles. El resultado es la neutralización de la sustancia tóxica o la destrucción del microorganismo portador de la molécula de antígeno.

Estos segmentos peptídicos se yuxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátopo) donde se aloja la región del antígeno reconocida por el anticuerpo (epítipo). El parátopo conforma una imagen especular del epítipo, y los seis segmentos que lo forman reciben el nombre de regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *Complementary Determining Regions*). Las regiones CDR confieren a las inmunoglobulinas una enorme especificidad y diversidad.^{7,8}

ORIGEN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas modificadas, diseñadas específicamente para actuar frente a dianas concretas, con el objetivo de interrumpir un proceso patológico concreto, estimular una acción celular determinada o desviar un mecanismo celular hacia una vía de interés.



Su historia comienza en 1975, fecha en la que se produjo un hito importante en el descubrimiento de estos fármacos, la puesta a punto de la **tecnología del hibridoma**, por Köhler y Milstein (Figura 2), hecho por el cual recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984.⁹

Figura 2. Representación esquemática de la obtención de anticuerpos monoclonales mediante la tecnología del hibridoma. Michnick W and Sidhu S (2008)

Esta tecnología supuso un importante avance, ya que permitió obtener anticuerpos específicos capaces de reconocer a un único epítipo o determinante antigénico y producirlos de forma ilimitada. El procedimiento comienza con la inmunización de un ratón con el antígeno de interés, tras la cual, se extraen los linfocitos B a partir del bazo del animal y se fusionan con células neoplásicas de mieloma. De esta manera se obtiene una célula de fusión, un hibridoma, que combina ciertas ventajas de sus progenitores, la capacidad de producir grandes cantidades de un único anticuerpo, propia de los linfocitos B y la capacidad de multiplicarse indefinidamente, característica de las células neoplásicas. A

continuación, se seleccionan los hibridomas capaces de producir los anticuerpos deseados y se produce la expansión del clon de mayor interés. Finalmente se procede a la purificación de los anticuerpos obtenidos. De esta manera se obtiene una fuente casi inagotable de anticuerpos producidos por un clon celular, que derivan de un único linfocito B, y que son por tanto idénticos y específicos de epítops individuales.

El primer anticuerpo monoclonal terapéutico producido mediante esta tecnología fue **muromonab**, de origen murino, dirigido frente al antígeno CD3 que se expresa en la superficie de los linfocitos T. Fue aprobado por la FDA (*Food and Drugs Administration*) en 1986 para el tratamiento del rechazo en pacientes trasplantados.

Sin embargo, el empleo de anticuerpos monoclonales murinos obtenidos mediante esta tecnología presentaba importantes limitaciones derivadas de su origen no humano, como su corta semivida plasmática o unas funciones efectoras ineficientes, pero sobre todo, la producción de anticuerpos humanos frente a las cadenas murinas, que provocaba importantes efectos adversos que limitaban su uso clínico.

