

ANTICUERPOS MONOCLONALES DE ORIGEN HUMANO

Manuel E. Jiménez Díaz¹

RESUMEN

Los anticuerpos monoclonales (AcM) humanos son, teóricamente, superiores a los de origen murino para terapia *in vivo* en humanos. A pesar de las múltiples posibilidades de aplicación médica para tales inmunoreactivos y aunque numerosos grupos trabajan en este campo, los avances han sido lentos en llegar debido, principalmente, a dificultades técnicas relacionadas con su preparación, las cuales incluyen la fuente de linfocitos B, técnicas de inmunización y de inmortalización. Una óptima utilización clínica de los AcM humanos requerirá un mejor entendimiento de los factores envueltos en la inmunización *in vitro* y en la habilidad de formular "cocteles" de estos reactivos. El presente artículo presenta una revisión sobre la tecnología de producción de AcM humanos y sus problemas. (*Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1996. 17-2:61-71.)

Key word: hybridomas; human monoclonal antibodies; *in vitro* immunization; immortalization.

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos en el suero de animales inmunizados son *policlonaes*, ya que reaccionan con varios o todos

los determinantes antigénicos (epitopos) del antígeno. Los anticuerpos *monoclonales* (AcM) son, por el contrario, altamente específicos y reaccionan únicamente con un epitopo del antígeno. Por lo tanto la principal diferencia entre anticuerpos policlonales y monoclonales es el grado de especificidad.

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales (ACM) ha revolucionado enormemente el campo de las biociencias y el uso de estos reactivos ha facilitado el desarrollo y creación de nuevas áreas en la investigación biomédica. El primer trabajo que detalla la producción de AcM de origen murino apareció en 1975 [1]; durante estos 20 años ha habido tanto progreso en el campo, que virtualmente todos los laboratorios modernos utilizan los AcM de ratón para diversos propósitos.

La utilidad de los AcM para diagnóstico, profilaxis y terapia ha sido intensamente estudiada durante los últimos años [2,3]. Los anticuerpos son, debido a su potencial selectividad y especificidad, bastante prometedores para la terapia de enfermedades infecciosas, tanto virales como bacterianas, y principalmente para la terapia del cáncer [2-10]. Los AcM pueden ser útiles, cuando se administran sistemáticamente como terapia, mediante una variedad de mecanismos: pueden ser indirectamente citotóxicos mediante la interacción de su región Fc con el complemento o células citotóxicas; también pueden tener efectos

1- Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

antiproliferativos directos compitiendo en el nivel de receptores para factores de crecimiento o bien alterando la regulación de la proliferación celular; pueden servir como transporte de agentes citotóxicos mediante la creación de inmunoconjugados en los cuales el anticuerpo está unido a radioisótopos, toxinas naturales, agentes quimioterapéuticos o células citotóxicas. Todos estos métodos pueden ser aplicables tanto a AcM murinos como a los de origen humano. La mayoría de los estudios clínicos se han hecho con AcM murinos y sus resultados han sido generalmente decepcionantes. La falta de eficacia en muchas de las aplicaciones se ha atribuido a la innata inmunogenicidad de la proteína de ratón, lo cual ha causado frecuentemente varias clases, de reacciones adversas en el huésped, tales como reacciones alérgicas, disfunciones hepáticas y formación de complejos inmunes en el riñón. Además, la respuesta inmune del paciente, con la producción de anticuerpos contra la proteína de ratón (HAMA: human-antimurine-antibody), ha limitado la utilidad y eficacia de los AcM de ratón para terapia y profilaxis [11-14].

