INMUNOGENICIDAD DEL INTERFERÓN ALFA-2B RECOMBINANTE (HEBERÓN ALFA R®). DETECCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO Y NEUTRALIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL

✉ Rolando González-Cabañas,[1] Joel Ferrero-Bibilonia,[1]
María G Morales-Menéndez,[2] Angel Aguilera-Rodríguez[1] y Pedro López-Saura[1]

[1]*Centro de Investigaciones Biológicas, apartado postal 6996, La Habana, Cuba.*
Telef: (53-7) 21 9635; E-mail: CLINTR@cigbdec.cigb.edu.cu
[2]*Instituto de Gastroenterología, 25 e I, Vedado, La Habana, Cuba.*

ABSTRACT

We studied the presence of anti-interferon antibodies in samples of healthy or sick individuals treated or not with natural leukocyte (Heberón alfa N) or recombinant alpha-2b (Heberón alfa R) interferon (IFN) by means of an immunoenzymatic assay (ELISA), "sandwich"-type (IFN alpha-2b/sample /protein A-peroxidase) with specificity confirmation. The IFN alpha-2b antiviral activity neutralization was also investigated. No anti-IFN antibodies were found by ELISA in 184 not treated individuals while among other samples the bioassay detected neutralizing activity in subjects with viral chronic hepatitis (8/181; 4.4 %) and neoplasia (11/121; 9.1 %). Ninety-eight healthy subjects or patients with other illness were negative. There was no positivity in leukocyte IFN-treated individuals, 27 of them evaluated by ELISA and 52 by the bioassay. After the treatment with IFN alpha-2b positivity by ELISA was confirmed in a girl with lymphangioma and in an adult with laryngeal papillomatosis among 177 patients. These ELISA-positive sera had neutralizing titers of 1:25 and 1:64 000 respectively. IFN alpha-2b treatment induced neutralizing activity in 13.1 % (19/145) of the patients evaluated by bioassay. The total incidence of treatment-induced antibodies, evaluated by either method, was 6.4 % (19/296). This is similar to what has been reported for IFN alpha-2b.

Key words: antibodies, anti-interferon alpha-2, ELISA, neutralization

Biotecnología Aplicada 1998;15:71-76

RESUMEN

En muestras de individuos sanos y enfermos tratados o no con interferón (IFN) alfa-2b recombinante (Heberón alfa R) o leucocitario natural (Heberón alfa N) se estudió la presencia de anticuerpos anti-IFN mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) tipo "sandwich" (IFN alfa-2b/muestra/proteína A-peroxidasa) con confirmación de la especificidad. También se investigó la neutralización de la actividad antiviral de IFN alfa-2b. Por ELISA no se encontró anticuerpos anti-IFN en 184 individuos no tratados mientras que en otras muestras evaluadas por bioensayo hubo actividad neutralizante en sujetos con hepatitis viral crónica (8/181; 4,4 %) y neoplasias (11/121; 9,1 %) y no en otros 98 con otras enfermedades o sanos. No se detectó anticuerpos anti-IFN en ninguno de los individuos tratados con IFN leucocitario, 27 de ellos evaluados por ELISA y 52 por neutralización de la actividad antiviral. Después del tratamiento con IFN alfa-2b se confirmó mediante ELISA la positividad en una niña con linfangioma y en un adulto con papilomatosis laríngea entre 177 pacientes. Los sueros positivos por ELISA tuvieron títulos neutralizantes de 1:25 y 1:64 000, respectivamente. El tratamiento indujo actividad neutralizante en 13,1 % (19/145) de los pacientes evaluados por bioensayo. La incidencia total de anticuerpos inducidos por el tratamiento, evaluada por cualquiera de los métodos, fue 6,4 % (19/296). Esta cifra es similar a la reportada para el IFN alfa-2b.

Palabras claves: anticuerpos, anti-interferón alfa-2, ELISA, neutralización

Introducción

Los interferones (IFN) se vienen produciendo por la vía del ADN recombinante en microorganismos desde finales de la década de 1970 y se han aplicado en el tratamiento de enfermedades virales, tumorales, desórdenes autoinmunes y otras (1). Sin embargo, el IFN producido en bacterias no es exactamente igual que su homólogo natural pues no está glicosilado y puede haber diferencias estructurales en algunas variantes de preparados farmacéuticos (1), lo que ha dado lugar a que, a diferencia de las preparaciones de IFN natural, algunos pacientes tratados con estos productos desarrollen anticuerpos neutralizantes de la actividad biológica del IFN.