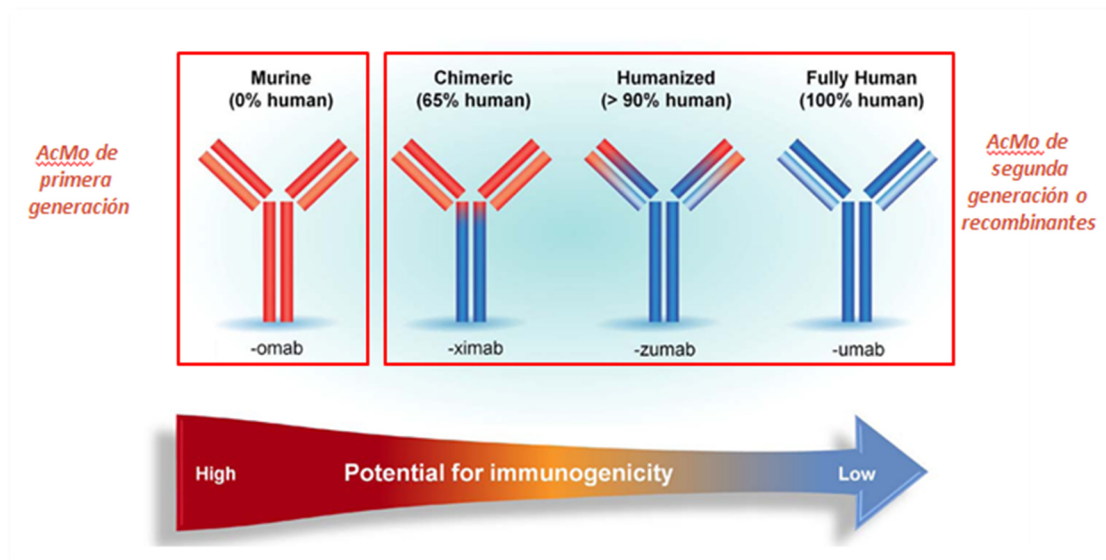


Figura 3. Tipos de anticuerpos monoclonales según su origen (Foltz IN, 2013)

Con el fin de evitar estos problemas, potencialmente graves, y gracias a las técnicas de ingeniería genética, se desarrollaron nuevas técnicas moleculares que dieron lugar a la obtención de los anticuerpos monoclonales de segunda generación, los **anticuerpos monoclonales recombinantes** (Figura 3), en los cuales se reemplazaron porciones del anticuerpo murino por proteínas humanas. En primer lugar se obtuvieron los anticuerpos monoclonales **quiméricos**, en los que la región *Fab* es de origen murino mientras que la fracción cristalizable *Fc* es de origen humano, y posteriormente los anticuerpos monoclonales **humanizados**, en los que la región *Fc* sigue siendo de origen humano y la región *Fab* es parcialmente humana y parcialmente murina. Los anticuerpos monoclonales quiméricos contienen aproximadamente un 65-90% de cadena humana mientras que los humanizados contienen aproximadamente un 90-95%. En 1997 se aprobó el primer anticuerpo monoclonal quimérico, **rituximab**, y en 1999 el primero humanizado, **daclizumab**.

Actualmente, se han desarrollado procedimientos que permiten obtener anticuerpos monoclonales completamente **humanos**, reduciéndose considerablemente el potencial inmunogénico. El primero de ellos, **adalimumab**,¹⁰ fue autorizado en 2003.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

Un método para obtener anticuerpos monoclonales completamente humanos consiste en la utilización de **ratones transgénicos**, en los cuales se introducen los genes de las inmunoglobulinas humanas utilizando distintos vectores. Los ratones transgénicos portadores de los genes de las inmunoglobulinas humanas se cruzan con ratones en los cuales se han eliminado los genes de las inmunoglobulinas endógenas murinas, con el fin de conseguir un ratón capaz de producir exclusivamente inmunoglobulinas humanas (Figura 4).^{11, 12}

