

Generación y caracterización primaria de anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico

A. FÉRNANDEZ, R. PÉREZ, A. MACÍAS, A. VELANDIA, I. ALVAREZ, M. RAMOS y A. VELOZO

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, MINSAP, 29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

Recibido en marzo de 1989

Aprobado en mayo de 1989

RESUMEN

El receptor del Factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) es una glicoproteína de membrana de interés creciente en las investigaciones sobre las neoplasias malignas. En este trabajo describimos la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) murinos contra el R-EGF mediante un sistema cruzado de selección, consistente en la inmunización con receptor purificado a partir de placenta humana y la identificación de hibridomas productores mediante el reconocimiento del receptor de las células tumorales A431.

Se seleccionaron cuatro hibridomas productores de AcM que reconocen el R-EGF con alta afinidad ($K_d = 10^{-9} - 10^{-10}M$) y que son capaces de inhibir la unión del EGF al receptor. Mediante un sistema ELISA competitivo se determinó que estos AcM reconocen al menos dos epitopes diferentes. El patrón de reconocimiento por inmunohistoquímica de estos anticuerpos fue similar al AcM EGF-R1 (Amersham) empleado como control. Estos AcM están disponibles para su uso en la detección inmunohistoquímica del receptor y otras investigaciones.

SUMMARY

The receptor for epidermal growth factor (EGF-R) is a membrane glycoprotein which is gaining growing interest in cancer research. In the present paper we describe the generation of murine hybridomas secreting monoclonal antibodies (MAbs) against EGF-R, by means of a cross-recognition selection system given by immunization with affinity purified receptors from human placenta and identification of secretory hybridomas through the recognition by the receptor of A431 human tumor cells. Four hybridomas were selected which produce MAbs with high affinity for EGF-R ($K_d = 10^{-9} - 10^{-10}M$). All MAbs were able to inhibit the binding of EGF to its receptor. A competition ELISA system showed that these MAbs recognize at least two different epitopes. These four MAbs are now available for the immunohistochemical identification of EGF-R in human tissues and for other research purposes.

INTRODUCCION

El Factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula la proliferación de células epiteliales y de origen mesenquimatoso, tanto *in vitro* como *in vivo* (Gospodarowicz, 1983). El EGF ejerce su acción a través de un receptor de membrana,

glicoproteína de 170 kDa, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado recientemente (Cohen *et al.*, 1982; Lin *et al.*, 1984). El R-EGF ha sido implicado en la transformación maligna debido a que: *i*) su dominio citoplasmático tiene una gran homología estructural con el producto del oncogen *v-erbB* (Downward *et al.*, 1984); *ii*) el gen que codifica para el R-EGF se ha encontrado amplificado en carcinomas epidermoides humanos (Cowley *et al.*, 1984; Merlino *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1986); *iii*) su expresión en el cáncer mamario humano está asociada a la malignidad del tumor (Pérez *et al.*, 1984; Macías *et al.*, 1986; Skoog *et al.*, 1986; Macías *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 1988).

En los últimos años se han generado AcM contra el R-EGF, utilizando como inmunógeno la línea celular humana A431 de carcinoma epidermoide de vulva (Sato *et al.*, 1987), que posee una alta expresión de sitios receptores para el EGF.

En el presente trabajo se reporta la generación y caracterización primaria de cuatro AcM, utilizando como inmunógeno el receptor de EGF parcialmente purificado a partir de placenta humana. Estos AcM de alta afinidad son capaces de inhibir la unión del EGF a su receptor y reconocen al menos dos epitopes diferentes de la molécula.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El EGF murino fue purificado por el método de Savage y Cohen (Savage y Cohen, 1972) y radioyodado por el método de la cloramina T (Hunter y Greenwood, 1962). La matriz de afinidad de EGF fue obtenida acoplado EGF murino a Sepharose 4B activada con CNBr, de acuerdo con las recomendaciones de Pharmacia Fine Chemicals. Por cada mililitro de gel se utilizaron 10 mg de EGF murino obteniéndose más del 90 % de acoplamiento.

Líneas celulares

La línea A431, proveniente de un carcinoma epidermoide humano de la vulva y con más de un millón de sitios receptores para el EGF por célula (Fabricant *et al.*, 1977) fue mantenida en DMEM-F12 suplementado con 5 % de suero bovino inactivado y antibióticos. La línea de mieloma murino Sp2/0.Ag14 no secretora y HAT sensible (Shulman *et al.*, 1978) fue mantenida en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero bovino inactivado, 26 mM de CO_3HNa , 18 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y antibióticos.

