



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

20013

26 p.
tablas
gráficos
diagramas

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA AMERICA
LATINA Y EL CARIBE DP/RLA/83/003**

**PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:
UN ESFUERZO COMPARTIDO EN LATINOAMERICA**

INFORME FINAL

**CONTRATO No. 90/141
Instituto de Investigaciones Biomédicas (Dr. Heriberto Cuevas)
La Paz, Bolivia**

9.

**INFORME DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE EL
ADIENTRAMIENTO EN PRODUCCION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES.**

Realizado del 4 de Febrero al 4 de Mayo de 1991 en el Centro Oncológico de Medicina Nuclear, Instituto Angel H. Roffo. Av. San Martín 5481. CP 1417. Buenos Aires - Capital Federal. República de Argentina.

Profesional Instructor.- Dr. Alberto L. Horenstein.
Dr. Gabriel L. Fiszman.

Proyecto.- Producción Masiva de Anticuerpos Monoclonales
Participante - Eduardo Gonzales Dávalos (Bioquímico-
Farmacéutico)

País.- Bolivia
- Academia Nacional de Ciencias de
Bolivia - Instituto de Investigaciones
Biomédicas. Av. 16 de Julio # 1732.
Casilla 5829. La Paz - Bolivia.

INDICE

	Pag.
1. ANTECEDENTES	1
2. ASPECTOS BASICOS DEL ENTRENAMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	2
3. ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO.....	3
4. CARACTERISTICAS DEL MATERIAL DE TRABAJO.....	3
4.01.- Lavado del material usado.....	3
4.02.- Soluciones.....	4
4.03.- Composición del medio Opti-MEM.....	4
4.04.- Preparación del medio Opti-MEM.....	4
5. DESCONGELAMIENTO DE CELULAS.....	5
5.01.- Metodología.....	5
6. RECUENTO CELULAR.....	5
6.01.- Metodología.....	5
7. CONGELAMIENTO DE CELULAS B2C114.....	6
7.01.- Metodología.....	6
8. CARACTERIZACION METABOLICA DE LA LINEA B2C114.....	7
8.01.- Metodología	7
8.02.- Reproducción de células Vs. tiempo.....	7
8.03.- Consumo de glucosa Vs. tiempo.....	8
8.04.- Consumo de glucosa Vs. número de células.....	9
8.05.- Viabilidad de las células Vs. tiempo.....	10
8.06.- Variación del pH Vs. tiempo.....	11
8.07.- Actividad del anticuerpo.....	13
8.08.- Comparación de gráficas.....	13
8.09.- ELISA anti A - B.....	14
8.10.- Inmuno-DOT anti A - B.....	15
9. PRODUCCION DE ASCITIS	16
9.01.- Metodología empleada.....	16
10. PURIFICACION DEL ANTICUERPO (IgG) DEL LIQUIDO ASCITICO.....	16
10.01.- Presipitación con sulfato de amonio.....	17
10.02.- Desalinización en G-25.....	17
10.03.- Cromatografía de afinidad por proteína A-Sepharosa.....	17
10.04.- Perfil cromatográfico y observaciones.....	18
10.05.- Determinación de la actividad aglutinante de los Picos.....	18
10.06.- SDS PAGE.....	19
10.07.- Conclusiones.....	19
11. CLONADO.....	20
11.01.- Obtención de Macrófagos.....	20
11.02.- Obtención de Timocitos y/o Linfocitos.....	20
11.03.- Clonado por dilución limitante.....	21
11.04.- Resultados.....	22
11.05.- Conclusiones y observaciones.....	22

PARTE II

12.	INMUNIZACION.....	22
13.	ANTIGENO UTILIZADO	23
14.	PROTOCOLO DE INMUNIZACION IN VIVO.....	23
15.	DETERMINACION DEL ANTICUERPO POR ELISA.....	23
15.01.-	Metodología empleada.....	23
15.02.-	Resultados y conclusiones.....	24
16.	PREPARACION DE CELULAS NSO PARA LA FUSIÓN.....	25
16.01.-	Actividad de la vía endogena.....	25
17.	FUSION.....	25
17.01.-	Metodología por agitación con PEG al 50%	25
17.02.-	Resultados y conclusiones.....	25
18.	CONCLUSION GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO.....	26

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

1. ANTECEDENTES.-

La preparación de hibridomas constituyó un hito en la inmunoquímica. La primera aplicación de esta tecnología fue la producción de anticuerpos monoclonales (AcM) para remplazar en toda clase de inmunoensayos a los anticuerpos policlonales obtenidos por medios convencionales. Es cierto que la preparación de AcM de alta afinidad no deja de ser una tarea laboriosa, pero las posibilidades que ellos ofrecen fueron pronto obvias para todo el mundo. Quizá lo más importante de los AcM fue que nos ayudaron a comprender muchos procesos inmunológicos y que posibilitaron el manipuleo in vitro de los anticuerpos.

Es así que hace pocos años atrás, el interés comercial de los AcM fue incrementado rápidamente, especialmente en las áreas de diagnóstico, imágenes de tumor, terapia del cáncer, etc. Se estima que en el año 1990 se invirtieron 2.7 billones de dólares: de los cuales la mayor parte fue dirigida hacia la investigación.

Los procedimientos de las técnicas en su gran mayoría se encuentran basadas en las investigaciones realizadas por Georges Köhler y César Milstein (1975), quienes demostraron que la hibridización de linfocitos inmunes de ratón y células de mieloma, daba por resultado la formación de células híbridas las cuales podían secretar inmunoglobulinas homogéneas de especificidad predefinida: los anticuerpos monoclonales.

La República de Bolivia a través del proyecto: PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES, otorgado por Naciones Unidas y donde participan varios países latinoamericanos, ahora se suma al conocimiento de la tecnología que hará posible que en un plano mediano pueda llegar a producir su AcM.

2. ASPECTOS BASICOS DEL PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

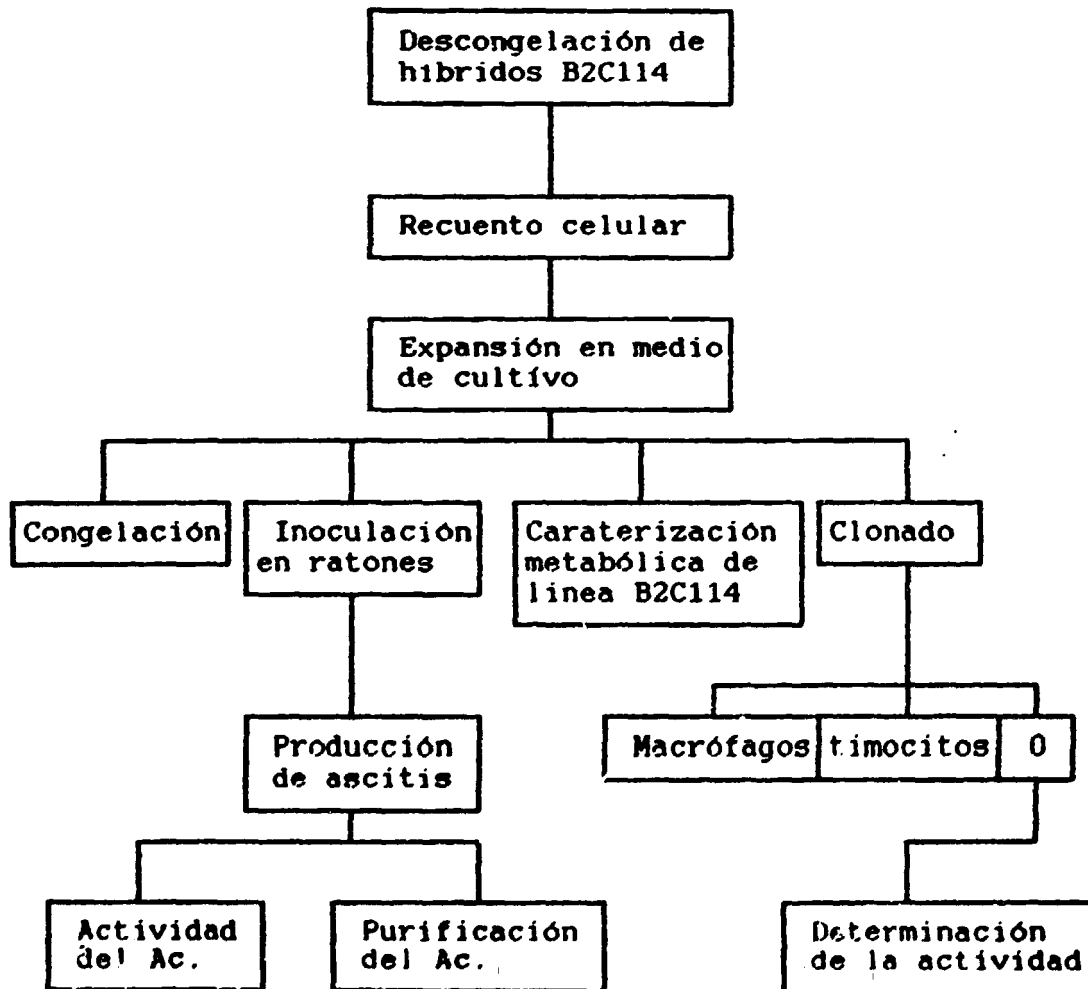
- 1) Preparación de medios y materiales para el cultivo de líneas celulares de mieloma y de hibridomas. Descongelación y congelación de líneas celulares.
- 2) Inoculación de ratones con células de mieloma y con hibridomas para preservar las líneas y para producción de ascitis.
- 3) Detección de micoplasma. Metodología para la descontaminación.
- 4) Estudios metabólicos en cultivo estacionarios para