Los reportes que muestran niveles de anticuerpos contra IFN no inducidos por el tratamiento (autoanticuerpos) han sido esporádicos. Se han encontrado en alrededor del 10 % de los pacientes con enfermedades autoinmunes (2) y en casos de rechazo de transplante de médula ósea contra huésped (3).

En 1981 apareció el primer reporte de anticuerpos anti-interferón en un paciente con carcinoma nasofaríngeo tratado con IFN beta (4). Está repor-

1. Baron S, Tyring SK, Fleischmann WR Jr *et al.* Interferon: Clinical use, mechanisms and future potential. JAMA 1991; 266:1375-1383.

2. Adolt GR, Kalsner I, Ahorn H, Mauer-Fogy I, Cantell K. Natural human interferon-alpha 2 is o-glycosylated Biochem J 1991;276:511-515

3. Prummer O, Seyfarth C, Sherbaum WA, Drees N, Porzolt F. Interferon-α antibodies in autoimmune disease J Interferon Res 1989,9:S67

✉ Autor de correspondencia

tado que el tratamiento prolongado con IFN alfa-2 recombinante induce la producción de anticuerpos (5-7) que pueden ser neutralizantes de la actividad biológica (8-10) y que esa neutralización puede revertir una respuesta clínica (11-13). Se ha estudiado la influencia que sobre este fenómeno pueden ejercer distintos factores como la diferencia de antigenicidad entre las preparaciones comerciales de IFN alfa-2 recombinante, enfermedad de base, dosis, vía de administración y esquema de tratamiento (7, 14, 15). No se ha podido aclarar totalmente estas cuestiones por lo que adquieren gran importancia los estudios de caracterización de este fenómeno en diferentes grupos de pacientes y esquemas de tratamiento.

La metodología a utilizar en la detección de anticuerpos anti-IFN es uno de los puntos críticos en estos estudios. Se utiliza principalmente la técnica de neutralización de la actividad antiviral (NAA), recomendada por la OMS (16). Sin embargo, este procedimiento es costoso y complejo metodológicamente por lo que se ha recurrido a métodos inmunoquímicos (17). Contar con una técnica sencilla, de rápida ejecución, bajo costo y alta especificidad y sensibilidad es de una importancia extraordinaria pues permite evaluar un gran número de sueros y llevar sólo aquellos que resulten positivos al ensayo de NAA.

En este trabajo se presenta el desarrollo de un procedimiento de ensayo inmunoenzimático sencillo para la detección de anticuerpos anti-IFN y la verificación de la especificidad de los mismos. Además se presentan los datos obtenidos en la evaluación de sueros de pacientes de varias enfermedades tratados con IFN alfa-2b recombinante o natural usando el procedimiento anterior y el ensayo de NAA.

Materiales y Métodos

Interferón

Se usó IFN alfa-2b humano recombinante (IFN alfa-2b hu-rec) producido en *Escherichia coli* en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana (CIGB) con una actividad específica de 2 x 10^8 UI/mg de proteínas (18). Los pacientes cuyos sueros se evaluaron fueron tratados con este producto en su forma comercial (Heberón alfa R, bulbos de 1, 3, 5 o 10 x 10^6 UI, HEBER BIOTEC, La Habana) o con IFN alfa natural producido en leucocitos de donantes de sangre inducidos por virus Sendai (Heberón alfa N, HEBER BIOTEC, La Habana). Para los ensayos de neutralización se usó una preparación de este producto previamente calibrada en ensayos de actividad antiviral contra el patrón internacional Gxa 01-901-535 de la OMS (19).

Muestras y controles

En la puesta a punto del ELISA para la detección de anticuerpos anti-IFN alfa-2b hu-rec se usó un suero de conejo inmunizado con IFN alfa-2b hu-rec (Subdirección de Control y Aseguramiento de la Calidad, CIGB) con un título de actividad neutralizante anti-IFN alfa de 1:128 en el ensayo biológico.

Para los análisis de las muestras, tanto por ELISA como por el bioensayo se usó como control positivo el suero de un paciente que había recibido tratamiento con IFN alfa-2b hu-rec durante 5 meses y que tenía título alto de anticuerpos anti-IFN por ambos procedimientos. Como controles negativos se usaron sueros de donantes del Banco de Sangre de Marianao (La Habana), de voluntarios aparentemente sanos. Como controles no relacionados de individuos con una enfermedad y tratamiento no relacionados se utilizaron sueros de pacientes de infarto del miocardio agudo 10 días y 3 meses después de haber recibido tratamiento con estreptoquinasa recombinante (Heberkinasa, HEBER BIOTEC, La Habana), producida en *E. coli*.

