

La digestión con pepsina de una IgG2b monoclonal de ratón, anti-DR monomórfico, no proporciona cantidades detectables de fragmentos F(ab')₂

J. Martínez-Quesada, T. Gallart,
L. Borche, R. Vilella, J. Solé y J. Vives

Servicio de Inmunología. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

Pepsin digestion of a mouse monoclonal IgG2b recognizing monomorphic determinants on DR antigens does not provide detectable amounts of F(ab')₂ fragments

EDU-1 is a mouse monoclonal antibody (MoAb) of IgG2b-K isotype, (complement fixing and protein A binding) which recognizes monomorphic determinants on DR antigens since it only reacted with cells bearing DR antigens and immunoabsorbed two radiolabeled polypeptide chains of 28,000 and 35,000 M.W. from Raji cells. In order to obtain preparations of F(ab')₂ fragments, pepsin digestion of EDU-1 was done. The pepsin digests were separated by gel filtration on Sephacryl S-200 and the antibody activity present in them was tested against B lymphocytes from patients with B-Chronic lymphocytic leukemia by indirect immunofluorescence, NIH complement mediated microcytotoxicity assay and rosettes formation with human erythrocytes coated with protein A. They were also analyzed for the presence of γ 2b and kappa chains and for their M.W. by SDS-PAGE 12% in nonreducing conditions. Irrespective of time digestion, the main product obtained was a Fc-related fragment since it reacted with anti-IgG2b but was lacking in kappa chains determinants. It did not show antibody activity and its M.W. was 50,000. Another minor product was also present and was constituted by a heterogeneous group of Fab-related fragments of 45,000, 50,000 and 55,000 M.W. This minor digest contained both γ 2b and kappa chains determinants and exhibited a reduced but detectable antibody activity by indirect immunofluorescence and by rosettes formation with human erythrocytes coated with protein A, but it did not show reactivity by NIH cytotoxicity assay. In comparison with human IgG, mouse monoclonal IgG2b showed a particular high sensitivity to the action of pepsin and detectable amounts of F(ab')₂ could not be obtained. The present widespread use of mouse MoAb recognizing leukocyte surface antigens points to the necessary utilization of F(ab')₂ fragments in order to avoid unpecific interactions via Fc receptors and consequently the knowledge of the effects of pepsin on the various subclasses of mouse IgG.

EDU-1 es un anticuerpo monoclonal (Acm) de ratón de subclase IgG2b, fijador de complemento y capaz de unirse a la proteína A, que reconoce determinantes monomórficos de los antígenos DR puesto que sólo reaccionó con células portadoras de los mismos y además fue capaz de immunoabsorber dos cadenas polipeptídicas radiomarcadas de P.M. 28.000 y 35.000 a partir de proteínas solubilizadas de células Raji. Con el fin de obtener preparaciones de fragmentos F(ab')₂, EDU-1 fue digerido con pepsina. Los productos de la digestión fueron aislados por gel filtración sobre Sephacryl S-200 y la actividad anticuerpo de los mismos fue medida frente a linfocitos de leucemia linfática de células B por tres métodos: inmunofluorescencia indirecta, linfocitotoxicidad mediada por complemento según técnica de NIH y formación de rosetas con hematies humanos cubiertos con proteína A. Se investigó también la presencia de cadenas γ 2b y kappa, así como el P.M. por electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) en SDS (EGPA-SDS) en condiciones no reductoras. Aun probando distintos tiempos, el principal producto de la digestión fue siempre un fragmento de tipo Fc puesto que sólo reaccionaba con anti- γ 2b pero no con anti-kappa, su P.M. era 50.000 y carecía de actividad anticuerpo por los tres métodos ensayados. Se obtenía también otro producto menor constituido por un grupo heterogéneo de fragmentos de tipo Fab puesto que por EGPA-SDS ofrecía tres bandas de P.M. 45.000, 50.000, y 55.000 y reaccionaba tanto con anti- γ 2b como con anti-kappa. Presentaba actividad anticuerpo por inmunofluorescencia y por formación de rosetas con hematies humanos cubiertos con proteína A, aunque en proporciones inferiores a EDU-1 no digerido; sin embargo, no mostraba reactividad por linfocitotoxicidad mediada por complemento. En comparación con la IgG humana policlonal, la IgG2b de ratón (EDU-1) mostraba una gran y particular sensibilidad a la pepsina, resultando imposible conseguir cantidades apreciables de fragmentos F(ab')₂. El actual uso generalizado de Acm de ratón contra antígenos leucocitarios plantea la conveniencia de utilizar fragmentos F(ab')₂ para impedir interacciones inespecíficas con los receptores Fc, y por tanto la necesidad de conocer los efectos de la pepsina sobre las distintas subclases de la IgG de ratón.