la caracterización de hibridomas. Incluye: velocidad de crecimiento, consumo de glucosa, pH, y producción de anticuerpos.

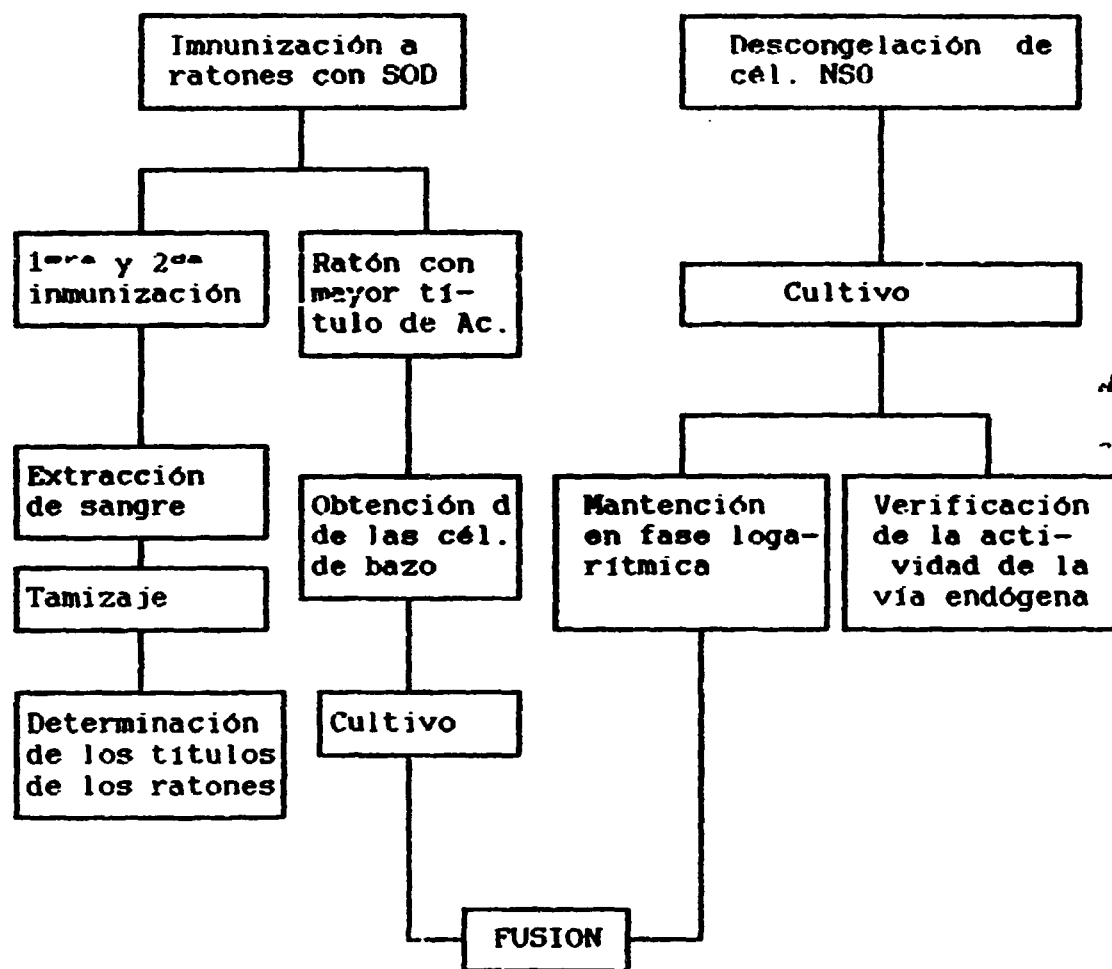
- 5) Métodos de inmunización empleados para la obtención de anticuerpos monoclonales.
- 6) Hibridización celular mediante la fusión con polietilenglicol, mantenimiento de los cultivos: Preparación de PEG, de medios selectivos, procedimiento de fusión, mantenimiento de los cultivos, clonado y preservación de híbridos.
- 7) Metodologías de detección de anticuerpos (Tamizaje); radioinmunoensayo, hemaglutinación, dot blot.
- 8) Purificación de sobrenadante y ascitis por precipitación y cromatografía. Determinación de la pureza.

3. ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO.

PARTE I



PARTE II



4. CARACTERISTICAS DEL MATERIAL DE TRABAJO.

Es necesario recalcar que todo el material de trabajo debe estar correctamente lavado y esterilizado.

4.01.- Lavado del material usado.-

- 1) De ser necesario inmediatamente lavarlo con abundante agua, y/o solamente sumergirlo en un recipiente que contenga lavandina al 10%.
- 2) Cepillar con detergente especial y enjuagar con agua corriente 8 veces.

- 3) Sumergir el material en bandejas con agua destilada (8 veces).
- 4) Enjuagar con agua desionizada o bidestilada 2 veces.
- 5) Secar el material de vidrio a 100 °C y el material de plástico a temperatura ambiente.
- 6) Esterilizar (autoclave o radiación gamma).

4.02.- Soluciones.-

Todas las soluciones que seran utilizadas en los medios de cultivo y/o que entren en contacto con las células en cultivo deberan ser previamente filtradas atravez de filtro milipor (0.22); o radiación gamma; de esta manera se asegura su esterilización.

4.03.- Composición del medio Opti-MEM.

Reduced Serum Medium
Modification of MEM (Eagles)

- Componentes:

HEPES buffer
Hypoxanthine
Thymidine
Na Pyruvate
L-Glutamine
Trece Elements and Growth Factors
Phenol Red reduced to 5 mg/L
NaHCO₃

4.04.- Preparación del medio Opti-MEM.

Disolver el contenido de un sobre en 900 ml de agua bidestilada, (enjuagar varias veces el sobre) y adicionar 2.4 gr. de bicarbonato de Na y 1 ml de 2 mercapto etanol, y llevar a pH 7.2, luego enrasar a 1000 ml. Filtrar con filtro 0.22 para su esterilización.

Si ha este medio se adiciona los componentes abajo indicados (esterilizados) se denomina medio completo al 5% de suero fetal bovino.

93 ml de medio
1 ml de piruvto de Na 100 mM.
1 ml de glutamina 200 mM.
0.25 ml de gentamicina 80 mg/ml
5 ml SFB

Este medio fue el que se utilizo para la mayoría de los cultivos realizados en este trabajo.

5. DESCONGELAMIENTO DE CELULAS.

Las células a descongelar denominadas B2C114 son células híbridas que provienen de la fusión entre linfocitos esplénicos de ratones BALB/c inmunizados con el antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) y células de mieloma. Estas células B2C114 tienen la propiedad de producir anticuerpos monoclonales dirigidos contra el anti-CEA, y también producen la aglutinación específica de glóbulos rojos humanos portadores del antígeno A. Las células B2C114 utilizadas fueron congeladas el 2 de Diciembre 1988, encontrándose en viales plásticos sumergidos en nitrógeno líquido.