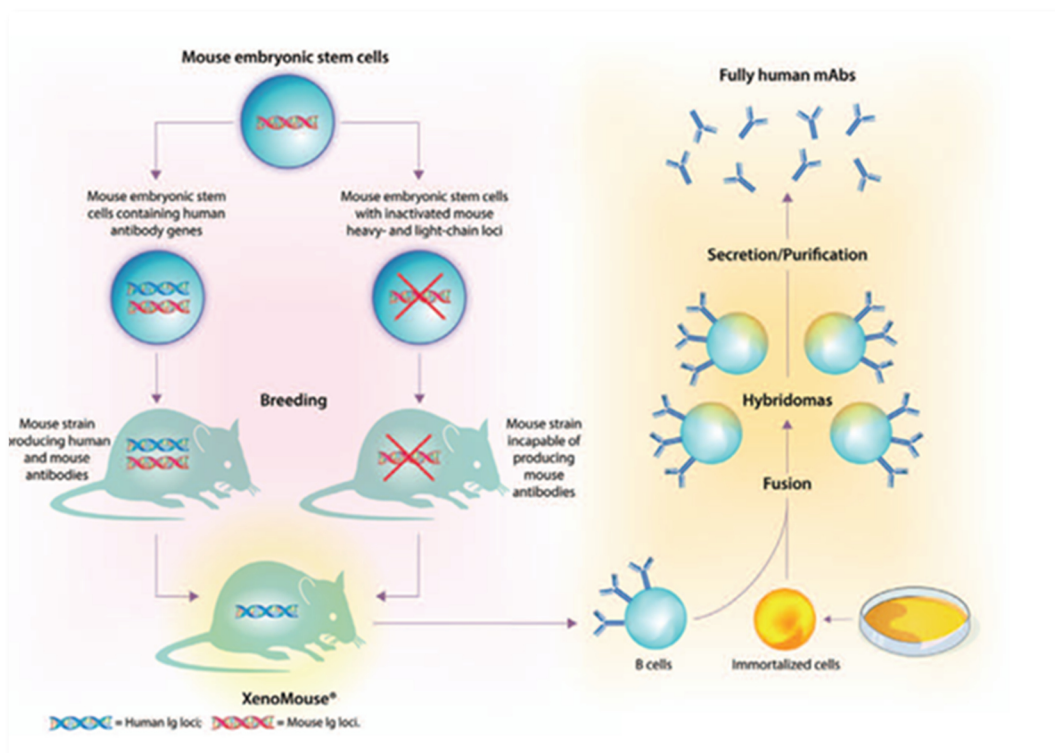


Figura 4. Obtención de anticuerpos monoclonales completamente humanos a partir de ratones transgénicos (Foltz IN, 2013)

Por otra parte, la tecnología **Phage Display** (presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos) permite obtener anticuerpos monoclonales sin utilizar ratones. Los fagos son partículas víricas que infectan bacterias, sin producir enfermedades en los seres humanos. Mediante técnicas de ADN recombinante es posible introducir genes de cualquier organismo, sin importar la complejidad, en el genoma de los fagos. Estos fagos modificados genéticamente pueden expresar en su superficie diferentes proteínas terapéuticas. En líneas generales, lo que se pretende con esta tecnología es obtener una molécula que posea la máxima afinidad por una determinada diana terapéutica. Y para ello, el primer paso es obtener todas las posibles combinaciones genéticas que produzcan la molécula que se está buscando y cada una de estas secuencias se fusiona con el gen que codifica las proteínas de la cápside del fago, para lograr que sean expresadas en su superficie. De esta forma se obtienen clones de fagos, cada uno de los cuales produce una variante diferente de la secuencia de la proteína que se desea

obtener. Posteriormente, se eligen aquellos fagos que expresen en su superficie la molécula con las mejores propiedades de unión a la molécula diana (Figura 5).^{13, 14, 15}

