

Instituto de Hematología e inmunología

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-Rh(D): ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

Lic. René A. Rivero Jiménez

RESUMEN

Se describen los antecedentes y el estado actual de los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-Rh(D). Estos AcM han dado lugar a una vía alternativa de producción de reactivos hemoclasificadores no dependientes de la inmunización deliberada de humanos basada en la tecnología de hibridomas. Los AcM contra el antígeno D son imposibles de obtener en roedores por la poca inmunogenicidad de este antígeno en dichas especies, pero los linfocitos B de los humanos sensibilizados con hematíes Rh(D) positivos pueden producir anticuerpos anti-Rh(D) en cultivo de tejidos después de la infección y la transformación de las células con el virus de Epstein Barr (VEB). No obstante, la complejidad de esta obtención viene dada por la existencia de individuos con hematíes con fenotipos D débiles (D^U) que tienen una expresión cualitativamente menor del antígeno y los D parciales (variantes de D) (categorías) donde el antígeno se puede presentar incompleto, ya que carecen de uno o más epítopes del mosaico D "normal", que posee más de 30. Para lograr una especificidad adecuada de un reactivo basado en AcM, este debe reconocer varios epítopes de los más comunes, y usualmente se prefiere una mezcla de anticuerpos clase IgG e IgM. Gracias a la nueva generación de reactivos anti-Rh(D) basados en AcM se ha incrementado la proporción de individuos previamente reconocidos como D^U , que ahora son agrupados por pruebas directas de hemaglutinación como Rh(D) francamente positivos.

Descriptor de CS: ANTICUERPOS MONOCLONALES; HERPESVIRUS 4 HUMANO; BIOLOGIA MOLECULAR; GRUPOS SANGUINEOS.

Subject headings: ANTIBODIES, MONOCLONAL; HERPESVIRUS 4, HUMAN; MOLECULAR BIOLOGY; BLOOD GROUPS.

Este trabajo trata sobre los antecedentes y avances en la tecnología para obtener reactivos hemoclasificadores anti-Rh(D) basados en anticuerpos monoclonales (AcM) humanos y su significado para corregir errores relacionados con la tipificación incorrecta de la sangre según el

grupo Rh, debidos a la poca disponibilidad de reactivos adecuados en algunos países, incluido el nuestro, donde aún no se cuenta con estos productos en toda la red de bancos de sangre.

La producción de antiseros policlonales confiables y de alta calidad para la

tipificación de la sangre es una tarea muy laboriosa, que tarda tiempo y depende de la inmunización de seres humanos altruistas que actúan como donantes especialmente sensibilizados, para a partir de su sangre, obtener este tipo de reactivos. En este principio se basa la producción de reactivos hemoclasificadores en Cuba y otros países y el autoabastecimiento de este tipo de reactivos es esencial para el funcionamiento adecuado del Sistema Nacional de Salud. Sin embargo, hay muchas dificultades para obtener reactivos policlonales normalizados a partir de donantes humanos, en particular los reactivos anti-Rh(D) y éstos, por lo general, no detectan a determinadas expresiones parciales del antígeno D.

FENOTIPOS D DÉBILES Y D PARCIALES

Desde 1946, *Stratton* describió la existencia de hematíes que reaccionaban más débilmente con los antisueros anti-Rh(D) que las células *Dnormales* y les llamó hematíes D^U ,¹ (actualmente D débiles) y surgieron los términos *alto grado* y *bajo grado*, para la clasificación serológica de los fenotipos D^U .² Ya en 1953 se describió el primer ejemplo inequívoco de una aloinmunización anti-D en un individuo D positivo,³ y a partir de este momento, se reconoció que los hematíes de ciertas personas pueden carecer de porciones del *mosaico* D, y así, estos individuos podrían resultar inmunizados contra epítopes del antígeno D que ellos no poseen. Las células D^U podrían tener todos los epítopes del antígeno D normal, pero en una densidad más baja⁴ o podrían ser tanto cualitativa como cuantitativamente diferentes del D normal, y de ser así, se designan como D parcial.⁵ Hoy se sabe, gracias a los AcM, que el antígeno D cuenta con más de

