rol en la angiogénesis y en la regeneración nerviosa y de tendones (Cohen, 1987; Elliot, 1980; O' Loughlin *et al.*, 1985; Goldsmith, 1983 y Tsutsumi *et al.*, 1986).

El EGF humano y el agente antisecretorio conocido como urogastrona son idénticos y presentan una fuerte homología de secuencia con el EGF de ratón, de forma tal que 37 de los aminoácidos son iguales, con tres puentes disulfuro localizados en las mismas posiciones relativas; más aún, solo dos de los 16 aminoácidos no homólogos no pueden ser interconvertidos por un simple cambio de base en los tripletes del código genético (Harper *et al.*, 1987).

Como es de esperar, el EGF de ratón es reconocido por el receptor de EGF presente en las células humanas, y sus actividades biológicas son casi indistinguibles (Cohen, 1987).

Teniendo en cuenta los datos recientes que indican la utilidad potencial del EGF humano como medicamento para la cicatrización de heridas (Van Brunt y Klausner, 1988), y los ensayos en curso que evalúan al EGF como posible agente antitumoral (Fonseca *et al.*, 1989), nosotros hemos trabajado en nuestro Centro en la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) con vistas a su empleo en la construcción de inmunoensayos analíticos para el seguimiento del proceso de producción de la molécula recombinante.

Estos ensayos son complementarios a los análisis de radiorreceptores que comúnmente se emplean para la evaluación final de la actividad biológica de los lotes producidos (Macías *et al.*, 1985).

Los inmunoensayos para EGF pueden también ser usados para estimar la concentración de EGF en fluidos y tejidos, durante ensayos preclínicos y clínicos con esta molécula; de hecho, algunos autores han reportado recientemente los datos de las concentraciones de EGF en saliva, suero, leche, orina, etcétera (Connolly y Rose, 1988; Pesonen *et al.*, 1987; Hirata *et al.*, 1980; Hirata *et al.*, 1982 y Joh *et al.*, 1986).

Estos AcM también pueden ser empleados en técnicas inmunohistoquímicas para la detección de las células que expresan el receptor de EGF, aprovechando la presencia del ligando en la superficie celular.

En este artículo reportamos la obtención de AcM que reconocen EGF humano recombinante (rhEGF) y EGF murino natural. Se presentan también los primeros resultados obtenidos en la construcción de radioinmunoensayos y ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA con estos AcM.

MATERIALES Y METODOS

Antígenos

El rhEGF, producido en levadura, y los interferones recombinantes humanos α2b y γ (α-IFN, γ-IFN), producidos en bacterias, fueron suministrados por la Planta Piloto/División de Producción del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, con un alto grado de pureza. El EGF natural de ratón fue suministrado por el Departamento de Bioquímica Tumoral del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología.

Inmunización

Hembras BALB/c, de peso corporal entre los 22-24 g, se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) e intraperitonealmente (i.p.), con un total de 20 μg de rhEGF por dosis, en los días 0, 7 y 21 (la primera dosis con adyuvante completo de Freund y las restantes con adyuvante incompleto); una semana después de la última dosis se estimó el título de anticuerpos de los animales (ver más adelante), y los escogidos se inocularon (i.p.) con 50 μg de rhEGF en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), pH 7,2, tres días antes de la fusión.

Fusión, cultivo y clonación de hibridomas

Las células esplénicas se hibridaron en proporción 10:1 con las líneas Sp2/O-AG-14 (Shulman *et al.*, 1978), o P3/x63-Ag8-653 (Kearney *et al.*, 1979), a temperatura ambiente, mediante fusión con polietilenglicol 1450 (Sigma) al 45 %. Los detalles de la técnica aparecen en publicaciones previas (Gavilondo *et al.*, 1988).

Las células se sembraron a 1,0 millón/ml en medio selectivo HAT, conteniendo 3 % de sobrenadante de células endoteliales humanas (HECS, Astaldi *et al.*, 1980), a razón de 100-150 µl por cada pozo, en placas de microtitulación (Costar No. 3596).

Luego de 10 días, la aminopterina se retiró progresivamente del medio de cultivo y los sobrenadantes se ensayaron para la presencia de anticuerpos específicos cuando las células cubrieron aproximadamente 2/3 del área de cultivo.

La clonación de los hibridomas de interés se realizó por dilución limitante. Para la expansión de los clones con vistas a su inoculación a animales y la cosecha de sobrenadante rico en anticuerpos, las células se cultivaron en suspensión en frascos *spinner* de 2 litros (Bellco).

Ensayo inmunoenzimático tipo ELISA para la detección de anticuerpos específicos para rhEGF

Para la determinación de la actividad de los sueros de ratones, los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas y los anticuerpos purificados, se empleó un sistema inmunoenzimático tipo ELISA indirecto, donde las placas se recubrieron con 10 µg/ml de rhEGF, tal como se describe en otras publicaciones (Duarte *et al.*, 1987).