5.01.- Metodología.-

- 1) Sacar el vial del tanque de nitrógeno líquido y sumergirlo rápidamente en un recipiente con agua a 37 °C.
- 2) Una vez descongelado, empaparlo con alcohol al 70%.
- 3) Abrir el vial dentro del flujo laminar y recoger el contenido con una pipeta y pasarlo a un tubo centrifuga.
- 4) Adicionar 10 ml de medio de cultivo, centrifugar a 800 rpm durante 5 min.
- 5) Tirar el sobrenadante y resuspender el pellet con una cantidad conocida de medio
- 6) Realizar recuento celular.
- 7) Sembrar y rotular.
- 8) Cambiar el medio cada 24 hrs aproximadamente.

6. RECUENTO CELULAR

Sirve para conocer el número de células vivas y muertas (viabilidad) que se tiene en un determinado volumen de medio; dato por lo cual nos permite manipular las células según nuestros requerimientos.

6.01.- Metodología

- 1) Resuspender las células en un volumen conocido de medio.
- 2) Tomar 50 ul y adicionar 50 ul de azul tripan, dejar al medio ambiente por 3 min.
- 3) Sembrar en cámara de Neubauer.

- 4) Contar las células vivas (no coloreadas*) contenidas en los cuadrados. Sacar un promedio, hacer la corrección por la dilución con el azul tripan. Calcular las células por ml de suspensión, luego multiplicar por el volumen inicial para calcular el número total de células.

* Las células muertas han perdido su permeabilidad selectiva y se tifen.

El siguiente recuento corresponde a las células B2C114 descongeladas, donde el volumen total de medio fue de 6 ml.

$$24 + 26 + 33 + 29 = 112 \text{ cel. vivas}$$

$$+ 4 \text{ cuadrados}$$

$$= 28 \text{ cel.}$$

$$+ 2 \text{ dilución } 1:2$$

$$= 56 \text{ cel.} \text{-----} 0,1 \text{ mm}^3$$

$$x \text{ cel} \text{-----} 1000 \text{ mm}^3$$

$$x = 560 \text{ 000 cel.} \text{-----} 1 \text{ ml}$$

$$y \text{ cel.} \text{-----} 6 \text{ ml}$$

$$y = 3.360.000 \text{ células.}$$

$$10 + 7 + 9 + 12 = 38 \text{ cel. muertas}$$

$$+ 112 \text{ cel. vivas}$$

$$= 150 \text{ cel. totales} \text{-----} 100 \%$$

$$112 \text{ cel. vivas} \text{-----} x$$

$$x = 74.66 \% \text{ de Viabilidad}$$

A partir de este número de células se procedió a sembrar en frascos de cultivo de 25 cm², se repicaron varias veces hasta que se realizó:

7. CONGELACION DE CELULAS B2C114.-

Una vez obtenido en los frascos de cultivo una buena cantidad de células en fase exponencial, se procedió con una parte de ellas a congelar, con esto se conservan por tiempo indefinido.

7.01.- Metodología.-

- 1) Desprender las células de las placas con golpe de la mano y/o raspado con pipeta, y transvasarlo a un tubo centrifuga con tapon.

- 2) Mezclar, y tomar una alicuota para recuento de células, lo restante centrifugar por 5 min. a 800xg.
- 3) Según el resultado del recuento, resuspender el pellet con medio de congelación frío (ver textos) en una cantidad que no exceda las $1-10^6$ células en 1 ml.
- 4) Inmediatamente transferir 1 ml de la suspensión a cada vial de plástico frío esterilizado, rotular y guardar a -70 °C en recipiente de tergopol.
- 5) Luego de 24 hrs. pasarlos a nitrógeno líquido.

8. CARACTERIZACION METABOLICA DE LA LINEA B2C114.-

8.01.- Metodología.-

- 1) Pregasear 11 frascos T-25 estériles con 5% de CO₂.
- 2) Adicionar a 10 frascos 9 ml de medio Opti-MEM al 5% de SFB con 1.10^5 cel/ml. Mantener un frasco control (sin células).
- 3) Incubar los frascos a 37 °C en 5% de CO₂, durante 2 hrs. para obtener el equilibrio gaseoso dentro de los frascos antes de remover la muestra.
- 4) Del frasco del día 0, tomar 0,5 y 2 ml del sobrenadante y transpasarlos a un vial de plástico, y un tubo centrifuga respectivamente. Con las alicuotas del vial se determinara consumo de glucosa e actividad, las del tubo se medira pH. El resto realizar recuento celular y viabilidad.
- 5) Repetir el procedimiento con los frascos restantes en los días respectivos.
- 6) Tabular los datos y graficar los valores.

8.02.- Reproducción de células Vs. tiempo

- Datos.-

x	0	23	46	72	96	Hrs.
y	98500	112500	242500	805000	1995000	cel/ml

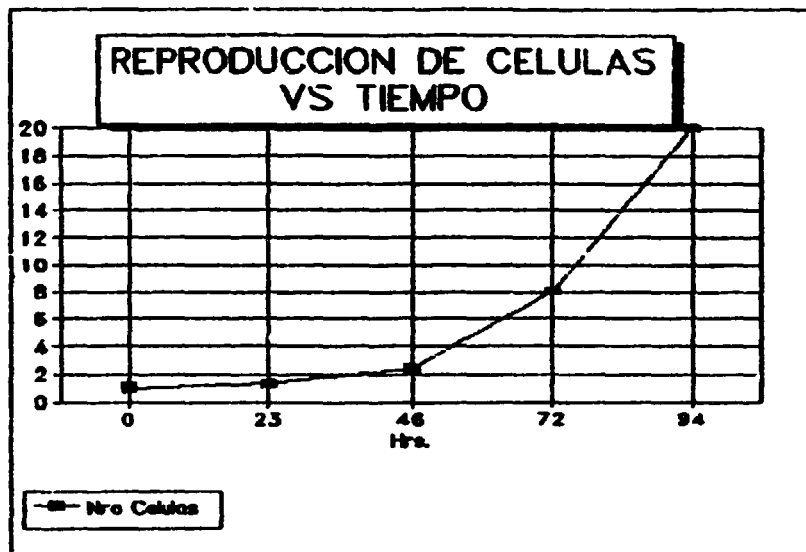


Figura 1

- Conclusión.-

En un principio las células se encuentran a una baja densidad poblacional, periodo en el cual estas no cuentan con todas las condiciones de crecimiento y requieren de un periodo de readaptación en el cual no se reproducen. Pasado este periodo las células comienzan a reproducirse en una escala casi gradual.

8.03.- Consumo de glucosa Vs. tiempo.-

- Datos.-

x	0	23	46	72	94	Hrs.
y	0	0.08	0.32	0.92	1.71	Glu. g/l
y'	2.21	2.13	1.89	1.29	0.5	Glu. g/l

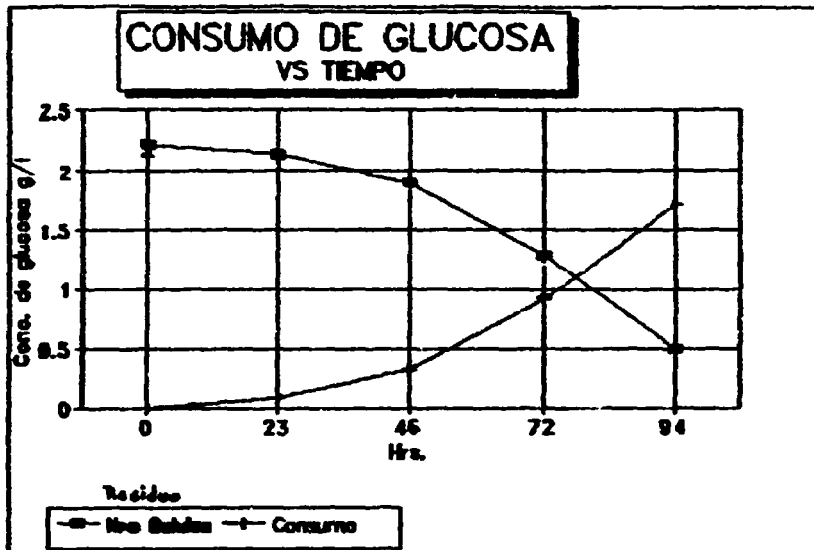


Figura 2

- Conclusión.-

La gráfica nos indica que a partir de las 24 hrs. se inicia el consumo de glucosa por parte de las células, este consumo va aumentando gradualmente a medida que el tiempo de estadía de las células en el medio de cultivo va aumentando.