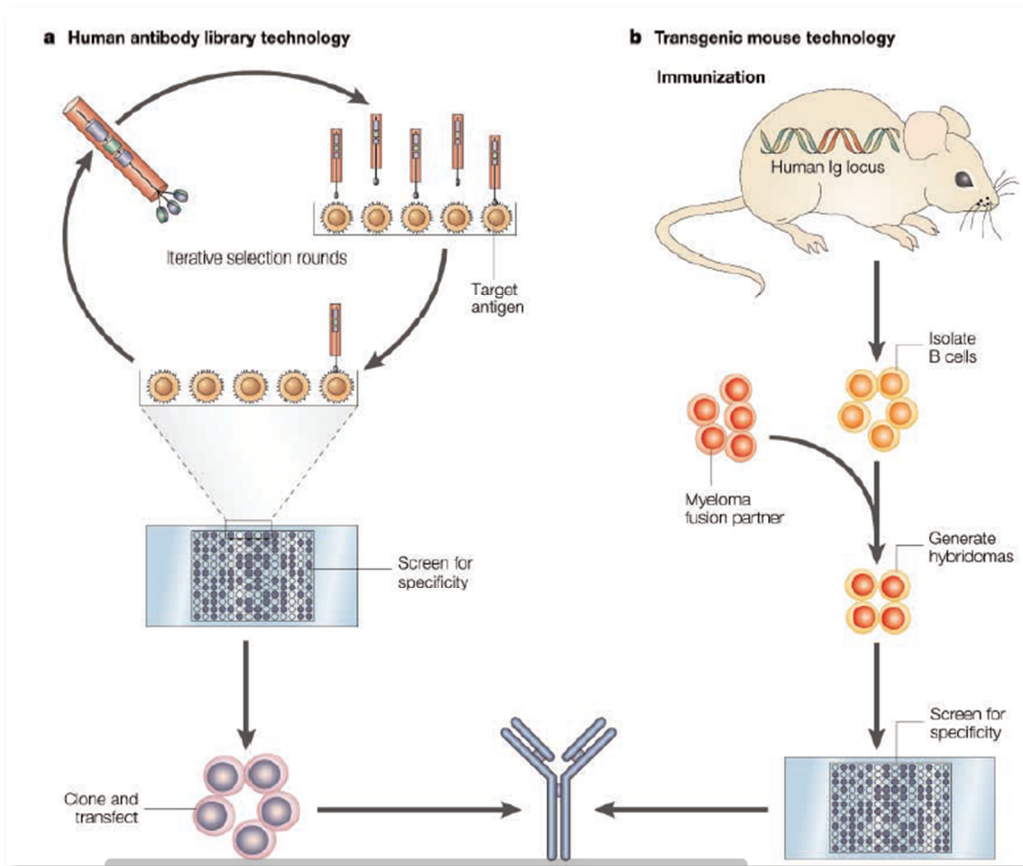


Figura 5. Técnicas de producción de anticuerpos mediante presentación en fagos (*in vitro*) y mediante la utilización de ratones transgénicos (*in vivo*). (Brekke and Sandlie, 2003)

A continuación, se describe el proceso de obtención de un anticuerpo monoclonal destinado a bloquear la acción de una proteína diana en un determinado proceso patológico. Dicho proceso se inicia con el aislamiento de los genes que codifican las cadenas ligeras (V_L) y pesadas (V_H) de la fracción variable, a partir de los linfocitos B aislados de donantes humanos adultos sanos. Estos genes se amplifican mediante un proceso denominado reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite aumentar su cantidad exponencialmente. Una vez aisladas y copiadas las secuencias genéticas, éstas se someten a un proceso de recombinación, obteniéndose todas las combinaciones posibles, lo que supone la creación de una gran cantidad de anticuerpos diferentes. El siguiente paso es clonar las combinaciones obtenidas, para lo cual se insertan en el ADN del fago junto a los genes que codifican las proteínas estructurales de la cápside. Los fagos se replican en el interior de *E. coli* y los anticuerpos funcionales son expresados en su cápside, de la misma manera que un linfocito B expresa los anticuerpos en su superficie. Los múltiples fagos originados, con sus correspondientes anticuerpos en la superficie constituyen una **biblioteca de anticuerpos**, a partir de la cual deberán seleccionarse aquellos que contienen la secuencia génica que codifica el anticuerpo con la mayor afinidad y especificidad por la proteína diana en cuestión.

Una vez seleccionada la combinación V_H/V_L (de la fracción F_{ab}), ésta se ensambla con el esqueleto estructural del anticuerpo, la fracción F_c . La secuencia genética resultante se introduce en células de ovario de hámster chino (células CHO).¹⁰

Seguidamente, se detallan las etapas del proceso de fabricación industrial.

El proceso de producción (Figura 6) consta de dos fases fundamentales:

1. Fase de elaboración o *upstream* o de producción a pequeña escala y
2. Fase de transformación o *downstream* o de producción a gran escala.