Una posible solución para evitar el HAMA y otras reacciones adversas relacionadas con los AcM murinos es el desarrollo de AcM humanos, los cuales deben ser mucho menos antigénicos [14, 15]. Además, los AcM humanos podrían ser más efectivos debido a su habilidad de interactuar en forma más apropiada con el complemento y las células efectoras humanas. Otra ventaja, es que pueden reconocer un grupo de antígenos alogénicos que no son reconocidos por los Ac de ratón. Ejemplos de esto son el antígeno Rhesus (Rh) y los antígenos de histocompatibilidad humanos (HLA),

cuyas finas especificidades no son reconocidas por los Ac murinos o bien para los cuales los animales no disponen de las correspondientes células B [16-18]. También finas especificidades de determinados antígenos tumorales y antígenos autoinmunes son reconocidas y diferenciadas por el organismo humano mientras que el sistema inmune del ratón no las reconoce [13, 18-22].

En general se considera, que los AcM de ratón reconocen los antígenos más inmunodominantes, mientras que los AcM humanos son más sutiles en el reconocimiento de estos antígenos [13, 15, 23]. Por lo tanto, para poder producir AcM contra tales antígenos se depende del sistema humano.

Casi dos décadas han pasado desde la publicación del primer artículo que describe la producción de AcM humanos mediante la inmortalización de las células B con virus Epstein-Barr (EBV) [24]. Tres años después, en 1980, apareció la primera publicación que presenta la generación de verdaderos hibridomas humano-humano que producían anticuerpos de especificidad deseada [25]. Durante este periodo, varias técnicas y metodologías han sido desarrolladas para generar AcM humanos de interés clínico, de manera que hoy en día, existe una considerable variedad de AcM humanos dirigidos contra diversas estructuras antigénicas [13, 18, 19, 21, 23, 26-30]. Sin embargo, hasta ahora, ningún sistema ha demostrado ser el método más eficaz para la producción de AcM humanos con especificidad deseada, por lo que su generación aún no está bien establecida. Esto se debe principalmente a dificultades técnicas ligadas con la tecnología de los AcM humanos [13, 21, 26]. Aunque por estas razones la experiencia clínica con

estos Ac es bastante limitada, en estudios farmacocinéticos para radioinmunolocalización e inmunoterapia de ciertos tipos de cáncer se ha demostrado su superioridad sobre los AcM de ratón [2, 20]. Asimismo, son prometedores los resultados obtenidos con estas moléculas en estudios de inmunización pasiva para prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por agentes resistentes a terapia convencional [4, 6, 8, 10].

Immunización

En contraste con los procedimientos de inmunización tradicionales para generar AcM de ratón, la inmunización *in vivo* de humanos limita claramente, por razones éticas y morales, el número de inmunógenos que pueden ser administrados inocuamente (por ejemplo: tétano, difteria, hepatitis B, etc.). Para producir AcM contra otros antígenos es necesario recurrir a sistemas alternativos. Una de las principales metas de la tecnología de AcM humanos es la producción de anticuerpos contra antígenos tumorales. Desafortunadamente, la dificultad de la inmunización *in vivo*, mencionada anteriormente, limita la efectividad para generar tales anticuerpos. Recientemente, varios laboratorios han tenido éxito en producir AcM humanos contra tumores malignos, empleando linfocitos derivados de nódulos linfáticos regionales de pacientes con cáncer [18, 19, 22, 31]. Los linfocitos de estos pacientes se cree que han sido "auto inmunizados" contra antígenos tumorales. Hasta el momento, esta es la forma más simple de generar AcM humanos contra antígenos tumorales poco definidos.

Un sistema alternativo para

obtener AcM de especificidad deseada, es la inmunización "*in vitro*" (IIV). La IIV es una activación primaria, en cultivo, de células B específicas para un antígeno y se ha reportado que mediante este sistema se pueden generar AcM contra inmunógenos débiles, así como antígenos asociados a tumores, tanto en el sistema murino como en el humano [21, 32-37]. El fin de la IIV es, como en el caso de la inmunización *in vivo*, hacer proliferar antígenoicamente los linfocitos B específicos y de esta manera enriquecer dicha población celular para la etapa de immortalización. La IIV tiene varias ventajas sobre los protocolos de inmunización convencionales: generalmente requiere menos de una semana, se necesita menos antígeno y pueden emplearse antígenos peligrosos como toxinas. La IIV de linfocitos humanos se desarrolló primero como un método para delinear las condiciones de cultivo óptimas, así como para entender el proceso de maduración de las células B y es vista ahora como un sistema efectivo para generar células B activadas con el fin de producir AcM humanos [21, 36, 37].

