



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

20036

41

PROYECTO ANTICUERPOS MONOCLONALES

Informe final del proyecto
10 de diciembre de 1992
DP/RLA/83/003
Contrato No. 91/0816

Se estandarizó la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos.

Se utilizaron ratones Balb/c y células de mieloma de la línea 63AG81653 los cuales se tenían disponibles en VECOL.

Varios grupos de ratones fueron inmunizados contra el virus de la fiebre aftosa tipos O1 Campos y Aze Cruzeiro utilizando virus purificado por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa con adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto y virus sin adyuvante, de manera secuencial, obteniéndose altos títulos de anticuerpos contra los virus respectivos.

Se llevaron a cabo fusiones de células de mieloma con células de bazo de los ratones inmunizados generando híbridos productores de anticuerpos específicos contra el tipo de virus correspondiente, evaluados mediante la técnica de ELISA.

Con los hibridomas obtenidos se intentó su multiplicación y clonaje pero no se logró debido a que las células se morían o perdían la capacidad de producción de anticuerpos. Se ensayaron varias estrategias para el crecimiento de los hibridomas productores de anticuerpos, incluyendo el uso de medios condicionados y/o células alimentadoras, sin resultados positivos.

Al evaluar los resultados se sospechó la falta de histocompatibilidad entre las células de mieloma y la cepa de ratones Balb/c disponibles por lo que se buscaron otras fuentes de células.

INMUNIZACION

4ta Dosis	1ra Dosis	2da Dosis	3ra Dosis
01 CAMPOS Virus	Virus con	Virus con	Virus con
sin A24 CRUZEIRO Adyuvante	ACF	ACF	AIF

OBSERVACIONES

FUSION 1 : 01 Campos

Maceración de bazo con una malla. Se obtuvo crecimiento de Híbridomas en medio selectivo HAT. No se evaluó producción de anticuerpos debido a la ocurrencia de contaminación.

FUSION 2 : 01 Campos

Crecimiento de híbridomas en medio selectivo HAT en 19 pozuelos en total. Se hizo clonación por dilución límite en presencia de células alimentadoras. Hubo crecimiento de células de 2 pozuelos pero no continuaron produciendo Ac. Las células de los otros 10 pozuelos se murieron.

FUSION 3 : A24 Cruzeiro

Crecimiento de células en medio selectivo HAT en 4 pozuelos de los cuales un híbridoma produjo Ac contra virus A24 cruzeiro, pero perdió la capacidad de producción.

FUSION 4 : A24 Cruzeiro

No se obtuvo crecimiento celular probablemente debido al cambio del reactivo aminopterina por haberse agotado existencia.

FUSION 5 : O1 Campos

Modificación de protocolos, no se hizo maceración de bazo con malla sino que se perfundio el bazo con medio para obtener las células. Se reemplazo el PEB y la incubación por 2 minutos. Se consiguieron 30 hidridomas de los cuales 4 fueron productores de Ac contra virus O1 Campos. Se hizo clonaje pero se perdió la capacidad de producción de Ac.

FUSION 6: A24 Cruzeiro

Se obtuvieron 2 de 16 hibridomas productores de Ac frente a virus A24 Cruzeiro. Se hizo clonaje pero se perdió la capacidad de producción de Ac. Posteriormente se presentó contaminación de los cultivos.

FUSION 7 : O1 Campos

Se murieron las células durante la semana siguiente a la fusión.

FUSION 8: A24 Cruzeiro

Se murieron las células durante la semana siguiente a la fusión.

FUSION 9 :

Cambio y comparación de reactivos y modificación de protocolos. El trabajo se perdió debido a daño en la incubadora de CO2.

NOTA: El proyecto fue suspendido.

En el mes de noviembre de 1991 se recibieron ratones ratones Balb/c y células de mieloma de la línea SP2-0 procedente del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, CPFA (Brasil) consiguiendo formar una nueva colonia de ratones y multiplicar las células de mieloma para su conservación en congelación.

Se diseñó además un proyecto de trabajo que sirvió de base para una tesis de grado, relacionado con la producción de anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína del virus de la rabia (cepa Pasteur).

Se utilizaron los ratones y células de mieloma recibidos del CPFA. Los ratones fueron inunizados con virus de la rabia inactivado y purificado o con glicoproteína purificada a partir del virus.

Las células de bazo de ratones inunizados se fusionaron con células de mieloma SP2-0 obteniéndose hibridomas que producían anticuerpos los cuales reaccionaban frente al virus de la rabia y la glicoproteína purificada en la prueba de ELISA.

En este trabajo se consiguió expandir y clonar los hibridomas productores de anticuerpos, debido a la pérdida de la capacidad de producción o por muerte de las células.