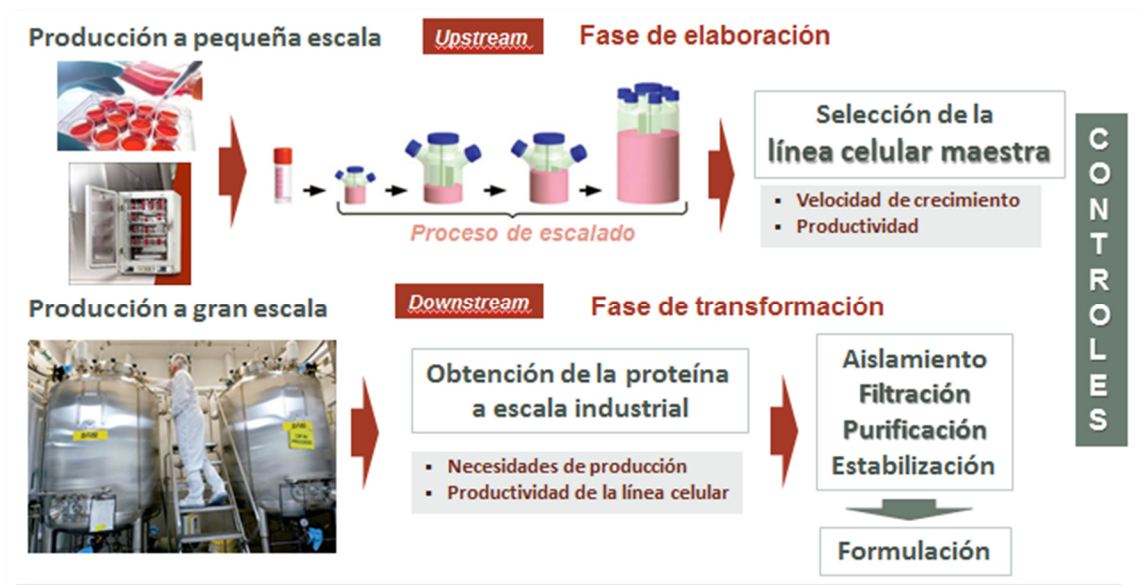


Figura 6. Pasos fundamentales del proceso de producción de un anticuerpo monoclonal

La fase de elaboración comienza con el cultivo de las células, que serán las encargadas de producir la proteína terapéutica. Estas células se cultivan a pequeña escala, en frascos o placas Petri, que contienen el medio de cultivo necesario para que las células crezcan. Una vez conseguida la línea celular, se somete a criopreservación en numerosos viales para crear un banco de células. Cuando se va a llevar a cabo el proceso de fabricación de un lote, se descongela un vial del banco de células y se inicia el cultivo celular en un matraz que contiene un pequeño volumen de medio de cultivo. Durante el proceso de escalado, las células se transfieren secuencialmente a recipientes cada vez más grandes, que contienen mayor volumen de medio de cultivo, de manera que las células se dividen constantemente siempre que el entorno de crecimiento siga siendo favorable. Los cambios más pequeños pueden afectar a las células y alterar las proteínas que producen. Por eso se requieren controles estrictos para garantizar la calidad y reproducibilidad del producto final. Hay que controlar variables como: temperatura, pH, nivel de oxígeno, concentración de nutrientes, etc. Además, deben realizarse pruebas para comprobar la ausencia de contaminación con bacterias, levaduras u otros microorganismos, ya que cualquier contaminación de un cultivo estropeará la totalidad del lote. Estos controles se realizan manualmente.

A continuación, las células que han mostrado mayor capacidad de crecimiento de forma estable a lo largo de varios cultivos se cultivan en equipos de volumen superior y se evalúa su capacidad de producción de la proteína de interés y la calidad de la misma, en base a su correcta estructura, glicosilación, funcionalidad, etc.

Esta etapa es muy crítica, ya que debe finalizar con la selección de la línea celular maestra, que será la que definitivamente se traslade a la última etapa del proceso.

