

Trabajo de revisión

Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales

JORGE GAVILONDO COWLEY

Laboratorio de Hibridomas, Agrupación de Vacunas y Medios de Diagnóstico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apdo. 6162, Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1987

INTRODUCCION

En el año 1984, Georges Kohler y Cesar Milstein recibieron el premio Nobel de Medicina y Biología por las investigaciones que condujeron a la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) de especificidad predeterminada, y al descubrimiento de los principios básicos de su producción controlada.

Los AcM son inmunoglobulinas homogéneas secretadas por clones celulares derivados de una única célula, capaces de proliferar en cultivo y/o propagarse en animales genéticamente compatibles o inmunodeprimidos. Estas células se "construyen" hibridizando linfocitos B normales y células tumorales de igual origen, transfectando oncogenes a linfocitos, o mediante la infección de estos con determinados virus. La alta especificidad de los AcM y la posibilidad tecnológica de su producción en grandes cantidades, han convertido a estos reactivos inmunológicos en una herramienta fundamental de la biomedicina y las ciencias biológicas modernas.

Los AcM se emplean ya para la definición de subpoblaciones celulares, el tipaje de antígenos de tejido y grupos sanguíneos, la detección de niveles de hormonas y otros factores séricos, el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y parasitarias, la demostración de daños tisulares, la detección de sustancias mutagénicas, toxinas, y drogas, y la facilitación del trasplante de órganos y tejidos (McMichael y Farre, 1982; Lerner, 1984; Phillips y Zodda, 1984; Ortho, 1985; Scott, 1985). En disciplinas específicas como la oncología, los AcM son valorados en la actualidad como un elemento relevante en la búsqueda de una mayor especificidad diagnóstica y terapéutica (Damjanov y Knowles, 1983; Oldham, 1983; Davies y Rao, 1984; Poynton y Reading, 1984; Carter, 1985).

En la investigación más fundamental, los AcM se han utilizado en el estudio de las enzimas (Vora, 1985), la determinación de la estructura de los antígenos (Pollock *et al.*, 1984), la detección y análisis de los productos génicos (Kennet *et al.*, 1980), y el estudio de la arquitectura y función celulares (Lin *et al.*, 1984); la conjugación de AcM a matrices adecuadas ha permitido el desarrollo de potentes métodos inmunoquímicos de purificación de diversas moléculas (Petska *et al.*, 1984).

El impacto práctico de los AcM ha provocado que ellos se conviertan en un elemento importante del mercado biotecnológico actual y prospectivo (Anónimo, 1979; Anónimo, 1983;

Kennet *et al.*, 1984a; Nash, 1985). Un estimado reciente de la ONUDI (UNIDO Secretariat, 1984) augura que en el año 1990 los AcM para el diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, la terapéutica y la investigación, se comercializarán en el orden de los miles de millones de dólares.

En este artículo se revisan las características principales de los AcM, sus formas de obtención y aspectos relativos al impetuoso avance de esta tecnología en los últimos años. Al final, se hace una breve reseña del desarrollo actual y perspectiva de esta biotecnología en Cuba.

ANTISUEROS POLICLONALES Y ANTICUERPOS MONOCLONALES

Antisueños policlonales convencionales

En la inmunología básica y en la aplicada se ha venido trabajando durante muchos años sobre la base de los resultados de las reacciones antígeno-anticuerpo, empleando antisueños policlonales obtenidos por métodos convencionales a partir de la sangre de animales inmunizados. Estos antisueños han sido, y son, utilizados para identificar, purificar y detectar enzimas, hormonas y drogas, y han servido como marcadores de diferentes tipos celulares.

Los antisueños convencionales son una mezcla heterogénea de anticuerpos, aun cuando estén dirigidos contra un mismo determinante antigénico y en muchos casos no poseen la suficiente especificidad y sensibilidad que requieren la experimentación y ensayos de la inmunología moderna: su carácter agotable hace difícil la repetibilidad necesaria para muchas de sus posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas (Scott, 1985).

Al ser inoculado un animal con un antígeno particular, los diferentes determinantes antigénicos ("epítopes" si se conocen detalles de su estructura) serán reconocidos por todas aquellas estirpes (clones) de linfocitos B que hayan sido condicionadas durante el desarrollo de la especie para responder ante estas determinadas estructuras moleculares, produciéndose consecuentemente un conjunto de inmunoglobulinas con diferente afinidad, clase y subclase.

Cada célula B fabrica un solo tipo de inmunoglobulina y se ha estimado que el repertorio necesario de anticuerpos está en el rango de los 10 a los 50 millones, calculándose que un determinante antigénico puede ser reconocido por unos 1 000 a 8 000 anticuerpos diferentes (Leder, 1982; Lerner, 1982). Pero cuando se analiza la respuesta real del animal a un antígeno, el organismo produce solo una muestra al azar de su repertorio, que habitualmente es de entre 5 y 10 tipos de anticuerpos mayoritarios contra cada determinante (Kohler, 1976).

Estas especies de inmunoglobulinas pueden ser distintas para un mismo animal que se desangra en diferentes momentos, y más aun si se comparan con aquellas producidas por un segundo animal frente al mismo antígeno. Todo ello ejemplifica el porqué es prácticamente imposible fabricar antisueños idénticos contra un mismo determinante, y su suplemento está limitado por la propia vida del animal con el cual estos se preparan.

Los antisueños policlonales presentan también reactividades cruzadas, imposibles de resolver cuando alguno de los determinantes relevantes del antígeno con que se inmunizó posee una alta homología estructural con los de otro antígeno.

Anticuerpos Monoclonales

Los problemas de falta de heterogeneidad y reproducibilidad de los antisueños convencionales podrían ser resueltos mediante una preparación estable y reproducible de anticuerpos uniformes, con especificidad, afinidad y clase conocidas, que tendría que ser elaborada a partir de las moléculas producidas por solo *una estirpe* de células B. Estas células deberían también

ser capaces de propagarse de manera continua y controlada, sin perder la propiedad de secretar las inmunoglobulinas de interés, con vistas a garantizar su asequibilidad permanente.

La posibilidad práctica de lograr esta idea se encontró cuando Kohler y Milstein inmortalizaron linfocitos B de ratón, productores de anticuerpos específicos, mediante su hibridización con mielomas de cultivo (Kohler y Milstein, 1975). El "hibridoma" formado por la fusión de ambas células hereda del linfocito B parental la especificidad para el anticuerpo secretado, y de la célula de mieloma la capacidad para la propagación indefinida en cultivo o en el animal, así como el fenotipo para la alta secreción de inmunoglobulinas.

Una vez seleccionados aquellos hibridomas que secretan el anticuerpo de interés, la monoespecificidad de la preparación de inmunoglobulinas se garantiza mediante la propagación de solo una de estas células, cuya progenie —clon— producirá anticuerpos idénticos. En la práctica, las inmunoglobulinas monoclonales son cosechadas del sobrenadante de los cultivos de hibridomas o del fluido ascítico provocado por el crecimiento tumoral intraperitoneal de estos en animales genéticamente compatibles.

Los AcM son reactivos homogéneos y totalmente reproducibles. En la actualidad existen posibilidades tecnológicas que garantizan su producción en las cantidades que demanda su utilización.

En virtud de que cada AcM reconoce un único determinante antigénico, es posible seleccionar aquel que identifica exclusivamente la estructura molecular de interés, evitando las reactividades cruzadas características de muchos antisueros. De esta forma, las reactividades cruzadas inesperadas se deberán exclusivamente a la presencia de secuencias aminoacídicas idénticas, o muy similares, en proteínas no relacionadas con el antígeno en cuestión (Nigg *et al.*, 1982).