Se evaluaron sueros de pacientes incluidos en diferentes investigaciones clínicas bajo tratamiento con IFN alfa-2b hu-rec o IFN alfa leucocitario natural. Se tomaron muestras antes de comenzar el tratamiento (para descartar la presencia de autoanticuerpos) y a varios tiempos después de haber comenzado el mismo. Las muestras evaluadas incluyeron casos de hepatitis B crónica, hepatitis C crónica y aguda, papilomatosis respiratoria recurrente, condiloma acuminado, individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, lepra lepromatosa, esclerosis múltiple, púrpura trombocitopénica idiopática, hemangioma y linfangioma de la infancia, leucemia mieloide crónica, micosis fungoide, cáncer del pulmón y otras neoplasias. Además, se evaluaron sueros de pacientes de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Peyronié buscando autoanticuerpos anti-IFN alfa, aunque no fueron tratados con este producto.

Los pacientes evaluados en el transcurso de la terapia con IFN alfa-2b hu-rec comprendieron períodos entre 3 y 12 meses de tratamiento. Las dosis de IFN variaron entre 3 y 9 millones de UI diarias o tres veces por semana por vía intramuscular o subcutánea. En todos los casos se tomó la muestra al menos 48 h después de la última administración de IFN para evitar que algún IFN alfa exógeno enmascarara la determinación al neutralizar a anticuerpos presentes según las recomendaciones de la OMS (17). Una vez separado el suero las muestras se conservaron a -20 °C hasta que se hicieron las determinaciones.

Sistema ELISA indirecto, procedimiento estándar

Se usaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Costar) que se recubrieron con 100 µL de IFN alfa-2b hu-rec 10 µg/mL en tampón Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 0,1 mol/L pH 9,8 durante 3 h a 37 °C. Después de lavar con Tween 20 al 0,5 % (esta solución se usó para todos los lavados) se incubaron las

4. Schellekens H, Van Der Meide PH, Von Wussow P. Factors inhibiting IFN avtivity. Biotherapy 1996;8:199-204.

5. Vallbracht A, Treuner J, Flehmig B, Joester KE, Niethammer D. Interferon-neutralizing antibodies in a patient treated with human fibroblast interferon. Nature 1981;289:496-497.

6. Dianzani F, Antonelli G, Amicucci P, Cefaro A, Pintus C. Low incidence of neutralizing antibody formation to interferon-α2b in human recipients. J Interferon Res 1989;9(Suppl. 1):S33.

7. Öberg K, Alm GV. Development of neutralizing interferon antibodies after treatment with recombinant interferon-α2b in patients with malignant carcinoid tumors. J Interferon Res 1989;9 (Suppl. 1):S45.

8. Spiegel RJ, Jacobs SL, Treuhaft H. Anti-interferon antibodies to interferon-α2b: Results of comparative assays and clinical perspective. J Interferon Res 1989;9(Suppl. 1):S17.

9. von Wussow P, Freund M, Block B, Diedrich H, Poliwoda H, Deicher H. Clinical significance of antibody titers during interferon therapy. Lancet 1987;2: 635-636.

10. Steis RG, Smith JW, Urba WJ et al. Resistance to recombinant interferon alpha-2a in hairy cell leukemia associated with neutralizing anti-interferon antibodies. New Engl J Med 1988;318:1409-1413.

11. Öberg K, Alm GV, Magnusson A et al. Treatment of malignant carcinoid tumors with recombinant interferon-α2b (Intron A): development of neutralizing interferon antibodies and possible loss of antitumor activity. J Natl Cancer Inst 1989; 81:531-535.

12. von Wussow P, Hartmann F, Freund M, Poliwoda H, Deicher H. Leukocyte-derive interferon-alpha in patients with antibodies to recombinant IFN-α2b. Lancet 1988;1:882-883.

13. von Wussow P, Jakschies D, Freund M et al. Treatment of anti-recombinant interferon-alpha 2 antibody positive CML patients with natural interferon-alpha. Br J Haematl 1991;78:210-216.

14. von Wussow P, Pralle H, Hochkeppel H et al. Effective natural interferon-α therapy in recombinant interferon-α-resistant patients with hairy cell leukemia. Blood 1991;78:38-43.

15. Itri ML, Sherman MI, Palleroni AV et al. Incidence and clinical significance of neutralizing antibodies in patients receiving recombinant interferon-α2a. J Interferon Res 1989;9:S9.

16. Weck PK, Levethal BG, Brand C, Finter NB. Detection and incidence of neutralizing antibodies to interferon-α-n1. J Interferon Res 1989;9:S37.

17. Grossberg SE. Human Antibodies to Interferons: Report of a National Institutes of Health Workshop held on 25-26 July 1988 in Bethesda, MD. J Interferon Res 1988;8(6):6-7.

