



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

19321

PROYECTO "PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:
UN ESFUERZO COMPARTIDO EN LATINOAMERICA"

PNUD/UNESCO/ONUDI
RLA 83 /003

CENTRO DE REFERENCIA: CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA.
LA HABANA - CUBA.

PARTICIPANTES: MONIKA MERINO E.
NUNCIADA SALMA E.
RODRIGO RAMOS M.
ALBERTO L. HORENSTEIN.

INFORME TECNICO

PROGRAMA DE CAPACITACION PERSONALIZADA EN PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

I. ASPECTOS TEORICOS

Durante el curso se incluyeron 3 sesiones teóricas semanales consistentes en conferencias, a cargo de profesionales de la División de Hibridomas y Modelos Animales, seminarios presentados por los participantes en el curso y seminarios internos de esta agrupación.

1. Conferencias:

- a. La tecnología de anticuerpos monoclonales (AcM). Aspectos generales. Proyectos de la División de Hibridomas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Aspectos generales del cultivo de hibridomas. Reactores de Fibra Hueca para producir AcM.
- b. Uso de líneas de ratones para la producción de AcM.
- c. Características de los AcM según su empleo. Uso de AcM en la purificación de moléculas diversas.
- d. Ensayos para AcM.
- e. AcM por Ingeniería Genética.
- f. AcM bifuncionales.
- g. Producción de AcM en bioreactor a burbujeo.

2. Seminarios:

- a. Encapsulación de hibridomas en alginato. Cultivo de hibridomas en saco de diálisis.
- b. Métodos generales de purificación de AcM.
- c. Fusión celular para la obtención de AcM.
- d. AcM humanos.
- e. Estudio del efecto de nutrientes en el cultivo de hibridomas y producción de AcM. (Seleccionado por los participantes).
- f. Uso de vectores (shuttle vectors) en la generación de AcM biespecíficos. (Seleccionado por los participantes).

II. ASPECTOS PRACTICOS

1. Aspectos generales en el cultivo de hibridomas.

1.1 Descongelamiento, cultivo y expansión de hibridomas. Se descongelaron ampulas del hibridoma CB-Hep1, productor del AcM contra el antígeno de superficie del virus de hepatitis B. Los hibridos descongelados se sembraron a una concentración entre $3-5 \times 10^5$ cels/ml en frascos de cultivo de 75cc con medio RPMI 1640/10% de suero de ternera (ST). Estos cultivos fueron expandidos durante dos semanas, en el transcurso de las cuales, se realizó la detección y cuantificación de las inmunoglobulinas presentes en los sobrenadantes mediante la técnica de ELISA ya estandarizada en este laboratorio. Adicionalmente, los hibridos fueron congelados utilizando medio completo RPMI 1640/20% ST y 5% de dimetilsulfóxido, mantenido a 4 C durante el proceso y almacenados primero a -70 C y posteriormente en nitrógeno líquido.

1.2 Detección de Micoplasmas: Se determina por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. La experiencia se encuentra en desarrollo.

1.3 Estudio de los parámetros metabólicos: Para este propósito se descongelaron los hibridomas CB-Hep1 y CB-Hep2, expandidos durante una semana, y luego distribuidos en frascos de cultivo de 25cc por duplicado para cada hibrido. Se determinaron diariamente los siguientes parámetros: pH, consumo de glucosa, densidad celular y cuantificación de inmunoglobulinas en el sobrenadante.

1.4 Transformación de linfocitos periféricos humanos con virus Epstein Barr (EBV)

Aunque los objetivos del curso están dirigidos a la producción masiva de AcM, fue de interés para los participantes conocer lo que se realiza en esta Agrupación en AcM humanos. Se nos brindó la oportunidad de aprender la metodología involucrada en la transformación de linfocitos periféricos humanos con EBV.