Con AcM se han podido definir antígenos o determinantes antigénicos que no habrían sido identificados con anterioridad mediante antisueros policlonales, por ser débilmente inmunogénicos en el animal. Tal ha sido el caso para un conjunto importante de antígenos asociados a tumores (Davies y Rao, 1984).

Por último, es posible fabricar AcM con características y funciones predeterminadas. Las formas de selección de los hibridomas permiten escoger aquellos que secretan anticuerpos con mayor o menor afinidad, isotipos particulares de inmunoglobulina, capacidad de fijación de complemento, etcétera.

Los AcM no pueden reproducir enteramente el comportamiento observado con las preparaciones policlonales, que están compuestas por varios isotipos de inmunoglobulinas con diferentes afinidades y anticuerpos contra varios de los determinantes del antígeno de interés. Ello hace que los antisueros convencionales exhiban una cierta homogeneidad de comportamiento en diferentes técnicas inmunológicas.

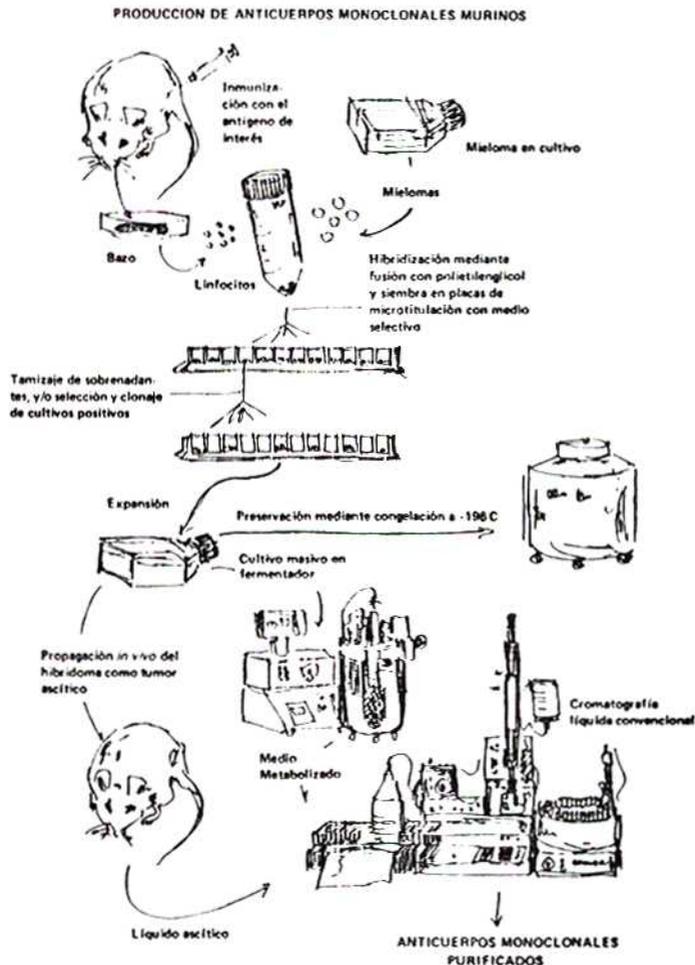
Las preparaciones de AcM pueden manifestar distinto funcionamiento en ensayos inmunológicos de diferente tipo, en dependencia de las características de la interacción del par AcM-epítipo y de las alteraciones en afinidad que pueden producirse cuando los anticuerpos se unen a matrices o fases sólidas. Las preparaciones de AcM pueden también cambiar su comportamiento si el antígeno se somete a distintos tratamientos. Por último, es posible encontrar diferentes funcionamiento y efecto biológico de los AcM en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Davies y Rao, 1984; Falkenberg *et al.*, 1984; Scott, 1985).

Por otra parte, y en el caso de las hibridaciones conducidas con linfocitos de ratón y rata, es muy frecuente la obtención de AcM de la clase IgG; esto, unido a la idéntica afinidad y monoespecificidad de los AcM contenidos en las preparaciones, hace que sean poco útiles en las técnicas de precipitación.

Una forma de solucionar los referidos problemas es la "ingeniería de policlonales", es decir, la combinación controlada de diferentes AcM contra un antígeno, hasta lograr una preparación que posea las propiedades requeridas.

Anticuerpos monoclonales de hibridomas

En la mayoría de los laboratorios del mundo, los AcM se producen a partir de hibridomas generados por fusión de linfocitos y mielomas. El lector puede consultar un volumen importante de textos y revisiones con los detalles teóricos y prácticos de la generación de hibridomas y la producción y purificación de los AcM (Kennet *et al.*, 1980: Cold Spring Harbour Lab., 1980; Fazekas de St. Groth y Scheidegger, 1980; Galfré y Milstein, 1981; Hammerling *et al.*, 1981; Kohler, 1981; Hurrell, 1982; Mitchell y Dettgen, 1982; Waldmann y Milstein, 1982; Allison y Tom, 1983; Goding, 1983; Campbell, 1984; Kennet *et al.*, 1984; Morgan, 1984; Engleman *et al.*, 1985). Los pasos básicos para la generación de hibridomas B de ratón y rata se esquematizan en la figura 1.



En síntesis, los animales son inmunizados con el antígeno de interés mediante un esquema muy dependiente de si este es soluble, en partículas o celular. Para los antígenos pobremente inmunogénicos, estos pueden acoplarse a moléculas de fuerte reactividad inmunológica que actúen facilitando su reconocimiento. Para la inmunización con antígenos solubles y particulados se emplean adyuvantes completos e incompletos y las vías más utilizadas son la subcutánea y la intraperitoneal, o ambas.

Para los antígenos celulares se utiliza frecuentemente la inmunización intraperitoneal o endovenosa, en soluciones balanceadas de sales. Tanto en uno como otro caso, después que el esquema de inmunización produce títulos adecuados en los animales, estos se inyectan con una última dosis de "amplificación" cuyo objetivo es reclutar a la proliferación un número grande de linfocitos B, para proceder a la fusión entre dos y cuatro días después, cuando las células B se encuentran en estado blástico y son capaces de hibridizarse exitosamente.

Los linfocitos se obtienen habitualmente del bazo, por su alto contenido de estas células, y se mezclan con células de mielomas en cultivo, preferentemente en proporciones de 10:1 ó 5:1, para ser sometidos entonces al proceso de hibridización por fusión. La forma más difundida para lograr la fusión entre las células es la adición de polietilenglicol (PEG) al "botón" celular producido por la centrifugación de linfocitos y mielomas.

Los PEG empleados tienen pesos moleculares entre 1 000 y 6 000, pero la mayoría de los trabajos se realizan con PEG 1 500 y 4 000, y en concentraciones de 35 a 50 por ciento. Por su carácter tóxico y por las diferencias entre lotes, los PEG deben ser verificados previamente para su eficiencia de formación de híbridos. Existen algunas diferencias en cuanto a tiempo y formas de incubación de las células con el PEG, pero parece ser fundamental un máximo acortamiento del período en que las células están en presencia del PEG, con vistas a prevenir efectos citotóxicos, sin afectar la eficiencia de fusión.

