

## Trabajo de revisión

### Hibridomas, Interferón y Biotecnología<sup>(1)</sup>

EDUARDO PENTÓN ARIAS

Centro de Investigaciones Biológicas

Apartado 6996

La Habana, Cuba

*Recibido el 5 de febrero de 1985*

#### INTRODUCCION

Desde el punto de vista operacional, los procedimientos para obtener organismos unicelulares productores predeterminados de proteínas o péptidos de interés, pueden involucrar manipulaciones de nivel molecular (recombinación y transfección de ADN), de nivel celular (fusión de protoplastos, hibridación y transformación celulares) o una combinación adecuada de ambos tipos de tecnologías.

El enfoque molecular implica operar directamente sobre las estructuras químicas portadoras de la información genética, las cuales, después de manipuladas del modo conveniente, transfieren estrictamente la información deseada a células receptoras apropiadas en condiciones preferenciales de expresión. De esta forma, es posible dirigir y controlar desde el exterior el clonaje y la expresión de un gen, así como formular hipótesis y predicciones cuya verificación experimental conduce a conclusiones inequívocas, a causa de que se controlan directamente las variables fundamentales del proceso.

Los procedimientos de nivel celular (células superiores), mucho menos controlables que los anteriores, dan lugar, sin embargo, a "construcciones" (hibridomas, hibricitos, protoplastos, células transformadas), que pueden retener la capacidad propia de procesar información con intrones y de efectuar modificaciones postraduccionales del producto, lo cual haría posible la producción de: *i.* proteínas complejas (con varias subunidades); *ii.* proteínas conjugadas (p. e., glicoproteínas) e inclusive; *iii.* más de una proteína de interés por la misma célula.

Esta concepción unificadora encierra un propósito generalizador y conforma un marco conceptual, según el cual las técnicas de ingeniería genética, hibridación y transformación celulares, transfección de ADN, fusión de protoplastos y otras similares, deben ser consideradas como variantes a seleccionar o combinar racionalmente para obtener e identificar organismos unicelulares rediseñados genéticamente para producir proteínas o péptidos cuya expresión es objeto de interés.

Un enfoque integral como el propuesto nos parece importante porque proporciona una variedad de opciones metodológicas, y propicia una interacción muy conveniente entre especialistas en ingeniería genética, inmunoquímica, síntesis química de nucleótidos y péptidos, cultivo de tejidos, virología y otras ramas afines, en áreas de convergencia interdisciplinaria.

Los resultados de tal interacción se aprecian ya en la literatura de los últimos años con tecnologías tan promisorias como el clonaje en células de organismos superiores (Bolon, 1984), la inmunoprecipitación de polisomas para obtención de ARNm (Shapiro, 1981), la síntesis de vacunas peptídicas (Sela, 1984), la inmunoidentificación de la expresión de un producto después del clonaje del gen correspondiente (Young, 1983), y otras.

## EL LINFOCITO COMO MODELO DE SISTEMA BIOLÓGICO

El linfocito constituye un sistema biológico con características particulares, que permiten abordar con criterio unitario las diferentes vertientes de aplicación de la biotecnología al trabajo con células de organismos superiores. Esta tendencia, al principio desplazada casi completamente en favor de los microorganismos del tipo de las bacterias y levaduras, viene ganando terreno en la medida en que estos últimos muestran su alcance real y sus limitaciones.

En efecto, los linfocitos incluyen entre sus importantes funciones la de producir dos tipos de proteínas con acciones a distancia; ellas son las inmunoglobulinas y las linfoquinas. Las primeras se producen en grandes cantidades y son proteínas bien caracterizadas, cuyo papel central en el sistema inmunitario ha sido establecido desde hace ya décadas. Las del segundo grupo, quizás no menos importantes, pero sí mucho peor conocidas, ejercen efectos intercelulares a más corta distancia, los cuales se manifiestan a tan bajas concentraciones que por mucho tiempo estas sustancias han escapado a los esfuerzos de aislarlas y caracterizarlas.

Las funciones e interacciones de las linfoquinas (Cohen, 1979) han sido estudiadas empleando preparaciones muy impuras con las que se manifiestan mezcladas y superpuestas. Sólo en la última década esta situación ha comenzado a variar, al menos para algunos miembros prominentes del grupo (interferón *gamma*, interleuquina 2, linfoquinas), gracias a la intervención de la ingeniería genética y los anticuerpos monoclonales. El empleo de estos últimos para el aislamiento y caracterización de algunas linfoquinas (Luben, 1980; Novick, 1983a) constituye un ejemplo notable de potenciación y retroalimentación en la acumulación de conocimientos sobre este sistema biológico, por el cual los linfocitos B proporcionan las herramientas para estudiar los productos de los linfocitos T.

## HIBRIDOMAS E INTERFERON (IFN)

Los interferones son proteínas de tres tipos moleculares: *alfa* (leucocitario), *beta* (fibroblástico) y *gamma* o inmune (linfocitos T), que se caracterizan porque poseen una potente acción antiviral mediada por células (por la cual fueron descubiertos), así como propiedades inmunomoduladoras y antiproliferativa tumoral. Con independencia de las posibilidades de aplicación clínica, avisadas ya desde su descubrimiento (Isaac y Lindenmann, 1957) y derivadas de las propiedades biológicas de estas moléculas, es incuestionable el carácter propulsor (heurístico) y el papel central que les ha correspondido desempeñar en el desarrollo contemporáneo de la biotecnología.