2. Entrenamiento en tecnología de cultivo masivo

2.1 Producción "in vivo "

El cultivo del hibridoma CB- Hep1 obtenido como se explica en el punto 1.1, fue utilizado para la inoculación de ratones Balb/c previamente sensibilizados con 0.5 ml de aceite mineral. El inculo fue de 1×10^6 de células por ratón en 1 ml de medio RPMI 1640 sin antibióticos, por vía intraperitoneal. Transcurridos 7 días se obtuvo el líquido ascítico por punción de la cavidad peritoneal.

2.2 Producción "in vitro".

2.2.1 Encapsulación en alginato de sodio

Introducción

Uno de los métodos desarrollados en los últimos años para el cultivo celular in vitro, particularmente de hibridomas, es la encapsulación de las células híbridas en perlas de alginato de calcio.

Metodología

Dado que los iones fosfatos son inhibidores competitivos en el proceso de gelificación del alginato, el hibridoma CB-Hep1 fue preadaptado a crecer en medio de cultivo Dulbecco modificado (DMEM) por 3 días. Este, por su baja concentración de fosfatos, garantiza que el proceso se realice adecuadamente.

Se descongelaron 2 ampulas conteniendo 50×10^6 células cada una provenientes de bancos conservados a -70°C en nitrógeno líquido. Las células descongeladas se sembraron a razón de 3×10^5 células/ml en medio DMEM/10%ST/3%HECS (MS) en spinner (Bellco) de 250 ml. Al cabo de 24 horas las células fueron transferidas a un spinner de 500 ml, en el cual se cambió el medio cada 24 horas.

Encapsulación

Las células fueron centrifugadas a 800 rpm por 10 min. El

pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo (MEM + 10% FCS + 100 U/ml estrept.) a razón de 2×10^6 células/ml. La suspensión celular fue centrifugada y lavada a la misma concentración de calcio en solución de ClNa 0,9%. Ambas fracciones fueron mezcladas por separado con igual volumen de una solución de alginato de sodio al 1,6%. Cada una de estas suspensiones fue transferida a una jeringa de 50 ml y goteada en forma uniforme utilizando aguja 20 1/2G, desde una distancia de 3cm, sobre 150 ml de solución 50 mM - 100 mM de Cl2Ca a temperatura ambiente. Las perlas de alginato formadas se dejaron sedimentar 2-3 min, eliminándose el sobrenadante por vacío. Luego de lavarlas sucesivamente con ClNa 0,9% y ML, fueron resuspendidas en 200 ml de MS y cultivadas a 37 C en frascos spinner de 250 ml. A partir del día 2 se cambió el medio cada 24 horas. El medio metabolizado extraído (200 ml aprox.) se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos tomándose al cuantar para la determinación de Glucosa (kit Diagen) y Concentración de IgG por ELISA. El pellet se resuspendió en un volumen adecuado para la determinación del número de células/ml de sobrenadante. Asimismo, cada 72 horas se determinó el número de células/gramo de perla, para lo cual las mismas fueron disueltas en 1 ml de citrato de sodio 50 mM. Se determinó la viabilidad celular por exclusión con azul de tripan. Por otro lado, con el fin de observar la formación de clusters en el interior de las perlas se extrajeron algunas de las mismas observándolas en microscopio invertida.

Resultados

De acuerdo al protocolo experimental descrito se cultivaron las células en los siguientes spinner:

TABLA # 1

Spinner	Cel. resuspendidas en		Solución de Cl2Ca	
	MS	NaCl	50 mM	100 mM
1	-	-	+	-
2	-	+	+	-
3	+	-	+	-
4	+	-	+	-
5	+	-	+	-
6	-	+	-	+

* Cl2Ca a 4 C.

Los spinner 1 y 2 fueron descartados a las 48 horas de cultivo debido a que la formación de las perlas no fue el óptimo.