30 epítopes.⁶ Dos grupos de investigadores han categorizado a los hematíes con antígenos D parciales (variantes de D): *Wiener y Unger*, que los clasificaron como Rh^A, Rh^B, Rh^C, Rh^D,⁷ y *Tippett y Sanger*⁸ que los clasificaron en categorías I-VI,⁹ pero ahora se excluye la categoría D^{1,5} y se incluyen la categoría D^{VII} y otras como la DFR, DBT, R₀^{Har}, HMi y HMii.⁶ Ambos estudios visualizan al antígeno D como una estructura tipo mosaico con fenotipos parciales de D que carecen de una o más partes del mosaico D normal. Es probable que los fenotipos D parciales sean más frecuentes en los individuos de la raza negra que en otras poblaciones, en otros países, del 5 al 10 % de los D^U son D parciales (variantes de D).¹⁰ En Cuba la incidencia de fenotipos D parciales no se conoce con exactitud, sin embargo, un ejemplo se encontró en un estudio realizado en 529 pacientes con anemia drepanocítica realizado en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), donde se detectaron 2 individuos definidos como variantes de D con expresión *normal* del antígeno D en los hematíes y anticuerpos anti-D (aloinmunizados) en el suero.¹¹ Estos resultados indicaron una incidencia de variantes de D del 0,37 % en este grupo de enfermos, 18 veces más elevada que la informada por investigadores en los Estados Unidos de América, Australia, la región sudoeste de Inglaterra, Francia y Holanda, en estudios realizados en poblaciones de donantes no seleccionados.¹²⁻¹⁷ Es muy probable que la incidencia de categorías de D en la población de donantes de Cuba sea alta, si tenemos en cuenta que alrededor del 40 % de los donantes cubanos se clasifican como no blancos. Otro dato que apoya esta hipótesis, que tiene relevancia desde el punto de vista transfusional, está dado por un estudio de embarazadas Rh-negativas,

donde se encontró una frecuencia de aloinmunización contra el antígeno D del 4,6 %, en la cual se definió que las transfusiones de sangre fueron la primera causa de esta aloinmunización.¹⁸ Es evidente que la calidad de los reactivos disponibles no es lo suficientemente homogénea y no es capaz de detectar a las variantes parciales del antígeno D en la población de donantes D^U, por lo que no se logra una completa y adecuada compatibilización de la sangre con respecto al grupo Rh, lo que explica la aloinmunización en receptores Rh-negativos. Estos resultados tienen relevancia si tenemos en cuenta que en el grupo de embarazadas aloinmunizadas, el 4 % de los recién nacidos vivos sufrieron de enfermedad hemolítica. La predicción se confirmó posteriormente cuando se encontró un antecedente de transfusiones en el 31,25 % de las mujeres multigestas no protegidas por la inmunoglobulina IgG anti-D y en el 100 % de las primogestas aloinmunizadas.¹⁹ En un estudio preliminar sobre la incidencia de fenotipos D débiles y parciales en 4 339 donantes de sangre de Guanabacoa, se encontró 0,11 % de fenotipos D débiles en los blancos y no se encontraron variantes D en este grupo racial; sin embargo, en los no blancos la frecuencia de D^U fue de 0,43 % y la de D parciales fue del 0,16 %.²⁰ Se sabe que entre los individuos con fenotipos D parciales las expresiones más inmunogénicas son las categorías D^{IV}, D^V y D^{VII}, que son detectables como D positivos por los reactivos convencionales clase IgG, mientras que la categoría D^{VI} es la menos inmunogénica y esto provoca errores en la clasificación de estos donantes.¹⁰ Los eritrocitos de fenotipo categoría D^{VI} sólo poseen 3 epítopes (según el modelo de los 9 epítopes) de los identificados para el antígeno D; esto explica por qué no se detecta por los reactivos basados en antiseros policlonales obtenidos mediante

la inmunización de donantes voluntarios.²¹ ¿Qué reactivos hemoclasificadores anti-Rh(D) serían necesarios para obtener una adecuada compatibilización de la sangre a transfundir? ¿Cómo poder identificar a los individuos con expresión parcial del antígeno D?