Purificación parcial del R-EGF

La purificación del R-EGF solubilizado se realizó por cromatografía de afinidad de acuerdo al método descrito (Cohen *et al.*, 1982a; Cohen *et al.*, 1982b) con ligeras modificaciones. Brevemente explicado se puede decir que las fracciones crudas de membrana de placenta fueron solubilizadas en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 con 10 % de glicerol y 1 % de tritón X-100. Luego de una centrifugación a 100 000 g durante una hora, se aplicaron a la matriz de afinidad de EGF, eluyéndose con pH alcalino tampón etanolamina 5 mM, pH 9,7 con 10 % de glicerol y 0,1 % de tritón X-100, neutralizándose inmediatamente la muestra obtenida. Esta fracción enriquecida en R-EGF posee capacidad de unión de 125I-EGF; la separación del radiotrazador ligado y no ligado se realizó por el método de polietilenglicol (Cohen *et al.*, 1980).

La fracción eluida muestra una banda mayoritaria (170 kDa) en SDS-PAGE. En cada purificación se procesaron 100 g de placenta, obteniéndose de 15 a 25 μg del R-EGF parcialmente purificado por cada gramo de tejido húmedo.

En el caso de las células A431, estas fueron inoculadas en ratones atímicos (Inu/nu; tres millones de células por animal), efectuándose la excéresis de los tumores luego de aproximadamente un mes de evolución. Las purificaciones se realizaron a partir de 10 g de tejido tumoral, siguiendo la metodología referida anteriormente, obteniéndose entre 150 y 250 μg de R-EGF parcialmente purificado por gramo de tejido.

Esquema de inmunización

Grupos de ratones Balb/c-Hab hembras se inocularon por vía subcutánea e intraperitoneal con 25 μg de R-EGF parcialmente purificado de placenta humana, empleando adyuvante completo de Freund en el día 0, e incompleto en los días 14, 21 y 28.

Aproximadamente 10 días después de la cuarta inmunización se tomó una muestra de sangre, resultando con títulos positivos todos los animales inmunizados, por lo que después de una última inoculación con 50 μg del inmunógeno por vía intravenosa se procedió a la fusión celular siguiendo el esquema previamente descrito (Fernández *et al.*, 1986).

Ensayo inmunoenzimático en fase sólida con R-EGF solubilizado

La inmovilización del antígeno se realizó recubriendo las placas de poliestireno con el R-EGF parcialmente purificado, en tampón HEPES 10 mM, pH 7,5 hasta su total desecación al vacío (Yarden *et al.*, 1985). Para el tamizaje de los sobrenadantes y de los AcM purificados por proteína A Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, 1986), se utilizó como sonda un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham). Para el ensayo competitivo en equilibrio el AcM R5 fue conjugado con fosfatasa alcalina (Voller *et al.*, 1976).

Ensayo de competencia por la unión del 125I-EGF a su receptor

La determinación de las constantes aparentes de inhibición (K_i) de la unión del 125I-EGF a su receptor por los AcM obtenidos, se realizó mediante un radio-receptor-análisis (RRA) en solución con fracción microsomal de placenta humana según se ha descrito previamente (Macías *et al.*, 1985b).

Determinación inmunohistoquímica del R-EGF

Se utilizaron cortes frescos de biopsias de carcinomas epidermoides humanos. Como sistema de detección se empleó el complejo biotina-streptavidina-peroxidasa (Amersham), según se ha descrito anteriormente (Hsu *et al.*, 1981). En todos los casos se ensayó simultáneamente el AcM EGF-R1 (Amersham) como control positivo.