INTRODUCCION

Es bien conocido que la digestión con pepsina de la IgG de diversas especies como la humana, la de conejo y la de cabra, proporciona, como producto principal, fragmentos F(ab)₂ los cuales tienen la virtud única de conservar la divalencia como anticuerpos y a la vez estar desprovistos del fragmento Fc, y por tanto incapaces de desarrollar las propiedades biológicas radicadas en esta región tales como la activación del complemento por la vía clásica, la unión a la proteína A estafilocócica (pA), o la unión a los receptores de Fc de diversas células.

En el curso de un estudio encaminado a determinar la interacción de las inmunoglobulinas de superficie (Ig-S) de los linfocitos B humanos con la pA, intentamos utilizar fragmentos F(ab)₂ de un anticuerpo monoclonal (Acm) de ratón denominado EDU-1, cuya derivación ha sido ya descrita^{1,2}, capaz de reconocer determinantes monomórficos de los antígenos DR, como un control negativo de experimentos de bloqueo y de modulación de las Ig-S con fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos de cabra anti-Ig humanas, experimentos con los que podíamos inhibir la interacción de los linfocitos B con la pA, tal como otro grupo de autores también ha descrito³. Pudimos comprobar que EDU-1, un Acm de subclase IgG2b, fijador del complemento y capaz de unirse a la pA, presentaba una especial sensibilidad a la acción de la pepsina, obteniéndose como producto principal de la proteólisis un fragmento de tipo Fc, sin que pudiéramos recuperar cantidades detectables de fragmentos F(ab)₂ a pesar de ensayar diversas variantes experimentales de la digestión.

Creemos justificada la comunicación de estos resultados por cuanto una revisión bibliográfica por teleproceso nos demostró que sólo existían otros tres trabajos previos parcialmente relacionados con la digestión con pepsina de las Ig de ratón^{4,5,6}. Sólo dos de ellos constataban la mayor sensibilidad de la IgG2b^{4,6} y además no incluían la separación y análisis de todos los fragmentos obtenidos con la digestión, y la actividad anticuerpo tampoco fue monitorizada. Por otro lado, es evidente que el actual uso generalizado de Acm de ratón dirigidos contra antígenos de membrana de leucocitos pone de manifiesto la conveniencia de emplear fragmentos F(ab)₂ para evitar uniones inespecíficas con los receptores Fc que muchas de estas células presentan. Es preciso, por tanto, conocer con detalle la secuencia de la proteólisis con pepsina de las distintas clases y subclases de las Ig de ratón con el fin de disponer de procedimientos optimizados para la obtención de buenas preparaciones de fragmentos F(ab)₂.

MATERIAL Y METODOS

Anticuerpo monoclonal EDU-1

El procedimiento utilizado para su obtención ha sido ya descrito^{1,2} así como su reactividad con linfocitos B y mo-

nocitos de sujetos normales de sangre periférica y de órganos linfáticos secundarios², con un título, por inmunofluorescencia indirecta, hasta 1/100.000 a partir de la forma ascítica².

En esta ocasión, fue además investigada su reactividad por inmunofluorescencia indirecta (I.I.) utilizando como segundo anticuerpo un antisuero de cabra fluoresceinado anti-IgG de ratón, Meloy, según procedimiento ya descrito² con las siguientes líneas celulares: RAJI, RAJI-MUTANTES carentes de antígenos DR, gentilmente cedidas por R. Acola (Institut Ludwig de recherches sur le cancer Epalinges, Suiza), DAUDI y MOLT-4. Asimismo, se ensayó sobre cinco LLC de células B (B-LLC), sobre timocitos y plaquetas.