La escasa concentración y pureza de las preparaciones de interferón inicialmente disponibles y la necesidad de grandes cantidades para su caracterización, especialmente para el estudio de sus efectos biológicos y clínicos, determinaron que se produjera una rápida progresión de investigaciones encaminadas a lograr el incremento de la síntesis del producto, así como el de la concentración y pureza de sus preparaciones. Con estos propósitos se desarrollaron paralelamente dos vertientes de trabajo, la primera de ellas orientada a estimular la síntesis por las propias células productoras y purificar el interferón por métodos convencionales a partir

de grandes cantidades de preparaciones crudas enriquecidas en el producto (Cantell, 1981 a y b; Bodo, 1981; Leong, 1981).

La segunda variante consistió en un enfoque esencialmente nuevo: el clonaje de genes de interferón humano, en bacterias propagables *in vitro* en grandes cantidades, asociados a fuertes promotores que aseguraran una intensa expresión (Pestka, 1981), empleándose para la purificación (Stahelin, 1981 a; Allen, 1982) inmunoadsorbentes preparados con anticuerpos monoclonales obtenidos según la tecnología de hibridización (fusión) linfocitaria (Kohler y Milstein, 1975).

Las técnicas de fusión celular para la obtención de heterocariotes y células híbridas son conocidas y se utilizan desde hace más de veinte años. Por ejemplo, la segregación sistemática de los cromosomas humanos por generaciones sucesivas de células híbridas humano x ratón, ha sido un procedimiento muy empleado para la asignación a un cromosoma específico de genes cuya traducción fenotípica desaparece cuando es segregado el cromosoma portador. Sin embargo, solamente en la última década la tecnología de la hibridización celular se ha divulgado profusamente en el mundo, a partir de los trabajos de Köhler y Milstein, que presentan por primera vez un procedimiento práctico y efectivo para la producción *in vitro* e *in vivo* de inmunoglobulinas con especificidad predeterminada.

El método propuesto por Köhler y Milstein, hoy ampliamente utilizado en numerosos países en innumerables variantes y versiones, consiste esencialmente en la obtención de linfocitos B esplénicos de ratones (e. g., Balb/C) previamente inmunizados y su fusión con células de una línea de mieloma de ratón (p. e., X63.Ag8; Sp2; P3U1; etcétera), productora de tumor ascítico, no productora de inmunoglobulinas y deficiente en la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT<sup>-</sup>). De este modo se logra la inmortalización *in vitro* de células híbridas linfocito B/mieloma (hibridomas), productoras de inmunoglobulinas específicas (anticuerpos monoclonales) contra epítopes individuales del antígeno con el que fue inmunizado el ratón. Estos hibridomas, al quedar completados con genes linfocíticos producen HGPRT<sup>+</sup> y adquieren la capacidad de crecer en el medio selectivo HAT letal para células HGPRT<sup>-</sup>, siendo aislados y cultivados independientemente para asegurar que cada colonia o clon proceda de una sola célula híbrida (clonaje).

De los hibridomas obtenidos, según se ha descrito, se seleccionan los productores de las inmunoglobulinas deseadas, los cuales se cultivan *in vitro*, o se inoculan al ratón para producirles un tumor ascítico y obtener, en los sobrenadantes de los cultivos o en los líquidos ascíticos, los anticuerpos monoclonales correspondientes con características invariables, reproducibles y bien definidas en cuanto a tipo, especificidad, afinidad, etcétera. A causa de las condiciones señaladas, estos verdaderos "reactivos inmunológicos" se utilizan como herramientas de trabajo con propósitos analíticos y preparativos en la identificación, purificación, cuantificación y caracterización de diversas moléculas biológicas y resultan especialmente útiles para el estudio de sustancias, que como el interferón, manifiestan gran actividad con pequeñísimas concentraciones presentes en los tejidos o en los líquidos en que se excretan o distribuyen hacia los sitios efectores.

## HIBRIDOMAS E HIBRICITOS

Por extensión del concepto de hibridoma surge el de hibricito, que al igual que los primeros, se obtendrían por fusión de dos células de linaje común, dando lugar a células híbridas en las que cada parental aporta genes que por complementación pueden determinar en el híbrido

características tales como la producción de una proteína, la perpetuación como línea, la tumorigenicidad, la capacidad de crecer en medios selectivos, etcétera. Es posible, además, incorporarles otros genes por transfección, transformación o recombinación de ADN.

Con arreglo al modelo propuesto cabe suponer, que si se dispone de líneas celulares establecidas que acepten como copartícipe de fusión células compatibles especializadas en la producción de determinadas proteínas (p. e., células productoras de insulina, de hormona del crecimiento, de renina, etcétera), se pudieran lograr híbridos celulares estables que conserven el carácter productor y que se reproduzcan *in vitro* o *in vivo* indefinidamente. De este modo, los hibridomas podrían ser considerados como un tipo particular de hibricitos secretores de inmunoglobulinas específicas.

Conforme ha sido posible inmortalizar por hibridización los linfocitos B, manteniendo intacta y aun estimulando su función como productores de anticuerpos, es también posible suponer que los hibridomas sean capaces de perpetuar otras funciones del linfocito. Si el copartícipe de fusión fuera un linfocito T sería razonable esperar, según este modelo, que el hibridoma resultante sea capaz de producir, por ejemplo, interferón *gamma* o interleuquina 2. Evidencias de este tipo han aparecido recientemente en la literatura y son comentadas en este trabajo.