Una vez sometidos al proceso de hibridización, los linfocitos no fundidos perecerán por su incapacidad de reproducirse *in vitro*, pero los mielomas sin hibridizar y las construcciones no deseadas (híbridos mieloma-mieloma), que pueden competir ventajosamente con los hibridomas linfocito-mieloma recién creados en cuanto a metabolitos, espacio, etcétera, se eliminan en un medio de cultivo selectivo donde solo sobrevivan y proliferen los hibridomas. Para ello se utilizan en la fusión mielomas deficientes en la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), que es esencial para que las células puedan emplear la hipoxantina del medio como fuente de purinas.

El medio de cultivo se suplementa con hipoxantina, timidina y aminopterina (medio HAT) y las células de mieloma no fundidas y los híbridos mieloma-mieloma, que son deficientes de la HGPRT, son eliminados en presencia de la aminopterina por su incapacidad de utilizar la vía de "salvación" para la síntesis de nucleótidos ante el bloqueo de la vía natural "endógena" que produce este compuesto. En este medio selectivo solo sobreviven y proliferan aquellos hibridomas a los cuales el linfocito parental haya aportado el gen para la HGPRT.

Las células recién fundidas se siembran en placas de microtitulación, siendo conveniente utilizar densidades a las cuales la probabilidad de aparición de más de un hibridoma sea baja (la frecuencia de híbridos es de aproximadamente 1 en 100 000 células fundidas). Ello favorecerá que los cultivos no provengan de una mezcla de diferentes híbridos.

En esta etapa de la técnica se adicionan células "alimentadoras", o los sobrenadantes de sus cultivos, cuyo papel es aportar al medio factores estimuladores de la proliferación, que aumentan la eficiencia de generación de híbridos y favorecen su crecimiento clonal inicial.

Una vez que las colonias de hibridomas cubren aproximadamente $\frac{2}{3}$ del área total de crecimiento, se pasa al ensayo de los sobrenadantes para detectar la presencia de los anticuerpos deseados. Existen muchas formas de tamizaje, pero las más empleadas son la inmunofluorescencia indirecta, el radioinmunoensayo, el ensayo inmunoenzimático de fase sólida y la microcitotoxicidad.

Los elementos comunes a cualquiera de las técnicas que se empleen deben ser: ensayo previo de su utilidad para la detección de AcM, sensibilidad adecuada, rapidez en los resultados y posibilidad de múltiples muestras. En una fusión corriente (100 millones de linfocitos y 10-20 millones de mielomas), se pueden obtener entre 250 y 1 000 cultivos de hibridomas. Se sobreentiende que las características anteriores son imprescindibles para que pueda atenderse adecuadamente el cultivo de las células.

Una vez identificados los cultivos secretores se pasa al clonaje repetido de las células de interés, que asegura el carácter monoclonal de las inmunoglobulinas producidas, y a su posterior expansión para la conservación mediante criopreservación y la producción masiva de AcM.

Como se había mencionado antes, los AcM pueden ser producidos mediante el cultivo masivo de los hibridomas, o a partir del fluido ascítico producido por la propagación de estos en la cavidad peritoneal de animales genéticamente compatibles o inmunodeprimidos. En la purificación de los anticuerpos a partir de estas fuentes, pueden emplearse diferentes tipos de cromatografía cuya selección está muy en dependencia del uso a que se destine el AcM y del isotipo de inmunoglobulina de este. Las cromatografías que emplean matrices de intercambio iónico tienen un alto rendimiento y conservación de la actividad biológica de los anticuerpos; también se utilizan las cromatografías de afinidad, gel filtración, adsorción o combinaciones de estas. Los contaminantes más comunes de los AcM en el sobrenadante de cultivos convencionales y el fluido ascítico son la albúmina y la transferrina; en el caso de ascitis también se pueden encontrar inmunoglobulinas contaminantes de especificidad desconocida y enzimas proteolíticas. El objetivo final para el cual se empleará el AcM define el grado de pureza que deben tener las preparaciones; para su uso en matrices de afinidad con vistas a la purificación de antígenos y en sistemas de diagnóstico *in vitro*, es suficiente de 50 a 75 por ciento, pero para la preparación de anticuerpos conjugados y con vistas a ensayos terapéuticos, este valor se incrementa hasta 98-99 por ciento.

AVANCES RECIENTES EN LA TECNOLOGIA

La extraordinaria utilidad de los AcM ha estimulado el progresivo desarrollo de la propia tecnología relacionada con su obtención. En los poco más de diez años que han seguido al descubrimiento de Kohler y Milstein, se han producido avances técnicos significativos que han aumentado la eficiencia en la generación cuantitativa y cualitativa de hibridomas específicos, así como la producción masiva para el consumo.

Generación de hibridomas B específicos

Se han obtenido mielomas de ratón y rata en cultivo, incapaces de sintetizar y/o secretar inmunoglobulinas propias (Kearney *et al.*, 1979; Shulman *et al.*, 1978; Bazin, 1982). Estas líneas celulares permiten que el único anticuerpo secretado por el hibridoma sea aquel comandado por el linfocito B normal parental. Por otra parte, la asequibilidad de mielomas de otra especie diferente al ratón hace posible la generación de AcM contra determinantes antigénicos

poco inmunogénicos en este animal, y amplía las posibilidades de obtención de reactivos monoclonales.

También se ha trabajado en la selección de nuevas líneas de mieloma y donantes de linfocitos que posean mutaciones favorables, para una más eficiente obtención de hibridomas secretores. Un ejemplo reciente son los hibridomas producidos fundiendo células de mieloma deficientes en la enzima adenosina fosforribosil transferasa (APRT), con linfocitos esplénicos de ratones que tienen la traslocación cromosómica Robertsoniana 8,12.

En este caso se ha logrado combinar a los genes para APRT y de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en el mismo cromosoma, de forma que en el medio selectivo solo crecerán los híbridos que producen inmunoglobulinas (método THT o *Taggart Hybridoma Technology*). Ello incrementa el rendimiento de híbridos secretores de anticuerpos en unas 3-10 veces y elimina el problema del sobrecrecimiento de revertantes que han perdido la capacidad para producir anticuerpos (Taggart y Samloff, 1983).

También se han obtenido mielomas y líneas linfoblastoides humanas adecuadas para la construcción de hibridomas humano-humano y la producción de AcM humanos (Kozbor y Croce, 1985; Larrick y Foug, 1985), sobre lo que se tratará específicamente más adelante.

Se han logrado importantes avances en los modelos y técnicas de inmunización. Desde el punto de vista de la forma de inmunización se han desarrollado métodos con vistas a: inmunizar con antígenos poco inmunogénicos (Lane *et al.*, 1986), obtener anticuerpos contra determinantes específicos de un antígeno (Atassi, 1986) y la producción de AcM del tipo IgA (Coldwell *et al.*, 1986). La inmunización intraesplénica única (Spitz, 1986) es atractiva por el tipo de inmunoglobulina producida y la rapidez con que se ejecuta la fusión. Por último, la introducción y el desarrollo de procedimientos de inmunización primaria y secundaria *in vitro* (Jonak y Kennet, 1984; Hoffmann y Hirst, 1985; Boss, 1986; Reading, 1986) han reducido el tiempo de inmunización a solo unos 4-6 días y permiten mantener concentraciones definidas del antígeno durante la inmunización, ensayar el efecto de varias citoquinas, muestrear el cultivo durante el curso del experimento y producir anticuerpos contra antígenos susceptibles de supresión o tolerancia *in vivo*. En el caso de la producción de AcM humanos, las dificultades inherentes a la inmunización *in vivo* hacen que la inmunización *in vitro* se perfila como una de las soluciones principales a su obtención en la práctica (Dorfman, 1985).