18. Hennes U, Jucker W, Fischer A et al. The detection of antibodies to recombinant interferon alpha-2a in human serum. J Biol Standardization 1987;15: 231-244.

muestras problema y los controles (100 µL) diluidos 1:5 en leche deslipidizada al 0,5 % en tampón fosfato-salino (NaCl 136 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L, Na_2HPO_4 8,1 mmol/L, KH_2PO_4 1,76 mmol/L, pH 7,2 – 7,4) durante 2 h a 37 °C. Se lavó cuatro veces y se añadieron 100 µL/pozo del conjugado proteína A - peroxidasa (División de Inmunotecnología y Diagnóstico, CIGB) diluido 1:5 000 en la misma solución que las muestras y se incubó 30 min a 37 °C. Se lavó seis veces y se reveló añadiendo 100 µL/pozo de H_2O_2 al 0,15 % + o-fenilendiamina 5 mg/mL (Merck). La reacción se detuvo con 50 µL/pozo de H_2SO_4 2 mol/L y se midió la absorbancia a 492 nm en el lector de placas SUMA 031 (Tecnosuma, La Habana).

En cada placa se colocó un control positivo y un control negativo. Se consideró posibles positivos a los sueros con valores de extinción superiores a tres desviaciones estándar por encima del promedio de 216 valores de los controles negativos evaluados en 25 ensayos consecutivos. Se consideró dudosas a las muestras con valores de absorbancia entre dos y tres desviaciones estándar del valor promedio de los controles negativos del ensayo y negativos a los sueros con valores inferiores a dos desviaciones estándar del promedio de los controles negativos. Las muestras posibles positivas y dudosas fueron sometidas posteriormente a la prueba confirmatoria (prueba de especificidad).

Prueba de especificidad

La especificidad del ensayo se evaluó de cuatro formas: (i) incubación previa del suero con IFN alfa-2b hu-rec (100 µg/mL) durante 1 h a 37 °C y evaluación posterior en el sistema de ensayo; (ii) incubación simultánea de la muestra y el IFN alfa-2b hu-rec (100 µg/mL) en la placa; (iii) ensayo de las muestras en pocillos recubiertos con interleuquina-2 (IL-2) hu-rec como proteína no relacionada producida también en *E. coli* y (iv) preincubación con proteínas no relacionadas producidas en *E. coli* (IL-2 hu-rec e IFN gamma hu-rec). Se consideró "confirmadas" a las muestras cuya extinción estuvo por debajo del punto de corte en las variantes (i), (ii), (iii) o quedó por encima del punto de corte en la variante (iv). Posteriormente, para la confirmación de la positividad de las muestras de pacientes se utilizó solamente la primera variante. Las que resultaron confirmadas se evaluaron en el ensayo de NAA. La IL-2 y el IFN gamma fueron producidos en el CIGB.

Evaluación de la actividad neutralizante anti-IFN alfa-2b hu-rec

Se realizó según las recomendaciones de la Sociedad Internacional para Investigaciones sobre IFN y la OMS (17). El método está basado en la capacidad de los anticuerpos de neutralizar la actividad antiviral de los interferones. Esta última se midió por la inhibición del efecto citopatogénico del virus Mengo sobre las células HEp-2 (carcinoma laríngeo humano) según el procedimiento descrito previamente (20). Todas las diluciones se realizaron en el medio que se usa para la titulación de IFN (MEM + aminoácidos esenciales + 2 % de suero fetal de ternera + 40 µg/mL de gentamicina). Se preincubaron diluciones seriadas de las muestras o controles con 10 UI/mL de IFN alfa-2b hu-rec 1 h a 37 °C. Esta mezcla (100 µL) se añadió a las placas de cultivo de 96 pozos (Costar) con la monocapa de células HEp-2. Se incubaron las placas a 37 °C, 3 % de CO_2 y 95 % de humedad relativa durante 24 h (tiempo que garantiza que se alcance el estado antiviral) al cabo de las cuales se añadió virus Mengo para provocar la destrucción celular en los pozuelos que no estuvieran protegidos. El diseño de cada placa contempló pocillos como controles de células, donde sólo se añade medio, controles de virus donde sólo se adiciona virus y controles de IFN donde no se añade ninguna muestra. En placas paralelas se descartó la posible citotoxicidad de las muestras evaluadas adicionando todos los componentes excepto el virus Mengo. Las placas se tiñeron con Cristal Violeta al 0,75 % y se midió la absorbancia a 570 nm en el equipo SUMA 031.