Uno de los principales obstáculos por vencer en el desarrollo de protocolos para la IIV es la comprensión de las condiciones de cultivo óptimas, requeridas para activar los linfocitos sensibilizados por el antígeno, o sea debe definirse cuáles células es necesario reconstituir para el cultivo *in vitro* y cuáles células deben ser removidas, tales como las células T supresoras (Ts); así como qué factores de crecimiento es necesario agregar. Para depletar las células Ts se han empleado varias técnicas, entre ellas la radiación [13], el tratamiento de los linfocitos con AcM OKT8 y complemento [13, 18] o con éster metílico de leucina

(Leu-OMe) [36-38]. Por otra parte, los estimuladores policlonales tales como citoquinas o mitógenos son esenciales para los sistemas de cultivo de IIV. En un principio el Pokeweed Mitogen (fitolaca americana, PWM) fue el más comúnmente empleado y más recientemente se han empleado con éxito algunas otras citoquinas, tales como sobrenadantes de células T estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) [39], interleucina 2 (IL-2) [35, 40, 41] y sobrenadante de células T estimuladas con PWM [36-38, 40]. Se ha demostrado que muchas citoquinas están envueltas en las vías de proliferación y diferenciación de las células B, por lo tanto, uno de los puntos que todavía es necesario aclarar es de qué manera se utilizan estas citoquinas purificadas y en qué combinaciones se agregan a los sistemas de cultivo *in vitro* [26, 41].

Otro de los problemas que deben ser resueltos se refiere al clonotipo de los anticuerpos obtenidos mediante una inmunización primaria *in vitro*, el cual tiende a ser de la clase IgM [13,21,26]. Clínicamente, los anticuerpos monoclonales IgG son muy importantes y por lo tanto uno de los principales puntos por resolver es cómo se obtienen anticuerpos de dicha clase. En este sentido el empleo de diferentes interleucinas en el cultivo podría ser de mucha ayuda [26, 41]. Si se logran vencer los obstáculos señalados se espera que la técnica de la IIV sea un sistema muy importante en el futuro de la tecnología de los AcM humanos [21, 26, 41].

Fuente de linfocitos para la producción de AcM humanos.

Para la generación de AcM humanos se han empleado diferentes fuentes de células B entre las que se

incluyen sangre periférica, bazo, nódulos linfáticos, tonsilas, médula ósea, cordón umbilical, efusiones pleurales y linfocitos que infiltran los tumores (LIT). Entre ellas, es obvio que, por razones prácticas y éticas, la sangre periférica es la fuente más conveniente de células B. Sin embargo, se considera que la sangre periférica es una fuente ineficiente de células linfoides por varias razones: la mayoría de los linfocitos en ella no son células B, las células B se encuentran en una relación desfavorable con respecto a las células supresoras; además, la mayoría de las células B de sangre periférica son pequeñas, no estimuladas que son difíciles de fusionar. La experiencia del autor, así como la de otros investigadores, señala que los linfocitos de sangre periférica son la fuente más pobre de células B estudiada hasta la fecha [13, 21, 26]. Las células B que se encuentran en los órganos inmunes, tales como nódulos linfáticos y bazo, han probado ser una excelente fuente de linfocitos activados por antígenos, cuando se utilizan linfocitos de pacientes infectados o donadores inmunizados activamente [13, 42, 43]. Teóricamente, los LIT serían la fuente ideal para producción de AcM contra tumores, ya que estarían activados por el antígeno y por lo tanto, mucho más factibles de fusionar. En la práctica, sin embargo, estas células están usualmente en cantidades tan bajas que no se obtienen fusiones de alto rendimiento; además, una alta proporción de los LIT no son células B. Debe señalarse en este punto que los procedimientos de IIV podrían llegar a solucionar el problema de la fuente de linfocitos B [38].