Existe una larga serie de artículos con procedimientos y estrategias para incrementar la eficiencia de generación de hibridomas específicos y simplificar la obtención de clones de hibridomas. Entre los más relevantes está el desarrollo de los métodos eléctricos de fusión, que aumentan extraordinariamente la eficiencia de generación de hibridomas (Zimmermann *et al.*, 1985). La combinación de este procedimiento con métodos para la preselección de linfocitos específicos para el antígeno, previa a la fusión, hace posible aumentar la eficiencia de generación de hibridomas secretores de anticuerpos contra el antígeno (Fox *et al.*, 1982).

También se han reportado formas de seleccionar y clonar los hibridomas en un solo paso, mediante la siembra de células recién fundidas en medio gelificado con metilcelulosa (Davies, 1986). De esta forma, los clones de híbridos pueden ser independizados desde los inicios de la técnica.

Anticuerpos monoclonales biespecíficos

En los últimos años se han abierto también nuevas posibilidades relativas a la calidad y especificidad de los AcM producidos. Un ejemplo de ello es la generación de AcM biespecíficos

(Suresh *et al.*, 1986). Estos anticuerpos pueden producirse mediante la fusión de un hibridoma secretor de un monoclonal determinado y un linfocito de un animal inmunizado para otro antígeno, o entre dos hibridomas. Para esto es necesario introducir características de selección en el o en los hibridomas (p.e. sensibilidad al HAT y a la ouabaina) con vistas a que solo sobrevivan las "construcciones" deseadas.

Así, si se hibridizan dos células productoras de anticuerpos, la "construcción" resultante expresa co-dominantemente las cadenas pesadas y ligeras de ambos parentales. Las regiones variables y constantes de cada cadena se encuentran en una única unidad transcripcional y de esta forma permanecerán en el "híbrido-híbrido". Ello produce un número de especies moleculares, de las cuales aquella proveniente de la asociación al azar de las cadenas pesadas, pero con asociación totalmente restringida de cadenas ligeras, dará los rendimientos mejores de AcM biespecíficos.

Como cada unidad básica de inmunoglobulina posee dos sitios de combinación, una proporción de los AcM secretados por los "híbrido-híbridos" serán capaces de reconocer los dos antígenos. Los AcM biespecíficos capaces de reconocer antígenos microbianos y células efectoras de la respuesta inmune pueden representar una nueva vía de estudiar y valorar el papel de la respuesta inmunológica celular en las enfermedades infecciosas.

Los AcM biespecíficos que reaccionan con antígenos asociados a tumores y drogas citostáticas comienzan a estudiarse como nuevas formas de terapia antitumoral (Corvalán *et al.*); por último, estos anticuerpos abren nuevas posibilidades para el desarrollo de sistemas inmunoenzimáticos homogéneos y acoplamiento funcionales de anticuerpos con otras moléculas, sin necesidad de afectaciones estructurales de los primeros (Suresh *et al.*, 1986).

Producción masiva de AcM

Todo el desarrollo relacionado con la obtención de AcM ha estado vinculado desde sus inicios con aquel relativo a la producción masiva de estos para satisfacer la demanda de su uso. Esta producción tuvo, desde sus inicios, una fuente importante en los animales: la introducción de los irritantes intraperitoneales para la generación de grandes volúmenes de ascitis tumoral por la propagación de los hibridomas murinos en ratas y ratones (Hoogenrad *et al.*, 1983) fue un paso esencial en la asequibilidad de AcM, pues las concentraciones de estos en el fluido ascítico puede llegar a ser 100 veces superior a la que se obtienen por los métodos convencionales de cultivo estacionario (Duff, 1985).

Estos resultados han estimulado la valoración de nuevas sublíneas de ratones híbridos, de costo inferior a la línea parental BALB/c, pero con similares rendimientos en términos de anticuerpos producidos (Brodeur y Tsang, 1986) y la búsqueda de nuevos procedimientos para la propagación de los hibridomas murinos (Witte y Ber, 1983; Mueller *et al.*, 1986). Por último, se han producido también AcM humanos en animales inmunodeprimidos, mediante la propagación de los hibridomas humanos en la cavidad peritoneal (Truitt *et al.*, 1984; Kozbor *et al.*, 1985).

A pesar de las ventajas innegables de los animales para la producción de AcM, las exigencias en cuanto a cantidad y calidad que se han generado por la demanda de estos reactivos con fines diagnósticos y terapéuticos, han provocado el desarrollo de la tecnología para el cultivo masivo de hibridomas y la producción, a partir de los sobrenadantes de estos, como una alternativa de menor costo y mayor efectividad (anónimo, 1983).

Se han introducido en la práctica, y con gran éxito, tecnologías para el cultivo masivo de los hibridomas con vistas al "escalado" de la producción de AcM de origen murino y humano.

Entre estas están: el uso de reactores de burbujeo y agitación, los sistemas de cultivo mediante perfusión por fibras huecas y cartuchos de cerámica, y la microencapsulación (Hanisch y Larrick, 1985). Algunos de estos sistemas ya hacen posible el escalado de la producción hasta el nivel de kilogramos, y garantizan las calidades necesarias para la utilización de los AcM en el diagnóstico, la inmunoafinidad y el tratamiento de pacientes (Birch, 1985; Duff, 1985).

Estos trabajos se complementan con aquellos relativos a la confección de medios para el cultivo de hibridomas, con un bajo contenido de suero o proteínas. Tales formulaciones, entre las que ya se incluyen medios químicamente definidos, permiten no solo una disminución de los gastos causados por el uso de suero en los medios de cultivo, sino que también ofrecen mejores condiciones de partida para la purificación de las inmunoglobulinas monoclonales producidas (Murakami *et al.*, 1982; Cleveland *et al.*, 1983; Kawamoto *et al.*, 1986; Kóvar y Franez, 1986; Vélez *et al.*, 1986).

Purificación de AcM

Todo este desarrollo productivo está asociado al relativo a la purificación de las inmunoglobulinas. La asequibilidad de inmunoglobulinas monoclonales ha conducido a la rápida adaptación de procedimientos de purificación ya conocidos, y al desarrollo de nuevas matrices cromatográficas (Bruck *et al.*, 1982; Langone, 1982; Stanker *et al.*, 1985). El aumento en la demanda de AcM ha conducido progresivamente al diseño de verdaderos sistemas integrales para el procesamiento de grandes volúmenes de ascitis o medio metabolizado y su purificación sin alteraciones importantes de actividad biológica (Malm, 1985; Ostlund, 1986; Boonekamp y Pomp, 1986; anónimo, 1986).

GENERACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS MEDIANTE OTROS METODOS

Si bien la hibridación de linfocitos y mielomas sigue constituyendo el principal procedimiento para la obtención de anticuerpos monoclonales, existen otras técnicas potencialmente utilizables para la producción controlada de anticuerpos específicos; entre estas están: a) el cultivo continuo de linfocitos B; b) la transformación directa de las células productoras de anticuerpos mediante virus u oncogenes; y c) el clonaje y expresión de los genes responsables de la síntesis de las inmunoglobulinas.

Cultivos continuos de linfocitos B

En trabajos recientes se han descrito y empleado factores de crecimiento y de diferenciación, que estimulan a las células B en reposo hacia la división y maduración (Cambier, 1986), pero no se ha podido prevenir de una forma efectiva la diferenciación terminal letal.