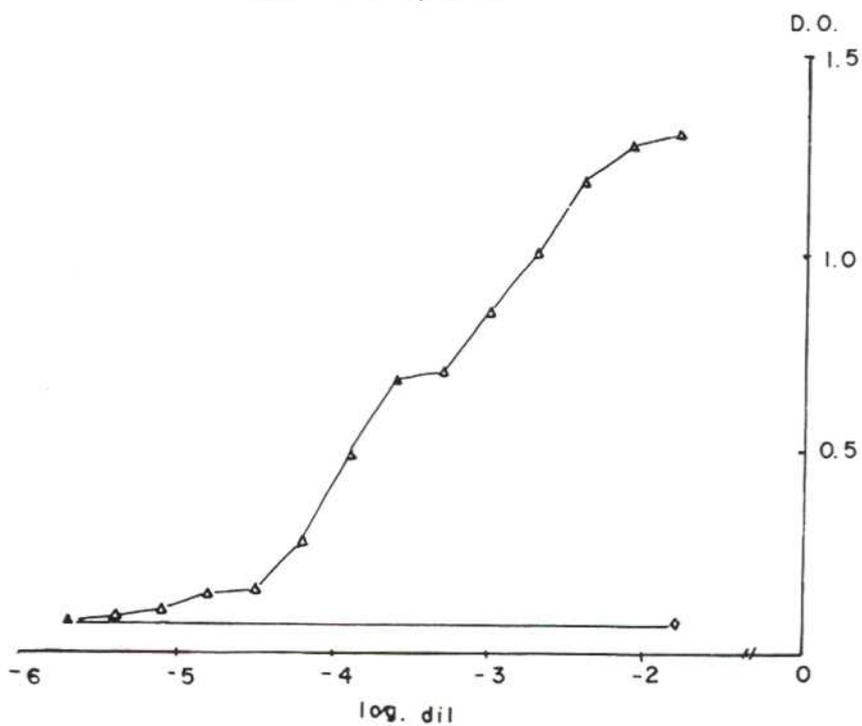
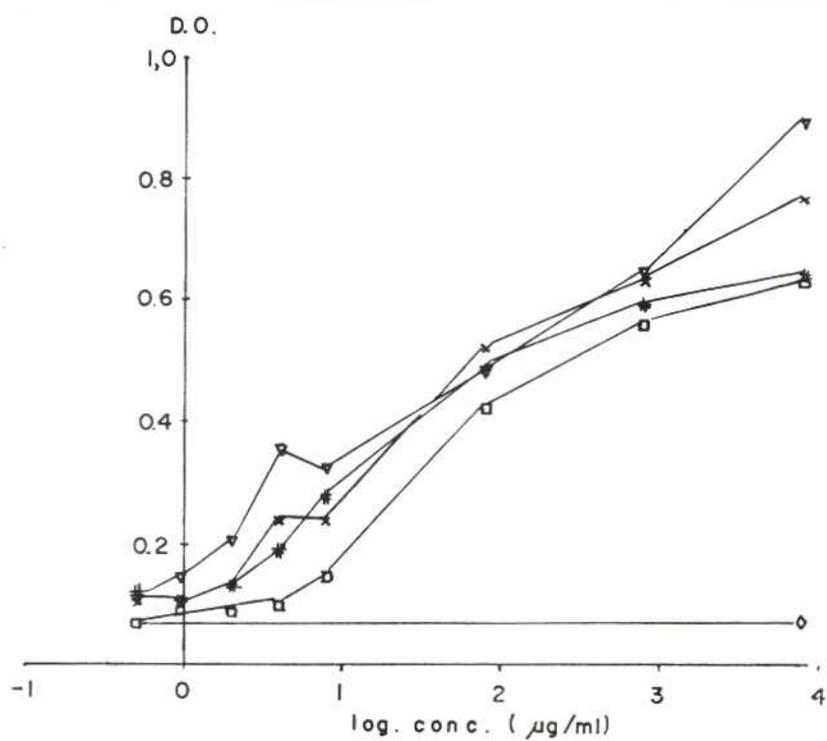
RESULTADOS

Más del 80 % de las células híbridas productoras de anticuerpos contra el inmunógeno reconocieron también el R-EGF parcialmente purificado a partir de las células tumorales A431.

Cuatro de estos AcM, capaces de reconocer el R-EGF parcialmente purificado de placenta humana y del carcinoma epidermoide A431, fueron seleccionados para una caracterización detallada. El isotipo de estos anticuerpos denominados R2, R3, R5 y R9 resultó IgG2a kappa, según la técnica de inmunodifusión doble.

La afinidad de los AcM R2, R3, R5 y R9 por el R-EGF de placenta humana y de las células tumorales A431, fue estimada a partir de las curvas de saturación obtenidas en un ELISA de fase sólida (figura 1), utilizándose concentraciones crecientes de los AcM purificados por proteína A Sepharose, en un rango de 0,5 ng a 7,5 μg /pozo.

Las constantes aparentes de disociación (K_d) se estimaron a partir de las concentraciones a las cuales se logró la semisaturación de la reacción antígeno-anticuerpo. Para el cálculo aproximado de la concentración molar de los AcM se asumió un 100 % de pureza. En las figuras 1a y 1b puede apreciarse que los AcM R2, R3, R5 y R9 mostraron una alta afinidad por el R-EGF proveniente de placenta humana, en el orden de 10^{-9} y 10^{-10} M. Estos AcM mostraron una afinidad similar por el R-EGF purificado a partir de la línea celular A431 (figuras 1c y 1d). Nótese que el rango de semisaturación fue el mismo para todos los AcM en ambos ensayos.