Se emplearon como controles negativos los sueros de ratones no inmunizados, otros AcM de diferente especificidad -en forma de sobrenadante o purificados-, así como antígenos diferentes al EGF en el recubrimiento (α-IFN, γ-IFN y seroalbúmina bovina). En el caso del tamizaje primario de los hibridomas, se consideraron secretores de anticuerpos específicos los cultivos cuyos sobrenadantes arrojaron valores de absorbancia tres o más veces superiores a las medias de los controles negativos, en tres pruebas consecutivas de ELISA con rhEGF (con 48 horas de intervalo), y que no reaccionaban con los antígenos no relacionados.

Radioyodación del rhEGF

El rhEGF y el EGF de ratón fueron marcados con 125-Yodo (Amersham) siguiendo esencialmente el método de cloramina-T (Hunter y Greenwood, 1962).

Radioinmunoensayo de fase sólida (RIA-FS) para la detección de anticuerpos específicos para el rhEGF y el EGF de ratón

Se recubrieron tiras de pozos de poliestireno (Dynatech) con 10 µg de anticuerpos policlonales anti IgG de ratón, por mililitro de tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6, durante tres horas a 37°C, y los sitios libres se bloquearon con 2 % de leche delipidizada en tampón de recubrimiento, por una hora a 37°C. Se incubaron 100 µl de sobrenadantes de hibridomas durante tres horas a 37°C y después de varios lavados con 0,05 % Tween 20-agua destilada, se añadió a cada pozo 100 000 cpm de rhEGF o EGF de ratón radioyodados, en tampón SSTF más 0,5 % de leche descremada. Después de cinco horas de incubación a temperatura ambiente, los pozos se lavaron repetidamente y se estimó la radioactividad en un contador LKB Clinigamma.

Se consideraron con anticuerpos reactivos contra el EGF aquellos sobrenadantes de hibridomas cuyos valores resultaron tres o más veces superiores a la media de las lecturas registradas en el caso de los controles negativos (sobrenadantes de hibridomas secretores de AcM contra otros antígenos).

Ensayo de competencia para los anticuerpos monoclonales

Para la determinación de la competencia de los AcM por determinantes antigénicos del rhEGF, se siguió el mismo protocolo descrito en el acápite anterior, con la diferencia de que 200 µl de sobrenadante de cada hibridoma se incubaron por separado con: (a) una mezcla de 100 000 cpm de rhEGF radioyodado y 200 µl de un anticuerpo monoclonal de actividad anti-rhEGF predeterminada, y (b) 100 000 cpm de rhEGF radioyodado.

El porcentaje de inhibición de la unión de los anticuerpos de cada sobrenadante y el rhEGF, se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (C - B)/(H - B) \times 10$$

donde *C* son los cpm adsorbidos en la incubación de la mezcla (a) con cada sobrenadante; *H* son los cpm adsorbidos en la incubación con (b), y *B* son los cpm adsorbidos en la incubación del rhEGF radioyodado con un control negativo (AcM que reconocen otros antígenos).

Determinación de la subclase de inmunoglobulinas

Se empleó la técnica de inmunodifusión radial doble (Ouchterlony y Nielsson, 1978) enfrentando sobrenadantes de cultivo concentrados diez veces, a un panel de anticuerpos clasificadores (ICN Immunobiologicals).

Producción y purificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos

Para la producción del AcM CB-EGF.2 fueron inyectados i.p. ratones BALB/c, preinoculados una semana antes con 0,5 ml de aceite mineral, con tres millones de células. El ascitis se recolectó por punción repetida, se clarificó por centrifugación, y se eliminaron los lípidos con cloroformo (v/v) antes de la purificación. Una vez dializado contra SSTF, el ascitis se diluyó con tampón 1,5 M de glicina, 3 M de NaCl pH 8,9 y se aplicó a una matriz de proteína A Sepharose CL-4B *(Pharmacia)*, eluyéndose como recomendado por el fabricante (anónimo, 1986). Después de la purificación, las fracciones se dializaron contra SSTF, y se ensayaron para su actividad utilizando el ELISA indirecto reportado anteriormente. Todas las determinaciones de proteína se hicieron como fue descrito por Lowry *et al.* (1951), y la pureza de los anticuerpos se estimó por electroforesis en geles de poliacrilamida, empleando sulfato dodecilo de sodio (SDS-PAGE, Laemli 1970).

En el caso del AcM CB-EGF.1, se partió de 1 250 ml de sobrenadante de cultivo, que se precipitó con sulfato de amonio al 50 % y, luego de la diálisis, se sometió a la purificación por proteína A Sepharose CL-4B, tal como se describió previamente.

Conjugación de anticuerpos con peroxidasa

Los anticuerpos se conjugaron con peroxidasa de rábano picante (HRP, Sigma, Fraction VI) empleando el método del peryodato, tal como fue sugerido por Nakane, 1978).

Producción de fragmentos F(ab)'2

Para la obtención de fragmentos F(ab)'2 se empleó el fraccionamiento de la molécula de inmunoglobulina con papaína según Mage y Lamoyi (1987). Se emplearon 10 mg de inmunoglobulinas purificadas y 1 mg de enzima. El producto resultante fue aplicado en una columna de proteína A Sepharose CL-4B (Pharmacia) para separar las moléculas de IgG sin digerir de diferentes fragmentos, empleando básicamente el protocolo reportado antes.

