Biotecnología aplicada, Vol. 7, No. 1, 32-41 (1990)

Artículos originales completos

Sistema de producción del anticuerpo monoclonal IOR-T3 para uso terapéutico

G. González, L. Cabrera, K. Torres, M. Ramos y A. Lage

Departamento de Biología Tumoral, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

Recibido en noviembre de 1989
Aprobado en noviembre de 1989

RESUMEN

En el presente trabajo se reportan las experiencias obtenidas en la producción de 21 lotes del anticuerpo monoclonal IOR-T3 para uso terapéutico.

Partiendo de líquido ascítico murino como fuente del anticuerpo monoclonal, se propone un sistema de purificación que tiene como paso principal una cromatografía de afinidad en proteína A Sefarosa. Este sistema es aplicable a la producción de anticuerpos monoclonales en la escala de los gramos con calidad adecuada para ser utilizados en forma inyectable, permitiendo obtener rendimientos de más del 70% de IgG recuperada.

Los controles de actividad biológica realizados durante las diferentes etapas del proceso, permiten conocer si tanto las células a inocular como el líquido ascítico tienen una calidad adecuada para continuar la marcha.

Se exponen los controles a realizar en el producto final para garantizar su calidad inyectable, entre los que se encuentran: pureza, esterilidad, ausencia de pirógenos y anticuerpos contra virus murinos.

Los datos acumulados permiten apreciar la variabilidad existente en el comportamiento de los diferentes parámetros controlados durante el flujo productivo, demostrándose que existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de IgG en ascitis, su concentraión mínima de trabajo y rendimientos de IgG monoclonal por mililitro de líquido ascítico y por miligramo de IgG procesados.

SUMMARY

In this paper we show the experiences obtained in the production of 21 lots of IOR-T3 monoclonal antibody to be used in therapy.

The purification system proposed is based on afinity chromatography in Protein A Sepharose, using murine ascitis as monoclonal antibody source.

The outlined system is useful for gram-scale production of monoclonal antibody with inyectable quality, with yields of more than 70% of recovered IgG.

The biological activity controls performed during the different steps of the production process allows us to know if the ascitis and the cells to be inoculated are suitable to continue the process.

The necessary controls to guarantee the inyectable quality of the final product are refered, i.e., purity, sterility, absence of pyrogens and of anti murine virus antibodies.

The variability in the behaviour of the different controled parameters during the production process are evidenciated by the accumulated data. It was demostrated a statistically significant correlation between the parameter IgG in ascitis with its minimal working concentration and the monoclonal antibody yield per ml of ascitis and per mg of processed IgG.

Copyright © 1990, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud. Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

INTRODUCCION

La utilización de anticuerpos monoclonales (AcM) con fines terapéuticos ha tenido un notable incremento en los últimos años. Estas biomoléculas pueden presentar una elevada especificidad de reconocimiento por antígenos presentes en células del sistema inmune, lo que las convierte en útil herramienta para el tratamiento de enfermedades en las cuales estas células se encuentren involucradas.

El uso del AcM Orthoclone OKT3 en tratamiento de crisis de rechazo por trasplante de órganos (*Ortho Mult. Transp. Study Group, 1985*; Kreis *et al.*, 1985a; Kreis *et al.*, 1985b), es ejemplo de estas aplicaciones. Este tratamiento se basa en el bloqueo de las funciones efectoras de las células T involucradas en las reacciones de rechazo ante el órgano trasplantado (Goldstein, 1986), por acción de dicho AcM.

El AcM IOR-T3 es una IgG2a de ratón que reconoce una estructura asociada al complejo T3 (Spits *et al.*, 1985), presente en los linfocitos T humanos. De sus características funcionales y de reconocimiento se deduce que es similar al Orthoclone OKT3, por lo que se decidió llevar a cabo un protocolo de ensayo clínico con este AcM en pacientes con crisis de rechazo por trasplante renal (Herrera *et al.*, 1987).

El uso terapéutico de AcM requiere un producto superior en calidad y cantidad al necesario para ser utilizado con fines de diagnóstico e investigativos.

Esto ha implicado la necesidad de implantar un sistema de producción cualitativamente diferente, con el que se controlen los distintos pasos, de manera que se asegure un producto final con la calidad requerida.