Análisis por electroforesis sobre gel de poliacrilamida en SDS (EGPA-SDS) de las proteínas de células Raji inmunoadsorbidas por EDU-1 y radiomarcadas

Fue practicado según lo descrito por Acola et al⁷. El Acm EDU-1, purificado a partir de ascitis por cromatografía de afinidad sobre columna de Sepharose 4B-CL-Protein A (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) según procedimiento descrito por Ey et al⁸, fue unido a CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) según indicaciones del fabricante. Las proteínas de células Raji solubilizadas con NP-40 al 0,5 % en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) (exactamente 1 ml correspondiente a 50 x 10⁶ células) fueron mezcladas con 0,1 ml de Sepharose-EDU-1 en rotación continuada durante 3 horas a 4° C; después de lavar tres veces con NaCl 0,5 M/Tris 0,125 M/NP-40 0,5 %/EDTA 10 mM, pH 8,2, y otras tres veces con PBS, fueron eluidas con 0,1 ml de SDS al 10 % calentando la mezcla durante 1 minuto a 100° C, y luego marcadas con ¹²⁵I según el método de la cloramina T⁹. La EGPA-SDS se realizó según Laemmli¹⁰ en condiciones no reductoras con gel de poliacrilamida al 12 % y de un grosor de 0,75 mm sobre placas verticales. En el mismo gel que las muestras se aplicaron en paralelo sustancias de peso molecular (PM) conocido (Sigma), con un rango oscilando desde 69 a 14 KD. Después de la electroforesis los geles se tñieron con Coomassie R y una vez decolorados y secados se autorradiografiaron sobre películas X-Ray Fuji.

Purificación de EDU-1

EDU-1 fue purificado a partir de la forma ascítica por electroforesis preparativa sobre bloques de acetato de celulosa (Chemotron) y subsiguiente repurificación por cromatografía de afinidad sobre Sepharose 4B-CL-Protein A practicando la elución con solución tampón de glicina 0,1 M/HCl a pH 3. Después fue dializado frente a PBS, concentrado y analizado por inmunoelectroforesis sobre gel de agarosa según procedimientos estándar con antisueros Nordic contra las clases y subclases de cadenas pesadas y de las cadenas ligeras de ratón. Fue recomprobada su actividad anticuerpo por I.I. sobre linfocitos B de leucemia linfática crónica de células B B-LLC.

Digestión con pepsina de EDU-1 purificado y de IgG humana purificada policlonal

EDU-1 purificado se dializó frente a acetato sódico 0,1 M a 4° C durante una noche y luego se ajustó el pH a 4,4 con ácido acético 2 M y se añadió pepsina (2 x cristallized, Sigma) en una relación 1/30 de peso enzima/EDU-1 (concretamente 1 mg pepsina con 30 mg EDU-1). La mezcla se dejó incubar a 37° C durante diferentes períodos de

TABLA I Reactividad por inmunofluorescencia indirecta de los Acm EDU-1 y D1-12 frente a diversas líneas celulares y linfocitos de B-LLC, plaquetas y timocitos

	D1-12 (%)	EDU-1 (%)
B-LLC (n = 5)	84 ± 11**	85 ± 9**
Timocitos	1	1
Plaquetas	1	1
Raji	100	≥ 90
Raji-mutante*	0	0
Daudi	100	94
Molt-4	0	0

* Carente de antígenos DR.

** Media ± 1 desviación estándar.

tiempo, y la reacción fue detenida con NaOH 5M subiendo el pH hasta 8,0. La digestión de IgG humana policlonal (Kabi) se realizó siempre en paralelo y en las mismas condiciones que para EDU-1.

Separación y análisis de los productos de la proteólisis con pepsina

Fueron separados sobre una columna (1,5 m x 1 m) de Sephacryl S-200 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrada con Tris/HCl 0,1 M pH 8,0. La elución fue monitorizada por la medida de la densidad óptica (D.O.) a 280 nm. Las fracciones proteicas eluidas fueron dializadas frente a PBS, concentradas y analizadas por inmunoelectroforesis con los antisueros Nordic, antes indicados, y estudiadas por EGPA-SDS en condiciones no reductoras según procedimiento antes indicado¹⁰. La actividad anticuerpo frente a linfocitos B de B-LLC fue determinada por tres métodos distintos: a) inmunofluorescencia indirecta² (I.I.); b) microcitotoxicidad mediada por complemento según NIH (MC); c) por formación de rosetas entre los linfocitos recubiertos del anticuerpo o las distintas fracciones y hematíes humanos sensibilizados por pA (rHHPa). Este último procedimiento se detalla a continuación.