RIA-FS para la cuantificación de rhEGF

Se recubrieron tiras de pozos de poliestireno (Dymatech) con 20 µg de anticuerpo monoclonal purificado, o fragmentos de anticuerpos, por mililitro de tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,6, durante tres horas a 37°C, y los sitios libres se bloquearon con 2 % de leche delipidizada en tampón de recubrimiento, durante una hora, a 37°C. Se mezclaron 100 µl de diluciones (1:20-1:200) de las muestras, con 100 000 cpm de rhEGF radioyodado, e incubaron por tres horas a 37°C.

Luego de varios lavados con 0,05 % Tween-20 en agua destilada, los pozos se individualizaron e introdujeron en tubos de conteo, para estimar la radioactividad en un contador LKB Clinigamma.

Como controles negativos se emplearon AcM contra ApoB lipoproteínas (Sorell *et al.* , 1986) como anticuerpos de "captura" en la fase sólida. También se incluyeron controles de "unión total" y "radiactividad total".

Sistema inmunoenzimático para la cuantificación de rhEGF

Se adsorbieron 20 µg de anticuerpo monoclonal a placas de poliestireno (Dynatech), por mililitro de tampón de recubrimiento, durante tres horas a 37°C, a razón de 100 µl por pozo. Los sitios libres remanentes se bloquearon y se añadieron las muestras a cada pozo, en tres réplicas. Después de su incubación durante tres horas a 37°C, las placas se lavaron extensivamente y se añadió un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa (dilución 1:1 000 -1:2 000), por una hora, a 37°C. Luego de estos procedimientos, la técnica se desarrolló tal como se ha reportado en otras publicaciones (Budd y Smith, 1986).

Muestras

Las muestras evaluadas con los sistemas RIA y ELISA fueron preparaciones estándares de rhEGF, con alta pureza, suministradas por la Planta Piloto del Centro, y diluidas (1:50-1:2 000), en SSTF-0,5 % de seroalbúmina bovina.

RESULTADOS

Fusión y ensayos para anticuerpos específicos

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en las dos fusiones realizadas. La generación de híbridos de crecimiento estable en las primeras semanas posteriores a la fusión fue superior en la segunda fusión, mientras que la eficiencia específica resultó mayor en la primera. En estas dos fusiones se emplearon diferentes sistemas de tamizaje primario de los sobrenadantes de hibridomas.

Tabla 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA FUSION (SE EMPLEARON DIFERENTES LINEAS CELULARES DE MIELOMA)

No.	*Línea de mieloma*	*Frecuencia de Hibridización (a)* Total pozos	%	*Eficacia Específica (tamizaje #1) (b) Pozos con IgG*	*Eficacia Específica (tamizaje #2) Pozos con IgG*
F1	Sp2/O-Ag-14	499	54,5	7	6
F2	P3/x63 = Ag8-653	386	75,0	5	5

(a) Número de pozos con crecimiento de hibridomas/número total de pozos.
(b) Número de cultivos con producción de Ac específicos con respecto al número total de cultivos con hibridomas.

A partir de los ensayos de reconocimiento se seleccionaron 8 hibridomas (5 de la primera por ELISA y 3 de la segunda fusión por RIA-FS y RIA-FS de competencia), que fueron clonados y reclonados hasta alcanzar una homogeneidad de comportamiento en al menos el 90 % en los clones, respecto a las pruebas de tamizaje de anticuerpos.

El trabajo se concentró finalmente en los AcM denominados CB-EGF.1 y CB-EGF.2. Ambos son de la subclase IgG1 y reconocen sitios diferentes de la molécula, tal como sugieren los resultados del RIA-FS de competencia, donde la preincubación de CB-EGF.2 con el rhEGF radioyodado no disminuye sensiblemente el por ciento de enlazamiento de radioactividad por la fase sólida activada con CB-EGF.1 (figura 1). Por otra parte, los estudios con empleo de EGF de ratón radioyodado demostraron que el CB-EGF.1 identifica exclusivamente rhEGF, mientras que el CB-EGF.2 reconoce también la molécula murina (figura 2).

Purificación de los anticuerpos monoclonales

La purificación del CB-EGF.1 a partir de sobrenadante de cultivo arrojó rendimientos de aproximadamente 150 μg/ml, con actividad y pureza adecuadas (>90 %). En la purificación del CB-EGF.2 proveniente de fluido ascítico de ratones BALB/c se alcanzó un rendimiento de 1,3-1,8 mg/ml de ascitis, en varios experimentos.