8.04.- Consumo de glucosa Vs. número de células.-

- Datos.-

x	98500	112500	242500	805000	1995000	cel/ml
y	0	0.08	0.32	0.92	1.71	Glu. g/l

- Cálculos.-

562500 cel.-----	0.92 Glu. g/l	
14000 cel.-----	x	x = 0.023 Glu. g/l
14000 cel.-----	0.023 Glu. g/l	
100000 cel.-----	x	x = 0.161 Glu. g/l
130000 cel.-----	0.21 Glu. g/l	
100000 cel.-----	x	x = 0.161 Glu. g/l
562500 cel.-----	0.92 Glu. g/l	
100000 cel.-----	x	x = 0.1635 Glu. g/l
1195000 cel.-----	2.12 Glu. g/l	
100000 cel.-----	x	x = 0.177 Glu. g/l

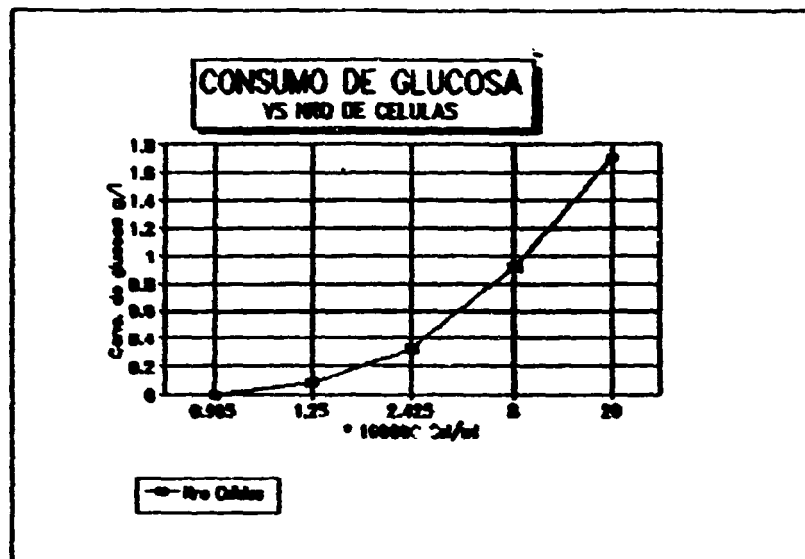


Figura 3

- Conclusiones y observaciones.-

El consumo de glucosa obtenido por cada 100000 cel. corresponderia a 0.164 g/l.; dato que se verificó en todos los puntos tomándose en cuenta que el número de cel. que se reproducen en 24 hrs. es de 562500 y consumen 0.92 g/l de glucosa, tomados entre los puntos 0.32 y 0.92 respectivamente. Sin embargo cabe señalar que el procedimiento no fue dilucidado a profundidad, por lo que no se sabe si fué el correcto.

8.05.- Viabilidad de las células Vs. tiempo.-

- Datos.-

x	0	23	46	72	95	Hrs.
y	78.2	80	68.8	62.25	71.5	%

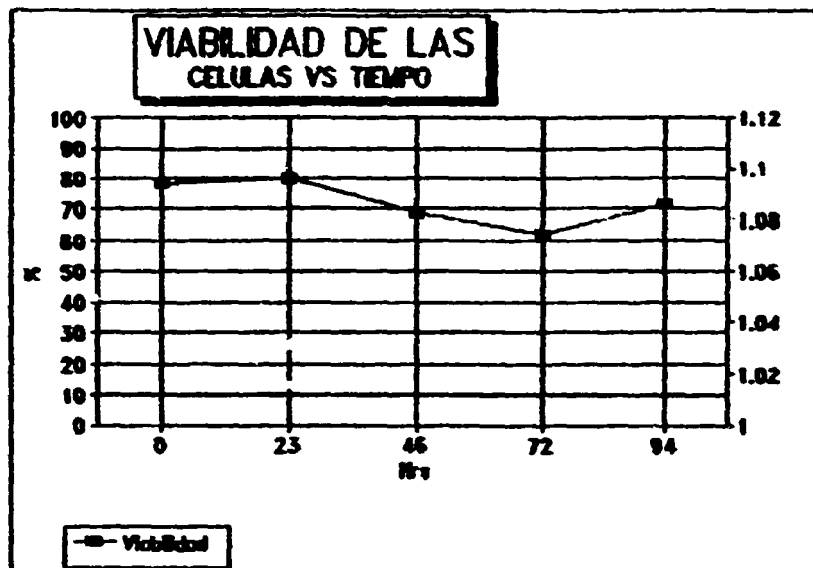


Figura 4

- Conclusión.-

Esta gráfica nos indicaría que la viabilidad baja en pequeña proporción a medida que las células se reproducen.

8.06.- Variación del pH Vs. tiempo.-

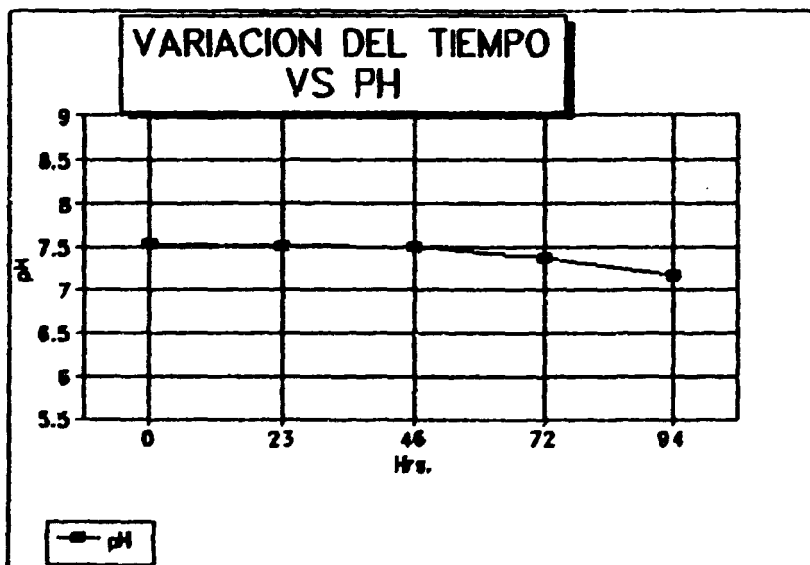


Figura 5

- Datos.-

x	0	23	46	72	94	Hrs.
y	7.53	7.515	7.5	7.38	7.16	pH

- Conclusión.-

Los datos obtenidos de D.O. verifican una disminución del pH, sin embargo la variación en la escala de pH es mínima lo que hace que este ensayo no pueda utilizarse como un indicador del crecimiento de las células.

8.07.- Actividad del Ac. mediante hemoaglutinación directa e indirecta

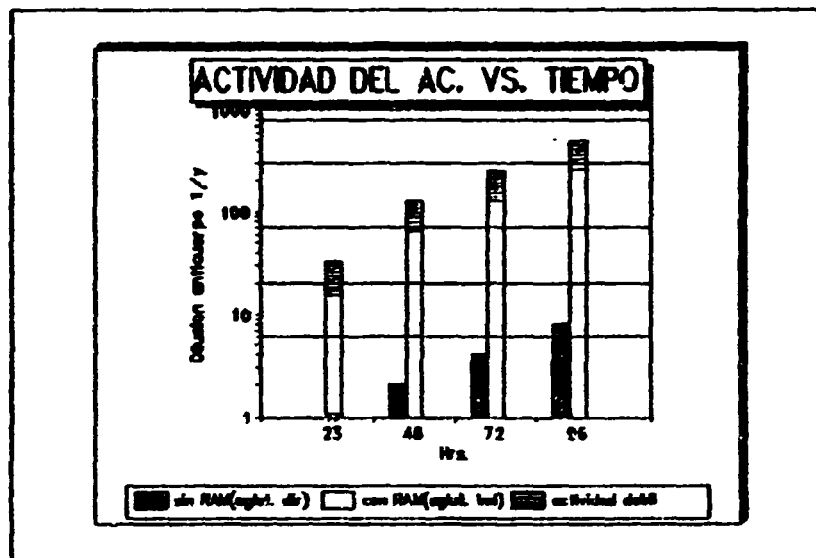


Figura 6

- Datos.-

x -->	0	23	46	72	94	Hrs.
y -->	0	16	64	128	256	Dil. 1/y
y' -->	0	32	128	256	512	Dil. 1/y'
y'' -->	0	0	2	4	8	Dil. 1/y''

8.07. b Número de células Vs. actividad del Ac.