En el presente trabajo se exponen las experiencias obtenidas en la producción de 21 lotes del AcM IOR-T3 en forma inyectable.

De los diferentes métodos que han sido reportados para purificar AcM de origen murino (Goding *et al.*, 1980; Ey *et al.*, 1978; Burchiel *et al.*, 1984; Carlsson *et al.*, 1985; Bruck *et al.*, 1982; Stanker *et al.*, 1985; Mahil *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1986) seleccionamos la cromatografía de afinidad en proteína A Sefarosa para la purificación del IOR-T3.

Se describen y se relacionan los datos obtenidos de los controles realizados durante las diferentes etapas del proceso, lo que nos permite dar una visión general del comportamiento y la productividad del proceso propuesto.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo del hibridoma

Las células del hibridoma productor del AcM IOR-T3 fueron cultivadas en medio Dulbeco D-MEM, suplementado con 10% de suero de bovino neo-nato, 26 mM de CO_3HNa, 18 mM de Hepes, 1 mM de piruvato de sodio y antibióticos.

Producción de ascitis

Los ratones BALB/c fueron preparados con 0,5 ml de aceite mineral inyectado por v.i. 10 días antes de la inoculación con 0,5 millones de células del hibridoma productor del IOR-T3.

El líquido ascítico se extrajo, centrifugándose a 400 x g para eliminar células y se congeló a -70°C hasta su purificación.

Purificación de AcM

La proteína A Sefarosa (Pharmacia) fue hinchada en glicina 1,5 M, 3 M NaCl, pH 8,9 (tampón 1), montándose una columna de 20 ml de lecho de gel.

El líquido ascítico del IOR-T3 (300 ml) se filtró y se diluyó 1:2 en tampón 1, aplicándose este volumen en cada corrida cromatográfica. Después de la aplicación de la muestra la columna se lavó con un litro de tampón 1, incluyéndose posteriormente un paso de elución con tampón citrato 100 mM, pH 6.

El AcM IOR-T3 se eluyó con tampón citrato 100 mM, pH 5 en el siguiente paso y, finalmente la matriz se lavó con citrato 100 mM pH 3 y se equilibró con tampón 1.

El AcM así eluido se aplicó a una columna de Sephadex G25, previamente equilibrada con tampón fosfato de sodio 0,01 M; 0,5 M NaCl, pH 7, corriéndose con igual tampón y colectándose la fracción excluida.

Todas las soluciones se prepararon con agua libre de pirógenos, esterilizándose inmediatamente en autoclave.

La cristalería utilizada se lavó con detergente especial (7X), se enjuagó con agua libre de pirógenos y se trató a 300°C durante 2 horas.

El material plástico fue tratado con NaOH 1 N durante 16 horas, enjuagado con agua libre de pirógenos y esterilizado en autoclave.

La columna de Sephadex G-25 se lavó después de cada corrida con NaOH 0,1 N durante 16 horas, y posteriormente con agua libre de pirógenos, y la proteína A Sefarosa con citrato 100 mM, pH 3 durante 16 horas y posteriormente con agua libre de pirógenos.

Filtración y envase del AcM purificado

Al AcM purificado se le ajustó la concentración a 1 mg/ml, añadiéndosele posteriormente polisorbato 80 a una concentración de 0,2 mg/ml. Inmediatamente fue filtrado por 0,2 y 0,1 μM, envasándose estéril en viales con 5 ml de solución.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas totales se realizó según Lowry *et al.* (1951) utilizándose albúmina sérica bovina (BSA) como patrón.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizó según el método descrito por Laemmli, 1970. Los geles, de 1,5 mm de grosor, fueron teñidos con azul de Coomassie. Las muestras se corrieron en condiciones no reducidas.

Determinación de concentración de IgG

Las concentraciones de IgG murina en los líquidos ascíticos y muestras purificadas se determinaron mediante la técnica de inmunodifusión radial simple (Hudson y Hay, 1980). Se utilizaron patrones de IgG murina de concentraciones conocidas.

Actividad biológica

La actividad biológica de las muestras se determinó mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en suspensión celular (Petterson *et al.*, 1978).