Los intentos de establecer cultivos continuos de linfocitos B normales para la producción de AcM no han sido eficientes, pues estas células perecen luego de producir cantidades limitadas de anticuerpos. En cambio, es posible propagar clones de linfocitos B humanos en cultivo si se infectan con el virus de Epstein Barr (Crawford, 1985). Estos linfocitos "inmortalizados" secretan pequeñas cantidades de anticuerpos y constituyen, hoy día, una de las variantes para la generación de cultivos secretores de AcM humanos.

La "inmortalización" de células B ha sido lograda también mediante la transfección de ADN tumoral, portador de oncogenes, a células de bazo de ratón (Jonak y Kennet, 1984a).

Este método, si bien no está ampliamente difundido, puede constituirse en uno de relativa importancia futura, a causa de su efectividad.

Clonaje de genes de inmunoglobulinas

Los métodos basados en el clonaje de los genes que codifican para las inmunoglobulinas, poseen hasta el momento varios serios inconvenientes: la frecuencia de células B que secretan el anticuerpo deseado es extremadamente baja en el organismo, lo que hace difícil, si no imposible, obtener cantidades suficientes de los ADN requeridos, y obligan a realizar tales trabajos a partir de hibridomas. A este problema se suma aquel relativo a los procesamientos postranscripcionales y al ensamblaje de la compleja estructura de las inmunoglobulinas, que impiden la expresión de los genes en células inferiores (Teng *et al.*, 1985).

Aun así recientemente se han clonado los genes de las zonas variables de las cadenas ligeras y pesadas de AcM de ratón, a partir de c-ADN de hibridomas, y luego de una adecuada inserción en plásmidos, se han transfectado a mielomas de ratón, junto a los genes para las zonas constantes de inmunoglobulinas humanas (Boulianne *et al.*, 1984). Las células transfectadas secretan entonces AcM "quiméricos", que poseen la especificidad del anticuerpo de ratón, y a la vez, son poco reconocidos como extraños por el humano al tener la región constante, compatible con esta especie.

Además del caso de los AcM quiméricos, que pueden constituir un elemento importante en la terapéutica humana con AcM, se prevén otras áreas de fuerte sinergismo y complementación entre las tecnologías de hibridomas y ADN recombinante; el aislamiento de las secuencias de ADN que codifican para AcM relevantes, su clonaje y la inserción cercana de nuevas actividades y funciones que no posee el anticuerpo original (segmentos de ADN que codifiquen para modificadores de la respuesta biológica, enzimas, toxinas, etcétera), daría lugar a nuevos conjugados recombinantes, que podrían remplazar los conjugados "químicos" de hoy día (Neuberger *et al.*, 1984).

ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS

El interés por la producción de AcM humanos tiene, al menos, tres motivaciones principales: a) el empleo de inmunoglobulinas monoclonales en el tratamiento de pacientes; b) el reconocimiento de detalles de la estructura antigénica no percibidos por los AcM de ratón o rata; y c) el conocimiento de los mecanismos de la respuesta humoral humana y, específicamente, su relevancia en el caso del cáncer, las enfermedades autoinmunes y los procesos alérgicos.

La naturaleza murina de la mayoría de los AcM existentes limita su utilización en la terapéutica humana a causa del reconocimiento inmunológico de estas inmunoglobulinas por el organismo, y el desarrollo de una respuesta que puede acarrear efectos colaterales indeseables y algún peligro en el curso del procedimiento terapéutico (Buck *et al.*, 1984; Kozbor y Croce, 1985). Con AcM de origen humano, a pesar de que pueden ser reconocidos como extraños por el sistema inmunológico de un individuo, es de esperar que la respuesta no deba ser tan fuerte como la prevista para los AcM de ratón o rata. Aparte de su menor antigenicidad, los AcM humanos deben poseer un catabolismo más lento.

Los AcM humanos son producidos en la actualidad a partir de hibridomas murino-humano y humano-humano, así como mediante la immortalización de linfocitos B con el virus de Epstein Barr (EBV).

Estas técnicas tienen una primera dificultad en la fuente y estado de los linfocitos a hibridizar. Los linfocitos humanos pueden ser obtenidos de la sangre periférica, los ganglios linfáticos, las amígdalas y el bazo. En la selección de alguna de estas fuentes están implicados factores, tanto éticos como de la propia respuesta inmunológica ante el antígeno en cuestión (Dorfman, 1985). Así, en no todos los casos es posible realizar inmunizaciones (Larrick, 1985) o tomar la muestra a partir de la población linfóide que supuestamente está más vinculada anatómicamente a la respuesta ante el antígeno de interés.

Una posible solución perspectiva a estas dificultades está en la utilización de la ya referida inmunización *in vitro* con linfocitos humanos, y el empleo de técnicas de preselección de células con la especificidad requerida y procedimientos de fusión más eficientes (Hoffmann y Hirst, 1985; Fox *et al.*, 1982; Dorfman, 1985).

La segunda dificultad para la producción de AcM, al menos por las técnicas de hibridación, está en la asequebilidad de líneas celulares adecuadas para la fusión. Si bien los mielomas de ratón se obtienen a partir de animales inyectados intraperitonealmente con aceite mineral, y son fácilmente cultivables, los mielomas humanos no se adaptan *in vitro* con igual facilidad, y luego, no es común encontrar líneas con altas eficiencias en el proceso de hibridación (Kozbor y Croce, 1985; Larrick y Foung, 1985). En la producción de AcM se han empleado mielomas o líneas linfoblastoides, en cuyo último caso se tienen evidencias de que en su origen puede estar implicado el EBV.

Existen solo unos pocos verdaderos mielomas humanos en cultivo, que se distinguen por su producción de inmunoglobulinas monoclonales idénticas a las que poseía el paciente de que se derivaron, así como por la ausencia de receptores de superficie para el EBV: de tales mielomas, el clon J3/SKO-007 es uno de los más evaluados como pareja de fusión (Olsson y Brams, 1985). Estas células crecen lentamente y su eficiencia de generación de hibridomas es baja. Entre las líneas linfoblastoides que expresan el antígeno nuclear del EBV (EBNA), las más ensayadas en la hibridación han sido las GM1500 6TG-A11 y la LICR-LON-HIMy2 (Kozbor y Croce, 1985).

Con estas líneas se han obtenido AcM humanos contra varios tumores malignos, que incluyen gliomas, cáncer de mama de cervix y melanoma, sarampión, influenza, pneumococos, citomegalovirus, bacilos Gram negativos, células de los islotes pancreáticos, ADN, plaquetas, eritrocitos, antígenos nucleares y otros (Olsson y Brams, 1985; Kozbor y Croce, 1985; Chiorazzi, 1986).

Algunos investigadores han intentado resolver el problema de la producción de AcM humanos con la construcción de hibridomas murino-humano, donde los linfocitos B humanos son fundidos con líneas de mielomas de ratón o de rata (Foung *et al.*, 1985). El mayor problema de estos heterohibridomas es que los clones generados pierden su capacidad de secretar inmunoglobulinas con motivo de la rápida segregación y exclusión de los cromosomas humanos.

Se conoce que los genes que codifican para las cadenas pesadas humanas están en el cromosoma 14 y los de las ligeras (*kappa* y *lambda*) en los cromosomas 2 y 22. Son precisamente estos últimos los que se segregan y excluyen con mayor frecuencia (Kozbor y Croce, 1985). A pesar de este inconveniente, se han podido generar heterohibridomas ratón-humano estables que secretan AcM humanos contra: el antígeno de Forssman, células tumorales humanas de cáncer mamario de pulmón, el toxoide tetánico, el toxoide diftérico y la hemocianina (Chiorazzi, 1986).