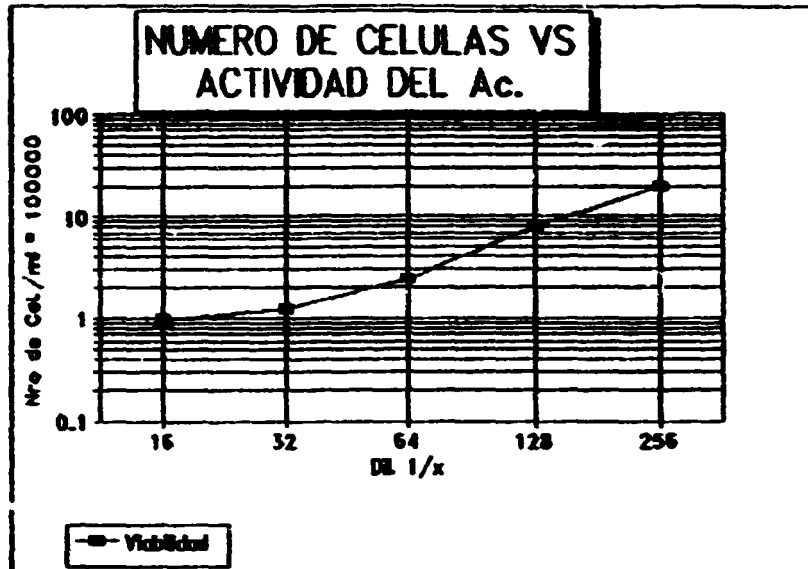


Figura 7

- Datos.-

x -->	16	64	128	256	Dil. 1/x
y -->	112500	242500	805000	1195000	cel/ml

- Conclusión.-

La producción del Ac. va aumentando gradualmente a medida que el número de células aumenta; esto se verifica indirectamente con la actividad.

8.08.- Comparación de gráficas.-

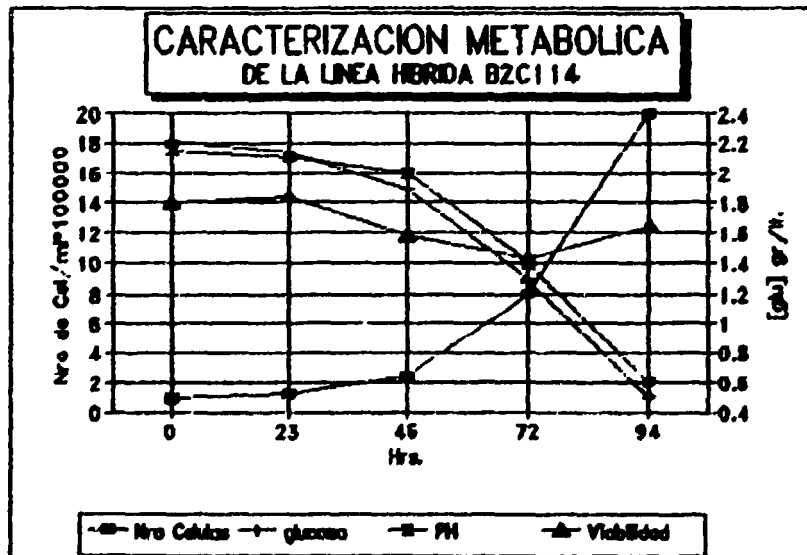


Figura 8

8.09.- ELISA ANTI A-B.-

A. Metodología

- a) Se sensibilizó las placas con 100 ul de sustancia A-B en buffer carbonato pH 9.6 en distintas diluciones dejando libre una hilera de pozos para sensibilizar con RAM diluido 1:50. (ver tabla).
- b) Se incubó una noche a 4 °C en camara humeda.
- c) Se lavó 3 veces con PBS T-20 al 0.05% (sol. de lavado).
- d) Se bloqueó con PBS T-20 + 2% de BSA 1 hr. a temperatura ambiente.
- e) Se lavó 3 veces.
- f) Se sembró las muestras y controles en un volumen de 50 ul/pozo y se incubo en camara humeda una noche (ver tabla)
- g) Se lavó 4 veces.
- h) Se adicionó 50 ul/pozo de GAM (Goat anti mouse) Δ biotinizado diluido 1:500 en PBS T-20 + 1% BSA, y se incubo 1 hr. a temperatura ambiente.
- i) Se lavó 3 veces.
- j) Se adiciono 50 ul/pozo del conjugado streptavidina - peroxidasa diluido 1:1000 en PBS-T + 1% de BSA, y se incubo 1 hr. a temperatura ambiente.
- k) Se lavó 3 veces
- l) Se adicionó 100 ul/pozo de ODP (o-felidendiamino) 1 mg/ml en buffer citrato pH 5. y se incubo 30 min. en oscuridad.
- ll) Se detuvo la reacción con 50 ul/pozo de a. sulfúrico 4M.

B. Resultados y conclusiones.-

	RAM 1:500	BUFFER	SUSTANCIA A-B diluida 1/x									
			10	20	40	80	160	320	640	1280-2560-5120		
ANTI A												
ANTI B												
ASCITIS B2C114	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOBRENAD. B2C114			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEDIO DE CULTIVO												

- Se constató reacción positiva tanto en la ascitis como en el sobrenadante de las células, sin embargo no se pudo encontrar diferencia entre ambos debido a que la concentración utilizada fué muy alta.
- Los controles positivos (sustancia anti A - B) resultaron negativos debido a que son policlonales de origen humano.
- El medio de cultivo resulto ser un buen control negativo para este ensayo.

8.10.- INMUNO DOT ANTI A-B.-

A Metodología empleada.-

- a) Se corto la nitrocelulosa del tamaño de una placa de 96 pozos.
- b) Se marcaron los pozos colocando el papel sobre la placa y presionando para que se marquen los contornos de los pozos.
- c) Se agrego 4 ul de sustancia A-B en distintas diluciones en PBS y RAM (ver grafica). y dejar secar a temperatura ambiente.
- d) Se bloqueó con PBS T-20 0.05% + 5% Molico.
- e) Se lavó 5 veces en PBS T-20.
- f) Paralelamente se sembraron 100 ul/pozo de las muestras y controles diluidos en PBS T-20 + 1 % de Molico en una placa de 96 pozos con fondo plano. (ver tabla)
- g) Se puso el papel sobre la placa haciendo coincidir los pozos y se cubrio con parafilm, luego se pusieron 4 papeles filtro, se tapo la placa y se aseguro con ganchos.
- h) Se invirtio la placa y se dejo una noche a temperatura ambiente.
- i) Se lavó 5 veces.
- j) Se incubo con GAM biotinizado diluido 1:750 en PBS T-20 + 1% Molico durante 2 días a temperatura ambiente.
- k) Se lavó 5 veces.
- l) Se incubo con el conjugado streptavidina peroxidasa diluido 1:1000 en PBS T-20 + 1% Molico, durante 45 min. a temperatura ambiente.
- m) Se lavó 5 veces.
- n) Se agregó 100 ul/pozo de OSP 1 mg/ml + peroxido de hidrógeno y se incubo 10 min. en oscuridad.

o) Se detuvo la reacción por lavado con agua destilada.

B Resultados y Conclusiones.