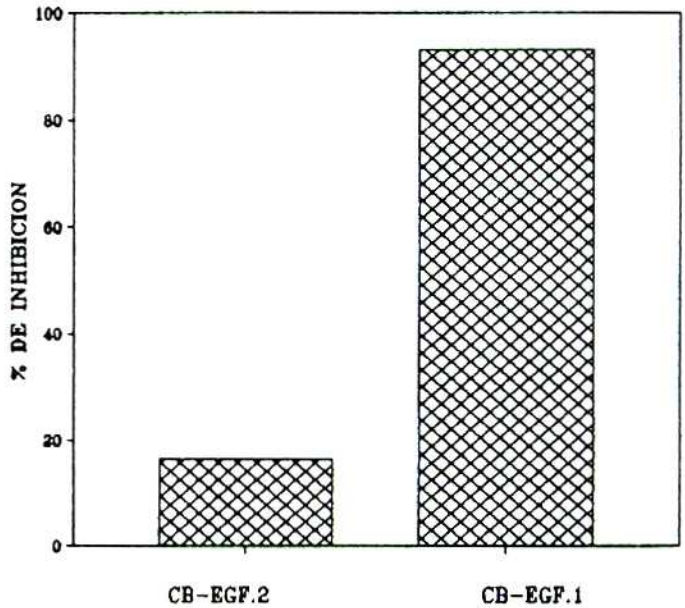

FIG. 1. Reconocimiento del EGF humano por los AcM CB.EGF-1 y CB.EGF-2, utilizando el RIA-FS de competencia.

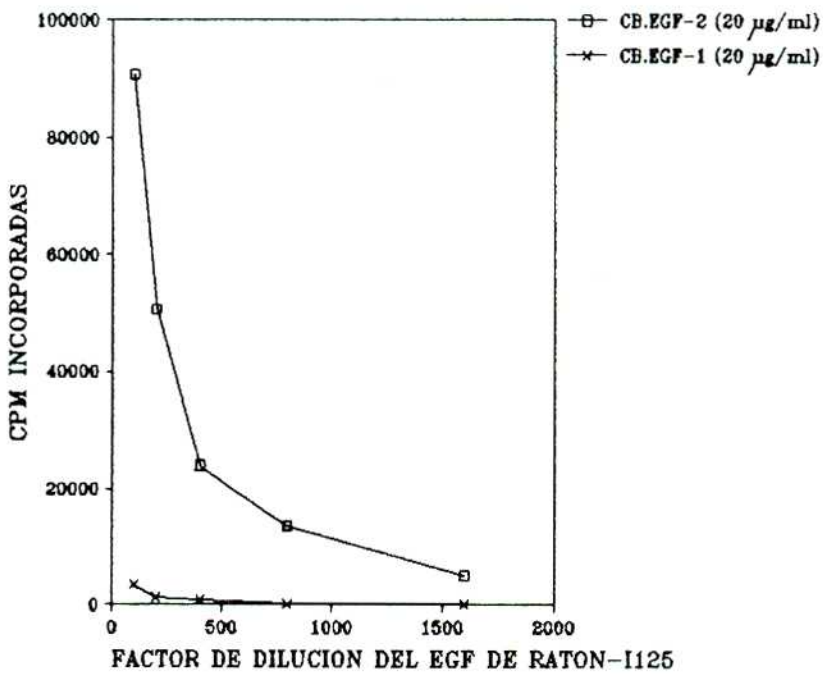

FIG. 2. Ensayo de identificación del EGF de ratón (radioyodado) por los AcM CB.EGF-1 y CB.EGF-2. Radioactividad total: 66,395 cpm; control negativo: 367 cpm.

Cuantificación de rhEGF mediante RIA-FS

La figura 3 muestra la curva estándar para rhEGF, que se obtiene mediante el RIA-FS donde los pozos se recubren con el AcM CB-EGF.1.

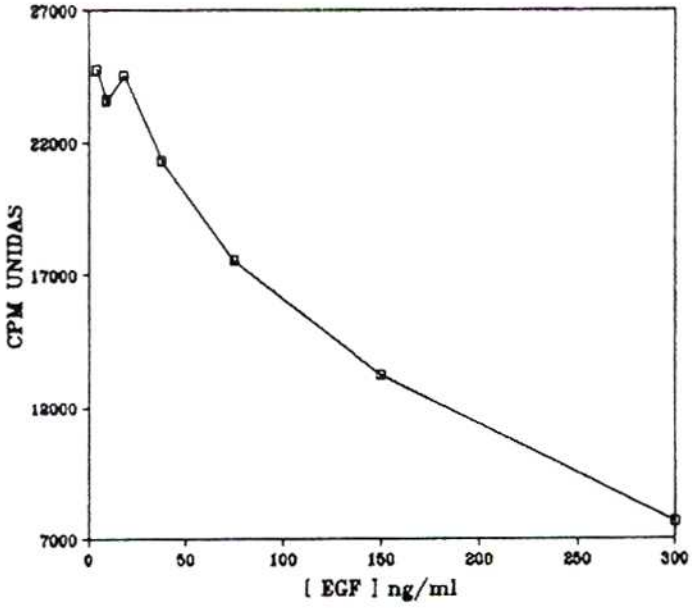

FIG. 3. Curva estándar para la cuantificación de EGF humano recombinante, utilizando el RIA en fase sólida. Radioactividad total: 97,834 cpm; unión total: 28,681 cpm; control negativo: 208 cpm.