Según los antecedentes expuestos, además de la fundamentación teórica existen ya resultados experimentales que permiten considerar los hibridomas (y por extensión, los hibricitos), no sólo como proveedores de anticuerpos monoclonales, sino también como una vía alternativa para la producción de otras proteínas de interés. Una vez más, los interferones han proporcionado un modelo de inestimable utilidad, al demostrarse que al menos uno de ellos, el tipo *gamma*, puede ser producido por hibridomas especialmente diseñados para ese propósito (Le, 1982).

## ANTICUERPOS MONOCLONALES VS ANTIGENOS MINORITARIOS

Una problemática especial está representada por la obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas y péptidos bioactivos cuyos efectos se manifiestan, en condiciones normales, con cantidades muy pequeñas del producto (p. e., del orden de los nano o picomoles). Este puede ser el caso de ciertas hormonas, linfoquinas, interferón, factores de crecimiento, etcétera, que con frecuencia en las preparaciones disponibles para inmunizar el componente de interés tiene una representación minoritaria (p. e., menos del 1%), en relación con el resto de las proteínas. En estos casos se presentan dificultades adicionales a las habituales, tanto en la etapa de inmunización como en la de identificación de clones de células híbridas productoras de inmunoglobulinas específicas, puesto que la obtención de estos últimos se convierte en un evento de baja probabilidad.

En experimentos de fusión realizados a partir de animales inmunizados con diversos esquemas y distintas preparaciones con mayor o menor representatividad de un componente minoritario, ha sido necesario probar cientos de colonias antes de encontrar alguna productora del anticuerpo monoclonal deseado. Es una experiencia común en estos casos que un experimento en el que se logra alta frecuencia de fusión y numerosas colonias de hibridomas con buen crecimiento, resulte completamente inútil, puesto que ninguna de ellas produce la inmunoglobulina que se busca.

La obtención de una o de unas pocas colonias positivas generalmente no resuelve el problema en el orden práctico por situaciones como las siguientes: *i*. Algunos híbridos pueden perder el carácter productor; *ii*. Algunos anticuerpos monoclonales pueden exhibir una afinidad

muy baja, inconveniente para ELISA, o muy alta, indeseable para preparar inmunoadsorbentes; *iii*. Una especificidad muy elevada puede limitar la utilidad del anticuerpo monoclonal a la detección de sólo una entre las diversas variantes moleculares de un antígeno, mientras que una especificidad pobre puede determinar reactividad cruzada con otros componentes que sería útil poder diferenciar; *iv*. Para un ELISA tipo "sandwich" se necesitan al menos dos anticuerpos distintos contra diferentes epítopes, si éstos no se repiten en el antígeno; *v*. Algunos anticuerpos pueden resultar lábiles ante manipulaciones inmuoquímicas necesarias.

Por otra parte, la prueba de los sobrenadantes de los hibridomas (pesquisaje) para la selección de los que producen las inmunoglobulinas específicas que interesan, resulta a menudo otro aspecto crítico, por la necesidad de recurrir al empleo de métodos indirectos, lentos y laboriosos o pruebas de inhibición de la actividad biológica, que suelen tener alta sensibilidad, pero baja reproducibilidad y son afectadas por muchas fuentes de error. Adicionalmente, puede suceder aun que el antígeno contra el cual se quieren generar anticuerpos monoclonales sea pobremente inmunógeno por tratarse de una molécula pequeña, ampliamente distribuida en animales superiores y con relativa homología estructural entre especies. El hecho de que, pese a las circunstancias adversas referidas, en varios casos ha sido posible obtener anticuerpos monoclonales contra antígenos minoritarios, es demostrativo de las poderosas posibilidades de la tecnología y de que es factible encontrar soluciones a esas dificultades.

Los problemas expuestos no son excepcionales ni privativos de algún modelo particular, sino más bien frecuentes y compartidos, al menos parcialmente, por otros sistemas. Por ejemplo, una situación semejante se presenta cuando se desea obtener una respuesta contra antígenos virales, inmunizando con macerados de tejidos o células infectados, en los que el bulto de proteínas procede de las células hospederas y no del virus.

Las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales en el estudio de proteínas y péptidos bioactivos minoritarios, han sido y seguirán siendo de gran utilidad a los efectos de deslindar las acciones específicas de otras introducidas por contaminantes presentes en el sistema, así como para producir inmunoadsorbentes con los que se logran en pocos pasos de purificación preparaciones de elevada pureza y concentración. Renunciar a enfrentar los problemas que estos sistemas plantean implica comprometer la posibilidad de servirse de las ventajas únicas que los anticuerpos monoclonales aportan en el estudio de estas importantes moléculas biológicas.

### ANTICUERPOS MONOCLONALES (AMCs) ANTI-IFN

Los interferones se ajustan típicamente a las características referidas para sustancias que se sintetizan en cantidades mínimas y exhiben su actividad biológica a partir de muy pequeñas concentraciones. Aunque en ellos inciden en mayor o menor grado las dificultades discutidas en relación con los antígenos minoritarios, varios grupos en el mundo a partir de 1980, han reportado la obtención de anticuerpos monoclonales contra los tres tipos de interferón (ver tabla 1). El estudio de estas moléculas ha resultado significativamente favorecido desde entonces por el uso de los anticuerpos monoclonales, cuya utilidad en diversas aplicaciones analíticas y preparativas en este campo (Staehein, 1982) puede ser justamente enfatizada.