Por último, es posible generar células secretoras de AcM humanos mediante la infección de linfocitos B con el EBV. La infección con este virus produce una estimulación policlonal y la producción de células capaces de mantenerse en cultivo continuo (Crawford, 1985).

En virtud de que los linfocitos inmortalizados por estos métodos secretan bajas cantidades de anticuerpos y son relativamente inestables para esta propiedad, varios grupos han propuesto y llevado a cabo la hibridación de clones de estos linfocitos, productores de AcM, con mielomas humanos y murinos; los híbridos así contruidos producen varias veces más anticuerpos y permanecen estables (Roder *et al.*, 1985).

Existen ya muchos ejemplos de AcM generados de células B "inmortalizadas" con el EBV, que se emplean o evalúan para procedimientos diagnósticos; entre ellos están los AcM contra el virus de la influenza, *Clamydia*, *Plasmodium falciparum*, nucleoproteínas y eritrocitos de los grupos A y D. También existen AcM contra el toxoide tetánico, cáncer de pulmón, *Mycobacterium leprae* y antígenos HLA, producidos por la fusión de líneas de linfocitos inmortalizados por el EBV, con mielomas de ratón (Chiorazzi, 1986).

No obstante, existe todavía alguna reticencia al empleo de AcM humanos generados por esta vía en la terapéutica, a causa de la posible presencia de ADN viral en las preparaciones. Para resolver esta dificultad se han diseñado esquemas de purificación que reducen considerablemente este riesgo (Crawford, 1985); existen ya ensayos terapéuticos controlados, en pacientes de cáncer colorectal, donde se utiliza un AcM humano obtenido a partir de una línea linfoblastoide generada por transformación con EBV. Estos AcM humanos del tipo IgM son producidos en cultivo masivo y su aplicación a pacientes no ha producido trastornos (W. Hanna, comunicación personal).

LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN CUBA

Los AcM han revolucionado los métodos diagnósticos, terapéuticos e investigativos con base inmunológica. Ello los ha convertido, junto al clonaje y expresión de genes, en una actividad fundamental de los laboratorios biotecnológicos y biomédicos de los sectores privado, universitario y estatal en muchos países.

A partir de 1982, en Cuba varios grupos comenzaron de manera casi simultánea programas estables de generación de hibridomas B de ratón para la obtención de AcM. Los primeros AcM reportados e introducidos en la práctica fueron los generados contra linfocitos T humanos (García *et al.*, 1984), el interferón *alfa* (Sierra *et al.*, 1983) y la alfabeto proteína (Otero *et al.*, 1984), producidos en el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, el Centro de Investigaciones Biológicas y el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, respectivamente. A cuatro años de aquellos primeros esfuerzos, la tecnología se ha difundido a varias otras instituciones y el repertorio de AcM generados y en uso en diversos trabajos de diagnóstico e investigación sobrepasa la treintena.

En 1987, es de esperar que una cantidad importante de nuevos AcM sea evaluada para su entrada en la práctica. Junto a ello, diferentes grupos están profundizando en aspectos básicos de la tecnología, tales como la producción de AcM humanos, la inmunización *in vitro*, el cultivo masivo de hibridomas, la derivación de nuevas líneas de ratones para la propagación de hibridomas, la generación de anticuerpos monoclonales biespecíficos, etcétera, y se investigan nuevas formas de empleo de estos biorreactivos, ya sea aislados o conjugados con toxinas, drogas, radioisótopos y enzimas.

REFERENCIAS

- ALLISON, J. P. y B. H. TOM (Edit.) (1983). *Hybridomas and Cellular Immortality*. Plenum Press.
 Anónimo (1979). *Monoclonal Antibodies: Clinical Potential of a Growth Industry*. JAMA 242: 2161-2163.

- Anónimo (1983). *Monoclonals by the Million*. New Scientist, 28 July: 271.
- Anónimo (1986). *Take a Closer Look at the Economy of Monoclonal Antibody Purification*. Science Tools **32**: 5.
- ATASSI, Z. (1986). *Preparation of Monoclonal Antibodies to Preselected Protein Regions*. Methods in Enzymology, **121**: 69-95.
- BAZIN, H. (1982). *Production of Rat Monoclonal Antibodies with the Lou Rat Non-secreting IR 938 F Myeloma Cell Line*. Protides Biol. Fluids, **29**: 615-618.
- BIRCH, J. R.; R. BORASTON y L. WOOD (1985). *Bulk Production of Monoclonal Antibodies in Fermenters*. Trends in Biotechnology **3**: 1-5.
- BOONEKAMP, P. M. y R. POMP (1986). *Cation-exchange Chromatography. A one Step Method for Purifying Monoclonal Antibodies from Ascites Fluid*. Science Tools **33**: 5-8.
- BOSS, B. (1986). *An Improved In Vitro Immunization Procedure for the Production of Monoclonal Antibodies*. Methods in Enzymology, **121**: 27-33.
- BOULIANNE, G. L.; N. HOZUMI y M. J. SHULMAN (1984). *Production of Functional Chimeric Mouse/Human Antibody*. Nature **312**: 643-646.
- BRODEUR, B. R. y P. S. TSANG (1986). *High Yield Monoclonal Antibody Production in Ascites*. J. Immunol. Method, **86**: 239-241.
- BRÜCK, C.; D. PORTELLI; C. GLINFUR y A. BOLLFN (1982). *One Step Purification of Mouse Monoclonal Antibodies from Ascites Fluid by DEAE Affi-gel Blue Chromatography*. J. Immunol. Meth, **53**: 313-319.
- BUCK, D. W.; J. W. LARRICK; A. RAUBITSCHIK; K. E. TRUITT; G. SENYK; J. WANG y B. J. DYER (1984). *Production of Human Monoclonal Antibodies (1984)*. En: *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines*. Plenum Press, pp. 275-310.
- CAMBIER, J. C. (1986). *Seeing the Way to B-cell Growth*. Nature **319**: 620.
- CAMPBELL, A. (Ed.) (1984). *Monoclonal Antibody Technology*. Vol. 13, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Pub. Co.
- CARTER, P. W. (1985). *Monoclonal Antibodies and the Biological Approach to Cancer*. J. Biol. Response Modif. **4**: 325-339.
- CHIORAZZI, N. (1986). *Human monoclonal antibodies as probes to study autoimmune and allergic disorders*. Bio/Technology **4**: 210-218.
- CLEVELAND, W. L.; I. WOOD y B. F. ERLANGER (1983). *Routine Large Scale Production of Monoclonal Antibodies in a Protein-Free Medium*. J. Immunol. Meth, **56**: 221-231.
- Cold Spring Harbour Hybridoma Techniques (1980). Cold Spring Harbour Laboratory Publications.
- COLWELL, D. E.; S. M. MICHALEK y J. R. MCGHEE (1986). *Method for Generating a High Frequency of Hybridomas Producing Monoclonal IgA Antibodies*. Methods in Enzymology, **121**: 42-59.
- CORVALAN, J. F. R.; W. SMITH y D. R. BRANDON. *The Specific In Vitro Localization of Drug to Tumor Cells by a Hybrid-Hybrid Monoclonal Antibody*. Nature (en prensa).
- CRAWFORD, D. H. (1985). *Production of Human Monoclonal Antibodies Using the Epstein-Barr Virus*. En: *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, pp. 37-53.
- DAMJANOV, I. y B. B. KNOWLIS (1983). *Biology of Disease: Monoclonal Antibodies and Tumor-Associated Antigens*. Lab. Invest. **510**: 510-525.
- DAVIS, F. M. y P. N. RAO (1984). *Monoclonal Antibodies in the Diagnosis and Treatment of Cancer*. En: *Novel Approaches to Cancer Chemotherapy*. Academic Press, pp. 23-92.
- DAVIS, J. (1986). *A Single-Step Technique for Selecting and Cloning Hybridomas for Monoclonal Antibody Production*. Methods in Enzymology, **121**: 307-322.
- DORFMAN, N. A. (1985). *The Optimal Technological Approach to the Development of Human Hybridomas*. J. Biol. Resp. Mod. **4**: 213-239.
- DUFF, R. G. (1985). *Microencapsulation Technology: A Novel Method for Monoclonal Antibody Production*. Trends in Biotechnology **3**: 167-170.
- ENGLIMAN, E. G.; S. K. H. FOUNG; J. LARRICK y A. RAUBITSCHIK (Ed.) (1985). *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press.
- FALKENBERG, F. W.; D. PIERARD; U. MAI y G. KANTWERK (1984). *Polyclonal and Monoclonal Antibodies as Reagents in Biochemical and in Clinical-Chemical Analysis*. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **22**: 867-882.
- FAZFKAS DE ST. GROTH, S. y D. SCHIEDLGGFR (1980). *Production of Monoclonal Antibodies: Strategy and Tactics*. J. Immunol. Meth, **35**: 1-21.