ANTICUERPOS MONOCLONALES HEMOCLASIFICADORES

Una vía alternativa de producción de hemoclasificadores se basa en la tecnología de hibridomas desarrollada por *Köhler* y *Milstein*,²² para la obtención de AcMo murinos y/o humanos. La administración profiláctica posparto de la inmunoglobulina humana anti-Rh(D) en mujeres D-negativas ha provocado una reducción del número de mujeres aloinmunizadas por vía natural.^{19,23} Por eso hoy en día es más escasa la fuente de obtención de reactivos hemoclasificadores policlonales humanos anti-Rh(D), pues ahora descansa únicamente en la inmunización de donantes voluntarios (especiales) con los riesgos que este tipo de proceder genera. Pero en la preparación de los AcM contra el antígeno Rh(D), se han observado dificultades adicionales, ya que son difíciles de obtener a partir de sistemas en roedores, por la poca inmunogenicidad de este antígeno en dichas especies. Sin embargo, se ha incursionado con éxito en la generación de AcM anti-Rh(D) humanos.

TRANSFORMACIÓN DE LINFOCITOS CON EL VIRUS DE EPSTEIN BARR (VEB)

Se demostró que los linfocitos B de los donantes sensibilizados con hematíes Rh(D) positivos pueden producir anticuerpos anti-Rh(D) en cultivos de tejidos

después de una infección con el VEB.^{24,25} La subpoblación de células inmortalizadas por el VEB se describe como formada por células pequeñas, de alta densidad, en reposo o alternativamente como una célula de gran ciclaje,²⁶ pero desafortunadamente, estas líneas celulares linfoblastoides B (LCL-B) usualmente cesan la producción del anti-Rh(D) después de unos pocos meses en cultivo.²⁵ Para obtener líneas celulares humanas secretoras de Igs más estables, varios investigadores han intentado la estabilización mediante la fusión con una línea de mieloma murino. Otras fusiones emplearon linfocitos B obtenidos del bazo, ganglios linfáticos, o sangre periférica.²⁷ Para estas fusiones se usaron las líneas de mieloma de ratón NS1 o SP1. También se publicó en la solicitud de patente No. 85/02413 de la PCT,²⁸ la fusión de linfocitos B de sangre periférica transformados por el VEB con un heterohibridoma, formado por una célula de mieloma humano y la de ratón X63-Ag8.653 y la obtención por esta vía de líneas secretoras de AcM anti-Rh(D), de las clases IgM o IgG. Por otra parte, en la solicitud de patente No. 0251440 de la EPO,²⁹ se informó que se pueden obtener heterohibridomas que cultivados en condiciones apropiadas, permiten obtener títulos de AcMo anti-Rh(D) en ausencia de Ig de ratón, mediante la fusión de una línea celular de mieloma de ratón no secretora de Igs, directamente con linfocitos B humanos transformados con VEB y obtenidos de donantes hiperinmunes para el antígeno Rh(D), con más de 20 µg de anticuerpos anti-Rh(D)/mL/24 horas cuando se cultivan a una concentración de 1×10^6 cel/mL.

Se sabe que sólo 1 en 10^3 ó 10^4 de los linfocitos B de sangre periférica de los donantes hiperinmunes para el Rh(D) son secretores de anticuerpos anti-Rh(D). La transformación con VEB de los linfocitos B

de los donantes Rh(D) negativos inmunizados por vía natural o deliberadamente con el antígeno Rh(D), facilita la selección según los criterios de un crecimiento vigoroso en cultivo y alto título de anticuerpos anti-Rh(D) *in vitro*, antes de llevar a cabo la fusión con la línea de mieloma. Los linfocitos B transformados por VEB se conoce que tienen una frecuencia de fusión superior con la línea X63-Ag8.653, si se compara con los linfocitos B no transformados con VEB bajo idénticas condiciones.²⁸