Inmortalización

Después de obtener los linfocitos B estimulados, la siguiente valla por

salvar es la etapa de la inmortalización de dichas células, la cual puede llevarse a cabo en varias formas. Una de ellas es la transformación con el virus Epstein-Barr (EBV) o sea el establecimiento de líneas linfoblastoides. Esto ha probado ser exitoso para algunos investigadores [24, 45]. Las principales limitaciones o desventajas de este método radican en que la mayoría de células inmortalizadas con EBV son malas secretoras de inmunoglobulina y presentan alta inestabilidad en cuanto a la producción del AcM, por lo que deben ser donadas frecuentemente para asegurar su estabilidad.

Un método alternativo es la utilización de la tecnología clásica de los hibridomas [1], ya sea como hibridomas intraespecie (humano-humano) o como hibridomas interespecie (humano-ratón) [26, 27]. Para tal efecto se utilizan diferentes clases de líneas celulares, tanto de ratón como de origen humano. Se ha demostrado que la elección de la línea celular para fusión es un punto determinante en la producción de AcM humanos y puede influir, en gran medida, tanto en el número de hibridomas obtenidos, como en la cantidad de Ac producido por los mismos. Mientras que en el sistema murino han existido, desde sus inicios, muy buenas líneas celulares para la fusión, han faltado por mucho tiempo estas eficientes líneas celulares para la producción de AcM humanos, lo cual ha dificultado en gran medida el desarrollo de esta tecnología [3, 12, 21, 26, 46-48]. Entre las líneas celulares humanas se encuentran líneas linfoblastoides de células B, mielomas y más recientemente se han desarrollado los heterohibridomas, mientras que las líneas murinas son todas mielomas [26, 45-48].

En general los hibridomas

humano-ratón sufren de inestabilidad genética, lo cual lleva a la pérdida principalmente de los cromosomas humanos y frecuentemente a la suspensión de la producción del Ac [26, 45-48]. Por otro lado, los hibridomas humano-humano, aunque genéticamente estables, son por lo general malos secretores de inmunoglobulina, típicamente en el intervalo de 0,2 - 2 µg/ml. Además la mayoría de las líneas celulares humanas presentan ciertos inconvenientes: secretan cantidades variables de su propia inmunoglobulina y tienen muy bajas frecuencias de fusión, lo cual las hace poco adecuadas. El desarrollo de los heterohibridomas promete mejores resultados en este aspecto [26, 46-48].

Otra opción para inmortalizar linfocitos humanos es la combinación de la transformación de los linfocitos B con el EBV y una posterior fusión de las líneas linfoblastoides producidas con una adecuada línea celular (la denominada técnica EBV-hibridoma), este sistema es el preferido por muchos de los que trabajan en este campo [22, 49-51].

Junto a la elección de la línea celular para fusión, también es de suma importancia el método para fusionar los linfocitos B. En este punto el desarrollo de la electrofusión representa una importante alternativa a la técnica de fusión mediante polietilenglicol (PEG). La electrofusión es el método de elección cuando se requiere fusionar cantidades pequeñas de células, menos de 10⁶, lo cual no es efectivo con el PEG y puede ser de gran valor en la inmortalización de LIT [26, 52-54].