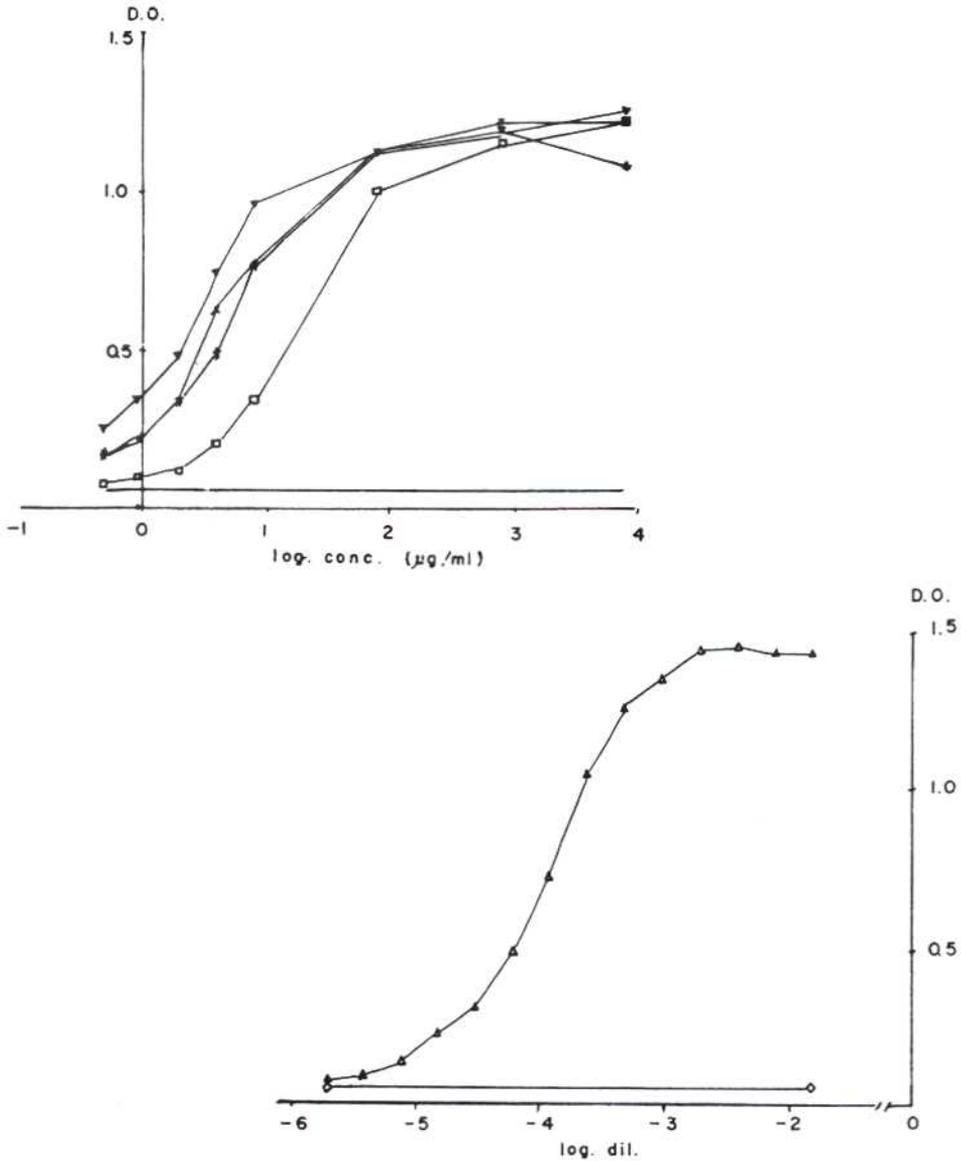


FIG. 1. Curvas de saturación obtenidas mediante ELISA de fase sólida

a) ELISA con el R-EGF proveniente de placenta humana y concentraciones crecientes (0,5 ng/pozo - 7,5 µg/pozo) de los AcM purificados: R2, □ ; R3, X; R5, ▽ y R9, #.

b) Curva control con el policlonal anti-R-EGF ensayado a diferentes diluciones (1/60 - 1/512 000). Policlonal, Δ ; promedio de los valores del fondo (PBS + 0,05 % de Tween-20), ◊

c) ELISA con el R-EGF proveniente de las células tumorales A431 y concentraciones crecientes (0,5 ng/pozo - 7,5 µg/pozo) de los AcM purificados: R2, □ ; R3, X; R5, ▽ y R9, #.

d) Curva control con el policlonal anti-R-EGF ensayado a diferentes diluciones (1/60 - 1/512 000). Policlonal, ▽ ; promedio de los valores del fondo (PBS + 0,05 % de Tween-20), ◊

En el eje de las abscisas: logaritmo de las concentraciones de los AcM ensayados o de las diluciones de los policlones empleados como control positivo. En el eje de las ordenadas: valores de densidad óptica.