Sensibilización de hematíes humanos con pA (HHPa) mediante CrCl₂

Un volumen de hematíes humanos (HH) de grupo 0 lavados cuatro veces con solución salina 0,15 M (SS) fueron mezclados con un volumen de pA (Pharmacia Fine Chemicals) disuelta en SS a la concentración de 2 mg/ml. Luego se añadió otro volumen de CrCl₂ diluido al 1/10 en SS de una solución madre al 1% preparada seis semanas antes como mínimo. La mezcla se agitó con suavidad durante 5 minutos a temperatura ambiente; luego se lavó cuatro veces con SS y los HHPa se resuspendieron al 1% en SS conteniendo albúmina bovina (AB) al 1%. Los HHPa se utilizaron a partir de las 24 horas después de su preparación y durante no más de 10 días, siendo mantenidos a 4° C y resguardados del contacto con el aire y con la luz. Respetando estas condiciones nunca se observó la formación de autoaglutinados. (Nunca debe usarse PBS durante este proceso, ya que la presencia de fosfatos impide la acción del CrCl₂.)

Formación de rosetas entre linfocitos B de leucemia linfática crónica (B-LLC) recubiertos de EDU-1 y HHPa

Los linfocitos se incubaron con la dilución óptima de EDU-1 en su forma ascítica o con EDU-1 purificado o con

las diversas fracciones obtenidas con la digestión, durante 30 minutos tal como ya se ha descrito²; después de lavar cuatro veces con PBS se ajustaron a una concentración celular de 10 x 10⁶ en PBS y 0,05 ml de esta suspensión se mezclaron con 0,1 ml de la suspensión al 1% de HHPa. Después de centrifugar durante 5 minutos, a 200 g, los tubos se dejaron durante 1 hora a 4° C. El sedimento celular se resuspendió con suavidad y se realizó conteo en cámara cuentaglobúlos sobre un total de 200 células. Las pruebas se efectuaron en duplicado y se contó como roseta aquellos linfocitos que presentaban 4 o más hematíes pegados a su alrededor. Los controles incluían la realización del procedimiento de forma idéntica sustituyendo la solución de EDU-1 por PBS.

RESULTADOS

Características de EDU-1

En la tabla I puede comprobarse que EDU-1 sólo reacciona con células portadoras de antígenos DR, lo que corrobora los resultados previamente descritos con linfocitos B y monocitos de sujetos normales². Además, como puede observarse en la figura 1(C) EDU-1, fue capaz de inmovilizar proteínas de células Raji correspondientes a un P.M. de 28.000 y 35.000, propios de las dos cadenas polipeptídicas unidas por fuerzas no covalentes que integran las moléculas DR. Como controles se incluyen los resultados obtenidos con el Acm D1-12 anti-DR monomórfico (véase B) gentilmente cedido por A. Acolla (Institut Ludwig de Recherches sur le Cancer, Epalinges, Suiza), así como controles negativos: A, idéntico proceso que con B y C pero sin proteínas solubilizadas de células Raji; D, idéntico proceso que con B y C pero sustituyendo el Acm unido a la Sepharose-CNBr por albúmina bovina. Estos resultados permiten concluir que EDU-1 reconoce epitopos comunes o monomórficos de los antígenos DR.

La inmunoelectroforesis de EDU-1 en forma ascítica demostró que EDU-1 es una IgG_{2b}-K. En la figura 2 puede comprobarse que EDU-1 purificado por electroforesis preparativa y subsiguiente cromatografía sobre Sepharose 4B CL-protein A, estudiado por inmunoelectroforesis a una concentración de 20 mg/ml, sólo reaccionaba con anti-IgG_{2b} y con anti-kappa, pero no con los antisueros anti-lambda ni tampoco con ningún otro antisuero contra otras subclases de la IgG de ratón.