Se consideró como título neutralizante, en unidades de neutralización de interferón (UNI), al inverso de la dilución del suero capaz de reducir la protección de las células en un 50 % (equivale a reducir la actividad del IFN de 10 UI a 1 UI).

Resultados

Desarrollo del ELISA para la detección de anticuerpos de unión anti- IFN alfa-2b hu-rec.

En la Figura 1 se observa que la diferencia de las absorbancias de los controles positivos y muestras posibles positivas con los controles negativos en el

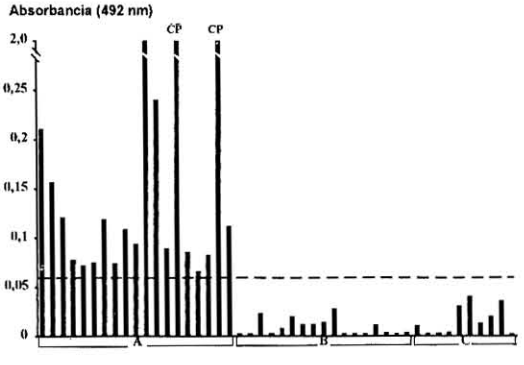

Figura 1. Valores de absorbancia a 492 nm de diferentes muestras de suero en el sistema ELISA indirecto (procedimiento estándar) para la detención de anticuerpos anti-IFN alfa-2b hu-rec. Cada barra representa la media de las determinaciones de suero de un individuo. Las desviaciones estándar fueron en todos los casos inferiores a 0,02. A: control positivo (CP) y otros pacientes tratados con IFN alfa-2b hu-rec cuyas muestras resultaron posibles positivas; B: donantes de sangre; C: pacientes de infarto del miocardio 10 o 30 días después de recibir estreptoquinasa recombinante producida en *E. coli*. La línea discontinua representa el valor de corte (0,06), media + 3 desviaciones estándar de los controles negativos (B).

19. Herrera L, de la Fuente J, Quiñones Y *et al.* Biologicals production by recombinant DNA technology in Cuba. Dev Biol Stand 1989;70:257-269.

20. National Institute of Alergy and Infectious Diseases, Research Reference Reagent Note No. 31. Freeze-dried Reference Human Recombinant Alpha-2 Interferon. Catalog Number Gxa 01-901-535. National Institutes of Health Bethesda, Maryland, 1984, pp. 1-5.

ELISA fue clara. El promedio de los valores de absorbancia obtenidos con los 17 sueros de donantes de sangre, evaluados en 216 determinaciones realizadas en 25 días diferentes fue de 0,015 con una desviación estándar de 0,015. De ahí que se tomara como límite de sensibilidad el valor de 0,060 que corresponde al promedio más tres veces la desviación estándar de estos valores. El estudio de los sueros pertenecientes a los 10 pacientes que recibieron estreptoquinasa después de sufrir infarto agudo del miocardio no arrojó valores de absorbancia diferentes a los de la población de donantes sanos estudiada.

En la Figura 2 se observa además el resultado de la prueba de especificidad del ensayo con el suero de conejo anti-IFN alfa-2b hu-rec usado para la puesta a punto de la técnica y con el control positivo. Las cuatro variantes analizadas confirmaron la especificidad del sistema. La señal positiva desapareció al preincubar las muestras con 100 µg/mL de IFN alfa-2b hu-rec (variante i) o al recubrir los pocillos con IL-2 (variante iii) y disminuyó en más del 70 % al aplicar la muestra simultáneamente con IFN alfa-2b hu-rec a 100 µg/mL (variante ii). Por otra parte la señal no se modificó al preincubar con proteínas no relacionadas como IL-2 (no mostrado) o IFN γ (variante iv).

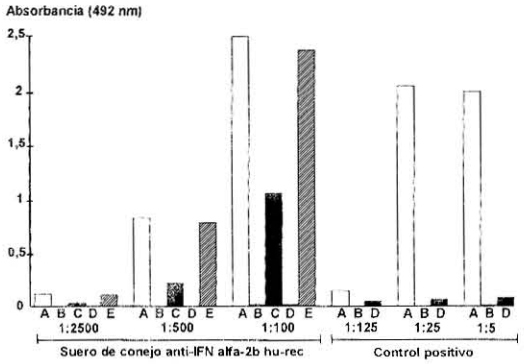

Figura 2. Valores de absorbancia a 492 nm obtenidos con el suero de conejo anti-IFN alfa-2b hu-rec y el suero humano usado como control positivo a las diluciones indicadas en la abscisa. Las desviaciones estándar fueron en todos los casos menores que 0,02. Prueba de especificidad
A: suero preincubado a 37 °C, 1 h con el tampón de ensayo en pocillos recubiertos con 1 µg de IFN alfa-2b hu-rec; B: suero preincubado con 100 µg/mL de IFN alfa-2b hu-rec (variante i descrita en Materiales y Métodos); C: suero incubado sobre la placa simultáneamente con 100 µg/mL de IFN alfa-2b hu-rec (variante ii); D: suero ensayado en pocillos recubiertos con IL-2 hu-rec (variante iii); E: suero preincubado con 100 µg/mL de IFN gamma (variante iv).