- FOX, P. C.; F. H. BERENSTEIN y R. P. SIRAGANIAN (1982). *Techniques for Enhancing the Yield of Antigen-Specific Hybridomas*. En: *Hybridomas in Cancer Diagnosis and Treatment*, Raven Press., pp. 15-18.
- GALFRE, G. y C. MILSTEIN (1981). *Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures*. Meth. Enzymology **73B**, Academic Press, pp. 3-46.
- GARCIA, C. A.; J. GAVILONDO; J. F. AMADOR; A. M. VAZQUEZ y A. FERNANDEZ (1984). *Obtención de Hibridomas de Ratón Productores de Anticuerpos Monoclonales que Reconocen Células Humanas de Origen T. II. Caracterización de los Anticuerpos Monoclonales IOR-T1 e IOR-T2*. *Interferón y Biotecnología I*: 29-38.
- GODING, J. (Edit.) (1983). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press.
- GRAVFKAMP, C.; S. J. L. BOL; A. HAGEMEIJER y R. L. H. BOLHUIS (1985). *Production of Human T-Cell Hybridomas by Electrofusion*. En: *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, pp. 323-339.
- HAMMERLING, G. J.; V. HAMMERLING y J. F. KEARNEY (Edit.) (1981). *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*. Elsevier Pub. Co.
- HANISCH, W. y J. W. LARRICK (1985). *Methods for Large Scale Tissue Culture*. En: *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, pp. 458-465.
- HOFFMANN, M. K. y J. A. HIRST (1985). *Principles of In Vitro Immunization of Human B Lymphocytes*. En: *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, pp. 277-289.
- HOOGENRAAD, N.; T. HELMAN y J. HOOGENRAAD (1983). *The Effect of Preinjection of Mice with Pristane on Ascites Tumor Formation and Monoclonal Antibody Production*. *J. Immunol., Meth.* **61**: 317-320.
- HURRELL, J. G. (Edit.) (1982). *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press.
- JONAK, Z. L. y R. H. KENNET (1984). *In vitro Immunization of Mouse Spleen Cells*. En: *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines*. Plenum Press, pp. 368-370.
- JONAK, Z. L. y R. H. KENNET (1984a). *Methods for Transfection of Human DNA into Primary Mouse Lymphocytes and NIH/3T3 Mouse Fibroblasts*. En: *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines*, Plenum Press, pp. 418-422.
- KAWAMOTO, T.; J. D. SATO; D. B. MCCLURE y G. H. SATO (1986). *Serum-Free Medium for the Growth of NS-1 Mouse Myeloma Cells and the Isolation of NS-1 Hybridomas*. *Methods in Enzymology*, **121**: 266-277.
- KEARNEY, J. F.; A. RADBRUCH; B. LISEFANG y K. RAJFWSKY (1979). *A New Mouse Myeloma Cell Line Which has Lost Immunoglobulin Expression but Permits Construction of Antibody Secreting Hybrid Cell Lines*. *J. Immunol.* **123**: 1548-1550.
- KLENNETT, G.; T. J. MCKEARN y K. BECHTOL (Edit.) (1980). *Monoclonal Antibodies -Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*. Plenum Press.
- KENNET, R. H.; K. B. BECHTOL y T. J. MCKEARN (Edit.) (1984). *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines: Progress and Applications*. Plenum Press.
- KENNET, R. H.; K. B. BECHTOL y T. J. MCKEARN (1984a). *Introduction: Reflections on Nine Years of Monoclonal Antibodies from Hybridomas*. En: *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines*, Plenum Press, pp. 3-14.
- KOHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). *Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity*. *Nature* **256**: 495-497.
- KOHLER, G. (1976). *Frequency of Precursor Cells Against the Enzyme Beta-galactosidase. An Estimate of the BALB/c Strain Antibody Repertoire*. *Eur. J. Immunol.* **6**: 340-347.
- KOHLER, G. (1981). *The Technique of Hybridoma Production*. En: *Immunological Methods*, Vol. 2, Academic Press, pp. 285-298.
- KOVAR, J. y F. FRANEZ (1986). *Serum-Free Medium for Hybridoma and Parental Myeloma Cell Cultivation*. *Methods in Enzymology*, **121**: 277-292.
- KOZBOR, D. y C. M. CROCE (1985). *Fusion Partners for Production of Human Monoclonal Antibodies*. En: *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, pp. 21-36.
- KOZBOR, D.; N. ABRAMOW-NEWERLY; P. TRIPPUTI; S. P. C. COLE; J. WEIBEL; J. C. RODER y C. M. CROCE (1985). *Specific Immunoglobulin Production and Enhanced Tumorigenicity Following Ascites Growth of Human Hybridomas*. *J. Immunol., Meth.* **81**: 31-42.