Se emplearon células mononucleares periféricas de donantes sanos como células blanco y en los ensayos se incluyó un control positivo con OKT3 (Ortho Diagnostic Systems).

Tanto para los líquidos ascíticos como para las muestras purificadas, se hicieron diluciones hasta la caída en el por ciento de células fluorescentes.

Virus murinos

El producto terminado se ensayó para detectar anticuerpos contra virus murinos mediante ensayos ELISA con kits adquiridos de Litton Bionetics Laboratory Products Division.

Las entidades ensayadas fueron:

- viruela murina,
- encefalomielitis murina,
- reovirus 3,
- pneumonía murina,
- virus diminuto,
- coriomeningitis linfocitaria,
- encefalomiocarditis murina.

RESULTADOS

El proceso de producción sistemática del AcM IOR-T3 para uso terapéutico, incluye las siguientes etapas (figura 1):

- cultivo de hibridoma
- inoculación de animales
- producción de líquido ascítico
- purificación de las inmunoglobulinas
- esterilización y envase.

Este flujo es producto de un proceso de ensayo de variantes y optimización. Los controles de calidad del proceso se hicieron en tres etapas de complejidad creciente.

En la etapa de cultivo de hibridomas, el parámetro importante fue la capacidad del sobrenadante para marcar mediante IFI las células mononucleares periféricas. El porcentaje de células marcadas debió ser superior al 50% para continuar la marcha.

Los animales produjeron entre 2 y 3 ml de ascitis cada uno. La calidad del líquido ascítico se evaluó igualmente por inmunofluorescencia a varias diluciones y se determinó la concentración de IgG por inmunodifusión radial simple.