	RAM 1:300	PBS	SUSTANCIA A-B diluida 1/x									
			10 x*	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
ANTI A	0.1											
ANTI B	0.1											
ASC. B2C114	5		4	4	4	3	3	2	1	0.5	0.3	0.1
Sb. B2C114	4		3	3	3	2	2	1	0.7	0.3	0.1	
Sb. B12	3		1	1	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1			
Sb. NSO	1		0.1	0.1	0.1							
Ig. Ratón	3		0.1	0.1	0.1							

- La ascitis de las células B2C114 dieron reacción positiva hasta la dilución 1:5120, observándose en ellas una disminución gradual en lo que se refiere a la intensidad de reacción.
- El sobrenadante del cultivo de estas células dio resultado positivo hasta la dilución 1:2560 observándose de igual manera una disminución gradual de la reacción.
- Los controles positivos no anduvieron en este ensayo.
- Como control negativo se utilizó inmunoglobulinas de ratón normal, observándose una muy leve reacción positiva hasta la dilución 1:40, sin embargo esta reacción podría solo deberse al ruido de fondo presente en el papel.

9.01.- PRODUCCION DE ASCITIS.-

Se realizó con el objetivo de obtener suficiente cantidad de anticuerpo, de manera que permita realizar estudios para su caracterización.

9.01.- Metodología.-

- 1) Inyectar via intraperitoneal 0.5 ml de pristane (aceite mineral 2-6-10-14 tetrametilenpentadecano) a cada ratón con objeto de pre-irritar el ambiente.
- 2) 10 días después , inocular $1 \cdot 10^{-4}$ células B2C114 a

cada ratón por vía intraperitoneal.

- 3) Observar a los ratones todos los días hasta que se encuentren con la cavidad peritoneal inchada.
- 4) Obtener la ascitis por punción con una aguja gruesa y dejar drenar en un tubo. Agregar azida de sodio y guardar a -70°C .
- 5) Repetir el paso 4. cada vez que se vea conveniente. hasta el momento que se note la formación de una masa sólida tumoral.

10. PURIFICACION DEL ANTICUERPO (IgG1) DEL LIQUIDO ASCÍTICO

10.01.- Precipitación con sulfato de amonio.-

- 1) Se partió de 40 ml de ascitis de B2C114 (Desconge-
lado de -20°C). que mostraban alto título de
aglutinación
- 2) Se filtró inicialmente por papel Wathman para sacar
las partículas groseras (Se guardo una alicuota).
- 3) Bajo agitación magnética y en hielo al ascitis se
le agregó 12.52 gramos de sulfato de amonio sólido
(313 gr/lt). Esta adición se realizó lentamente
(Aproximadamente en tres horas).
- 4) Centrifugar a 7500 rpm durante 30 min a 4°C .
- 5) Se tomó una alicuota del sobrenadante y se guardo
para el PAGE; el resto se desecho. El pellet
resuspenderlo en 16 ml de sulfato de amonio al
50%; de igual manera que en la parte 8.01-3.
- 6) Se centrifugó a 7500 rpm durante 30 min a 4°C . y
se desecho el sobrenadante. Al pellet resuspender-
lo en 15 ml. de PBS pH 7.2.

10.02.- Desalinización en G-25.

Se empaquetó una jeringa de 20 ml con G-25, calculan-
dose luego el volumen muerto con azul de bromo fenol
(BFB). Se realizó la corrida con la ascitis y se
recolectó las fracciones que contenían el anticuerpo,
previa prueba de aglutinación con glóbulos rojos A.

El volumen total obtenido fué de 50 ml en PBS pH 7.2 .
Posteriormente se midió la concentración proteica en
U.V. dando aproximadamente una concentración de 10
mg/ml.

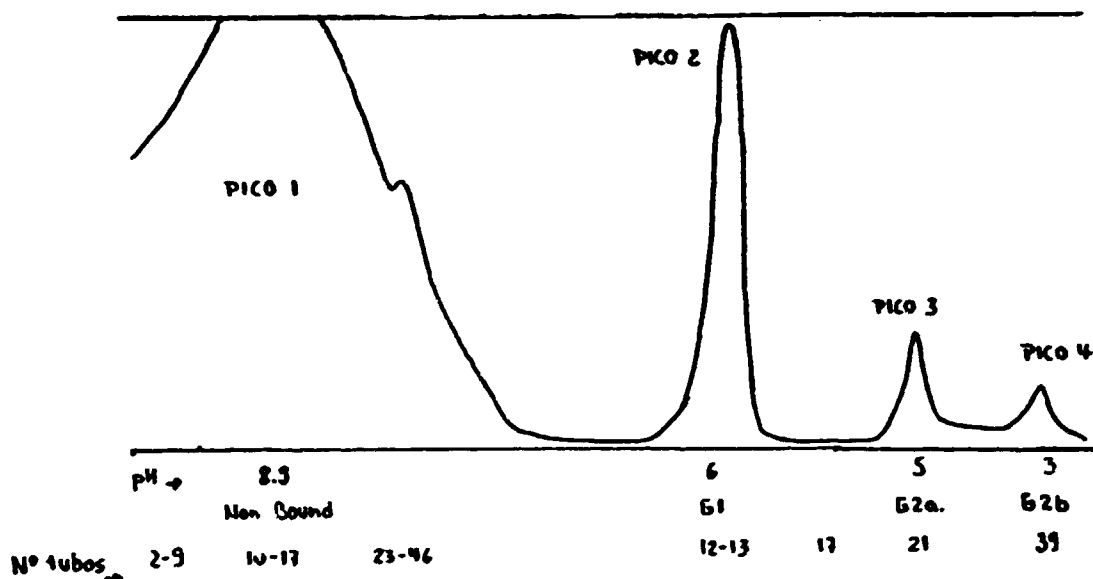
10.03.- Cromatografía de afinidad por proteína A-Sepharosa.-

-- Se reconstituyo la proteína A con buffer glicina 1.5 M

en ClNa 3M pH 8.9. y se empaquetó en una jeringa de 2.5 ml que estaba previamente taponeada con fibra de vidrio y papel filtro en el extremo terminal. El total de proteína inchada fue de 2 ml, los cuales atrapan 40 mg de IgG.

- De los 50 ml de anticuerpo obtenidos por G-25. 15 ml fueron almacenados a -70°C . y los 35 ml restantes fueron diluidos 1:3 en buffer glicina 1.5 M en ClNa 3 M pH 8.9. El volumen final obtenido fue de 105 ml, que contienen aproximadamente 350 mg de anticuerpo. De este volumen se tomaron 20 ml y se corrieron en la columna que fue previamente lavada con buffer glicina 1.5 M pH 8.9.
- La muestra fué eluida a un flujo de 10-30 ml/hr. Se realizó un gradiente discontinuo con buffer citrato 0.1 M a pH 6 - 5 y 3. Según bibliografía a pH 6 desorciona la IgG1, a 5 la IgG2a y a 4 la IgG2b.

10.04.- Perfil cromatográfico obtenido.-



- Las fracciones que contenían los picos fueron neutralizados con buffer TRIS-HCl 1 M pH 8 hasta un rango de pH entre 7 - 8 verificado con papel indicador.
- Se produjo una saturación en la columna debido a que se cargó un exceso de la muestra (aproximadamente de 20 mg.).

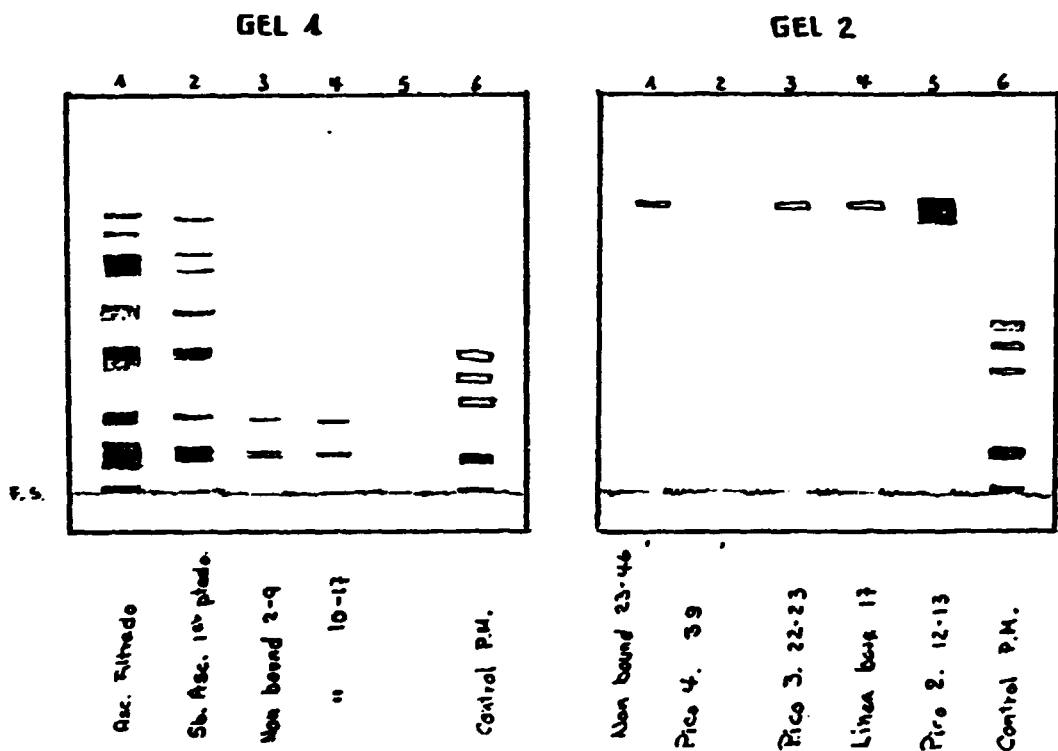
10.05.- Determinación de la actividad aglutinante de los picos.