La sensibilidad del sistema es de 2 ng/ml de rhEGF y su límite superior de detección confiable es de 300 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayos e interensayos, con este sistema exhibieron rangos de valores entre 3,7 y 11,4 % y 5,4 y 10,7 %, respectivamente (tabla 2).

Tabla 2A

PRECISION DEL RIA EN FASE SOLIDA DETERMINADA CON UN ESTANDAR DE EGF HUMANO RECOMBINANTE

Concentración de EGF (ng/ml)	*Coeficiente de variación Intraensayo (%) (n=4)*	*Coeficiente de variación Interensayo (%) (n=3)*
300	11,4	10,7
150 (a)	10,0	10,5
75	9,1	8,9
37,5	9,0	9,4
19	6,1	7,5
9,5	3,7	8,0
4,2	5,1	5,4
2,1	5,1	6,2

n: Número de réplicas analizadas en cada ensayo, o número de ensayos independientes; (a) = valor que corresponde aproximadamente con el 50 % del valor máximo de radioactividad.

Tabla 2B

REPRODUCIBILIDAD INTERENSAYO PARA EL RIA EN FASE SOLIDA, ESTIMANDOSE LA CONCENTRACION DE EGF HUMANO RECOMBINANTE EN MUESTRAS PROVENIENTES DEL PROCESO DE PURIFICACION DE DICHA MOLECULA

Número de muestra	*Concentración (a) estimada de rhEGF* (μg/ml)	*Coeficiente de variación* (%)
1	8,5 ± 0,3	2,3
2	25,6 ± 1,2	2,5
3	67,0 ± 2,3	5,2
4	173,5 ± 9,9	8,0
5	255,7 ± 22,5	9,8

(a) Determinada por extrapolación sobre una curva estándar simultánea; valores expresados como media y desviación estándar de tres ensayos independientes.

ELISA "sandwich" para la cuantificación de EGF

El sistema ELISA diseñado utilizó el AcM CB-EGF.1 conjugado con peroxidasa, como anticuerpo de revelado, y el CB-EGF.2 como anticuerpo de captura. La figura 4 muestra la curva estándar resultante; la sensibilidad del método es de 6 ng/ml, con un valor máximo de detección correspondiente a 125 ng/ml.

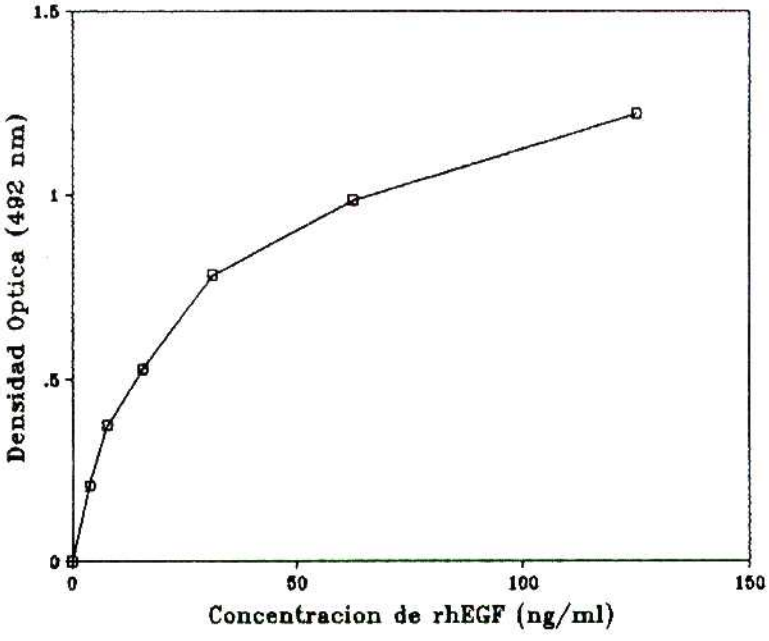

FIG. 4. Curva estándar para la cuantificación de EGF humano recombinante empleando el ELISA secuencial.

Estudios con fragmentos F(ab)'2

Los fragmentos obtenidos a partir del AcM CB-EGF.1 exhibieron un comportamiento similar a la molécula intacta de IgG, en cuanto a niveles de captura de rhEGF (tabla 3); estos fragmentos también inhibieron la unión del antígeno al anticuerpo sin fragmentar (figura 5).

Tabla 3

RECONOCIMIENTO DE LA MOLECULA DE EGF HUMANO POR LOS FRAGMENTOS F(ab)'2 Y POR LA INMUNOGLOBULINA INTACTA, EMPLEANDO EL SISTEMA RIA-FS

AcM o fragmentos	*CPM unidos*
AcM CB.EGF-1 (20 μg/ml)	83,596
F(ab)'2(10 μg/ml)	34,370
F(ab)'2(20 μg/ml)	65,241
F(ab)'2(40 μg/ml)	68,205
Control negativo (20 μg/ml)	322