En nuestro laboratorio hemos obtenido un clon de hibridomas productor de inmunoglobulinas anti-interferón, a juzgar por la inhibición que éstas producen del efecto protector del interferón sobre la acción citopática y citolítica del virus mengo inoculado a un cultivo de células HEP 2. Para la inmunización se utilizó interferón *alfa* leucocitario ( $1,2 \times 10^6$  y  $5 \times 10^7$  U/mg proteína) obtenido por el método de Cantell (1981 a y b) y sometido a electroforesis preparativa en bloque de gel de poliacrilamida ( $1 \times 11 \times 12$  cm) para lograr la preparación más pura.

Tabla 1

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-Hu-IFN REPORTADOS (HASTA DICIEMBRE DE 1984)

Autores (ref.), año institución y país	Especificidad	Preparación inmunogénica empleada, pureza, concentración	Método de pesquiasaje utilizado (fundamento)	Número de colonias positivas detectadas y observaciones
Secher (1980, 1981) MRC Lab. Mol. Biol. (UK) Morser (1981) Allen (1982) Slocombe (1982) Whittall (1984)	anti-alfa-IFN	IFN linfoblastoide (Namalwa). 2,4 x 10 <sup>7</sup> U/mg prot. (la mejor preparación)	Neutralización de la actividad antiviral de interferón humano alfa	1 colonia positiva de 48 probadas (hibridoma denominado NK2). Ig clase IgG
Montagner (1980) Inst. Pasteur (Francia) Laurent (1982) Meurs (1982)	anti-alfa-IFN	IFN leucocitario (purificado por mét. Cantell) 3 x 10 <sup>6</sup> U/mg (0,1% de la prot. total) en liposomas	Neutralización del efecto antiviral y de la acción anticelular del IFN	1 colonia positiva Inmunoglobulina IgG1
Staehein (1981 a, b y c) Pestka (1983) Hoffman-LaRoche (USA-Suiza)	anti-alfa-IFN	IFN leucocitario (purificado por HPLC) 15-20% de la proteína total	Fijación sobre IFN unido a fase sólida y revelado con Ig de conejo anti-Ig ratón - 125I	13 colonias positivas de 154 probadas. Inmunización con < 1% de IFN no logró hibridomas positivos
Hochkeppel (1981) Biotechnol. GmbH (FRG)	Anti-beta-IFN	IFN beta purificado 1 µg por ratón (7 x 10 <sup>6</sup> U/mg prot.) unido a Sepharosa azul.	Inhibición de actividad antiviral de IFN ensayo reducción de formación de placas	No reporta No. colonias positivas obtenidas. Inmunoglobulina clase IgM
Hochkeppel (1982)	anti-gamma IFN	IFN gamma leucocitario purificado ConA, vidrio poro controlado, gel filtr. Grado de pureza?	Determinación de IFN residual por neutralización de actividad anti-viral	16 colonias positivas. Inmunoglobulina clase IgM
Novick (1982) Weizman Inst. (Israel)	anti-alfa-IFN	IFN leucocitario 2 x 10 <sup>8</sup> U/mg prot., purificado HPLC	Inmunoprecipitación con 2do. anticuerpo. Disociación ácida y ensayo biológico. IFN recuperado	3 colonias positivas de 624 probadas
Novick (1983 a)	anti-gamma IFN	IFN gamma homogéneo purificado por HPLC	Idem	29 colonias positivas de 1400 probadas. Inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgM
Novick (1983 b)	anti-beta-IFN	IFN beta 1 recombinante	Idem	
Meager (1984) Nat. Inst. for Biol. Standards and Control. Celltech Ltd. (UK)	anti-gamma IFN	IFN gamma parcialmente purificado (10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup> UI/dosis)	Inmunoprecipitación con 2do. anticuerpo y revelado con 125I-gamma IFN	16 colonias positivas de 400 probadas

En el experimento cuyos resultados se muestran en la figura 1, las condiciones han sido escogidas para que, con excepción de los pozuelos que se toman como controles del efecto viral, cada uno de los restantes pozuelos de una placa de cultivo portador de una monocapa de células, reciba unas diez unidades de interferón previamente incubado con muestras de los sobrenadantes de hibridomas productores de las inmunoglobulinas cuya capacidad de inhibición del efecto protector del interferón se desea probar. En las placas se introducen también controles positivos y negativos en los que las muestras de sobrenadantes se sustituyen respectivamente por una dilución adecuada de un suero convencional de conejo anti-interferón y por una cantidad equivalente de sobrenadante de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de especificidad irrelevante con relación al interferón.

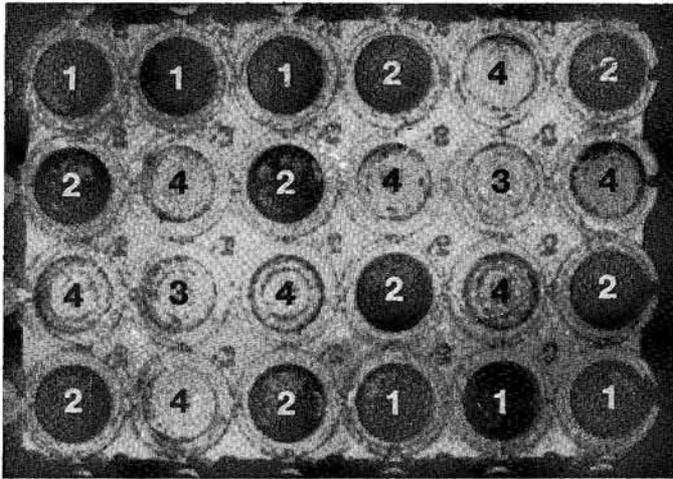


FIG. 1. Pesquisaje de hibridomas productores de inmunoglobulinas (Igs) anti-IFN. Foto de la placa e identificación de las posiciones. 1. Control de células solas; 2. Control negativo (sobrenadante de hibridoma productor de Igs. inespecíficas); 3. Control positivo (dilución de suero de conejo anti-IFN); 4. Sobrenadante de hibridoma productor de Igs. anti-IFN. No aparece en la foto el control del efecto viral en ausencia de IFN que está fuera del sector fotografiado.