Discusión y expectativas futuras

En esta revisión se presentan los esfuerzos actuales para producir AcM humanos empleando diferentes

sistemas. Las expectativas generadas por la tecnología de los AcM humanos tienen que esperar ya que los avances en este campo han sido lentos durante los últimos años. Durante la última década, se ha hecho mucho esfuerzo para generar poblaciones de células B humanas, las cuales presenten una reactividad específica deseada. Aunque hasta el momento no se han desarrollado métodos totalmente efectivos y reproducibles, se espera que la IIV llegue a ser un sistema adecuado para este propósito. La disponibilidad de tales poblaciones de células B, combinada con esquemas de inmortalización efectivos, nos permitiría generar hibridomas genéticamente estables, los cuales secreten AcM humanos que reconozcan los antígenos deseados. El desarrollo de este campo nos dará enormes posibilidades y por lo tanto, ha atraído la atención de muchos investigadores con interés en los AcM humanos. Sin embargo, si es realmente posible estimular linfocitos *in vitro* contra antígenos de elección, es un asunto desconocido en su mayor parte. Otra pregunta que permanece sin resolver es si un periodo de incubación de 7-8 días es adecuado para la inmunización, ya que éste es usualmente el límite para cultivos de linfocitos normales. Es también posible, que los AcM que han sido obtenidos de "células B inmunizadas *in vitro*" pueden ser el resultado de hibridación de células B, las cuales habían sido inmunizadas previamente *in vivo* por los antígenos utilizados o antígenos que tienen similitud estructural con los mismos. Aún siendo así, la tecnología de la IIV jugará un papel importante en el futuro de la producción de hibridomas humanos, ya que puede ser aplicada para la proliferación de células B reactivas con antígenos tumorales de

pacientes con cáncer. En este sentido, no sería importante la diferencia entre una "inmunización *in vitro*" y una "reestimulación".

Ya que las propiedades biológicas y químicas de los AcM humanos y murinos son muy similares, el conocimiento obtenido en los pasados años sobre el uso clínico de los AcM murinos en oncología [56] ha cimentado las bases para el uso general de estos reactivos inmunobiológicos en salud humana [57]. El consenso general después de varios años de esfuerzo intenso es que los AcM individuales empleados como tales no son tan efectivos y por eso serían más útiles mezclas o "cocteles" de varios AcM, cada uno con propiedades únicas; la mayoría de estos AcM estarían probablemente unidos a algún tipo de agente biológico o químico formando inmunocombinados. Este concepto será de suma importancia en el tratamiento de tumores, ya que debido a la heterogeneidad del cáncer aunque se encuentre un antígeno específico de tumor, es razonable asumir que no todas las células del tumor presenten este antígeno, por lo tanto, para asegurar que todas las células malignas sean reconocidas y consecuentemente destruidas, deberán formularse "cocteles" adecuados de AcM humanos [56, 57]. Antes de que se pueda hacer realidad el uso práctico de "cocteles" de AcM humanos, es necesario vencer las dificultades ligadas a la tecnología para la generación de hibridomas/AcM humanos, lo cual esperamos ocurra en pocos años. Cómo va a ser utilizada esta tecnología en el futuro, será de importancia para todos aquellos interesados en la producción y aplicación de AcM humanos.

ABSTRACT

Human monoclonal antibodies (MAbs) are theoretically superior to murine monoclonal antibodies for therapeutic use in vivo. Despite their potential for clinical use and even though many laboratories work in their production; progress in this field have been slow, especially due to technical difficulties, including the source of B lymphocytes, immunization and immortalization techniques. Optimum clinical utilization will require a better understanding of the factors involved in the vitro immunization and the ability to formulate cocktails of MAbs. In the present article, the human monoclonal hybridoma technology and its hurdles are reviewed.