La selección de la línea celular maestra se lleva a cabo en función de:

- La velocidad de crecimiento (concentración de células/unidad de tiempo) en el sistema final
- La productividad de la línea celular (cantidad de proteína producida por cada célula).

La siguiente etapa es **la fase de transformación o *downstream*** o de producción a gran escala; es decir, a la escala de producción necesaria, que vendrá determinada por las necesidades de producción (en base al volumen de mercado al que va destinado el fármaco) y la productividad de la línea celular.

A continuación, se aísla el anticuerpo monoclonal a partir de las células para ser sometido posteriormente a sucesivos procesos de filtración y purificación (cromatografía y ultrafiltración). Estos procesos también son una parte muy importante del proceso de fabricación, ya que puede tener una influencia crítica en la economía global del proceso en función del rendimiento obtenido.

Finalmente, se formula el producto según las especificaciones vigentes y se acondiciona para su uso clínico.

Cada uno de los pasos que se llevan a cabo para la producción de un anticuerpo monoclonal es específico para cada fármaco. Cualquier mínima alteración puede dar lugar a cambios en la estructura del principio activo, comprometiendo su estabilidad o su comportamiento terapéutico, o incrementando el riesgo de efectos adversos. Los parámetros que definen los procesos de fabricación deben estar bien especificados para una correcta valoración de la calidad del producto.¹⁶

Por tanto, actualmente pueden obtenerse de manera específica anticuerpos totalmente humanos, que se dirigen de modo muy específico y con un buen perfil de seguridad hacia una molécula concreta que desempeña una función clave en un proceso patológico. Esta molécula puede ser un receptor de superficie celular, una molécula de señalización, etc. El objetivo es que el anticuerpo reconozca dicha molécula, se una a ella y finalmente, se detenga el proceso patológico.

Todos los anticuerpos aprobados para uso terapéutico pertenecen a la familia de las IgG. Pero, a la hora de desarrollar un anticuerpo monoclonal terapéutico, surge la pregunta de cuál elegir. ¿Existen razones para preferir un isotipo u otro de IgG?

En humanos, existen cuatro isotipos de IgG, que se diferencian estructuralmente entre sí por el tamaño de la región bisagra, en el número de puentes disulfuro entre las cadenas pesadas, en su forma funcional *in vivo*, en su vida media, en el número de alotipos (polimorfismo alotípico), así como en su capacidad para ejercer funciones efectoras.

A la hora de elegir el isotipo será necesario tener en cuenta los resultados que se pretendan obtener *in vivo*, sobre todo dependiendo del mecanismo de acción que se busque.

Las funciones efectoras son muy útiles, por ejemplo, cuando lo que se pretende es destruir células tumorales. Los anticuerpos diseñados para tener un mecanismo de acción en enfermedades neoplásicas requieren un isotipo capaz de activar el complemento y que ejerza funciones efectoras para provocar la muerte celular por citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Sin embargo, si el objetivo es la neutralización de antígenos solubles, las funciones efectoras son menos relevantes.

Por tanto, a la hora de desarrollar anticuerpos monoclonales terapéuticos deben considerarse las propiedades de los diferentes isotipos, aunque no existen reglas generales para la selección de uno u otro, ya que la elección final debe guiarse por los resultados de los estudios pertinentes.¹⁷

MOLÉCULAS RECOMBINANTES DERIVADAS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Además de los anticuerpos monoclonales completos, también se utilizan en clínica diversas moléculas recombinantes derivadas de ellos para finalidades concretas, considerando la diana farmacológica hacia la que se dirigen.

Estas moléculas derivadas de anticuerpos constituyen un conjunto heterogéneo de proteínas recombinantes entre las que se incluyen los fragmentos de anticuerpos monoclonales, tipo F_{ab} , F_v de cadena sencilla (ScF_v), *diabodies*, *triabodies*, etc. y las proteínas de fusión.