Separación de los productos de la digestión de EDU-1 y de IgG humana con pepsina

El perfil de elución de EDU-1 durante 1 hora (fig. 3a) resultó superponible al hallado con 2 horas de reacción. Con estos tiempos de digestión se obtenía un único pico aunque ligeramente desplazado hacia la derecha respecto del volumen de elución de EDU-1 purificado y no digerido (fig. 3a). Contrariamente, con digestiones de 5, 12 y 24 horas se obtenían tres picos denominados F1, F2 y F3, siendo este último siempre el predominante. Los perfiles de elución con estos tiempos de digestión eran superponi-

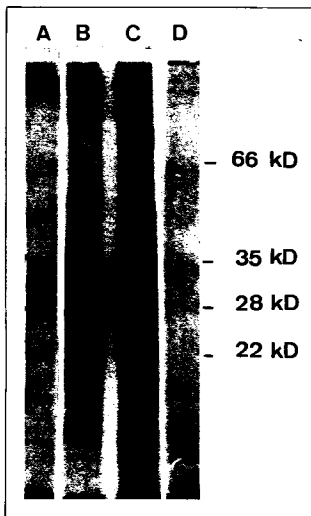


Fig. 1. Autorradiografía de la electroforesis sobre gel de poliacrilamida al 12% en SDS en condiciones no reductoras de las proteínas solubilizadas de células Raji inmuoabsorbidas por: B, el Acm D1-12 anti-DR monomórfico (cedido por Acolla) y C por EDU-1. A y D son controles en los que se siguió idéntico proceso pero en A no se incluyeron proteínas de células Raji y en C, el Acm, fue sustituido por albúmina bovina.

bles y en la figura 3a sólo se ha representado el obtenido con 12 horas de digestión. Comparando estos resultados con los hallados con la digestión de la IgG humana durante 12 horas (fig. 3b) resulta evidente la particular sensibilidad de EDU-1 a la acción de la pepsina. Nótese que el perfil de elución de la digestión de la IgG humana es idéntica al típicamente hallado por otros autores con Sephadex G-150 según la técnica clásica de Nisonoff¹¹.

Análisis de los productos obtenidos por la proteólisis con pepsina de EDU-1

Debemos advertir que para la detección de la reactividad EDU-1 con los linfocitos B de B-LLC median-

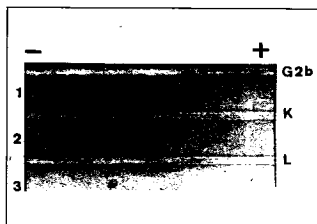


Fig. 2. Inmuno-electroforesis de EDU-1 purificado (1, 2, 3) por electroforesis preparativa y posterior cromatografía sobre Sepharose-Protein A, estudiado a una concentración de 20 mg/ml. G2b, antisero anti- γ 2b de ratón; k y L - anticadenas kappa y lambda de ratón, respectivamente.

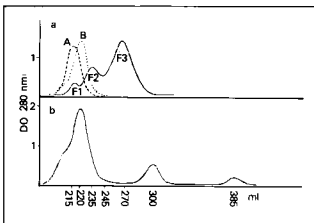


Fig. 3. Perfiles de elución del gel filtración sobre columnas de Sephacryl S-200. (a) EDU-1 purificado no digerido A---; EDU-1 digerido 1 hora B.....; digerido 12 horas —. (b) IgG humana policlonal digerido con pepsina durante 12 horas.

te la formación de rHHpA, debimos seleccionar aquellos casos que no presentaban formación de rosetas HHpA directas, ya que tal como puede apreciarse en la tabla II muchas B-CII pueden interactuar directamente con la proteína A formando rosetas directas con HHpA, y esta interacción tiene lugar a través de las propias Ig-S, tal como otros autores han demostrado^{3,12}. Para este tipo de ensayos se seleccionaron los pacientes de 15 a 19, y concretamente los resultados que se muestran fueron los obtenidos con el paciente 18.

El único pico obtenido con la digestión de 1 hora o 2 horas mostraba una actividad anticuerpo, por los tres métodos ensayados, no diferente respecto de

TABLA II Capacidad de los linfocitos de pacientes con B-LLC para formar rosetas directas con HHpA

Pacientes con B.LLC	rE %	Ig-S %	rM %	rHHpA directas
1	22	78	50	18
2	10	70	45	55
3	8	82	57	30
4	20	75	60	40
5	20	80	58	4
6	6	95	60	22
7	8	85	59	38
8	6	87	85	72
9	7	90	79	7
10	3	98	45	41
11	7	77	73	7
12	8	90	78	70
13	7	87	84	58
14	10	90	60	89
15	8	90	62	4
16	4	95	66	6
17	10	82	50	4
18	8	90	68	2
19	4	86	63	

rE: rosetas espontáneas con hemates de certero.

rM: rosetas espontáneas con hemates de ratón.