Una porción de las células hibridizadas y productoras de anticuerpos ha sido conservada en congelación a -150° C para trabajos posterior cuando se tenga un método para que las células híbridas se multipliquen adecuadamente.

15 DEC 82 15:08 HECHEM CUCUBINTA

Producción de anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína del virus de la rabia cepa P.V.

Las primeras fusiones (1-4), se llevaron a cabo según los siguientes protocolos:

Inmunización: Levine, B.B. and Vaz, N.N. 1970

Procedimiento de Hibridización : Geoffrey Iatchworth and Judith Apleton.

Prueba de ELISA : Krauder A.F.R.C. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory.

Prueba de Dot : Manual de Laboratorio. Aplicación de Anticuerpos Monoclonales en Biología. Oscar Orozco, INC. 1988

Clonación por Dilución Límite. Ailsa M. Campbell. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Monoclonal antibody technology 1984

FUSION 1-4 : Ratones BALB/c 2 meses de edad inoculados con 0.1 ml de virus rábico purificado, 6 dosis con intervalos de 15 días via i.p, en concentración de 12 ug/ml con adyuvante completo de Freund (ACF) para la primera dosis, y con adyuvante incompleto de Freund (AIF) las 5 últimas dosis. Obtención de células de bazo

según Gavilondo J.V. 1988, línea celular de mieloma 63 Ag 81653 mantenida en medio de cultivo MEM AANE y 8% de SFB.

Clonación en metil celulosa.

Estandarización de las pruebas de ELISA y Dot.

Total de pozos cultivados en :

Primera fusión 288, 6 pozos con células híbridas crecidas, negativas para la producción de anticuerpos monoclonales.

Segunda fusión 216, 11 pozos con células híbridas crecidas,

3 pozos con lecturas positivas.

Tercera fusión 260, 15 pozos con células híbridas crecidas, 2 pozos con lecturas positivas.

Cuarta fusión 305, 20 pozos con células híbridas crecidas, negativas para la producción de anticuerpos monoclonales.

FUSION 5. Ratones BALB/c de 2 meses de edad inoculados con 0.1 ml de Glicoproteína purificada; según el siguiente protocolo de inmunización:

primera dosis--- Glicoproteína (8.5ug/ml) + ACF----via
i.p--dia0

segunda dosis--- Glicoproteina (8.5ug/ml) + AIF----via
i.p--dia15

tercera dosis--- Glicoproteina (10ug/ml + AIF----via
i.p--dia26

cuarta dosis---- Glicoproteina (10 ug/ml) sin AIF--via
i.p--dia28

Cambio de linea celular de mieloma AgX63 procedente del
Instituto Nal. de Cancerologia.

Cambios en el protocolo de fusión y en la preparación
del PEG.

Clonación por dilución límite.

Total de células cultivadas 224, 9 pozos con células
híbridas crecidas, 2 pozos con lecturas significativas.

Criopreservación de los híbrido positivos.

FUSION 6-7. Ratones BALB/c y células de mieloma
procedentes del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
del Brasil. Se utilizó el mismo protocolo de
inmunización de la fusión 5.

Clonación por dilución límite.

Criopreservación del híbrido positivo.

Fusión 6, 300 pozos con células, 25 pozos con células
híbridas crecidas, 6 pozos con lecturas positivas.

Fusión 7, 296 pozos con células, 39 pozos con células híbridas crecidas, 2 pozos positivos.

Criopreservación de células híbridas.

Se entrenaron dos profesionales tanto en las técnicas de fusión y clonaje como en los de escalamiento a nivel de fermentador para la multiplicación de hibridomas.

Se realizaron reuniones técnicas con personal técnico del Instituto Colombiano Agropecuario ICA y la Oficina Sanitaria Panamericana a fin de unificar criterios y establecer una cooperación técnica que permita estandarizar las técnicas e intercambiar resultados.

El entrenamiento proyectado sobre producción masiva de anticuerpos no pudo realizarse en Brasil por lo que se optó por intensificar los trabajos sobre clonaje y fusión para desarrollar hibridomas productores de anti-glyproteína de rabia, reactivo de alto uso y necesidad en la Empresa y en Colombia.

El objetivo general de intensificar la cooperación y desarrollo de los anticuerpos monoclonales se logró a cabalidad.

Se hicieron los ensayos de su empleo y validación y se dejaron las bases para la producción futura de estos productos. Contribuyó significativamente a aumentar el nivel de autosuficiencia tecnológica en la región y especialmente en el país.

Sometido a UNIDO

Doctor Rodolfo Quintero

Doctor M. Kohonen