Antes del desarrollo de las técnicas de ingeniería genética la obtención de **fragmentos de anticuerpo** (F_{ab} , *fragment antigen-binding*) (Figura 7) se llevaba a cabo mediante la acción de enzimas proteolíticas. Posteriormente se obtuvieron versiones recombinantes funcionales de F_v y F_{ab} en *E. coli*. *E. coli* es en la actualidad el sistema de expresión más accesible para la producción de estos fragmentos debido a las ventajas indiscutibles que ofrece en lo que se refiere a manipulación, transformación, cinética de crecimiento y condiciones de fermentación.

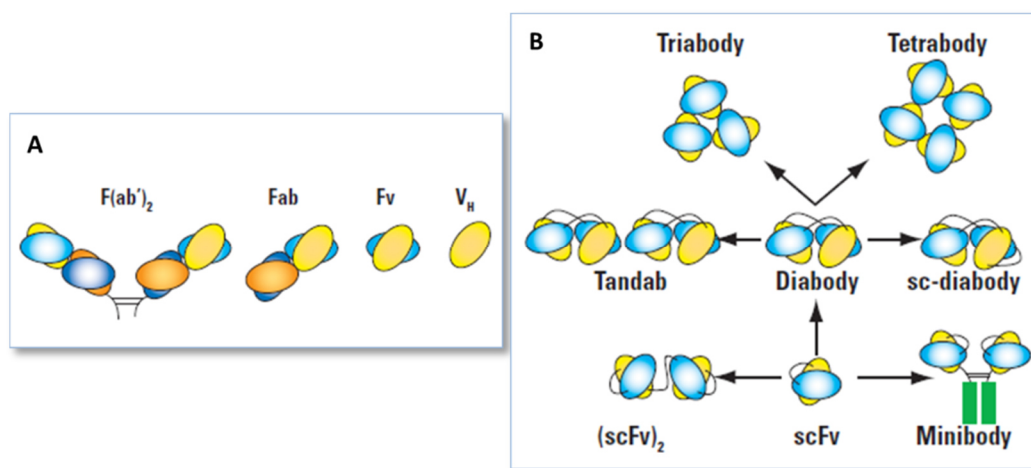


Figura 7. A. Fragmentos de anticuerpos monoclonales. B. Ingeniería de anticuerpos empleando fragmentos variables de cadena única o $ScFv$ como base. (Sanz L, 2009)

La utilización de fragmentos de anticuerpo, como los F_v , formados por las regiones variables de la cadena pesada y ligera, donde se encuentra la zona de reconocimiento del antígeno, se debe a que su bajo peso molecular les confiere unas propiedades óptimas tanto en el campo diagnóstico como en el terapéutico. Sin embargo, las interacciones débiles que unen las regiones V los hacen muy inestables a temperatura fisiológica. Con el fin de mejorar la estabilidad y preservar la conformación de este tipo de fragmentos de anticuerpo recombinantes se han desarrollado diferentes estrategias que incluyen la introducción de puentes disulfuro adicionales y la adición de segmentos peptídicos flexibles (*linkers*), que conectan los genes de las regiones V de la misma cadena o de cadenas distintas.

De esta manera se han obtenido fragmentos recombinantes en los que las regiones V_H y V_L están unidas por un *linker* peptídico. Estas estructuras se denominan *scFv* (*single chain Fv*). También se han obtenido fragmentos bivalentes (*diabodies*) que presentan dos sitios de unión al antígeno, y *diabodies* biespecíficos que pueden reconocer dos antígenos distintos.

La tecnología de ADN recombinante ha hecho posible el diseño de moléculas artificiales denominadas **proteínas de fusión** o proteínas recombinantes quiméricas, (Figura 8) derivadas de anticuerpos monoclonales, que son el resultado de combinar la porción F_c de una IgG humana con fracciones peptídicas de determinados receptores biológicos o de sus correspondientes ligandos. Las proteínas de fusión constituyen, por tanto, una alternativa para mejorar la expresión de proteínas recombinantes.