Evaluación de sueros por ELISA

En la Tabla 1 se muestra que de 184 individuos evaluados sin recibir tratamiento, 2 (1,1 %) resultaron con valores de absorbancia superiores a 0,06 por lo que se consideraron como posibles positivos. Sin embargo, no se confirmó la positividad en ninguno de ellos. En la evaluación de 177 sueros de pacientes que habían recibido tratamiento con IFN alfa-2b hu-rec, se encontraron 16 (9,0 %) muestras como posibles positivas, de las cuales se confirmó la positividad en 2 (1,1 %) al preincubar el suero con la proteína de recubrimiento (Tabla 2). Uno de los pacientes es un adulto de 65 años con papilomatosis laríngea recurrente con un título muy alto de actividad neutralizante (ver más adelante). El otro caso es una niña de 16 meses con un linfangioma. En la Tabla 2 se presentan también, como ejemplo, los resultados obtenidos con los sueros de algunos pacientes que resultaron posibles positivos pero no fueron confirmados. Ninguno de ellos mostró neutralización de la actividad antiviral. No se encontró positividad en ninguno de 20 portadores del VIH ni en siete pa-

Tabla 1. Evaluación por ELISA de la presencia de anticuerpos anti-IFN alfa-2b hu-rec en sueros de pacientes, antes y/o después del tratamiento con IFN alfa-2b hu-rec.

Condición	No tratados			Después del tratamiento		
	Evaluados	PP	PC	Evaluados	PP	PC
Hepatitis C aguda	10	0	-	10	0	-
Hepatitis C crónica	25	0	-	25	4 (16)	0
Leucemia mieloide crónica	0	-	-	40	3 (7,5)	0
Seropositivos al VIH	24	1 (4,2)	0	53	2 (3,8)	0
Papilomatosis respiratoria	10	0	-	16	2 (12,5)	1 (6,3)
Enfermedad de Peyronié	20	0	-	0	-	-
Hemangioma	22	1 (4,5)	0	22	2 (9,1)	1 (4,5)
Micosis fungoide	17	0	-	10	3 (30,0)	0
Esclerosis múltiple	11	0	-	1	0	-
Artritis reumatoide	18	0	-	-	-	-
Infarto agudo del miocardio	10	0	-	-	-	-
Sanos	17	0	-	-	-	-
Total	184	2 (1,1)	0	177	16 (9,0)	2 (1,1)

Las cifras representan número de pacientes (entre paréntesis el por ciento del total evaluado).
PP: posibles positivos; PC: positividad confirmada.

Tabla 2. Resultados del examen de algunos sueros de pacientes en la evaluación para anticuerpos anti-IFN alfa-2b hu-rec por ELISA y por neutralización de la actividad antiviral de IFN.

Paciente	Edad (años)	Diagnóstico	Tiempo con IFN (meses)	ELISA (valores de absorbancia a la dilución indicada)			Neutralización (UNI)
				Dilución	Preincubación		
					Tampón	IFN alfa-2b hu-rec	
LM[a]	65	PL	5	1:80	1,002	0,03	64 000
JC	46	PL	3	1:10	0,180	0,214	< 2
AH	5	PL	9	1:10	0,75	0,87	< 2
EG	65	MF	6	1:25	0,134	0,118	< 2
CM[b]	1,3	L	6	1:10	0,112 0,147	0,043 0,012	25
DM	53	HCC	9	1:10	0,130	0,135	< 2

a: Este suero es el que se tomó como control positivo; b: Se presentan los resultados de dos evaluaciones por ELISA en días diferentes; PL: papilomatosis laríngea; MF: micosisfungoide; HCC: hepatitis C crónica; L: linfangioma.

cientes con micosis fungoide tratados con IFN alfa leucocitario natural.

Evaluación mediante ensayo NAA

En el ensayo de NAA se evaluaron las muestras que resultaron positivas en el ELISA así como algunas posibles positivas y negativas con el propósito de validación del mismo. También se analizaron algunos pacientes antes de que se hubiera desarrollado el ELISA por lo que no se cuenta con resultados de este tipo de ensayo en esos casos.