Se realizó la actividad aglutinante de los glóbulos rojos A en placa, obteniéndose los siguientes resultados:

Tubos	Ubicación	Resultado
2 - 9	Pico 1	Aglutina
10 - 17	Pico 1	Aglutina
23 - 46	Pico 1	Aglutina
Sb 1 ptado.	-	Aglutina
12 - 13	Pico 2	Aglutina
17	Línea base	Aglutina
22 - 23	Pico 3	No aglutina
30	Pico 4	No aglutina
Asc. filtrado	-	Aglutina

10.06.- SDS PAGE.-

Se realizó siguiendo el método de LAEMMLI, y se obtuvieron los siguientes resultados.



10.07.- Observaciones y conclusiones.-

El revelado del gel indicaría que la ascitis filtrada presenta 7 bandas, después de la 1ra precipitación con sulfato de amonio esta también presenta 7 bandas pero se observa que estas son de menor concentración, indicando que en el procedimiento realizado se eliminaron proteínas que no eran de nuestro interés. El non bound (pico 1) nos reveló 3 bandas, el pico 2 y 3 nos revelaron a 1 banda. El pico 4 no reveló bandas, posiblemente debido a que se encuentra en baja concentración. Tanto el pico 3 y 4 eluidos a pH 5 y 3 respectivamente no aglutinaron; mientras que el pico 2 eluido a pH 6 dio aglutinación positiva, confirmando

que se trata de la IgG1. Es importante mencionar que la banda revelada presentó gran concentración indicando que el procedimiento de purificación fue el adecuado.

11. CLONADO.-

Se realiza para obtener una población celular derivada de una célula madre, de esta manera, se asegura que todas las células hijas tengan idéntica información genética, lo que da lugar a la producción de los AcM. Pero para que una sola célula pueda proliferar en el medio de cultivo requiere de una cooperación celular (contacto celular, transferencia de nutrientes y otros) los cuales tratan de ser adquiridos de las células alimentadoras (feeder cells). Estas células no son capaces de proliferar in vitro, pero secretan al ambiente factores promotores de la proliferación de hibridomas. Las células utilizadas para este propósito son: células del exudado peritoneal (macrófagos), timocitos y otros.

11.01.- Obtención de macrófagos.-

Metodología.-

Se sacrificó los ratones de 4 semanas en eter, luego se los sumergió en etanol al 70%. Luego se removió la piel del abdomen, dejando a la vista la membrana peritoneal. Se inyectó en la cavidad peritoneal 5 ml de sol. de dextrosa al 10% fría y se realizó masajes abdominales. Luego se procede a extraer la dextrosa y traspasarla a un tubo de plástico de 50 ml. Se lavó las células con medio Opti-MEM frío y se realizó recuento celular.

Posteriormente se plaqueó $5-10^4$ células en 100 μ l de medio con SFB en placas de 96 pozos, y $2-10^5$ células en 1 ml de medio con SFB en placas de 24 pozos.

Incubar las células en estufa gaseada durante 24 hrs. y luego observar en microscopio de contraste de fases.

11.02.- Obtención de Timocitos y/o Linfocitos.-

Se sacrificó los ratones de 5 semanas en eter y se los sumergió en etanol al 70%. Se tomó el Timo (o el Bazo) del ratón y se lo transfirió a una placa de petri, que contenía 10 ml de medio de cultivo sin SFB.

Se efectuó en el Timo (o Bazo) varios pinchazos con las agujas, luego se cargo la jeringa con medio de cultivo y se inyectó en un extremo del mismo. Se repitió varias veces este procedimiento.

Se disolvió los grumos celulares por pipeteos reiterados del medio de cultivo. Se transfirió las células

contenidas en el medio a un tubo de 15 ml, se decanto los trozos de tejido de mayor tamaño durante 2 min., luego se toma el sobrenadante y se centrifuga a baja velocidad por 5 min., luego se resuspendio las células en 10 ml de medio y se realizó recuento celular. Se plaqueo igual que 11.01 las células del timo. Para las células de bazo resuspenderlas en el volumen requerido para obtener un número determinado de cel/ml.

11.03.- Clonado por dilución limitante.

Para el aislamiento de las células se tienen varios métodos, en este caso solo se describe el método realizado en este trabajo. Para esto se utilizaron células B2C114 provenientes del año 1988 con el objetivo de conocer el procedimiento de la técnicas. *u*

Metodología empleada.-

- A) Se resuspendió las células de un frasco de cultivo que se encuentran en fase exponencial, y se realizó recuento celular.
- B) Preparar las siguientes 3 diluciones 1. 100 cel/ml de medio, 2. 10 cel/ml, 3. 5 cel/ml.
- C) Sembrar:
 - 100 ul de 1. por pozo a la 1ra hilera de placa de 96 pozos con Macrófagos, con Timocitos, y sin nada.
 - 100 ul de 2. por pozo a las 4 hileras restantes de la placa de 96 pozos que contienen macrófagos, timocitos, y sin nada.
 - 100 ul de 3. por pozo a las 3 ultimas hileras de las placas de 96 pozos que contien macrofagos, timocitos, y sin nada.
- D) A las 24 hrs se añadió 100 ul de medio a cada pozo.
- E) Se incubo por 2 semanas a 37 °C y 5% de CO₂.
- F) Se tomó el sobrenadante de aquella dilución donde el crecimiento del hibridoma fue buena, y se sembro en placa de 24 pozos.
- G) Luego se determinó la actividad.

11.04.- Resultados.-

	MACROPAGOS		TIMOCITOS		SIN CRIJITAS		ALIMENTADORAS	
	Crec.	%	Crec.	%	Crec.	%	Crec.	%
10 cel/pozo	12 de 12	100	11 de 12	91.6	11 de 12	91.6	11 de 12	91.6
1 cel/pozo	21 de 48	43.75	19 de 48	39.6	14 de 48	29.16	37 de 48	77
0.5 cel/pozo	9 de 36	25	7 de 36	19.4	15 de 36	41.9	21 de 36	58.3

11.05.- Conclusiones y observaciones.-

- Según la distribución de Poisson indica que en aquellas diluciones (0.5 - 1 - 10 cel/pozo) donde se observe un crecimiento del 63% (o menor) de sus pozos son los que deberán ser tomados en cuenta para la detección del Ac. y para realizar el reclonado.
- Si observamos nuestros resultados nos indica que la mayoría de las placas cumplen con el porcentaje indicado en la distribución de Poisson. Lamentablemente las 3 primeras placas se contaminaron, por lo que se continuó el trabajo con la última, de la cual se tomaron 3 pozos para su reclonado en placa de 24 pozos, en la cual se determinó la actividad aglutinante directa de glóbulos rojos A, dando en todos un título 1:8.

Esto indicaría que las células B2C114 mantienen un mismo nivel de actividad.