REFERENCIAS

1. Kóhler, G.; Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature (London)*. 1975; 256: 495-497.
2. Bossler, K.: Monoklonale Antikörper. Ihre Verwendung für die Diagnose und Therapie. In: *mta*. 1992; 7: 754-758.
3. Glassy, M.C.; Dillman, R.O. Molecular biotherapy with human monoclonal antibodies. In: *Mol. Biother.* 1988; 1: 7-13.
4. Daifuku, R.; Panacek, E.A.; et al. Pilot study of anti-lipopolysaccharide human monoclonal antibody MAB-T88 in patients with gram-negative sepsis. *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1993; 4: 36-39.
5. Whitley, R.S. Neonatal herpes simplex virus infections: is there a role for immunoglobulin in disease prevention and therapy *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1994; 13: 432-439.
6. Bruderer, U.; Deusinger, M.; Schurch., U.; Lang, A.B. Affinities of endotoxin-specific human monoclonal antibodies, their polyclonal counterparts and murine monoclonal antibodies. *Res. Immunol.* 1993; 144: 659-665.
7. Torensma, R.; Fluit, A.C.; Verhoef., J. Reactivity of monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitalized adults and patients with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 19: 11-14.
8. Ito, M.; Mizutans, K.; et al.: Inhibition of varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein expression by a human monoclonal antibody against VZV glycoprotein III. *J. Infect. Dis.* 1993; 168: 1256-1259.
9. Reilly, R.M.; Sandhu, J.; et al. Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. *Clin. Pharmacokinetic*, 1995; 28: 126-142.
10. Erler, T.; Hamsch, J. Erste Erfahrungen mit monoklonalen Antikörpern bei der Therapie lebensbedrohlicher Nosokomialinfektionen im Neugeborenenalter. *Monatsschr. Kinderheilkd*, 1993; 141: 951 -953.

11. Blottiere, H.M.; Steplewski, Z.; Herlyn, D.; Douillard, J.-I. Human anti-murine immunoglobulin responses and immune functions in cancer patients receiving murine monoclonal antibody therapy. *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1991; 2: 16-25.
12. Shaw, J.: *Human Hybridomas and monoclonal antibodies*. In: Engleman, E.G.; Fong, S.K.H. et al., (Hrsg.): *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, New York London, S. 1985; 5-20.
13. James, K.; Bell, G.T.: Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. *J. Immunol. Methods*. 1987; 100: 5-40.
14. Shawler, D.L.; Bartholomew, R.M.; Smith, L.M. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG.: *J. Immunol*. 1985; 135: 1530-1535.
15. Larrick, J.W.; Bourla, J.M. Prospects for the therapeutic use of human monoclonal antibodies: *J. Biol. Resp. Mod.* 1986; 5: 379-393.
16. Ernst, M.; Sonneborn, H.H. Human monoclonals against erythrocyte antigens. In: *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1990; 1: 122-125.
17. McCann, M.C.; James, K.; Kumpel, B.M.: Production and use of human monoclonal anti D antibodies. In: *J. Immunol. Methods*. 1988; 115: 3-15.
18. Liu, H.; Xu, Z.-L.; Wang, Y.; Yang, L.; Feng, O.; Wang, Y. Li. Y.-M.; Zhang, G.-G.: Production of anti-tumor human monoclonal antibodies using different approaches. In: *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1993; 4: 2-8.
19. Li, Y.; Ashby, J.M.; Eremin, O.: In vitro primary immunization of B lymphocytes for producing human monoclonal antibodies against tumor-associated antigens. In: *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1993; 4: 26-30.
20. Saleh, M.N.; Khazaeli, M.B.; Wheeler, R.H.; Allen, L.; Tilden, A.B.; W.Grizzle; Reisfeid, R.A.; Yu, A.L.; Gillies, S.D.; LoBuglio, A. F: Phase I trial of the chimeric anti- GD2 monoclonal antibody ch14.18 in patients with malignant melanoma. *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1992; 3: 19-24.
21. Borrebaeck, C.A.K.: Strategy for the production of human monoclonal antibodies using in vitro activated B cells. In: *J. Immunol. Methods*. 1989; 123: 157-165.
22. Houghton, A.N.; Cote, R.J. *Human monoclonal antibodies. Humoral immune response in patients with cancer*. In: Stewart, S.; Reisfeid, R., (ed.): *Monoclonal Antibodies in Cancer*. Humana Press, New Jersey. 1985; 399-422.
23. Glassy, M.C.; Handley, H.H.; Royston, I.: *Design and Production of human monoclonal antibodies to human cancers* In: Engleman. E.G.; Fong. S.H.K