Se evaluaron 400 pacientes sin haber recibido tratamiento con IFN. Se encontró actividad neutralizante en el suero de 19 individuos (4,8 %), de los cuales 11 padecían enfermedades oncológicas y 8, hepatitis viral crónica. No se encontró actividad neutralizante en ninguno de los 14 voluntarios sanos evaluados.

Se valoraron 52 sueros de sujetos que recibieron tratamiento con IFN alfa leucocitario. Provenían de pacientes con cáncer del pulmón (46 pacientes), hepatitis B crónica (2 pacientes), papiloma laríngeo (2 pacientes), sarcoma de mastoide (1 paciente) y cáncer renal (1 paciente). En ninguno de ellos se encontró actividad neutralizante (resultados no mostrados).

Después de haber recibido tratamiento con IFN alfa-2b hu-rec se evaluaron 145 pacientes (ninguno de ellos positivo antes del tratamiento) y se detectó actividad neutralizante en 19 (13,1 %). En todos los casos la actividad fue baja (≤100 UNI) excepto en el paciente de papilomatosis laríngea referido anteriormente (Tabla 3).

Antigenicidad del Heberón alfa R®

Tomando el conjunto de análisis efectuados, de 296 individuos tratados con Heberón alfa R, que han sido evaluados por cualquier ensayo (ELISA o NAA) se indujo la formación de anticuerpos, todos neutralizantes, en 19 (6,4 %). No se detectó ningún caso de anticuerpos de unión solamente.

Discusión

Los reportes en la literatura sobre las determinaciones de anticuerpos anti-interferón mediante ELISA usan sistemas tipo "sandwich" muy similares al empleado por nosotros, con pasos de recubrimiento con interferón, adición de la muestra a evaluar y posteriormente de anti-IgG humana en carnero conjugada con fosfatasa alcalina (21) o peroxidasa (8) o peroxidasa-interferón alfa-2b hu-rec (22). La comparación de los resultados usando radioinmunoensayos, ELISA y bioensayo no arrojó diferencias entre ellos (8). En nuestro caso se usa proteína A - peroxidasa como conjugado de revelado. Este conjugado se usa con frecuencia en sistemas de diagnóstico (23, 24) y ha demostrado ser útil.

El sistema ELISA desarrollado resultó útil para la detección de anticuerpos anti- IFN alfa-2b hu-rec ya que garantizó una diferencia suficientemente grande entre sueros positivos y negativos discriminados por otro método con diferente principio (bioensayo), y el valor de corte fue bajo, demostrado por el estudio de una población sana, lo que indica sensibilidad del sistema para la detección de posibles sueros positivos. La señal por encima del valor de corte no fue siempre debida a anticuerpos anti-IFN, como lo demostró la prueba de especificidad. Sin embargo, la pérdida de la señal de los sueros controles positivos al ser preincubados con IFN alfa-2b hu-rec resultó ser un buen criterio de confirmación ya que todos los sueros donde esta prueba fue positiva tuvieron actividad neutralizante y ninguno de los negativos evaluados neutralizó la actividad antiviral de IFN *in vitro*. Las causas de la señal positiva no específica pueden ser diversas (presencia de IgA, factor reumatoideo u otras) y deben ser estudiadas.

Los resultados obtenidos de la evaluación de muestras mediante el sistema ELISA demuestran una baja frecuencia (1,1 %) de aparición de anticuerpos anti-interferón después del tratamiento con Heberón alfa R y concuerdan con lo reportado para el IFN alfa-2b hu-rec

21. Ferrero J, Ochagavia ME, Aguilera A, López-Saura P. Titulación de la actividad antiviral de interferón utilizando el sistema de equipos SUMA. Biotecnología Aplicada 1994;11:34-42.

22. Bekisz JB, Zur Nedden DL, Enterline JC, Zoon KC. Antibodies to interferon-α2 in patients treated with interferon-α2 for Hairy Cell Leukemia. J Interferon Res 1989;9:S1.

23. Von Wussow P, Jakschies D, Freund M, Deicher H. Humoral response to recombinant interferon α2b in patients receiving recombinant interferon α2b therapy. J Interferon Res 1989;9:S25.

24. López G, Benítez J, Serrano P. Mezclas de sueros para la detección de anticuerpos al VIH mediante el sistema diagnóstico RECVIH 1+2. Biotecnología Aplicada 1994;11:30-33.

Tabla 3. Evaluación de la actividad neutralizante anti- IFN alfa-2b hu-rec en sueros de pacientes, antes y/o después del tratamiento con IFN alfa-2b hu-rec.