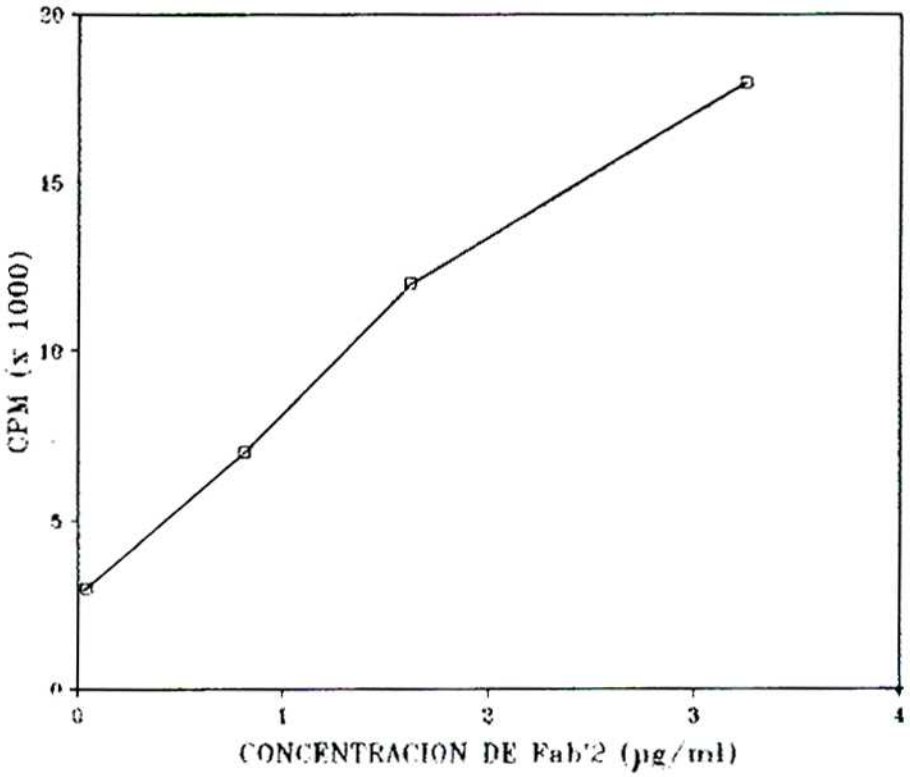

FIG. 5. Curva de identificación del rhEGF por los fragmentos F(ab)'2 obtenidos.

DISCUSION

A pesar del bajo peso molecular del EGF y de la alta homología estructural entre el EGF de ratón y el EGF humano, los animales inmunizados desarrollaron altos títulos de anticuerpos, y se pudieron rescatar mediante la fusión celular hibridomas secretores de AcM de la clase IgG. Más aún, se demostró que varios de estos AcM reconocían no solo el EGF humano, sino también el autólogo.

El tamizaje de los hibridomas provenientes de la primera fusión se realizó mediante un sistema ELISA indirecto, con el antígeno adsorbido a la fase sólida. Algunos autores han presentado evidencias sugestivas de que la fijación directa del antígeno al plástico puede afectar algunos determinantes, trayendo como consecuencia la pérdida de hibridomas positivos cuyos anticuerpos reaccionan con la molécula no alterada. Aun así, nosotros seleccionamos este sistema por su gran sencillez y repetibilidad, basándonos, además, en datos experimentales que sugieren una gran estabilidad estructural de la molécula de EGF (R. Pérez, comunicación personal). En la práctica, este sistema de tamizaje es adecuado, lo que se demuestra por la selección de AcM que, como el CB-EGF.1, manifiestan un alto reconocimiento del antígeno también en el RIA-FS, cuyo principio básico de detección es diferente (el antígeno se encuentra en la fase líquida).

Aprovechando esta propiedad del AcM CB-EGF.1, se elaboró un RIA-FS para la cuantificación de rhEGF, con la sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad necesarias para los propósitos de control de diferentes pasos de producción de esta molécula, en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, donde este sistema se emplea ya desde hace varios meses de forma rutinaria. En AcM CB-EGF.1 ha sido usado también con buenos resultados en el desarrollo de un sistema RIA de fase líquida, donde el anticuerpo es incubado con las muestras de antígeno radioyodado, y los complejos se precipitan con la ayuda de un segundo anticuerpo anti IgG de ratón (resultados no mostrados).

Con el propósito de desarrollar sistemas inmunoenzimáticos que pudieran sustituir perspectivamente el empleo de los RIA, en la segunda fusión se empleó un sistema de tamizaje de los hibridomas que conjugara, tanto la posiblidad de reconocimiento del antígeno en solución como la factibilidad de evaluar la competencia de los anticuerpos por determinantes antigénicos del EGF. El RIA-FS empleado cubría estas posibilidades y, finalmente, permitió la selección de AcM que como el CB-EGF.2, reconocen determinantes antigénicos distintos al identificado por el CB-EGF.1.

En estudios posteriores se comprobó que este nuevo AcM identifica también el EGF de ratón; esto sugiere que el sitio reconocido por el CB-EGF.1 puede estar distante de los dominios que interactúan con el receptor de membrana, aunque ello requiere una demostración más directa, quizás mediante experimentos de neutralización del efecto biológico del EGF, con ambos AcM.