- et al., (Hrsg.): *Human Hybridomas and monoclonal antibodies*. Plenum Press, New York-London. 1985; 211-225.
24. Steinitz, M.; Klein, G.; Koskimies, S.; Mákelá, O.: EB virus- induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. In: *Nature*. 1977; 269: 420-422.
 25. Olsson, L.; Kaplan, H.S.: Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980; 77: 5429-5431.
 26. Jiménez-Díaz, M.: *Lipopeptid Antigen Konjugate als neuartige Immunisierungsentien zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper nach in vitro Immunisierung*. Tesis Doctoral, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Alemania. 1994.
 27. Hoffmann, E; Jiménez-Díaz, M.; Loleit, M.; Tröger, W.; Wiesmüller, K.-H.; Metzger, J.; Jung, G.; Kaiser, I.; Stöcklin, S.; Lenzner, S.; Peters, J.H.; Schäfer, E.; Bessler, W.G.: Preparation of human and murine monoclonal antibodies: antigen combined with or conjugated to lipopeptides constitute potent immunogens for in vitro and in vivo immunizations. *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1990; 1:137-144.
 28. Morrison, S.L.; Johnson, M.J.; Herzenberg, L.A.; Oi, V.T.: Chimeric human antibody molecules: mouse antigen binding domains with human constant region domains: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984; 81: 6851-6855.
 29. Morrison, S.L.: Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science*. 1985; 229: 1202-1207.
 30. Brown., B.A. et al: Tumor specific genetically engineered murine/human chimeric monoclonal antibody: *Cancer Res*. 1987; 47: 3577-3583.
 31. Glassy., M.C.: Immortalization of human lymphocytes from a tumor-involved lymph node. In: *Cancer Res*. 1987; 47: 5181-5188.
 32. De Boer, M.; Ossendorp, F.A.; Van Duijn, G.; Ten Voorde, G.H.T.; Tager, J.M.: Optimal conditions for the generation of monoclonal antibodies using primary immunisation of mouse splenocytes in vitro under serum-free conditions. *J. Immunol. Methods*. 1989; 121: 253-260.
 33. Böldicke, T.; Kindt, S.: Maywald, F; Frank, R.; Collins, J. In vitro Immunisierung mit synthetischen Peptiden zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen native Proteine. *Forum Mikrobiol*. 1988; 12: 561-562.
 34. Reading, C.L.: Theory and Methods for immunization in culture and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods*. 1982; 53: 261 -291.

35. Borrebaeck, C.A.K.; Möller, S.A. In vitro immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens. In: *J. Immunol.* 1986; 136.: 3710-3715.
36. Borrebaeck, C.A.K.; Danielsson, L.; Möller, S.A.: Human monoclonal antibodies produced by primary in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85: 3995-3999.
37. Ohlin, M.; Broliden, P.A.; Danielsson, L.; Wahren, B.; Rosen, J.; Jondal, M.; Borrebaeck, C.A.K.: Human monoclonal antibodies against a recombinant HIV envelope antigen produced by primary in vitro immunization. Characterization and epitope mapping. *Immunology.* 1989; 68: 325-333.
38. Borrebaeck, C.A.K.: *Human monoclonal antibodies produced from primary in vitro immunized leucine-methyl-ester-treated peripheral blood lymphocytes: In vitro immunization in Hybridoma Technology.* Elsevier, Amsterdam. 1988.
39. McLachlan, S.M.; Fukuma, N.; Sarsero, D.; et al. Potential role of PHA in producing human monoclonal thyroid autoantibodies of different subclasses: *Hum. Antibod. Hybridomas.* 1990; 1: 166-170.
40. Martin, R.F.; Kisor, R.; Schroer, D.; Eichler, G.; Filaccio, M.L.: Pokeweed mitogen-stimulated human lymphocytes fused to LICR-2 (HMY2) generate human-human hybridomas producing monoclonal IgG antibodies reactive to human breast carcinoma and malignant melanoma. In: *Hum. Antibod. Hybridomas.* 1990; 1: 154-159 (1990).
41. Danielson, L.; Möller, S.A.; Borrebaeck, C.K.: Effect of cytokines on specific in vitro immunization of human peripheral B-lymphocytes against T-cell dependent antigens. In: *Immunology.* 1987; 61: 51-55.
42. Carrol, K.; Prosser, E.; O'Kennedy, R. Parameters involved in the in vitro immunization of tonsillar lymphocytes: effects of rIL-2 and muramildipeptide. *Hybridoma.* 1990; 9: 81-89.
43. Wunderlich, D.; Teramoto, Y.A. et al. The use of lymphocytes from axillary lymph nodes of mastectomy patients to generate human monoclonal antibodies. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1981; 17: 719-730.
44. Lowe, D.H.; Handley, H.H.; Schmidt, J.; Royston, I.; Glassy, M.C. A human monoclonal antibody reactive with human prostate. *J. Urol.* 1984; 132: 780-785.
45. Crawford, D.F.: *Production of human monoclonal antibodies using Epstein-Barr- Virus.* In:

- Engleman, E.G.; Foug, S.K.H. et al., (ed): *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, New York-London. 1985; 37-53.
46. Bulter, J.L.; Lane, H.C.; Fauci, AS.: Delineation of optimal conditions for producing mousehuman heterohybridomas from human peripheral blood B cells of immunized subjects. In: *J. Immunol.* 1983; 130: 165-168.
47. Watts, R.A.; Winska-Wiloch, H.; Muller, S.; Isenberg, D.A.: Analysis of factors affecting human hybridoma production. In: *Hum. Antib. Hybridomas*. 1990; 1: 160-165.
48. Westerwoudt, R.J. Factors Affecting Production of Monoclonal Antibodies. In: *Methods in Enzymology* 1986; 121:3-19.
49. Roder, J.C.; Cole, S.P.C.; Atlaw, T.; Campling, B.G.; McGarry, R.C.; Kozbor., D. *The Epstein-Barr-Virus-Hybridoma Technique*. In: Engleman, E.G. et al., (Hrsg.): *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, New York-London. 1985; 55-70.
50. Steven, K.; Foug, H.; Engleman, E.G.; Grumet, F.C. Generation of human monoclonal antibodies by fusion of EBV-activated B cells to a human-mouse hybridoma. *Methods in Enzymology* 1986; 121: 168-174.
51. Poder, J.C.; Cole, S.P.C.; Kozbor, D. The EBV - Hybridoma technique. *Methods in Enzymology* 1986; 121: 140-167.
52. Perkins, S.; Zimmermann, U.; Foug, S.K.H.: Parameters to enhance human hybridoma formation with hypoosmolar electrofusion. *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1991; 2: 155-159.
53. Foug, S.; Perkins, S.; Kafadar, K.; Gessner, P.; Zimmermann, U.: Development of micro-fusion techniques to generate human hybridomas. In: *J. Immunol. Methods*. 1990; 134: 35-42.
54. Zimmermann, U.; Klóck, G.; Gessner, P.; Sammons, D.W.; Neil., G.A.: Microscale production of hybridomas by hypo-osmolar electrofusion. In: *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1992; 3: 14-18.
55. Simonsson, A.C.; Larrick, J.W.; Borrebaeck., C.A.K.: In vitro Immunization of human B lymphocytes. Mapping of lymphokine specific mRNA and the effect of recombinant factors. *Hum. Antibod. Hybridomas*. 1991;2: 148-154.
56. Dillman, R.O. *Antibody therapy*. In: Oldham R.K. (ed.) . *Principles of Cancer Biotherapy*. New York, Raven Press. 1987; 1-20.
57. Oldham R.K. *Biotherapy: general principles*. In: Oldham R. K. (ed.) *Principles of Cancer Biotherapy*. New York, Payen Press. 1987; 1-20.