- LANE, R.; R. S. CRISSMAN y S. GINN (1986). *High Efficiency Fusion Procedure for Producing Monoclonal Antibodies Against Weak Immunogens*. *Methods in Enzymology*, **121**: 183-192.
- LANGONE, I. (1982). *Applications of Immobilized Protein A in Immunochemical Techniques*. *J. Immunol. Meth.* **55**: 277-296.
- LARRICK, J. W. (1985). *In Vivo Immunization of Humans*. En: *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, pp. 472-473.
- LARRICK, J. W. y S. K. H. FOUNG (1985). *Human T-and B Cell Lines*. En: *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, pp. 421-425.
- LEDER, P. (1982). *The Genetics of Antibody Diversity*. *Sci. Amer.* **246**: 102-115.
- LENER, R. A. (1982). *Tapping the Immunological Repertoire to Produce Antibodies of Predetermined Specificity*. *Nature* **299**: 592-596.
- LENER, R. A. (1984). *Antibodies of Predefined Specificity in Biology and Medicine*. *Adv. Immunol.* **36**: 1-44.
- LIN, J. J. C.; J. R. FERAMISCO; S. H. BLOSE y F. MATSUMURA (1984). *Monoclonal Antibodies to Cytoskeleton Proteins*. En: *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines*. Plenum Press, pp. 119-152.
- MALM, B. (1985). *A Rapid Method for Isolation of Monoclonal Antibodies from Large Volumes of Hybridoma Cell Culture Supernatants*. Biotech'85 Exhibition, Oc. 21-23, Washington, D.C., USA.
- MCMICHAEL, A. J. y J. W. FARRE (Edit.) (1982). *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*. Academic Press.
- MITCHELL, M. S. y H. F. OETTGEN (Edit.) (1982). *Hybridomas in Cancer Diagnosis and Treatment*. Raven Press.
- MORGAN, J. (1984). *Monoclonal Antibody Production*. En: *Modern Methods in Pharmacology*. Alan R. Liss Inc., pp. 29-67.
- MUELLER, U. W.; C. S. HAWES y W. R. JONES (1986). *Monoclonal Antibody Production by Hybridoma Growth in Freund's Adjuvant Primed Mice*. *J. Immunol. Meth.* **87**: 193-196.
- MURAKAMI, H.; H. MASUI; G. H. SATO; N. SUEOKA; T. P. CHOW y T. KANO-SUEOKA (1982). *Growth of Hybridoma Cells in Serum-Free Medium. Ethanalamine is an Essential Component*. *PNAS USA* **79**: 1158-1162.
- NASH, M. (1985). *On the Emergence of Commercial Products for Biotechnology*. *Trends in Biotechnology* **3**: 219-222.
- NEUBERGER, M. S.; G. T. WILLIAMS y R. O. FOX (1984). *Recombinant Antibodies Possessing Novel Effector Functions*. *Nature* **312**: 604-608.
- NIGG, E. A.; G. WALTER y S. J. SINGER (1982). *On the Nature of Cross Reactions Observed with Antibodies to Defined Epitopes*. *PNAS USA* **79**: 5939-5943.
- OLDHAM, R. K. (1983). *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy*. *J. Clin. Oncol.* **1**: 582-590.
- OLSSON, L. y P. BRAMS (1985). *Human-human Hybridoma Technology*. En: *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, pp. 227-245.
- Ortho Multicenter Transplant Group (1985). *A Randomized Clinical Trial of OKT3 Monoclonal Antibody for Acute Rejection of Cadaveric Renal Transplants*. *New Engl. J. Medicine* **313**: 337-342.
- OSTLUND, C. *Large Scale Purification of Monoclonal Antibodies*. *Trends in Biotech.* (enviada).
- OTERO, A. J.; J. SARRACENT; J. L. FERNANDEZ-YFRO e I. RODRIGUEZ (1984). *A Ten Microliter UltramicroELISA for Detection of Monoclonal Antibodies Against Human Alfafetoprotein*. *Hybridoma* **3**: 391-396.
- PESTKA, S.; H. -FU KUNG; B. DURRER; J. SCHMIDT y T. STAEHELIN (1984). *Monoclonal Antibodies to the Interferons: their use in Assay and Purification*. En: *Interferon*, Vol. 2: *Interferons and the Immune System*. Elsevier Pub. Co., pp. 249-262.
- PHILLIPS, S. M. y D. N. ZODDA (1984). *Monoclonal Antibodies and Immunoparasitology*. En: *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines*. Plenum Press, pp. 239-274.
- POLLOCK, R. R.; J. L. TEILLAUD y M. D. SCHARFF (1984). *Monoclonal Antibodies: A Powerful Tool for Selecting and Analyzing Mutations in Antigens and Antibodies*. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 389-417.
- POYNTON, C. H. y C. L. READING (1984). *Monoclonal Antibodies: A Review of Some of the Possibilities for Cancer Therapy*. *Exp. Biol.* **43**: 13-33.
- READING, C. L. (1986). *In Vitro Immunization for the Production of Antigen-Specific Lymphocyte Hybridomas*. *Methods in Enzymology*, **121**: 19-27.

- RODER, J. C.; S. P. C. COLE; T. ATLAU; B. G. CAMPLING; R. C. MACGARRY y D. KOZBOR (1985). *The Epstein-Barr Virus-Hybridoma Technique*. En: Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies. Plenum Press, pp. 55-70.
- SCOTT, M. G. (1985). *Monoclonal Antibodies- Approaching Adolescence in Diagnostic Immunoassays*. Trends in Bio/Technology 3: 170-175.
- SHULMAN, M.; C. D. WILDE y G. KOHLER (1978). *A Better Line for Making Hybridomas Secreting Specific Antibodies*. Nature 276: 269-270.
- SIERRA, G.; P. WRIGHT; J. GAVILONDO y E. PENTON (1983). *Híbrido productor de inmunoglobulinas anti-interferón recobra su pérdida. Expresión de inmunoglobulinas específicas en presencia de interferón*. Memorias del Primer Seminario Cubano sobre Interferón, La Habana, pp. 135.
- SPITZ, M. (1986). *"Single Shot" Intrasplenic Immunization for the Production of Monoclonal Antibodies*. Methods in Enzymology, 121: 33-41.
- STANKER, L. H.; M. VANDERLAAN y H. JUAREZ-SALINAS (1985). *One Step Purification of Mouse Monoclonal Antibodies from Ascitis Fluid by Hydroxylapatite Chromatography*. J. Immunol. Meth. 76: 157-169.
- SURESH, M. R.; A. C. CUELLO y C. MILSTEIN (1986). *Bispecific Monoclonal Antibodies from Hybrid Hybridomas*. Methods in Enzymology, 121: 210-228.
- TAGGART, R. T. e I. M. SAMLOFF (1983). *Stable antibody-producing murine hybridomas*. Science 219: 1228-1230.
- TENG, N. N. H.; G. R. REYES; M. BIEBER; K. E. FRY; K. S. LAM y J. M. HEBERT (1985). *Strategies for Stable Human Monoclonal Antibody Production*. En: Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies. Plenum Press, pp. 71-91.
- TRUITT, K. E.; J. W. LARRICK; A. A. RAUBITSCHKE; D. W. BUCK y S. W. JACOBSON (1984). *Production of human monoclonal antibody in mouse ascites*. Hybridoma 3: 195-199.
- UNIDO Secretariat (1984). *Biotechnology for Developing Countries*. Document V.84: 83242.
- VELEZ, D.; S. REUVENY; L. MILLER y J. D. MACMILLANS (1986). *Kinetics of Monoclonal Antibody Production in Low Serum Growth Medium*. J. Immunol. Meth 86: 45-52.
- VORA, S. (1985). *Monoclonal Antibodies in Enzyme Research: Present and Potential Applications*. Analyt. Biochem. 144: 307-318.
- WALDMANN, H. y C. MILSTEIN (1982). *Monoclonal Antibodies*. En: Clinical Aspects of Immunology. Vol. 2, Blackwell Sci. Pub., pp. 476-503.
- WITTE, P. L. y R. BER (1983). *Improved Efficiency of Hybridoma Ascites Production by Intrasplenic Inoculation in Mice*. J. Natl. Cancer Inst. 70: 575-577.
- ZIMMERMANN, U.; J. VIENKEN; J. HALFMANN y C. C. FMEIS (1985). *Electrofusion: A Novel Hybridization Technique*. Adv. Biotech. Processes. 4: 79-150.