Una vez determinado que los AcM CB-EGF.1 y CB-EGF.2 no competían por un mismo sitio antigénico, se decidió elaborar un sistema inmunoenzimático ELISA tipo *sandwich* en el cual se empleó como AcM de recubrimiento el AcM CB-EGF.2, y el CB-EGF.1 conjugado con peroxidasa para el revelado de la reacción. Teniendo en consideración el pequeño tamaño de la molécula de EGF, se realizaron algunos ensayos preliminares donde se prepararon fragmentos F(ab)'2 del AcM CB-EGF.1, con vistas a producir un recubrimiento activo en la fase sólida, con una menor posibilidad de impedimentos estéricos. Se demostró que los fragmentos eran capaces de enlazar el rhEGF a niveles tales que inhibían la unión del anticuerpo intacto.

En definitiva, los primeros ensayos del sistema ELISA con los AcM hicieron innecesaria en esta fase del trabajo la utilización de los fragmentos; el ensayo inmunoenzimático desarrollado es simple y exhibe niveles de sensibilidad semejantes al RIA-FS, y suficientes para su uso en los ensayos de cuantificación del rhEGF. A ello se le suma la ventaja de no tener que usar material radioactivo. Su repetibilidad y reproducibilidad ha resultado satisfactoria en ensayos preliminares y en la actualidad se realizan experimentos para correlacionar los valores de rhEGF en muestras biológicas, obtenidos por RIA-FS y esta nueva posibilidad tecnológica.

REFERENCIAS

ABE, Y.; T. SAGAWA; K. SAKAI y S. KIMURA (1987). *Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA), for human epidermal growth factor (hEGF).* Clin. Chim. Acta. **168**: 87-95.

AKAI, K.; M. GOTO y M. UEDA (1986). *Isolation of epidermal growth factor with monoclonal antibody.* Chem. Pharm Bull. **34**: 1721-1727.

ANONIMO (1986). *Specific monoclonal antibody purification techniques. The use of protein-A sepharose to purify murine IgG MAb.* Separation News. **13**.

BUDD, R. y K. SMITH (1986). *Interleukin-2 immunoassay using monoclonal antibodies.* Bio/Tecnhology. **4**: 983-986.

BYNY, R.L.; D.N. ORTH y S. COHEN (1972. *Radioimmunoassay of epidermal growth factor.* Endocrinology **90**: 1261-1266.

COHEN, S. (1987). *Epidermal growth factor.* In Vitro Cell. Devel. Biol. **23**: 239-246.

CONNOLLY, J. y D. ROSE (1988). *Epidermal growth factor-like proteins in breast fluid and human milk.* Life Sci. **42**: 1751-1756.

COOKE, R.; A. WILKINSON; M. BARON; A. PASTORE; M. TAPPING; I. CAMPBELL; H. GREGORY y B. SHEARD (1987). *The solution structure of human epidermal growth factor.* Nature **327**: 339-341.

DAILEY, G.E.; J.W. KRAUS y D.N. ORTH (1978). *Homologous radioimmunoassay for human epidermal growth factor (Urogastrone).* J. Clin. Endocrinol. Metab. **46**: 929-936.

DUARTE, C.; M.E. FERNANDEZ DE COSSIO; G. SIERRA; E. PENTON; A. AGRAZ; G. FURRAZOLA y A. AGUILERA (1987). *Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón recombinante α-2. Su empleo en la purificación y detección del antígeno.* Interferón y Biotecnología **4**(3): 221-232.

ELLIOT, J. (1980) *Epidermal growth factor:* In vivo *ocular studies.* Trans. Am. Ophthalmol. Soc. **78**: 629-656.

FONSECA, R.; J. LOMBARDERO; R. PEREZ; S. QUINTERO; B. TORMO; A. MACIAS; N. CORDIES; F. FONT; V. LEON; M. PUIG; O. AGUILAR; C. RODRIGUEZ y A. LAGE (1989). *Efecto anti-tumoral del factor de crecimiento epidérmico humano sobre carcinomas epidermoides humanos: reporte preliminar.* Interferón y Biotecnología **5**(3) (en prensa).

GAVILONDO, J.; I. LOPEZ; E. FERRA; y C. DUARTE (1988). "*In vitro* primary immunization for the obtención of mouse monoclonal antibodies against human recombinant gamma interferon and epidermal growth factor", en: In vitro *Immunization in Hybridoma Technology.* Progress in Biotechnology. Vol. 5. Ed. Borrebaeck, C.A.K., Elsevier Pub. Co. Amsterdam, Oxford, New York, pp. 131-136.

GOLDSMITH, L. (editor) (1983). *Epidermal growth factor.* Oxford University Press, New York.

HAYASHI, T.; S. NAGAE y S. SAKAMOTO (1985). *Radioimmunoassay of human epidermal growth factor.* Seikagaku **75**: 1133.

HAYASHI, K.; H. NOMOTO; M. KUROBE; S. NISHIMURO; H. HIRATANI y S. FURUKAWA (1985). *A sensitive two-site enzyme immunoassay for human epidermal growth factor (Urogastrone).* Biochem. Int. **10**: 839-845.