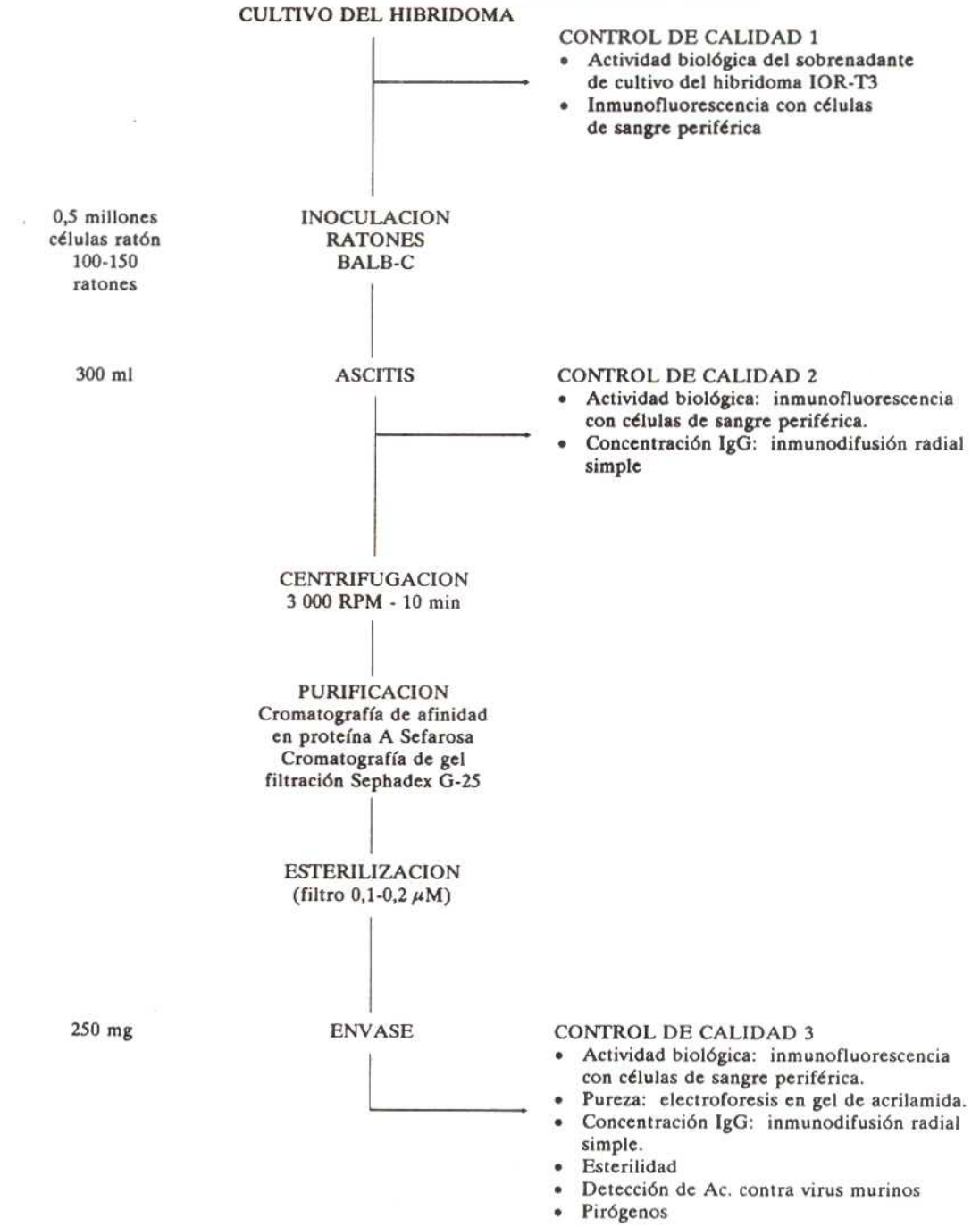

FIG. 1. Diagrama de flujo del proceso productivo del AcM IOR-T3.

La prueba de inmunofluorescencia permitió evaluar la concentración mínima de trabajo, que es la menor concentración en la cual el anticuerpo contenido en el líquido ascítico continúa marcando más del 50% de las células mononucleares de sangre periférica.

La cromatografía de afinidad en proteína A Sefarosa produjo un perfil cromatográfico típico con 3 picos (figura 2).

50% de las células mononucleares periféricas a concentraciones inferiores a 65 μg/ml,

- concentración de proteínas: ajustada a 1 mg/ml,
- esterilidad,
- libre de pirógenos en la prueba de pirogenicidad en conejos,
- ausencia de anticuerpos contra virus murinos.

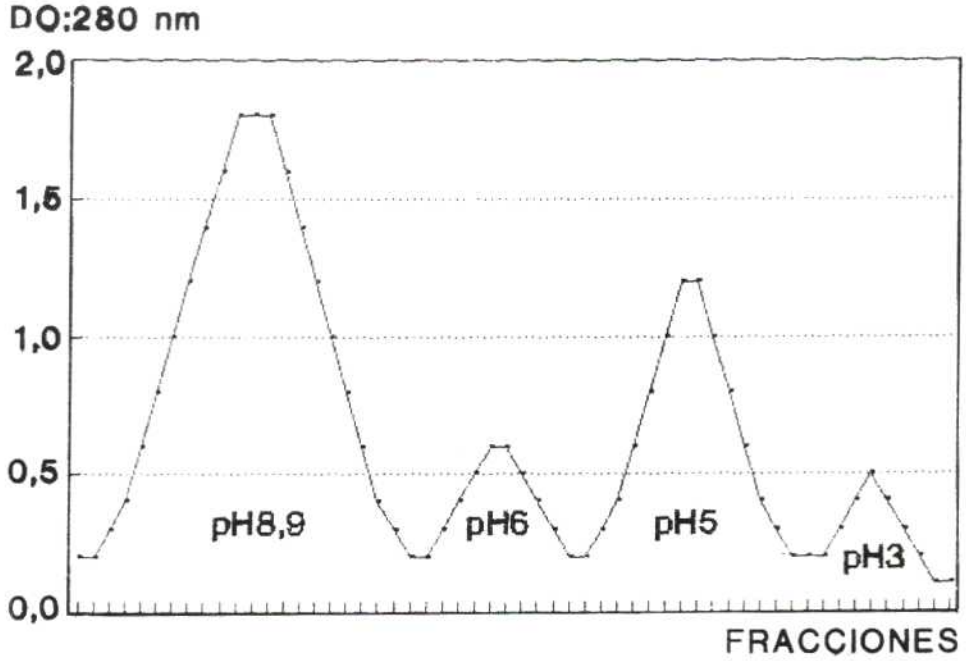

FIG. 2. Perfil cromatográfico de afinidad en proteína A Sefarosa para el ascitis conteniendo AcM IOR-T3.