REACTIVOS ANTI-RH(D) QUE RECONOCEN FENOTIPOS D DÉBILES Y A LAS VARIANTES D

Una de las dificultades en la clasificación parcial de los hematíes D es la escasez de reactivos adecuados, los cuales se han obtenido del suero de individuos con fenotipos parciales de D que se han aloinmunizado anti-D, o a través de los AcM. Aunque los primeros AcM humanos clase IgG obtenidos en el mundo^{30,31} no fueron superiores a los sueros policlonales y fallaban en la detección de los fenotipos D débiles y de las variantes D,³² la obtención de AcM clase IgM anti-D estables, como los clones MAD-2 y FOM-1³³ provocó un cambio radical en la serología del sistema Rh. Estos AcM dieron lugar a reactivos con altos títulos de anticuerpos, que trabajan bien tanto a temperatura ambiente como a 37 °C, que unidos a los AcM clase IgG, desarrollados al final de la década del 80,^{27,34} han convertido a los hemoclasificadores basados en AcM humanos en los productos de elección para la clasificación sanguínea en el sistema Rh.

En relación con los requerimientos de especificidad, por la complejidad del

antígeno Rh(D), muchos consideran que un buen hemoclasificador no se debe elaborar sobre la base de un solo AcM, sino que es preferible una mezcla, por lo que hay que evaluar mediante la prueba de antiglobulina (prueba de Coombs) la presencia de la variante D^U en casos críticos del estudio del grupo Rh(D) negativo y utilizar células D^U en el panel celular, para la generación de reactivos basados en AcM anti-Rh(D), con vistas a monitorear su calidad. Con la nueva generación de AcM reactivos anti-Rh(D) se ha incrementado la proporción de individuos previamente reconocidos como D^U (débil D, positivo por prueba de antiglobulina indirecta) que ahora son agrupados por pruebas directas de hemaglutinación como Rh(D) francamente positivos. Sin embargo, el primer requisito de un reactivo anti-Rh(D) debe ser que de forma segura y sin ambigüedades aglutine a los hematíes que aparentemente expresan un complemento completo de epítopes D, por lo cual la mayoría de los expertos considera que la prueba de antiglobulina indirecta no es ya esencial para la detección de los débiles D positivos (D^U), siempre que se usen AcM que reconozcan a esta expresión, aunque para obtener la licencia o registro sanitario no es necesario que los reactivos anti-Rh(D) detecten a todas las variantes de hematíes D débiles o parciales. Se insiste en la necesidad de un panel celular internacional para la evaluación definitiva de estos reactivos y la obtención de AcM en diferentes países, lo que sin dudas contribuirá a su más rápida creación.³⁵

Entre los aportes más recientes, 5 trabajos describen AcM con reactividad con hematíes D parciales, 3 AcM con actividad contra la categoría D^{VI}, uno que no se podía mantener en cultivo por más de 3 meses,³⁴ otro con una reactividad muy débil³⁶ y un tercero con reactividad anti-D^{VI} y crecimiento celular estable.³⁷ Los AcM anti-Rh(D) producidos a partir de cultivos de

larga duración por otros 2 grupos, no reaccionan con las categorías D^{VI},^{27,33} y el trabajo de *Leader* y otros,¹⁵ que describe 3 AcM humanos con reactividad contra la categoría D^{VI} y uno, el AcM H-26, que se enlaza tanto a los hematíes con fenotipo D^{VI} como D normal.

Por otra parte, en relación con su uso como elementos terapéuticos en humanos, ya se han obtenido AcM humanos anti-Rh(D) que se pueden utilizar como inmunizantes pasivos anti-D para la prevención de la enfermedad hemolítica del recién nacido. En su excelente revisión sobre este novedoso tema, *Fletcher y Thomson*³⁸ describen los ensayos que se han llevado a cabo para evaluar *in vitro* a los AcM humanos anti-D, que incluyen la medición de la adherencia de los eritrocitos sensibilizados con estos anticuerpos a los receptores Fc de las células efectoras (por ejemplo, mediante rosetas), la fagocitosis por los monocitos de los eritrocitos sensibilizados o la lisis citotóxica de estas células por efectores a través de ensayos de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y también por quimioluminiscencia se ha evaluado la respuesta metabólica de los monocitos durante la fagocitosis de los eritrocitos sensibilizados con AcM anti-D. Así se ha visto que los monoclonales clase IgG3 son más eficientes que los IgG1 en varios ensayos, incluyendo la formación de rosetas, la ADCC mediada por monocitos, la adherencia y la fagocitosis. También se han descrito las características que deben reunir los AcM anti-D para ser buenos agentes terapéuticos, tales como especificidad, potencia, afinidad, grado de glicosilación, y ausencia de reactividad cruzada con otros tejidos humanos. Finalmente, los ensayos clínicos en curso, permitirán obtener los datos necesarios para obtener los permisos de las agencias reguladoras.^{37,38}