Los AcM seleccionados fueron capaces de inhibir la unión del 125I-EGF a su receptor en un ensayo de competencia con fracción microsomal de placenta humana. A partir de las curvas de desplazamiento obtenidas en el RRA se estimaron las constantes aparentes de inhibición, las que se encontraron en el orden de 10^{-7} - 10^{-8} M. Como control negativo se utilizó el AcM anti-citoqueratina (publicación en preparación), con el cual no se encontró ningún desplazamiento de 125I-EGF (figura 2).

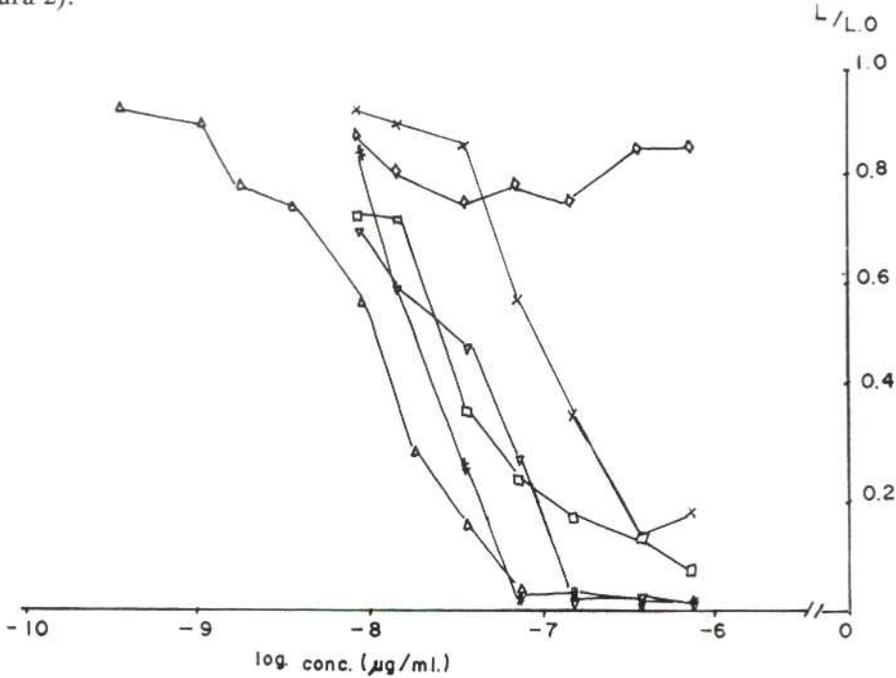


FIG. 2. Curvas de desplazamiento obtenidas por RRA
 Ensayo de competencia con fracción microsomal de placenta humana y concentraciones crecientes (1 µg/ml - 100 µg/ml de los AcM purificados: R2, □; R3, X; R5, ▽; R9, # y anti-citoqueratinas, ◇ (control negativo). El 125I-EGF (Δ) se ensayó a concentraciones crecientes (0 - 200 ng/ml).
 En el eje de las abscisas: logaritmo de la concentración de los anticuerpos. En el eje de las ordenadas: cociente de L/Lo (unión específica).

Con vistas a evaluar si estos AcM reconocían más de un sitio diferente de la molécula del receptor, se realizó un ELISA competitivo en equilibrio utilizando como sonda el AcM R5 conjugado con fosfatasa alcalina. Como puede apreciarse en la figura 3, concentraciones crecientes de los anticuerpos R5 y R9 (1 ng/pozo - 7,5 µg/pozo) produjeron una disminución de la señal, mientras que por el contrario, los AcM R2 y R3 (50 ng/pozo - 7,5 µg/pozo) no fueron capaces de desplazar al anticuerpo R5 utilizado como sonda en el ELISA de competencia por la unión al R-EGF. Esto evidencia que los AcM R5 y R9 reconocen el mismo epítipo o epítopos "estéricamente" relacionados, mientras que los anticuerpos R2 y R3 reconocen al menos un epítipo diferente.