Después de incubadas las muestras y los controles con el interferón durante dos horas a 37°C, y 12 horas a 4°C, se centrifugan a 10<sup>4</sup> g durante 20 min, y los sobrenadantes se transfieren a los pozuelos de la placa donde se incuban a 37°C con la monocapa de células durante 24 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. En los casos en que el pretratamiento descrito no modifica la cantidad o actividad de interferón, este último protege las células de la lisis que produce la adición posterior de unas cien dosis infectivas del virus en cada pozuelo, exceptuando los que se toman como controles de células sanas.

En el proceso de revelado de las placas, las células que se mantienen indemnes porque no han sido inoculadas con el virus (control de células sanas) o porque han sido protegidas del virus por acción del interferón (controles negativos), fijan fuertemente el colorante cristal violeta que se les añade en solución, mientras que no toman color las células dañadas por el virus porque no se puso interferón en el pozuelo (controles del efecto viral), o porque el interferón que se puso fue inactivado o precipitado por la presencia de anticuerpos específicos (controles positivos o sobrenadantes que contienen inmunoglobulinas anti-interferón).

---

## INMUNIZACION CON IFN Y PESQUISAJE DE AMCs ANTI-IFN

En las publicaciones sobre el tema es fácil identificar dos problemas principales a resolver de algún modo, para incrementar las posibilidades de éxito en la obtención de anticuerpos monoclonales anti-IFN. El primero de ellos está representado por la dificultad de inmunizar con preparaciones no solamente impuras, sino en las que además el IFN aun después de varios pasos de concentración y purificación puede tener una representación inferior al 1% de la proteína total. El segundo problema lo constituye la selección del método de pesquiasaje a emplear para la detección de las colonias de células híbridas productoras de inmunoglobulinas específicas contra este antígeno.

La impureza relativa de las preparaciones utilizadas para la inmunización y el procedimiento empleado para realizarla son aspectos decisivos en cuanto a las posibilidades de éxito de un experimento de fusión para obtención de anticuerpos monoclonales anti-IFN. Diversos enfoques experimentales han sido empleados en este sentido, siendo nulo o muy escaso el número de colonias positivas obtenidas cuando en los primeros trabajos aparecidos (Secher, 1980; Morser, 1981; Montagnier, 1982; Staehelin, 1981) se utilizaron preparaciones de interferón leucocitario o linfoblastoide (Namalwa) con el grado de pureza habitual para uso clínico ( $10^6$  -  $10^7$  U/mg proteína).

Con la experiencia de los resultados de estos primeros trabajos, otros autores (Staehelin, 1981; Novick, 1982; Hochkeppel, 1981, 1982; Novick, 1983 a y b) decidieron realizar varios pasos de purificación por distintos procedimientos para aumentar la actividad específica de IFN en sus preparaciones a niveles entre el 15% de la proteína total hasta la completa homogeneidad. En varios de estos trabajos se emplearon procedimientos de HPLC y de absorción sobre matrices selectivas, con lo cual lograron preparaciones en las que el IFN ya no era un componente minoritario.

Resulta también de mucha importancia el esquema de inmunización empleado en relación con el tipo y las características del anticuerpo monoclonal que se obtiene. En este sentido prácticamente cada autor preconiza uno u otro esquema, lo cual hace pensar que aún predomina el empirismo en estos procedimientos. Para antígenos solubles parece prevalecer el criterio de utilizar esquemas rápidos de inmunización con reactivaciones a corto intervalo empleando muy pequeñas cantidades del inmunógeno y sacrificando precozmente el animal a fin de obtener mayor diversidad en la respuesta. Hemos utilizado con éxito un esquema consistente en 2-3 inyecciones de la preparación de interferón en PBS sin adyuvante, con intervalos de 2-3 días entre ellas, por la vena de la cola, para un total de 200  $\mu$ g de proteína durante 1-3 semanas, hasta detectar la primera respuesta de producción de anticuerpos.

Por otra parte, la calidad del método de pesquiasaje utilizado como criterio de selección de las colonias positivas, define el destino de todo el trabajo y el esfuerzo invertidos hasta la obtención de los hibridomas. Un procedimiento de pesquiasaje óptimo debería ser simple, rápido, controlado, sensible, específico, reproducible y preferiblemente un micrométodo automatizado.

En efecto, un micrométodo automatizado, simple y rápido, requiere una pequeña cantidad de muestra y permite el pesquiasaje de numerosas colonias en poco tiempo. Su sensibilidad, además, deberá ser suficiente para asegurar la detección de pequeñas cantidades de inmunoglobulinas producidas por colonias de crecimiento aún incipiente y la presencia de controles, así como la especificidad y reproducibilidad del método, darán credibilidad al resultado disminuyendo la probabilidad de falsos positivos y negativos. El carácter inequívoco del procedimiento, por último, evitará situaciones intermedias y ambigüedades que dificultan la decisión.