La actividad biológica del AcM IOR-T3 se recuperó completamente en el tercer pico que eluyó a pH 5,0. Después del cambio de tampón en columna de G-25, esterilización y envase del producto, se sometió al control de calidad final cuyos resultados son:

- pureza: banda única en electroforesis en gel de acrilamida (figura 3),
- actividad biológica: capacidad de marcaje por inmunofluorescencia de más del

Los parámetros controlados del proceso de purificación mostraron una importante variabilidad, según puede apreciarse por los rangos mostrados en la tabla 1.

El proceso permite obtener en promedio 1,13 mg de IgG monoclonal purificado por mililitro de ascitis, lo que equivale a más de 200 mg por ciclo de purificación, con un rendimiento de más del 70%.

La evolución de los parámetros en el tiempo se muestra en la figura 4,

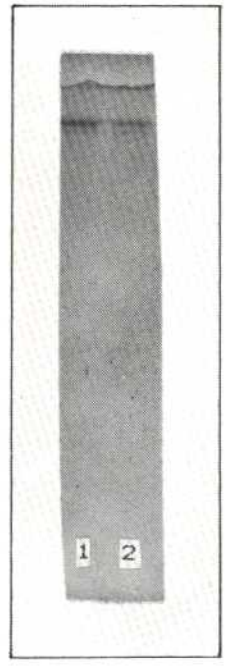

FIG. 3. Electroforesis en gel de acrilamida, en condiciones no reducidas, del anticuerpo monoclonal (AcM) IOR-T3, para uso terapéutico en forma de inyectable: columna 1 IgG murina patrón (PM 150 kDa), columna 2 AcM purificado.

correspondiéndole a cada mes diferente número de lotes de ascitis. Los lotes de mayor concentración de IgG en el líquido ascítico produjeron menores rendimientos de inmunoglobulina monoclonal.

La concentración de IgG en ascitis mostró una correlación directa con sus

Tabla 1
PARAMETROS CONTROLADOS DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DEL AcM IOR-T3

	ASCITIS		PRODUCTO FINAL		
	Concentración IgG mg/ml	Concentración mínima de trabajo μg/ml	Concentración mínima de trabajo μg/ml	mg, IgG purificados / ml ascitis	mg, IgG purificados / mg, IgG aplicados
N	21	17	12	21	15
Media	2,8	22,5	43,8	1,13	0,77
Desviación estándar	1,8	21,1	21,9	0,39	0,43
Rango	0,98–4,75	3–78	21–100	0,53–1,94	0,3–1,52