En la tabla 1 se compara el reconocimiento por inmunohistoquímica de los AcM R2 y R5 con el AcM R1 (Amersham) empleado como control en carcinomas epidermoides de laringe humanos, observándose resultados muy similares en los casos estudiados.

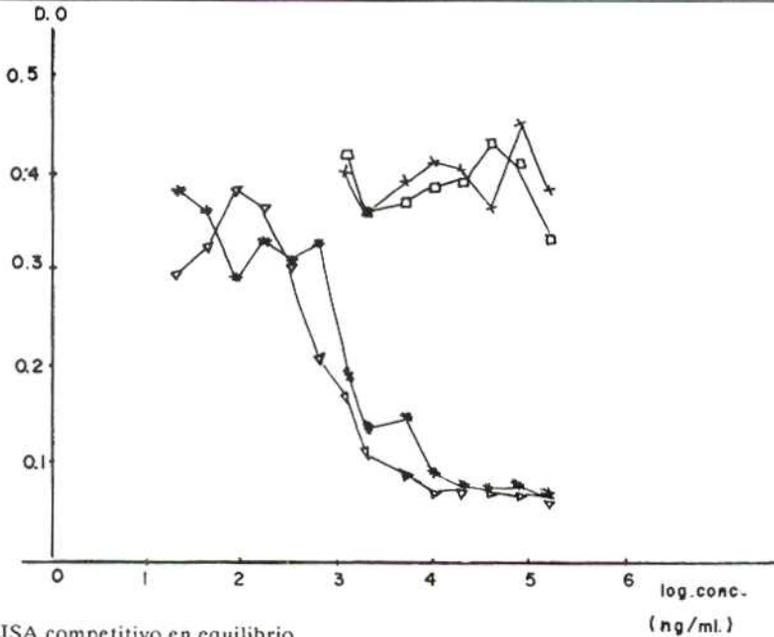


FIG. 3. ELISA competitivo en equilibrio

Curvas obtenidas con concentraciones crecientes de los AcM purificados (R2 y R3: 50 ng/pozo - 7,5 μ g/pozo); R5 y R9: 1 ng/pozo - 7,5 μ g/pozo); R2, \square ; R3, X; R5, ∇ y R9, #, y mezclados (1:1) previo al ensayo, con el AcM R5 (dilución 1/500) empleado como sonda.

En el eje de las abscisas: logaritmo de las concentraciones de los AcM en ensayo. En el eje de las ordenadas: valores de densidad óptica.

Tabla 1
ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS

Tipo histológico	Reconocimiento de los AcM		
	R1	R2	R5
Carcinoma epidermoide queratinizante moderadamente diferenciado e infiltrante	2+	3+	3+
Carcinoma epidermoide queratinizante moderadamente indiferenciado e infiltrante	3+	3+	3+
Carcinoma indiferenciado metastásico de posible origen epidermoide	3+	3+	3+

2+: Reconocimiento de moderada intensidad.

3+: Reconocimiento muy intenso.

DISCUSION

En el presente trabajo se reporta la generación y caracterización de anticuerpos monoclonales que reconocen al R-EGF. Como fuente de purificación del receptor se empleó la placenta humana a causa de que tiene una alta expresión del R-EGF (Macías *et al.*, 1985a). La estrategia del tamizaje incluyó el reconocimiento simultáneo de fracciones enriquecidas en receptor a partir de placenta humana y de la línea de carcinoma epidermoide humano A431, ya que el R-EGF parcialmente purificado

por cromatografía de afinidad y utilizado como inmunógeno, no constituye una preparación pura del receptor.

Los AcM contra el R-EGF generados hasta el presente por otros autores han sido obtenidos a partir de inmunizaciones con la línea celular A431 y muchos de ellos muestran reacción cruzada con membranas de eritrocitos (Sato *et al.*, 1987); esto puede deberse al aumento de la glicosilación de las membranas tumorales (Buck *et al.*, 1970; Pouyssegur *et al.*, 1977; Warren *et al.*, 1978), lo cual hace que muchos de los AcM que reconocen al R-EGF de A431 estén dirigidos contra restos glicosídicos del mismo (Fernández-Pol, 1985; Sato *et al.*, 1987).

Sin embargo, en nuestro caso, los AcM R2, R3, R5 y R9 no reconocieron las membranas de eritrocitos humanos (resultados no mostrados), lo que sugiere que estos AcM reconozcan determinantes antigénicos de naturaleza proteica.