Diversas e ingeniosas variantes de pruebas de neutralización de la actividad biológica, ELISA, RIA, coprecipitación con un segundo anticuerpo, determinación de actividad residual, adhesión a fases sólidas, etcétera, han sido utilizadas para evidenciar la producción de anticuerpos monoclonales anti-IFN por los hibridomas obtenidos (ver tabla 1).

## USOS DE AMCs ANTI-IFN. DIFICULTADES QUE PERSISTEN

La obtención de preparaciones de anticuerpos monoclonales anti-interferón útiles para su aplicación práctica con propósitos analíticos y preparativos, no ha resultado una tarea sencilla ni puede considerarse completamente concluida en el momento actual, pues aunque varios laboratorios han reportado la obtención de hibridomas productores de inmunoglobulinas específicas y en el mercado están disponibles preparaciones comerciales con distintas calidades y especificidades, persisten todavía un número de problemas que han determinado que su empleo no se haya generalizado como cabría esperar a juzgar por la apremiante necesidad que existe de estos productos.

Los anticuerpos monoclonales y policlonales (Berg, 1981) para la purificación de interferón por cromatografía de afinidad, se han ido imponiendo progresivamente a pesar de que la disponibilidad de preparaciones adecuadas de estos inmunorreactivos es escasa y a muy elevado precio (sobre todo cuando se preparan cantidades importantes de inmunoabsorbentes), y que se ha comprobado, además, cierta contaminación del IFN purificado con cantidades mínimas de inmunocomplejos e inmunoglobulinas de ratón que se desprenden durante la elución (Yonchara, 1981).

Aún persiste, sin embargo, la necesidad de que se generalice el uso de procedimientos inmunquímicos de alta sensibilidad capaces de sustituir definitivamente, en sus aplicaciones rutinarias, al ensayo biológico, por ser este último válido sólo para las condiciones, difícilmente estandarizables, en que se efectúa la determinación, y confiable sólo cuando es posible repetirlo suficientemente para obtener valores con significado estadístico, razones que explican la pobre reproducibilidad y comparabilidad de las determinaciones cuantitativas de IFN efectuadas por los múltiples laboratorios que trabajan la temática en diversos lugares del mundo.

Recientemente se han comenzado a ofertar en el mercado combinaciones de reactivos para determinación de interferones *alfa* y *gamma* cuyos fabricantes reclaman para sus productos niveles de sensibilidad comparables al ensayo biológico, gran especificidad para el tipo de IFN que detectan y falta de reconocimiento de moléculas inactivas de IFN (Pestka, 1983), que ha sido una dificultad presente en varias preparaciones de anticuerpos monoclonales reportadas\*. Si estas características se confirman, probablemente se hayan resuelto los principales problemas.

## HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE IFN GAMMA

La obtención de hibridomas de células T productores de interferón *gamma* sugiere una nueva dimensión para la tecnología de la hibridación celular como alternativa de carácter más general para la producción de organismos unicelulares con características y comportamiento productivo predeterminados.

\* Ha sido propuesto en un artículo reciente (Hermodsson, 1984) un procedimiento inmunobiológico para determinación de IFN que debe detectar solamente moléculas activas pero mantiene los problemas señalados a los ensayos biológicos.

En efecto, a finales de 1982, Junming Le *et al.* reportaron la producción de hibridomas a partir de linfocitos T periféricos de sangre humana estimulados con ConA, por fusión con células de una línea mutante resistente a la 5-tioguanina, no productora de IFN y derivada por irradiación de una línea clonada de linfoma T cutáneo humano. Varios de los hibridomas así obtenidos y especialmente el denominado L265 y sus subclones demostraron capacidad productora de IFN *gamma* cuya actividad antiviral fue neutralizada por antiseros específicos. Niveles de 1330 U/ml de medio sobrenadante fueron producidos espontáneamente y hasta 16 veces esa cantidad por inducción con 12-O-tetradecanoil phorbol 13 acetato. Además del *gamma* IFN algunas otras linfoquinas como TCGF y factor estimulante de colonias aparecieron como componentes menores en los sobrenadantes de algunos cultivos de hibridomas de células T, resultados similares para la interleuquina 2 y otras moléculas inmunorreguladoras habían sido previamente reportados (Okada, 1981).

## CONCLUSIONES

Este trabajo no constituye una revisión exhaustiva, sino analítica y selectiva sobre el tema. Hemos preferido presentar una visión crítica un tanto fuera de lo convencional de las relaciones hibridoma/interferón y su significado en el contexto de la biotecnología contemporánea, limitando las referencias bibliográficas a las consideradas imprescindibles. Los interferones y los linfocitos han sido presentados como sistemas biológicos, molecular el uno y celular el otro, que proporcionan modelos adecuados para una concepción integral de los procedimientos biotecnológicos fundamentales.

La tecnología de hibridización linfocitaria no sólo ha servido para la producción de anticuerpos monoclonales útiles para el estudio de los interferones, sino que hibridomas de linfocitos T han mostrado capacidad propia de producción de considerables cantidades de interferón *gamma*. Si este comportamiento pudiera demostrarse para otros sistemas celulares, los "hibricitos" resultantes constituirían una alternativa ventajosa para la producción de ciertas proteínas complejas y conjugadas.