OTRAS ALTERNATIVAS PARA LA OBTENCIÓN DE AcM

Los anticuerpos humanos se pueden generar también por la tecnología recombinante.^{39,40} El repertorio de las inmunoglobulinas humanas se puede copiar de manera muy efectiva según la tecnología de despliegue de fagos de los genes V. Con el uso de estas técnicas, los genes que codifican para los dominios variables de un anticuerpo de interés, se pueden capturar del repertorio de las células B. Con estos genes V se pueden obtener moléculas de reconocimiento inmunológico por una estrategia de diseño y construcción. Estos descubrimientos recientes aportan una oportunidad única para estudiar la estructura molecular de la región variable de los anticuerpos contra los antígenos en células sanguíneas, y estos estudios podrían dar la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias, incluso terapéuticas, para la prevención y eliminación de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido.⁴¹

Un producto muy atractivo de esta tecnología son los fragmentos de Ac producidos en microorganismos a partir de bibliotecas de fagos con aplicación en la inmunohematología.^{43,44} Esta tecnología, al utilizar microorganismos como célula productora, facilita y abarata en gran medida el proceso de escalado. Estas opciones, basadas en la ingeniería genética, serían otra

alternativa para la obtención de Ac anti-(D) en sustitución de los que se obtienen a partir de los donantes sensibilizados.

COMENTARIOS FINALES

Los aportes de la biología molecular al entendimiento de la complejidad antigénica del sistema Rh y los avances alcanzados en la serología, gracias a los AcM, han permitido tener hoy por hoy un mejor conocimiento de este sistema de grupos sanguíneos. En este sentido, los AcM están contribuyendo decisivamente a la definición de algunos antígenos sanguíneos cuyas características estructurales son desconocidas y al conocimiento de la expresión de los antígenos sanguíneos en los diversos tejidos y su relación con la significación funcional de estos antígenos, que obviamente nada tiene que ver con las transfusiones, y probablemente está muy relacionado con los procesos de diferenciación y crecimiento celular.⁴⁵ En el IHI se desarrolla en la actualidad un proyecto de investigación para la obtención de AcM anti-Rh(D) que sean adecuados para el escalado industrial y la formulación de estos reactivos, y la firma CIMAB SA ha iniciado la distribución de pequeños volúmenes de reactivos monoclonales anti-Rh(D) elaborados a partir de sobrenadantes (de cultivo de células B transformadas por el VEB) importados desde el extranjero.

SUMMARY

Antecedents and present state of Anti-Rh (D) monoclonal antibodies (MAB) are described. These MAB have give rise to alternative way of production of non-dependent hemoclassifiers of deliberate immunization of humans, based on hybridomes technology. The MAB to D antigens are impossible to obtain in rodents because of low immunogenicity of this antigen in such species, but human B lymphocytes sensitized with positive Rh (D) red cells, may produce anti-Rh (D) antibodies in tissue culture after infection and cell transformation using Epstein Barr virus (EBV). Nevertheless, complexity of this obtention is in ciew of existence of individuals carriers of red cells with weak D phenotypes (D^w) showing an expression qualitatively minor of antigen, and partials D(variants of D) (category), where presentation of antigen may be

incomplete, since they lack of one or more epitopes of "normal" D mosaic, which has more than 30. To obtain a proper specificity of a reagent based on MAB, this must recognize some of the commonest epitopes, and usually is preferred a mixture of class IgG and IgM antibodies. Thanks to the fact that there is a new generation of anti-RH (D) reagents, based on MAB, it was possible increase in ratio of individuals previously recognized as D^u, that at present time are grouped by hemagglutination direct tests as Rh (D) obviously positives.