Los cuatro AcM seleccionados mostraron una alta afinidad por el R-EGF (Kd en el rango de 10^{-9} a 10^{-10} M). Las constantes aparentes de disociación de estos anticuerpos por el receptor se encuentran solamente en un orden de magnitud por debajo de sus constantes aparentes de inhibición de la unión del EGF al receptor, lo que indica a favor de que ellos reconocen epitopes relacionados con el sitio de unión del EGF. El hecho de que estos AcM inhiban la unión del EGF a su receptor, constituye un criterio definitivo de que reconocen el dominio externo del mismo.

Los experimentos de competencia realizados posibilitan definir, al menos operacionalmente, dos epitopes diferentes de la molécula del receptor, lo que permite concluir que los AcM R5 y R9 reconocen el mismo epitope o epitopes estéricamente relacionados, mientras que los AcM R2 y R3 reconocen al menos un epitope diferente. El AcM EGF-R1 (Amersham) ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la expresión del R-EGF en tumores humanos (Ozanne *et al.*, 1985). Los AcM R2 y R5 mostraron un patrón de reconocimiento similar al EGF-R1 en las muestras tumorales estudiadas, lo que evidencia su utilidad en la determinación inmunohistoquímica del R-EGF.

Como ha sido reportado por nuestro grupo de trabajo y por otros autores, el R-EGF constituye un marcador tumoral de malignidad en el cáncer mamario y otras neoplasias humanas (Pérez *et al.*, 1984; Fitzpatrick *et al.*, 1984; Macías *et al.*, 1986; Skoog *et al.*, 1986; Macías *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 1988). La disponibilidad de AcM contra el R-EGF debe permitir una amplia difusión de la determinación inmunohistoquímica del receptor para el manejo de los pacientes con cáncer.

REFERENCIAS

- BUCK, C.A.; M.C. GLICK y L. WARREN (1970). *A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous Sarcoma Virus transformed hamster cells*. *Biochemistry* 9: 4567-4575.
- COHEN, S.; G. CARPENTER y L. KING (1980). *Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity*. *J. Biol. Chem.* 255: 4834-4842.
- COHEN, S.; H. USHIRO; C. STOSCHECK y M. CHINKERS (1982a). *A native 170 000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles*. *J. Biol. Chem.* 257: 1523-1531.
- COHEN, S.; R.A. FAVA y S.T. SAWYER (1982a). *Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6237-6341.
- COWLEY, G.; J.A. SMITH; B. GUSTERSON; F. HENDLOR y B. OZANNE (1984). "The amount of EGF receptor is elevated on squamous cell carcinomas". In: J.L. Arnold, G.F. Van de Woude, W.C. Topp and J.D. Watson (eds). *Cancer Cells* 1, pp. 5-10. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.