Ig-S: células con Ig de superficie.

rHHpA: rosetas directas con hemates humanos recubiertos con proteína A.

TABLA III Reactividad frente a los linfocitos de B-LLC de EDU-1 purificado sin digerir y de los diferentes productos obtenidos con la digestión con pepsina (fig. 3)

Linfocitos B tratados con:	Reactividad medida por:		
	I.I.	rHHpA	MC
(A) EDU-1 purificado no digerido	95 %	98 %	(+)
(B) EDU-1 digerido durante 1 hora	93 %	97 %	(+)
Fragmentos de EDU-1 digerido durante 2 horas:			
F1	94 %	96 %	(+)
F2	55 %*	57 %	(-)
F3	0 %	3 %	(-)
PBS	0 %	3 %	(-)

I.I.: Inmunofluorescencia indirecta.

rHHpA: Formación de rosetas con hemáticas humanas cubiertos de pA.

MC: Microcitotoxicidad mediada por complemento según NIH.

*: Intensidad de fluorescencia muy débil.

(+): % citotoxicidad superior o igual al 80 %

(-): % citotoxicidad igual o inferior al 30 %

B-LLC: Leucemia Linfática Crónica de células B.



Fig. 4. Inmunoelectroforesis de la única fracción proteica obtenida por digestión de EDU-1 a 1 hora (fig. 3).

relacionados con las cadenas $\gamma 2b$ exclusivamente (fig. 4).

En cuanto a las tres fracciones generadas con la digestión de 5 o más horas, el F3, o producto siempre predominante, estaba constituido por fragmentos de tipo Fc puesto que por EGPA-SDS en condiciones no reductoras ofrecía una única y marcada banda de P.M. de 50.000 (fig. 5). Carecía de actividad anticuerpo por los tres métodos ensayados (tabla III) y sólo reaccionaba con antisuero anti-IgG2b pero no lo hacía con anti-kappa (fig. 6). La fracción F2 estaba constituida por fragmentos de tipo Fab de composición heterogénea ya que por EGPA-SDS aparecía distribuido en tres bandas de P.M. de 45.000, 50.000 y 55.000 (fig. 5). Era capaz de reaccionar con linfocitos B de B-LLC por I.I. aunque con un porcentaje más reducido y con menor intensidad de fluorescencia que EDU-1 sin digerir. También era capaz de formar rosetas con HHpA, aunque en inferior proporción que EDU-1 sin digerir, pero en cambio daba resultados negativos con la citotoxicidad mediada por complemento (tabla III). Además esta fracción reaccionaba con anti-kappa y también con anti-IgG2b, y en este último caso exhibía un doble arco de identidad parcial (fig. 6). La fracción F1, la más minoritaria, estaba constituida por EDU-1 residual no digerido ya que mostraba, por los tres métodos, la misma actividad anticuerpo que EDU-1 sin digerir (tabla III), se obtenía en el mismo volumen de elución que éste (fig. 3) y por EGPA-SDS al 12 % de poliácridamida no penetraba en el gel (fig. 5). Además, por inmunoelectroforesis, los arcos de precipitación con anti-IgG2b y anti-kappa ofrecían el mismo patrón que con EDU-1 sin digerir (fig. 6).

DISCUSION

De estos resultados queda claro que a partir de un cierto tiempo de reacción (5 o más horas), en el que resultaba evidente la proteólisis por gel filtración, los productos de la digestión no contenían cantidades apreciables de fragmentos F(ab)₂, siendo, por el contrario, fragmentos de tipo Fc de P.M. 50.000, el producto predominante. Podíamos obtener también en estas condiciones pequeñas proporciones de frag-

EDU-1 no digerido, tal como puede apreciarse en la tabla III. Por tanto, la actividad anticuerpo existente en esta fracción corresponde a EDU-1 completo no digerido. Sin embargo, por inmunoelectroforesis podía detectarse que había habido una pequeña proporción de proteólisis con generación de fragmentos