Aunque unos cinco grupos de trabajo han reportado la obtención de anticuerpos monoclonales contra los tres tipos de interferón, y aunque tanto la purificación con inmunoabsorbentes como las determinaciones con métodos inmunoquímicos ultrasensibles son necesidades urgentes y procedimientos de elección para las investigaciones en este campo, la mayoría de los trabajos que se publican actualmente emplean métodos convencionales para estos fines, lo cual se debe a la escasa disponibilidad y elevados precios de los inmunorreactivos necesarios, así como a que subsisten algunas dificultades técnicas con estos materiales, como por ejemplo, la sobrestimación del producto por la presencia de poblaciones moleculares inactivas biológicamente, pero reactivas inmunológicamente.

A más de un lustro del comienzo de las investigaciones para el desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-interferón, aún no se ha generalizado el uso de los procedimientos inmunoquímicos que los emplean, a pesar de la evidente necesidad de que se impongan como métodos de elección. Las primeras dificultades estaban relacionadas con el carácter minoritario del IFN en las preparaciones disponibles para inmunizar y los complejos procedimientos para el pesquaje de hibridomas productores de estas inmunoglobulinas.

La actual disponibilidad de preparaciones puras de interferones naturales y recombinantes en cantidades adecuadas para inmunizar, hace presumir que en breve estarán accesibles para uso general preparaciones de anticuerpos monoclonales y policlonales mono-específicos con la

calidad y características necesarias para resolver definitivamente las dificultades de la purificación, cuantificación y caracterización de los interferones en beneficio de las investigaciones que en este campo se realizan en múltiples laboratorios de diversos países.

Algunas abreviaturas utilizadas ocasionalmente: IFN(s) = interferón(es); AMC(s) = anticuerpo(s) monoclonal(es); ELISA = *enzyme linked immunosorbent assay*; RIA = radio inmuno ensayo; HPLC = cromatografía líquida de alta eficiencia; ADN = ácido desoxirribonucleico; ConA = concanavalina A; TCGF = *T cell growth factor*; leu-IFN = interferón alfa leucocitario; Hu-IFN = interferón humano; MAB(s) = *monoclonal antibodies*.

## REFERENCIAS

- ALLEN, G.; K. H. FANTES; D. C. BURKE y J. MORSER (1982). *Analysis and purification of Hu-IFN lymphoblastoid (Namalwa) using a MAB*. J. of Gen. Vir. 63, 207-212.
- BERG, K. e I. HERON (1981). *Antibody affinity chromatography of Hu-leu-IFN*. En: Methods in Enzymology 78 (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press. New York and London, pp. 487-499.
- BODO, G. (1981). *Procedures for large-scale production and partial purification of Hu-IFN from lymphocyte (Namalwa) cultures*. En: Methods in Enzymology 78 (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press, N. Y. and London, pp. 69.
- BOLON, A. P. y S. I. SILVERSTEIN (1984). *Techniques of DNA-mediated gene transfer for eukaryotic cells*. En: Techniques in somatic cells Genetic J. W. Shay Ed., Plenum Press, N. Y. and London, pp. 415-428.
- CANTELL, K.; S. HIRVONEN; H. L. KAUPPINEN y G. MYLLYIA (1981 a). *Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus*. En: Methods in Enzymology 78 (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press, New York and London, pp. 29-38.
- CANTELL, K.; S. HIRVONEN y V. KOISTINEN (1981 b). *Partial purification of human leukocyte interferon on a large scale*. En: Methods in Enzymology 78 (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press, N. Y. and London, pp. 499-505.
- COHEN, S.; E. PICK y J. OPPENHEIM (1979). *The Biology of Lymphokines*. Ac. Press, N. Y., San Francisco and London.
- HERMODSSON, S.; Ö. STRANNEGARD y S. JEANSSON (1984). *Bioimmunoassay (BIAs) of human interferon*. Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. 175, 44-51.
- HOCHKEPPEL, H.; U. MENGE y J. COLLINS (1981). *Monoclonal antibodies against human fibroblast interferon*. Eur. J. Biochem. 118, 437-442.
- HOCHKEPPEL, H. K. y M. DE LEY (1982). *Monoclonal antibodies against human interferon gamma*. Nature 296, 258-259.
- ISAACS, A. y J. LINDENMANN (1957). *Virus interference*. I. The interferon. Proc. Royal Soc. 147B, 258-267.
- KOHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity*. Nature 256, 495-497.
- LAURENT, A. G.; J. GRUEST; B. KRUST y L. MONTAGNIER (1982). *Characterization of monoclonal antibody specific for Hu-alpha-IFN*. Hybridoma 1 (3), 313-322.
- LE, J.; J. VILCEK; C. SAXINGER y W. PRENSKY (1982). *Human T cell hybridoma secreting immune interferon*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 79, 7857-7861.
- LEONG, S. y J. S. HOROSZEWICZ (1981). *Production and preparation of Hu (fibroblast) IFN for clinical trials*. En: Methods in Enzymology 78 (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press. N. Y. and London, pp. 78.