PARTE II

12. INMUNIZACION.-

En la producción de anticuerpos monoclonales uno de los primeros pasos a realizar es la inmunización que consiste en la administración del antígeno a los animales seleccionados (ratones) para que se de lugar a la formación de anticuerpos por parte de las células del sistema inmune. Antes de proceder con la inmunización se requiere conocer las principales características del antígeno, como ser el grado de pureza, PM, solubilidad, estabilidad y actividad. Para esta última se requiere contar con un sistema de tamizaje que sea sensible, específico, económico, y relativamente fácil de manipular.

Tomando en cuenta las consideraciones mencionadas se realiza la inmunización, para lo cual existen varias metodologías a seguir que dependen en si del tipo de

antígeno que se utilizara en esta fase.

13. **IMPORTANCIA Y CARACTERISTICAS DEL ANTIGENO.-**

Antígeno: superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD)

14. **PROTOCOLO DE INMUNIZACION IN VIVO.-**

- A) El día 20 antes de la fusión (día 0) se inyectaron de 50 a 100 ug del antígeno en adyuvante completo de Freund, por vía intraperitoneal a 5 ratones BALB/c.
- B) El día 15 antes de la fusión se volvió a administrar 50 ug del antígeno en adyuvante incompleto de Freund, a cada ratón vía intraperitoneal.
- C) El día 12 antes de la fusión se extrajo sangre a los ratones para realizar el primer screening del anticuerpo.
(ver punto 15)
- D) El día 5 y 4 antes de la fusión se administraron 50 ug del antígeno en solución fisiológica a cada ratón vía intraperitoneal.
- E) El día de la fusión (día 0) se extrajo el bazo. (ver 9.02).

15. **DETERMINACION DEL ANTICUERPO POR ELISA.**

Se procedió a realizar un test ELISA en placa con objeto de determinar que ratón presentaba un mayor título del anticuerpo en el suero.

15.01.- Metodología empleada.-

- A) Se sensibilizaron las placas grado ELISA con 100 ul de SOD (superóxido dismutasa Cu-Zn) en distintas diluciones en buffer carbonato pH 9.6.
- B) Se incubó una noche a 4 °C en cámara húmeda.
- C) Se lavó 5 veces con PBS-T 20 a 0.05 % (solución de lavado)
- D) Se bloqueó los pozos con 100 ul de PBS T-20 + 1 % de Molico (ver tabla) y se incubó 1 hr. a 37 °C.
- E) Se lavó 7 veces.
- F) Se adicionó 50 ul/pozo de GAM (Goat anti mouse) biotinizado diluido 1:750 en PBS T-20 + 1 % de BSA; se incubó a temperatura ambiente 1 hr. con agitación esporádica.
- G) Se lavó 5 veces.
- H) Se adicionó 100 ul/pozo de conjugado streptavidina - peroxidasa diluido 1:1000 en PBS T-20 + 1 % de

BSA, y luego incubar 45 min. a temperatura ambiente con agitación esporádica.

- I) Se lavó 5 veces.
- J) Adicionar 100 ul/pozo de OPD (o-felidendiamino) conteniendo 1 mg/ml en buffer citrato pH 5 y 50 ul de peroxido de hidrógeno de 10 vol. e incubar 10 min. en oscuridad.
- K) Se detuvo la reacción con 50 ul/pozo de a. sulfúrico 4M.

15.02.- Resultados y Conclusiones.-

SOD Cu -Zn ug/ml ↓	SUERO DE C/RATON DILUIDO 1:100										Ig de BSA d 1% dil. 1:100	Medio Cultivo	
	N°67		N° 69		N° 71		N°76		N° 78				
100	0-1	0-1								0-1	0-1		
50	0-1	0-1								0-1	0-1		
25	0-1	0-1								0-1	0-1		
12	0-1	0-1								0-1	0-1		
6	0-1	0-1								0-1	0-1		

- Los ratones número 67 y 78 son los que presentan una cantidad mayor de anticuerpo que los otros; sin embargo el título que ellos presentan es muy bajo debido a que se encuentran en la primera fase de la inmunización (7 días). Durante el periodo restante (13 días), se espera que la producción de anticuerpos sea elevada.
- Los resultados obtenidos con el medio de cultivo indican que este es un buen negativo para este ensayo.

16

PREPARACION DE CELULAS NSO PARA LA FUSION.-

Las células NSO (línea de mieloma) fueron descongeladas siguiendo el procedimiento del punto 5, y luego fueron sembradas para su expansión. Una vez obtenida una buena cantidad de células una parte de ellas se utilizó para determinar la actividad de la vía endógena, y la otra se mantuvo en fase logarítmica.

16.01.- Actividad de la vía endógena.-

Es un ensayo que se realiza para seleccionar las células de mieloma a utilizar, para lo cual se tomó las células NSO y se le adiciona medio HMT (hipoxantina, metotrexate, timidina) hasta llegar a una concentración del 100 %. Si se observa muerte de todas las células en 6 días, se comprueba que las células NSO tienen bloqueada la vía endógena y exógena para la síntesis de las proteínas. Las células que tienen esta propiedad son las utilizadas para la fusión.

17.

FUSION

Dentro la producción de anticuerpos monoclonales, la fusión involucra la unión de dos células a través de sus membranas, dando origen en un principio a una célula que presenta 2 núcleos, estos al ingresar en el proceso de mitosis intercambian el material genético, y dan por resultado la formación de una célula híbrida o hibridoma. Este proceso se halla facilitado in vitro por la adición del PEG (polietilenglicol), el cual disminuye la tensión superficial de las células.

17.01.- Metodología por agitación con PEG al 50 %

- A) Se procedió cuando todas las soluciones estaban preparadas.
- B) Se lavó los esplenocitos 2 veces por centrifugación a baja velocidad (400xg) en medio de cultivo Opti-MEM sin suero y precalentado a 37 °C. Con el segundo lavado se centrifuga paralelamente 20 ml de células de mieloma. Durante la centrifugación se coloca el PEG en baño de agua a 50 °C. Se agregó al PEG fundido 0.5 ml de Opti-MEM sin suero y se transfirió el frasco a baño de agua a 37 °C.
- C) Se resuspendió ambos tipos celulares en medio precalentado a 37 °C sin suero, y se mezcló ambas suspensiones celulares en relación 1:10 de mieloma linfocito respectivamente. Luego se centrifugó a 800xg durante 5 min. y se removió el sobrenadante cuidadosamente en forma completa.
- D) Se agregó 0.8 ml de PEG al 50% durante 1 min. con agitación de las células. Se continuó la agitación durante 1 min. adicional. Luego se agregó 1 ml de Opti-MEM durante 1 min., luego 11 ml gota a gota, continuándose luego con 17 ml también gota a

gota y luego centrifugar a 400xg durante 5 min.
E) Se resuspendió las células en medio Opti-MEN con 10 % de SFB precalentado a 37 °C y dispensar 110.000 células en 100 ul pozo para placa de 96 ; y 1.100.000 células en 1ml/pozo para placa de 24 .

Estas placas estaban previamente preparadas con macrófagos.

F) Después de 24 hrs. se extrajeron 50 ul por pozo y se adicionó 50 ul de medio HMT. Repetir este procedimiento hasta llegar a una concentración del 100 % de HAT.

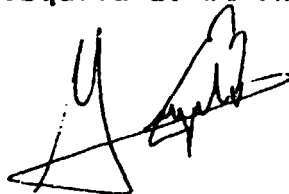
17.02.- Resultados y Conclusiones.-

- El día 6 después de la fusión se pudo observar en algunos pozos, células que podrían estar iniciando la formación de clones.

18. CONCLUSION GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO

En el trabajo realizado se pudo llegar a obtener un conocimiento claro de los procedimientos de obtención de anticuerpos monoclonales. Tanto la parte teórica como la parte práctica fueron asimiladas bajo experiencias prácticas que fueron seguidas en su totalidad por profesionales en el tema. La cooperación brindada por todos los integrantes del Centro Oncológico de Medicina Nuclear hicieron posible que este trabajo se realizara sin contratiempos que podrían haber retrasado este trabajo; para ellos va mi más sincero agradecimiento.

Igualmente la República de Bolivia agradece la cooperación prestada por todos los países y organismos que participan de este proyecto y que hicieron posible la realización de este trabajo, mediante el cual mi país se suma a la búsqueda de su anticuerpo monoclonal.



Eduardo L. Gonzales Dávalos
BIOQUIMICO-FARMACEUTICO