Condición	No tratados		Después del tratamiento	
	Evaluados	Positivos (%)	Evaluados	Positivos (%)
Hepatitis C aguda	10	0	10	0
Hepatitis C crónica	16	1 (6,2)	11	1 (9,1)
Hepatitis B crónica	165	7 (4,2)	47	14 (29,8)
Papilomatosis respiratoria	3	0	3	1 (33)
Lepra lepromatosa	33	0	22	0
Cáncer del pulmón	102	9 (8,8)	18	2 (11,1)
Hemangioma	13	0	13	1 (7,7)
Otras neoplasias	19	2 (10,5)	5	0
Condiloma acuminado	19	0	-	-
Lupus eritematoso sistémico	1	0	-	-
Púrpura trombocitopénica idiopática	5	0	-	-
Seropositivos a VIH	0	-	16	0
Sanos	14	0	-	-
Total	400	19 (4,8)	145	19 (13,1)

(6, 25), donde se ha encontrado menos del 3 % de anticuerpos inducidos en pacientes tratados.

Los anticuerpos encontrados por ELISA en el suero de dos pacientes fueron neutralizantes de la actividad antiviral del IFN alfa, lo que era de esperar de sueros policlonales, aunque en la literatura existen datos sobre la aparición de anticuerpos de unión sin actividad neutralizante. El pequeño número de sueros positivos por ELISA encontrados en este estudio no permite afirmar que no existan en los pacientes tratados con Heberón anticuerpos de unión.

Los datos generados de la evaluación mediante el ensayo de neutralización de la actividad antiviral muestran una frecuencia de aparición de anticuerpos anti-IFN (13,1 %), mayor que la reportada (26). Sin embargo se debe tener en cuenta que la mayoría de las muestras evaluadas en el ensayo de neutralización corresponden a pacientes seleccionados por los médicos de asistencia debido a evolución no favorable con el tratamiento o a sueros previamente positivos por ELISA. Hay que tener presente que las muestras evaluadas sólo mediante NAA que resultaron positivas no necesariamente deben ser consideradas como continentes de anticuerpos, ya que existe otro grupo de factores como receptor soluble de interferón, moléculas híbridas inmunoglobulina-receptor, factores bloqueadores de la actividad de los interferones (4) que pueden ser los responsables de la neutralización. Es posible que este sea el caso de al menos algunos de los sueros con actividad neutralizante en individuos que no habían recibido tratamiento con IFN. La mayoría de los sueros positivos tuvieron títulos bajos, con muy poca o ninguna significación clínica.

Resulta interesante el elevado título de neutralización de la actividad antiviral que se encontró en el paciente con papilomatosis laríngea, también positivo por ELISA, el cual debe tener una marcada repercusión clínica. Esta actividad neutralizante se ha repetido en varias muestras del mismo paciente y debe ser caracterizada adecuadamente en cuanto a cinética de aparición, subtipos de IFN que neutraliza y significado clínico. Este paciente desarrolló recaídas de la enfermedad bajo tratamiento con IFN alfa-2b hu-rec. El paciente de hepatitis C crónica que desarrolló actividad neutralizante después del tratamiento ha sido reportado anteriormente. Fue el único de una serie de 11 casos de esa enfermedad que no tuvo respuesta completa al tratamiento con IFN alfa-2b hu-rec (26). En el resto de los casos con actividad neutralizante ésta no tuvo repercusión clínica documentada.

Este trabajo aporta los primeros datos sobre la inmunogenicidad del Heberón alfa R. Es importante evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IFN porque brinda la posibilidad de detectar una causa de resistencia al tratamiento y cambiar al uso de interferón natural evitando que el paciente pierda los beneficios de esta terapia. Se ha visto que pacientes tratados con IFN recombinante que no responden al mismo debido a la presencia de anticuerpos neutralizantes pueden responder al tratamiento con IFN natural (12-14). El conocimiento sobre la antigenicidad y las implicaciones en la terapéutica de estos productos actualmente resultan temas con muchas interrogantes que deben ser investigadas.

25. Benitez J, Rivero J, Calzadilla R, Serrano M. Follow-up of HIV-infected individuals by semiquantitative detection of antibodies to p24 in ELISA. Serodiagn Immunother Infect Disease 1994;6:113-116.

26. Intron A. Product information. Schering Plough Corporation Kenilworth, NJ, USA, 1996.

27. Arús E, Infante M, Padrón GJ, Morales MG, Gra Oramas B, Soto G *et al.* Interferón alfa-2b recombinante en hepatitis C crónica: resultados del tratamiento y determinación de anticuerpos anti-interferón. Biotecnología Aplicada 1997;14:242-247.

Recibido en abril de 1997. Aprobado en octubre de 1997.