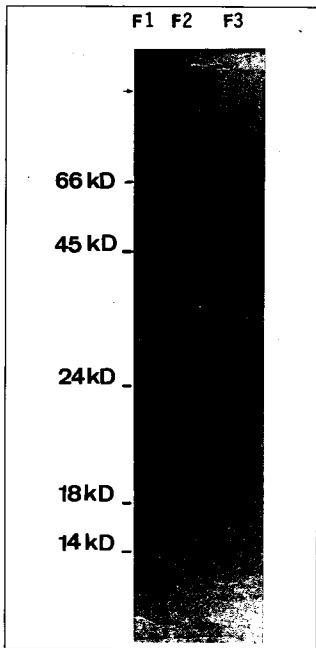


Fig. 5. Electroforesis sobre gel de poliacrilamida al 12 % en SDS en condiciones no reductoras de las tres fracciones F1, F2 y F3 obtenidas con la digestión de EDU-1 durante 12 horas (fig. 3). La pequeña flecha señala el origen del gel, en donde quedaba retenido el material proteico de F1.

mentos heterogéneos de tipo Fab, de P.M. 45.000, 50.000 y 55.000. Asimismo, en todos estos tiempos de digestión (5, 12 y 24 horas) quedaba una mínima cantidad de IgG2b residual no digerida.

Si se acortaban los tiempos de reacción enzimática a 1 o 2 horas, apenas se podía detectar que hubiera existido proteólisis, de forma que el material

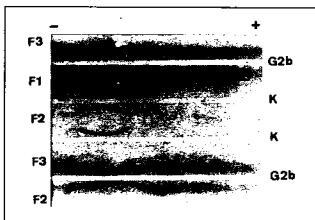


Fig. 6. Inmunolectroforesis de las fracciones F1, F2 y F3, obtenidas con la digestión de EDU-1 durante 12 horas, enfrentadas con antiseros anti- γ 2b y anti-kappa de ratón.

predominante en la única fracción eluida por gel filtración, era la propia IgG2b no digerida.

Esta alta y particular susceptibilidad de la IgG2b de ratón a la acción de la pepsina, en relación a las otras subclases de IgG murina, fue ya detectada por Gorini et al⁴ en 1969, y también por Dissanayake y Hay⁶ en 1975. En el primer caso emplearon 17 horas de digestión con una relación enzima/IgG de 1/100, y en el segundo, 12 horas, con una relación 1/20. Gorini et al⁴ dedicaban fundamentalmente su atención a la digestión con papaina y tripsina, y en lo que se refiere a la digestión con pepsina no aislaron y analizaron todos los productos obtenidos por gel filtración, aunque comprobaron que el producto principal era un fragmento de P.M. (por gel filtración) de 52.000. En el otro estudio⁶ mencionado, tampoco se hizo este tipo de análisis ya que el objetivo era obtener subfragmentos de los fragmentos Fc. En todo caso el perfil de elución por gel filtración sobre Sephadex G-150 obtenidos en ambos trabajos son prácticamente superponibles a los obtenidos por nosotros. Tampoco monitorizaron la actividad anticuerpo ni siquiera de la mezcla (en ambos casos emplearon IgG2b monoclonales de mielomas murinos). No fueron capaces, por tanto, de detectar la presencia de fragmentos de tipo Fab, y de pequeñas proporciones residuales de IgG2b sin digerir tal como nosotros hemos demostrado, porque su tipo de análisis no lo permitía, aunque podía inferirse que fragmentos de tipo F(ab)₂ no se obtenían en sus condiciones de digestión (no probaban ninguna otra más que las indicadas).

Cuando este manuscrito estaba preparado, ha aparecido un estudio de Lamoy y Nisonoff¹³ sobre digestión con pepsina de las distintas subclases de la IgG de ratón con el fin de obtener preparaciones de fragmentos F(ab)₂. En él se confirman nuestros resultados en cuanto a la mayor sensibilidad de la IgG2b a la acción de la pepsina y a la imposibilidad de obtener cantidades detectables de F(ab)₂. También en

este caso el producto principal obtenido fueron fragmentos sin actividad anticuerpo de P.M. 50.000, así como pequeñas cantidades de IgG_{2b} sin digerir. Es de subrayar, sin embargo, que no aislaban los productos y que el tipo de análisis utilizado tampoco les permitió aislar y caracterizar la presencia de una pequeña proporción de fragmentos de tipo Fab como nosotros hemos demostrado.