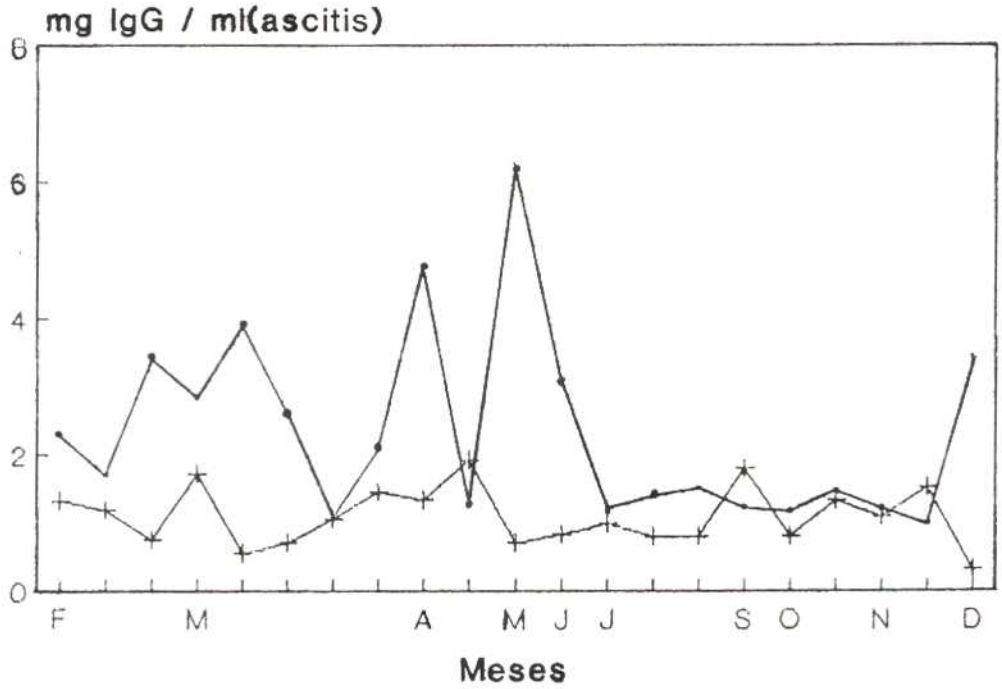

FIG. 4. Evolución de los parámetros: concentración de IgG en ascitis (—) y rendimiento de purificación (mg AcM/ml ascitis) (+) en el tiempo. Cada punto en el eje X corresponde a un lote de ascitis; como puede observarse a cada mes le corresponde diferente número de lotes de ascitis.

concentraciones mínimas de trabajo e inversa con los rendimientos de IgG monoclonal por mililitro de líquido ascítico y por miligramo de IgG procesados, lo cual fue estadísticamente significativo al realizarse un análisis de correlación de los valores obtenidos (tabla 2).

Tabla 2
TABLA DE CORRELACION: CONCENTRACION DE IgG EN ASCITIS, CONCENTRACION MINIMA DE TRABAJO DEL ASCITIS Y RENDIMIENTO DE IgG MONOCLONAL POR MILILITRO DE ASCITIS Y POR MILIGRAMO DE IgG PROCESADOS

	Concentración de IgG en ascitis	
	r	significación
Concentración mínima de trabajo (ascitis)	0,48	$p < 0,05$
mg de IgG pura / ml ascitis procesados	-0,392	$p < 0,05$
mg de IgG pura / mg IgG aplicados	-0,748	$p < 0,01$

DISCUSION

La utilización de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de pacientes genera para la producción un nivel cualitativamente superior de complejidad por dos razones:

- la necesidad de una escala de producción a nivel de gramos,
- la necesidad de un control superior de calidad.

La decisión de comenzar a aplicar anticuerpos monoclonales antilinfocitos T en el tratamiento de la crisis de rechazo de trasplantes, adoptada en 1987 por acuerdo entre el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología y el Instituto de Nefrología, requirió el establecimiento de un sistema de trabajo cuyas primeras experiencias se resumen en el presente artículo.

La calidad del inóculo de células debe ser rigurosamente comprobada al inicio del proceso. De hecho se comprobó que cuando se inicia el proceso con células cuyo sobrenadante presentaba escasa actividad biológica, esta baja actividad se mantiene durante todo el proceso. El crecimiento *in vivo* no corrige este defecto.

Esto puede indicar el predominio en estos casos de subpoblaciones de células híbridas de baja productividad en inmunoglobulinas o una modulación fenotípica lo suficiente mente estable para mantenerse *in vivo*. En el momento actual, las evidencias experimentales no permiten distinguir entre ambas posibilidades, pero en el orden práctico estas células deben desecharse y descongelar una nueva ámpula para asegurar la calidad del proceso posterior.

Los parámetros principales del proceso son intrínsecamente muy variables. Es indispensable mantener un buen número de mediciones en todos los pasos de todos los ciclos de producción.

La técnica de medición de IgG en el líquido ascítico determina IgG total de ratón, no solo IgG monoclonal. De hecho, se comprobó que las altas concentraciones de IgG total en el líquido ascítico conllevan bajos rendimientos de AcM, por lo que estas altas concentraciones reflejan probablemente la existencia de IgG naturales, no producidas por el hibridoma.

Los líquidos ascíticos con concentración de IgG total superior a 3 mg/ml tuvieron rendimientos inferiores a 30%, indicando que en ellos al menos el 70% de la IgG del líquido ascítico no correspondía a IgG monoclonal.

Por el contrario, los líquidos ascíticos con concentraciones de IgG total inferiores a 1,5 mg/ml tuvieron rendimientos de IgG monoclonal entre 70 y 100%.