HARPER, R.; J. PIERCE y R. SAVAGE, Jr. (1987). "Purification of human epidermal growth factor by monoclonal antibody affinity chromatography", en: *Methods in Enzymnology. Peptide Growth Factors,* Part A. Eds.: D. Barnes, D. Sirbasku, Vol. 146, Academic Press Inc. New York, pp. 3-11.

HIRATA, Y.; G. MOORE; C. BERTAGNA y D. ORTH (1980). *Plasma concentrations of immunoreactive human epidermal growth factor (Urogastrone) in man.* J. Endrocrinol. Metabol. **50**: 440-444.

HIRATA, Y.; M. UCHIHASHI; M. NAKAJIMA; F. FUJITA y S. MATSUKURA (1982). *Immunoreactive human epidermal growth factor in human pancreatic juice.* J. Endocrinol. Metabol. **54**: 1242-1245.

HISSEY, P.H.; K.J. THOMPSON y L. BAWDEN (1985). *Single-step monoclonal antibody affinity purification of human urogastrone from urine.* J. Immunol. Meth. **78**: 211-216.

HUNTER, W.M. y F.C. GREENWOOD (1962). *Preparation of Iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.* Nature **194**: 495-496.

IKUTA, S.; Y. YAMADA; Y. YOSHITAKE y K. NISHIKAWA (1985). *Production and properties of monoclonal antibody against human epidermal growth factor.* Biochem. Internat. **10**: 251-258.

JOH, T.; M. ITOH; K. KATSUMI; T. YOKOYAMA; T. TAKECHI; T. KATO; Y. WADA y R. TANAKA (1986). *Physiological concentration of human epidermal growth factor in biological fluids: Use of sensitive enzyme immunoassay.* Clin. Chim. Acta **158**: 81-90.

KUROBE, M.; N. TOKIDA; S. FURUKAWA; E. ISHIKAWA y k. HAYASHI (1986). *Development of sensitive enzyme immunoassay for human epidermal growth factor (Urogastrone).* Clin. Chim. Acta **156**: 51-60.

LAEMLI, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature (London) **227**: 680-685.

LOWRY, O.H.; N.J. ROSENBROUGH; A.L. FARR y R.K RANDALL (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. **193**: 265-269.

MACIAS, A.; R. PEREZ y A. LAGE (1985). *Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico. II. Desarrollo de un ensayo de radiorreceptores para la determinación de cantidades picomolares.* Interferón y Biotecnología. **2**: 115-127.

MAGE, M. y E. LAMOYI (1987). "Preparation of Fab and F(ab)'2 fragments from monoclonal antibodies", en: *Monoclonal Antibodies Techniques and Applications.* Ed. Schook, L. B., Marcel Dekker Inc., New York and Basel., pp. 79-97.

NAKANE, P. (1979). "Preparation and standardization fo enzymelabelled conjugates", en: *Immunoassays in the Clinical Laboratory.* Eds.: R.M. Nakamura, W.R. Dito; E.S. Tucker, A.R. Liss. New York, pp. 81-87.

NISHIKAWA, K.; Y. YOSHITAKE y S. IKUTA (1987) "Derivation of monoclonal antibody to human epidermal growth factor", en: *Methods in Enzymology. Peptide Growth Factors*, Part A. Eds.: Barnes, D., D. Sirbasku, Vol. 146, Academic Press Inc. New York, pp.11-22.

OKA, Y. y D.N. ORTH (1983). *Human plasma epidermal growth factor/beta-Urogastrone is associated with blood platelets.* J. Clin. Invest. **72**: 249-259.

O'LOUGHLIN, E.; M. CHUNG; M. HOLLENBERG; J. HAYDEN; I. ZAHAVI y D. GALL (1985). *Effect of epidermal growth factor on ontogeny of the gastrointestinal tract.* Am. J. Physiol. **249**: G674-G678.

OUCHTERLONY, O. y L.A. NIELSSON (1978). *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.* Handbook of Experimental Immunology (Ed. D.M. Weir), p. 196. Blackwell Scientific Publication. Oxford.

PESONEN, K.; L. VIINIKKA; A. KOSKIMIES; A.R. BANKS; M. NICOLSON y J. PERHEENTUPA (1987). *Size heterogeneity of epidermal growth factor in human body fluids.* Life Sci. **40**: 2489-2494.

SORELL, L.; M.E. FERNANDEZ DE COSSIO; E. PENTON; J. LOPEZ Y I.C. PEREZ (1986). *Producción y características de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas que contienen ApoB.* Interferón y Biotecnología **3**: 239-241.

TSUTSUMI, O.; H. KURASHI y T. OKA (1986). *A possible physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function.* Science (Wash. D.C.). **233**: 975-977.

TSUTSUMI, O.; A. TSUTSUMI y T. OKA (1988). *Epidermal growth factor-like. Corneal wound healing substance in mouse tears.* J. Clin. Invest. **81**: 1067-1071.

VAN BRUNT, J. y A. KLAUSNER (1988). *Growth factors speed wound-healing.* Bio/Technology, **6**: 25-30.