- LUBEN, R. A. y M. A. MOHLER (1980). *Use of in vitro immunization in production of monoclonal antibodies against osteoclast activating factor. A method with general application to lymphokines.* En: Biochemical Characterization of Lymphokines, A. L. de Week ed., Ac. Press, N. Y.
- MEAGER, A.; S. PARTI; S. BARWICK; J. SPRAGG y K. O'HAGAN (1984). *Detection of hybridomas secreting monoclonal antibodies to human gamma-IFN using a rapid screening technique and specificity of certain monoclonal antibodies to gamma-IFN.* J. of IFN Research 4, 619-625.
- MEURS, E.; C. ROUGEOT; J. SVAB; A. LAURENT; A. G. HOVANESSIAN; N. ROBERT; J. GRUEST; L. MONTAGNIER y F. DRAY (1982). *Use of an anti-human leukocyte IFN monoclonal antibody for the purification and RIA of human alpha-IFN.* Infection and Immunity. 37 (3), 919-926.
- MONTAGNIER, L.; A. LAURENT y J. GRUEST (1980). *Isolation of a cellular hybrid secreting an antibody specific for human leukocyte IFN.* Comptes rendus hebdomadaires des séances de L'Académie des Sciences, Serie D 291, 893-896.
- MORSER, J.; A. MEAGER; D. C. BURKE y D. S. SÈCHER (1981). *Production and screening of cell hybrids producing a monoclonal antibody to human interferon alpha.* J. Gen. Virol. 53, 257-265.
- NOVICK, D.; Z. ESHHAR y M. RUBINSTEIN (1982). *Monoclonal antibodies to human alpha interferon and their use for affinity chromatography.* The Journal of Immunology 129 (5), 2244-2247.
- NOVICK, D.; Z. ESHHAR; D. G. FISHER; J. FRIEDLANDER y M. RUBINSTEIN (1983 a). *Monoclonal antibodies to human interferon gamma: production, affinity purification and radioimmunoassay.* The EMBO J. 2 (9), 1527-1530.
- NOVICK, D.; Z. ESHHAR y M. RUBINSTEIN (1983 b). *Affinity chromatography of human fibroblast IFN (IFN beta 1) by MAB columns.* J. Gen. Vir. 64, 905-910.
- OKADA, M.; N. YOSHIMURA; T. KAIEDA; T. YAMAMURA y T. KISHIMOTO (1981). *Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78 (12), 7717-7721.
- PESTKA, S. (1981). *Cloning of the human interferons.* En: Methods in Enzymology vol. 78 (Part B), Sydney Pestka, ed. AC. Press N. Y. and London 599-601.
- PESTKA, S.; B. KELDER; J. A. LANGER y T. STAEHELIN (1983). *Monoclonal antibodies can discriminate between some active and inactive forms of leu-IFN.* Arch. of Bioch., 224(1), 11-116.
- SECHER, D. S. y D. C. BURKE (1980). *A monoclonal antibody for large scale purification of Hu-Lue-IFN.* Nature 285, 446-450.
- SECHER, D. S. (1981). *An immunoradiometric assay for Hu-leu-IFN using MAB.* Nature, London 290, 501-503.
- SELA, M. (1984). *Towards totally synthetic vaccines.* Lecture in the 16th FEBS Meeting. Moscow.
- SHAPIRO, S. Z. y J. R. YOUNG (1981). *An immunochemical method for mRNA purification.* The J. of Biol. Chem. 25 (4), 1495-1498.
- SLOCOMBE, P.; A. EASTON; P. BOSELEY y D. C. BURKE (1982). *High level expression of an interferon alpha 2 gene cloned in phage M13 mp7 and subsequent purification with a MAB.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 5455-5459.

- STAEHELIN, T.; D. S. HOBBS; H. F. KUNG; C. Y. LAY y S. PESTKA (1981 a). *Purification and characterization of recombinant Hu-leu-IFN (IFLrA) with monoclonal antibodies*. J. of Biol. Chem. **256** (180), 9750-9754.
- STAEHELIN, T.; C. STAHLY; S. HOBBS y S. PESTKA (1981 b). *A rapid quantitative assay of high sensitivity for human leukocyte IFN with monoclonal antibodies*. En: *Methods in Enzymology*, **78** (Part B), S. Pestka ed. Ac. Press New York and London, pp. 589-595.
- STAEHELIN, T.; B. DURRER; J. SCHMIDT; B. TAKACS; J. STOCKER; V. MIGGIANO; C. STAHLI; M. RUBINSTEIN; W. LEVY; R. HERSHBERG y S. PESTKA (1981 c). *Production of hybridomas secreting monoclonal antibodies to the human leukocyte interferon*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **78** (3), 1848-1852.
- STAEHELIN, T.; B. DURRER; B. SCHMIDT; J. TAKACS; J. STOCKER; V. MIGGIANO; C. STAHLY; F. KUNG; D. S. HOBBS; W. P. LEVY; J. A. MOSCHERA y S. PESTKA (1981-1982). *Monoclonal antibodies to human leukocyte interferons: their use in assay and purification*. Texas Reports on Biology and Medicine. **41**, 43-57.
- WHITTALL, J. T. D.; R. M. KING y D. C. BURKE (1984). *The reaction of the anti-IFN monoclonal antibody NK 2 with different interferons*. J. Gen. Vir. **65**, 629-633.
- YONCHARA, S.; Y. YANASE; T. SANO; M. IMAI; S. NAKASAWA y H. MORI (1981). *Purification of human lymphoblastoid IFN by a simple procedure with high yields*. J. of Biol. Chem. **258** (8), 3770-3773.
- YOUNG, R. A. y R. W. DAVIS (1983). *Efficient isolation of genes by using antibody probes*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **80**, 1194-1198.

---

(1) Trabajo presentado en la Primera Reunión Ordinaria de 1984 de la Sociedad Cubana de Investigaciones sobre Interferón el 17 de enero de 1984.