- DOWNWARD, J.; Y. YARDEN; E. MAYES; G. SCRACE; N. TOTTY; P. STOCKWELL; A. ULLRICH; J. SCHLESSINGER y M.D. WATERFIELD (1984). *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences*. *Nature* **307**: 521-527.
- FABRICANT, R.N.; J.E. DE LARCO y G.J. TODARO (1977). *Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 565-569.
- FERNANDEZ, A.; C. HERMIDA; J. GAVILONDO; C. GARCIA e I. ALVAREZ (1986). *Utilización de líneas celulares de cáncer mamario humano en la obtención de anticuerpos monoclonales que reconocen tejido tumoral*. *Interferón y Biotecnología* **3**: 125-138.
- FERNANDEZ-POL, J.A. (1985). *Epidermal growth factor receptor of A431 cells. Characterization of a monoclonal antireceptor antibody noncompetitive agonist of epidermal growth factor action*. *J. Biol. Chem.* **260**: 5003-5011.
- FITZPATRICK, S.; J. BRIGHTWELL; J. WITTLIFT; G. BARROWS y G. SCHULTZ (1984). *Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progesterin receptor levels*. *Cancer Research* **44**: 3448-3453.
- GOSPODAROWICZ, D. (1983). *Growth factors and their action in vivo and in vitro*. *Pathology* **14**: 201-233.
- HUNTER, W.M. y F. GRENEWOOD (1962). *Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity*. *Nature* **194**: 495-496.
- HSU, S.M.; L. RAINE y H. FANGER (1981). *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures*. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 577-580.
- LIN, C.R.; W.S. CHEN; W. KRUIGER; L.S. STOLARSKY; W. WEBER; R.M. EVANS; I.M. VERMA; G.N. GILL y M.G. ROSENFELD (1984). *Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA: Gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells*. *Science* **224**: 843-848.
- MACIAS, A.; R. PEREZ y A. LAGE (1985a). *Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico. I. Expresión del receptor en el cáncer mamario humano*. *Interferón y Biotecnología* **2**: 27-40.
- MACIAS, A.; R. PEREZ y A. LAGE (1985b). *Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico. II. Desarrollo de un radio-receptor-análisis para la determinación de cantidades picomolares*. *Interferón y Biotecnología* **2**: 115-127.
- MACIAS, A.; E. AZAVEDO; R. PEREZ; E.L. RUTQUIST y L. SKOOG (1986). *Receptors for epidermal growth factor in human mammary carcinomas and their metastases*. *Anticancer Research* **6**: 849-852.
- MACIAS, A.; E. AZAVEDO; T. HAGERSTROM; C. KLINTENBERG; R. PEREZ y L. SKOOG (1987). *Prognostic significance of the receptor for epidermal growth factor in human mammary carcinomas*. *Anticancer Research* **7**: 459-464.
- MERLINO, G.T.; Y.H. XU; S. ISHII; A.J.L. CLARK; K. SEMBA; K. TOYOSHIMA; T. YAMAMOTO y I. PASTAN (1984). *Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells*. *Science* **224**: 417-419.
- OZANNE, B.; A. SHUM; C.S. RICHARDS; D. CASSELLS; D. GROSSMAN; J. TRENT; B. GUSTERSON y F. HENDLER (1985). *"Evidence for an increase of EGF receptors in epidermoid malignancies"*. In: J. Feramisco, B. Ozzane and C. Stiles (eds) *Cancer cells* **3**, pp. 41-49. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- PEREZ, R.; M.R. PASCUAL; A. MACIAS y A. LAGE (1984). *Epidermal growth factor receptors in human breast cancer*. *Breast Cancer Res. and Treat.* **4**: 189-193.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (1986). *Specific monoclonal antibody purification techniques*. Separation News **13.5**, Pharmacia. Lab. Separation Division, S-75182 Uppsala, Sweden.
- POUYSEGUR, J.; M. WILLINGHAN y I. PASTAN (1977). *Role of cell surface carbohydrates and proteins in cell behavior. Studies on the biochemical reversion of an N-acetyl-glucosamine-deficient fibroblast mutant*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 243-247.
- RIOS, M.A.; A. MACIAS; R. PEREZ; A. LAGE y L. SKOOG (1988). *Receptors for epidermal growth factor and estrogen as predictors of relapse in patients with mammary carcinoma*. *Anticancer Research* **8**: 173-176.
- SATO, J.D.; A.D. LE y T. KAWAMOTO (1987). *"Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors"*. In: *Peptide Growth Factors, Methods in Enzymology*, vol. **146**, pp. 63-81. Edited by D. Barnes y D.A. Sirbasku, Academic Press, Inc.
- SAVAGE, R. y S. COHEN (1972). *Epidermal growth factor and a new derivate. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization*. *J. Biol. Chem.* **247**: 7609-7611.
- SHULMAN, M.; C.D. WILDE y G. KOHLER (1978). *A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies*. *Nature* **276**: 269-271.

- SKOOG, L.; A. MACIAS; E. AZAVEDO; J. LOMBARDERO y C. KLINTENBERG (1986). *Receptors for EGF and oestradiol and thymidinekinase activity in different histological subgroups of human mammary carcinomas*. Br. J. Cancer **54**: 271-276.
- VOLLER, A.; D.E. BIDWELL y A. BARTLETT (1976). *Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice*. Bull. World Health Organ. vol. **53**, pp. 55-65.
- WARREN, L.; C.A. BUCK y G.P. TUSZYNSKI (1978). *Glycopeptide changes and malignant transformation. A possible role for carbohydrate in malignant behavior*. Biochim. Biophys. Acta **516**: 97-127.
- YAMAMOTO, T.; N. KAMATA; H. KAWANO; S. SHIMIZU; T. KUROKI; K. TOYOSHIMA; K. RIKIMARU; N. NOMURA; R. ISHIZAKI; I. PASTAN; S. GAMOU y N. SHIMIZU (1986). *High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines*. Cancer Research **46**: 414-416.
- YARDEN, Y.; I. HARARI y J. SCHLESSINGER (1985). *Purification of an active EGF receptor kinase with monoclonal antireceptor antibodies*. J. Biol. Chem. **260**: 315-319.