Subject headings: ANTIBODIES, MONOCLONAL; HERPESVIRUS 4, HUMAN; MOLECULAR BIOLOGY; BLOOD GROUPS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stratton F. A new Rh allelomorph. *Nature* 1946;258:26.
2. Widman FK. American Association of Blood Banks Technical Manual. 9th ed. Basel: Karger 1985:133.
3. Argall CI, Bale JM, Trenelman E. Presence of anti D antibody in the serum of D^u patient. *J Lab Clin Med* 1953;41:895-8.
4. Masouredis SP, Sturgeon P. Quantitative serologic and isotopic studies on the Rh o variant D^u. *Blood* 1964;25:954-75.
5. Tippett P. Sub divisions of the Rh(D) antigen. *Med Lab Sci* 1988;45:88.
6. Jones J, Scott ML, Voak D. Monoclonal anti D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routing typing of patients and donors. *Transfus Med* 1995;5:171-84.
7. Wiener AS, Unger LJ. Further observations on the blood factors Rh^A, Rh^B, Rh^C, Rh^D. *Transfusion* 1962;2:230-3.
8. Tippett P, Sanger R. Observations on the subdivision of the Rh antigen. *Vox Sang* 1962;7:9-13.
9. _____ . Further observations on the subdivision of the Rh antigen. *Arzt Lab* 1977;23:476-80.
10. Mollison PL, Engelfried CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 10 th ed. Oxford:Blackwell Scientific, 1997:156.
11. Bencomo A, Hernández P. Variante D (Rho). Informe de un caso. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1991;7:98-102.
12. Beckers EAM, Thijssen PMHJ, Geraedts JPM, Rhenen DJ van. A study of the prevalence and patterns of inheritance of partial D antigen category D^{VI} in a white donor population. *Transfusion* 1994;34:455.
13. Beck ML, Hardman JT. Incidence of D category VI amongst D^U donors in the USA [abstract]. *Transfusion* 1991;31(Suppl 85):255.
14. Watt J. The incidence of category VI amongst weak Rh(D) positive Sydney blood donors [abstract]. *Transfus Med* 1993;3:72.
15. Leader KA, Kumpel BM, Poole GD, Kirkwood JT, Merry AH, Bradley BA. Human monoclonal anti D with reactivity against category D^{VI} cells used in blood grouping and determination of the incidence of the category D^{VI} phenotype in the D^U population. *Vox Sang* 1990;58:106-11.
16. Rhenen DJ van, Thijssen PM, Overbeeke MA. Serological characteristic of partial D antigen category DVI in 8 unrelated blood donors. *Vox Sang* 1994;66:133-6.
17. Roubinet, Apoil PA, Blancher A. Frequency of partial D phenotypes in the south western region of France. *Transf Clin Biol* 1996;3:247-55.
18. Bencomo A, Palacios N, Basanta P. Aloinmunización eritrocitaria en embarazadas Rho(D) negativas. Comparación de tres métodos de detección de anticuerpos anti-eritrocitarios. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1989;5:45-57.
19. González C, Basanta P, Rodríguez C, González I. Prevención posnatal de la isoimmunización Rho(D) por la inmunoglobulina G anti-D producida en Cuba. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1992;8:37-41.
20. Martínez M, Bencomo A, Rivero R, Alfonso Y, Douglas B, Alfonso ME. Incidencia de fenotipos D débiles y D parciales en donantes de sangre de Guanabacoa. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997;13:120-3.
21. Tippett P, Lomas C, Wallace M. The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sang* 1996;70:123-31.

22. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.
23. Urbaniak SJ. Rh(D) haemolytic disease of the newborn: the changing scene. *Br Med J* 1985;291:4-6.
24. Boylston AW, Gardner B, Anderson RL, Hughes Jones NC. Production of human IgM anti D in tissue culture by EB virus transformed lymphocytes. *Scand J Immunol* 1980;12:355.
25. Melamed MD, Gordon J, Ley SJ, Edgar D, Hughes Jones NC. Senescence of a human lymphoblastoid clone producing anti rhesus (D). *Eur J Immunol* 1985;15:742-6.
26. Walls EV, Crawford DH. Generation of human B lymphoblastoid cell lines using Epstein Barr virus. En: GCB Klaus, ed. *Lymphocytes. A practical approach*. Oxford: IRL Press, 1987:149-62.
27. Kumpel BM, Poole GD, Branley BA. Human monoclonal anti-D antibodies. *Br J Hematol* 1989;71:125-9.
28. Kaplan HS, Teng NH, Bron DG (06.06.85). Human monoclonal antibody against Rh(D) antigen uses. PCT /US84/01939-WO 85/02413, 1985.
29. Hughes Jones NC, Thompson KM, Melamed MD (07.01.88). Human anti Rhesus D producing heterohybridoma. EPO 0251440, 1988.
30. Crawford DH, Barlow MJ, Harrison JF, Winger L, Huehns ER. Production of human monoclonal antibody to Rhesus D antigen. *Lancet* 1983;1:386-8.
31. Thompson KM, Hough DW, Maddison PJ, Melamed MD, Hughes Jones N. The efficient production of stable, human monoclonal antibody secreting hybridomas from EBV transformed lymphocytes using the mouse myeloma X63 Ag8.653 as a fusion partner. *J Immunol Methods* 1986;94:7-14.
32. Lomas C, Hughes Jones NC, Thompson KM, Tippett P. Monoclonal anti D: reactivity with various D phenotypes. En: Mayer WR, ed. *Advances in forensic hameogenetics*. Berlin:Spiger Verlag, 1986:294-9.
33. Thompson KM, Melamed MD, Eagle K, Gorick BD, Gibson T, Holburn AM, et al. Production of human monoclonal IgG and IgM antibodies with anti D (rhesus) specificity using heterohybridomas. *Immunology* 1986;58:157-60.
34. Goosens D, Champomier F, Rouger P, Salmon C. Human monoclonal antibodies against blood group antigens: preparation of a series of stable EBV immortalized B cell clones producing high levels of antibody of different isotypes and specificity. *J Immunol Methods* 1987;101:193-200.
35. Hughes Jones NC. Monoclonal antibodies as potential blood typing reagents. *Immunol Today* 1988;9:68-70.
36. Lowe AD, Green SM, Voak D, Gibson T, Lennox ES. A human monoclonal anti D by direct fusion with a lymphoblastoid line. *Vox Sang* 1986;51:212-6.
37. Paire J, Monestier M, Rigal D, Martel Fr, Desgranges CI. Establishment of human cell lines producing anti D monoclonal antibodies: identification of the rhesus D antigen. *Immunol Lett* 1986;13:137-41.
38. Fletcher A, Thomson A. Introduction of human monoclonal anti D for therapeutic use. *Transf Med Rev* 1995;9(4):314-26.
39. Committee for Proprietary Medicinal Products: Ad hoc Working Party on Biotechnology/Pharmacy and Working Party on Safety Medicines: Production and quality control of human monoclonal antibodies. EEC Regulatory Document. Note for Guidance. *Biological* 1991;19:133-8.
40. Food and Drug Administration. Centre for Biologics Evaluation and Research: draft points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use, 1994.
41. Ouwehand WH, Watkins N. Novel diagnostic and therapeutic strategies with genetically engineered human antibodies. *Vox Sang* 1998;74(Suppl 2):223-32.
42. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991;352:624-8.
43. Marks JD, Ouwehand WH, Bye JM, Finnern R, Gorick BD, Voak D, et al. Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. *Biotechnology* 1993;11:1145-9.
44. Hughes Jones NC, Gorick BD, Bye JM, Finnern R, Scott ML, Voak D, et al. Characterization of human blood group scFv antibodies derived from a V gene phage display library. *Br J Haematol* 1994;88:180-8.
45. Urdaniz MP, Cuadrado E, Garrido F. Informe sobre I Taller Internacional (y Simposio) sobre anticuerpos monoclonales contra antígenos de grupos sanguíneos de los eritrocitos humanos y moléculas relacionadas. *Immunología* 1988;7:93-8.

Recibido: 4 de octubre de 1999. Aprobado: 10 de octubre de 1999.

Lic. *René A. Rivero Jiménez*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: (537) 578268. Fax: (537) 338979. e mail:ihidir@hematol.sld.cu