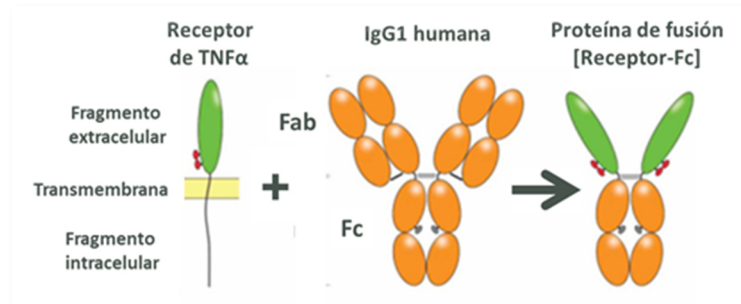


Figura 8. Proteínas de fusión. Análogos de receptores solubles

La tecnología de ADN recombinante también ha hecho posible el diseño de **anticuerpos monoclonales biespecíficos**. Se trata de inmunoglobulinas construidas artificialmente mediante técnicas de ingeniería genética, en las cuales los dos sitios de unión a antígeno poseen especificidades diferentes. De esta manera, una parte del anticuerpo es capaz de reconocer un tipo de molécula o célula diferente de la otra.

Para ello deben obtenerse dos cadenas, $V_{H A}-V_{L B}$ y $V_{H B}-V_{L A}$ (siendo A y B, los dos antígenos diferentes), que se expresan en el mismo vector y se ensamblan para formar dímeros con dos sitios distintos de unión al antígeno.^{8, 18}

En conclusión, podemos afirmar que los anticuerpos monoclonales constituyen una indiscutible herramienta terapéutica, que, junto con los grandes avances en el conocimiento de la Biología Molecular, han permitido la actuación de manera específica sobre dianas clave en la etiopatogenia de muchas enfermedades graves. Por otra parte, la tecnología actual de fabricación de estos fármacos permite cada vez nuevos y mejores diseños capaces de ampliar sus horizontes terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Real Decreto 1345/2007, de 11 de octubre por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente.
<https://www.boe.es/boe/dias/2007/11/07/pdfs/A45652-45698.pdf>
2. <http://www.ema.europa.eu/ema/>
3. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-8
4. Ehrlich P. Collected papers of Paul Ehrlich. Compiled and edited by F. Himmelweit. EA. London, Pergamon Press, 1956-60
5. Edelman GM, Poulik MD. Studies on structural units of the *g*-globulins. *J Exp Med.* 1961; 113: 861-84
6. Porter RR. The structure of antibodies. *Scientific American.* 1967; 180: 713-6.
7. García Merino A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología* 2011; 26(5): 301-6
8. Sanz L, Álvarez-Vallina L. Anticuerpos monoclonales. *Biotecnología y Biofármacos*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2009
9. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517): 495-7.

10. **Martínez de Lagrán Z, Pérez-Barrio S, Díaz-Pérez JL.** Adalimumab: la molécula y el proceso de obtención. *Actas Dermosifiliogr.* 2008; 99(Supl 3): 3-9
11. **Lonberg N.** Human antibodies from transgenic animals. *Nature biotechnology* 2005; 23(9): 117-25
12. **Foltz IN, Karow M, Wasserman SM.** Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies. What cardiologists need to know. *Circulation* 2013; 127: 2222-30
13. **Brekke OH, Sandlie I.** Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature* 2003; 2: 52-62.
14. **Marcus RD, Fiorini RN.** Different approaches for obtaining antibodies from human B cells. *Current Drug Discovery Technologies* 2014; 11: 41-7.
15. **Michnick W, Sidhu S.** Submitting antibodies to bindin arbitration. *Nature Chemical Biology* 2008; 4: 326-9
16. <http://www.amgenbiotech.es/index.jsp>
17. **Salfeld JG.** Isotype selection in antibody engineering. *Nature Biotechnology* 2007; 25(12): 1369-72.
18. <http://www.labome.es/method/Antibody-Structure-and-Fragments.html>