En el rango de la variabilidad biológica del proceso, el parámetro menos variable fue la concentración de IgG monoclonal por mililitro de líquido ascítico, lo cual sugiere que existe una producción estable de AcM por las células del hibridoma *in vivo*, sumada con una respuesta muy variable de IgG natural producida por el ratón. En el momento actual no existe una explicación clara de esta variabilidad en la contaminación de la ascitis con IgG endógena.

Los volúmenes de líquido ascítico extraídos por animal fueron bajos (2-3 ml). Esto parece ser una característica propia del hibridoma ya que, con iguales procedimientos, hemos obtenido el doble de estos volúmenes de ascitis al inocular otro hibridoma, productor también de un AcM anti T3 (resultados no mostrados en el presente trabajo). Debe descartarse la posibilidad de que se deba al tipo de irritante utilizado, pues experimentos realizados con Pristane y adyuvante incompleto mostraron iguales resultados.

Los ensayos de diferentes procedimientos de purificación cromatográficos indicaron la conveniencia de la cromatografía de afinidad en proteína A Sefarosa por tres razones principales.

En primer lugar se obtiene un mayor grado de pureza (criterio electroforético) que mediante la cromatografía de intercambio iónico.

En segundo lugar, la posibilidad de la separación de subclases (Seppala *et al.*, 1981; Ey *et al.*, 1978; Langone *et al.*, 1982) se hace muy importante dada la contaminación del líquido ascítico con IgG endógena, como se ha discutido previamente.

La cromatografía de afinidad en proteína A Sefarosa limita esta contaminación a la IgG endógena de la misma subclase.

En tercer lugar se ha reportado que este método es capaz de remover pirógenos (Lee *et al.*, 1986), lo cual es de una gran importancia para AcM de uso terapéutico.

De hecho, las medidas adoptadas en este proceso para evitar la presencia de pirógenos, a saber: preparación de todas las soluciones con agua libre de pirógenos y esterilización posterior; tratamiento de la cristalería a 300°C, 2 horas; tratamiento del material plástico con NaOH 1N, 16 horas; lavado de la columna de G-25 con NaOH 0,1 N, 16 horas; lavado de la columna de proteína A Sefarosa a pH 3, 16 horas, resultaron eficaces. Ninguno de los 21 lotes evaluados en este trabajo tuvo que ser rechazado por la presencia de pirógenos.

El proceso productivo descrito en el presente trabajo puede utilizarse para la producción de AcM de calidad adecuada para uso terapéutico. Los métodos cromatográficos utilizados para la purificación de ascitis pueden escalarse a producciones de gramos de AcM, obteniéndose preparaciones de pureza adecuada, libres de pirógenos y virus murinos.

Experimentos con ADN marcado nos permitieron comprobar que el sistema de purificación utilizado es capaz de eliminar cualquier contaminación con ADN procedente del hibridoma, presentando un factor de depuración mayor que 100 000, lo que asegura niveles menores de 10 pcg de ADN por dosis del producto inyectable (manuscrito en preparación).

Los resultados obtenidos deben ser válidos para el procesamiento de AcM IgG2a, IgG2b e IgG3, pero su efectividad debe comprobarse en el caso de AcM de clase IgM o IgG1, los cuales se enlazan muy débilmente a la matriz de afinidad.

Los AcM producidos mediante este proceso han sido utilizados, hasta la fecha, en 16 pacientes, a dosis iguales o superiores a 5 mg diarios por vía endovenosa, mostrando excelente tolerancia, produciendo la disminución esperada en la cantidad de linfocitos T circulantes y resultados terapéuticos alentadores.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la asistencia técnica de Ana Veloso, María E. García y Miriam Zaldívar, la cual fue decisiva para la realización de los procedimientos reportados.

REFERENCIA

BRUCK, C.; D. PORTELLE; C. GLINEUR y A. BOLLEN (1982). *One step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE Affi-gel Blue chromatography.* J. Immunol. Meth **53**: 313-319.

BURCHIEL, S. W.; J. R. BILLMAN y T. R. ALBER (1984). *Rapid and efficient purification of mouse monoclonal antibodies ascitic fluid using HPLC.* J. Immunol. Meth. **69**: 33-42.