Esta mayor sensibilidad de la IgG_{2b} de ratón a la proteólisis con pepsina se debe obviamente a particularidades estructurales de las cadenas pesadas de esta subclase que, por el momento, se desconocen. En este contexto, tal vez no sea impropio recordar que los primeros Acm mutantes de clase IgG (con producción de Fab en lugar de IgG completa) se hayan conseguido con híbridos productores de Acm de subclase IgG_{2b}¹⁴ y que la frecuencia de esta selección de mutantes era superior a la obtenida por otros autores¹⁵ con mutantes de clase IgM. La obtención deliberada de este tipo de Acm mutantes se ha llegado a postular como una futura e hipotética alternativa a las degradaciones enzimáticas para la obtención de fragmentos de tipo Fab para usos diagnósticos y/o terapéuticos^{14, 15}. Por el momento, sin embargo, lo único cierto es que la obtención de buenas preparaciones de fragmentos F(ab')₂ de Acm de subclase IgG_{2b} de ratón mediante digestión con pepsina, resulta imposible.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue sufragado por una ayuda a la Investigación de la Fundación Knickerbocker 1982, y por la subvención de la Comisión Asesora para el Desarrollo de la Investigación Científica del Ministerio de Educación y Ciencia, n.º 0653, 1981.

Nuestra sincera gratitud a Mercè Bayo por mecanografiar el manuscrito.

Bibliografía

1. Vilella R, Yagüe J, Vives J. Monoclonal Antibody against HLA-Aw32 + A25. Is HLA-Aw32 an allele with no unique antigenic determinant? *Human Immunol* 1983; 6:53-62.

2. Vilella R, Yagüe J, Gallart T, Vives J. The efficacy of hybridoma technology in studying surface antigens in human T and B lymphocytes. *Immunología* 1982; 1:58-64.
3. Romagnani S, Grazia Giudizi M, Biagiotti R, Almerigogna F, Maggi E, Del Prete G, Ricci M. Surface immunoglobulins are involved in the interaction of protein A with human B cells and in the triggering of B cell proliferation induced by protein A-containing *Staphylococcus Aureus*. *J Immunol* 1981; 127:1.307-1.313.
4. Gorini G, Medgyesi GA, Doria G. Heterogeneity of mouse myeloma γ G globulins as revealed by enzymatic proteolysis. *J Immunol* 1969; 103:1.132-1.142.
5. Casey FB, Tokudas. Pepsin digestion of mouse antibody. *J Immunol* 1970; 105:1.294-1.295.
6. Dissanayake S, Hay FC. Pepsin digestion of mouse IgG immunoglobulins subfragments of the Fc region. *Immunochemistry* 1975; 12:373-378.
7. Acolla RS, Gross N, Carrels, Corte G. Distinct forms of both α and β sub-units are present in the human molecular pool. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1981; 78:4.549-4.551.
8. Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* 1978; 15:429-436.
9. Hunter WM. Radioimmunoassay. Chapter 14, pp. 14.1-14.40. In *Handbook of Experimental immunology*. Ed. D.M. Weir Third Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978.
10. Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
11. Stanworth DR, Turner MW. Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits (capítulo G 6,1-6.102.) In *Handbook of Experimental Immunology*. Ed. D.M. Weir. Third Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978.
12. Romagnani S, Giudizi MG, Biagiotti, Almerigogna F, Del Prete GP, Maggi E, Dicci M. Protein A reactivity of Lymphocytes from some patients with chronic lymphocytic leukaemia mediated by an interaction with the F(ab)₂ region of surface immunoglobulin. *Scand J Immunol* 1982; 15:287-295.
13. Lamoryi E, Nisonoff A. Preparation of F(ab)₂ fragments from mouse IgG of various subclasses. *J Immunol Methods* 1983; 56:235-243.
14. Yelton DE, Scharff MD. Mutant monoclonal antibodies with alterations in biological functions. *J. Exp Med* 1982; 156:1.131-1.148.
15. Köhler G. Mutant monoclonal antibodies. *Immunol. Today* 1983; 4:106-107.