CARLSSON, M.; A. HEDIN; M. INGANAS; B. HARFAST y F. BLOMBERG (1985). *Purification of* in vitro *produced mouse monoclonal antibodies. A two step procedure utilizing cation exchange chromatography and gel filtration*. J. Immunol. Meth **79**: 89-98.

EY, P. L.; S. J. PROWSE y C. R. JENKIN (1978). *Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulin from mouse serum using protein A sepharose*. Immunochemistry **15**: 429-436.

GODING, J. W. (1980). *Antibody production by hybridomas*. J. Immunol. Meth. **39**: 285-308.

GOLDSTEIN, G. (1986). *An Overview of Orthoclone OKT3*. Transp. Proc. **18**: 927-930.

HERRERA, R.; A. LAGE; D. MORENO; G. GONZALEZ y C. MAGRANS (1987). *Evaluación clínica de un paciente trasplantado de riñón con rechazo esteroideo resistente*. Simposium sobre Trasplante de Organos y Nuevas Tecnologías. La Habana, Cuba, abril de 1987. Libro de Resúmenes, p. 67.

HUDSON, L. y F. C. HAY (1980). *Single radial immunodifusion*. Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications, 2nd Ed. Oxford, London, Edimburg, Boston, Melbourne, pp. 114-117.

KREIS, H. y G. GOLDSTEIN (1985a). *Monoclonal antibodies for the treatment of acute rejection episodes in renal transplantation*. Transp. Proc. **17**: 2751-2753.

KREIS, H.; N. CHKOF; L. CHATENOUD; H. CAMPOS; J. F. BACH y G. GOLDSTEIN (1985b). *Prolonged administration of monoclonal anti-T3 cell antibody (Orthoclone OKT3) to kidney allograft recipient*. Transp. Proc. **17**: 2734-2736.

LAEMMLI, U. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227**: 680.

LANGONE, J. J. (1982). *Aplications of immobilized protein A in immunochemical techniques*. J. Immunol. Methods **55**: 277-296.

LEE, S. M.; M. E. GUSTAFSON; D. J. PICKLE; M. C. FLICKINGER; G. M. MUSCHIK y A. C. MORGAN, Jr. (1986). *Large scale purification of a murine antimelanoma monoclonal antibody*. J. of Biotechnology **4**: 189-204.

LEVY, J. A.; H. M. LEE; R. T. KAWAJATA y L. E. SPITER (1984). *Purification of monoclonal antibodies from mouse ascitis eliminates infectious mouse type C viruses and nucleic acids*. Clin. Exp. Immunol. **56**: 114-120.

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

MANIL, L.; P. MOTHE; P. PERNAS; F. TROALEN; C. BOHION y D. BELLET (1986). *Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies*. J. Immunol. Methods **90**: 25-37.

NORMAN, D. J. y C. F. SHIELD (1987). *Orthoclone OKT3 First Line Therapy or Last Option?* Transp. Proc. **18**: 949-953.

ORTHO MULTICENTER TRANSPLANT STUDY GROUP (1985). *A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants*. N. Engl. J. Ned. **1985**: 313-317.

PETTERSON, D.; H. WELLSTED y G. HOLM (1978). *IgG on human blood lymphocyte studied by immunofluorescence*. Scand. J. Immunol. **8**: 535-542.

PHARMACIA (1986). Lab. Sep. Div. Separations News vol. **13**: 5.

SEPPALA, I.; H. SARVES; F. PETERFY y O. MAKELA (1981). *The four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using protein A Sepharose*. Scand. J. Immunol. **14**: 335-342.

SPITS, A.; H. YSSEL; J. LEEUWENBERG y J. E. DE VRIES (1985). *Antigen-specific cytotoxic T cell and antigen-specific proliferating T cell clones can be induced to cytotoxic activity by monoclonal antibodies against T3*. Eur. J. Immunol. **15**: 88-91.

STANKER, L. H.; M. VANDERLAAN y H. JUAREZ-SALINAS (1985). *One step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by hydroxylapatite chromatography*. J. Immunol. Methods **76**: 157-169.

TECHNOLOGY REPORTS. Biotechnol. Dec. 1984, p. 1035.