Los resultados obtenidos en los spinner 3-6 se presentan en la figura 1a-c (Los resultados obtenidos con los spinner 4 y 5 son similares, por lo tanto solo se presenta el histograma del spinner 5). Del análisis de los mismos podemos observar:

a) La mayor densidad celular ($5,39 \times 10^6$ cel/gr gel) se observó en el spinner 3, con una viabilidad del 83% en el día 5.

b) El spinner 3 mostró una estrecha correlación entre la densidad celular y el consumo de glucosa.

c) La producción de Ig alcanzó a 6 mg totales al día 5 en el spinner 3. La producción total de este spinner durante los 12 días de la experiencia fue de 33 mg de Ig.

d) El spinner 6 fue el que presentó la menor salida de células al sobrenadante durante el periodo experimental.

e) Con respecto a la morfología de los clusters formados, solo el spinner 5 los presentó alargados (de acuerdo a lo descrito en la literatura: Sinacore M. et al, 1989, Biotechnology 7: 1275); en los otros spinner eran redondos.

Estas observaciones sugieren que las células cultivadas en el spinner 3 estuvieron sometidas a un mejor intercambio de oxígeno y de nutrientes. Ello podría estar relacionado con una formación más eficiente de las perlas. Por otra parte, se observó que la gelificación en 100 mM $CaCl_2$ (spinner 6), si bien permitió un menor escape de células al sobrenadante, podría limitar el crecimiento celular, debido a que la porosidad de las perlas no sería la más adecuada para que el intercambio de gases y nutrientes fuera eficiente.

Finalmente, entre los factores que probablemente influyeron en un rendimiento de producción inferior al descrito en la literatura está la baja viscosidad del alginato usado. En efecto el uso de alginato de cadena larga (alta viscosidad) permite una formación de perlas de mayor porosidad. Otro factor a considerar es la capacidad secretora de Ig del híbrido usado en estos experimentos.

2.2.2 Producción de anticuerpos monoclonales por cultivo en bioreactor Acusyst-R (Endotronics)

Introducción

El Acusyst-R constituye una alternativa de escalado al

efecto de reemplazar la producción de AcM en ratones y roller. El sistema consiste en: reservorio de medio, sistema de gaseado para el control de pH, cartucho de fibra hueca y un dispositivo que permite el flujo reverso. El panel de control permite regular: temperatura, flujo de CO₂, tiempo de ciclaje reverso y velocidad de las bombas (medio, circulación, cosecha y factores).

Desarrollo

Se realizaron 3 procesos de producción, siguiéndose el protocolo experimental que se detalla a continuación:

1. Montaje del Bioreactor: se realizó en sesión demostrativa bajo condiciones de extrema esterilidad. El espacio extracapilar (ECS) fue pretratado con medio RPMI-1640 sin aditivos durante una semana con el objeto de eliminar compuestos tóxicos.

2. Preparación y siembra del inóculo: se descongelaron ampulas conteniendo el hibridoma CB-Hep1, secretor de AcM contra el Ag S del virus de la hepatitis B. Se creció en medio RPMI-1640 (3.5 g glucosa/l con 5% de suero de ternero durante 7 días). EL inóculo obtenido fue de 300 millones de células con una viabilidad aproximada al 90%. En el bioreactor se sembraron 200 millones de células y se ajustaron las siguientes condiciones de cultivo:

a. Control de consumo de glucosa: fue realizado diariamente (kit Sigma) ajustando la concentración de glucosa mediante un aumento progresivo de la circulación del medio intracapilar y de su renovación.

b. Ajuste de pH: se realizó 2 veces por día mediante el rotámetro de CO₂ ajustándolo con el objeto de alcanzar pH 7.3.

c. Velocidad de circulación: fue iniciada a 100ml/min.

d. Medio fresco: se renovó a razón de 50 ml/h.

e. Ciclaje del flujo reverso: se inició el día 2 con intervalos de 12 horas.

Las experiencias 1 y 2 se detuvieron el día 7 al aparecer contaminación bacteriana en el medio intracapilar. Al iniciar la experiencia 3 se extremaron las medidas de esterilidad en el envasado y conservación de aditivos (glutamina, piruvato). Al momento de realizar este informe, esta experiencia cursa su día 20 con un desarrollo normal.

2.2.3 Cultivo de hibridoma en saco de diálisis

Como técnica alternativa al cultivo por encapsulación en alginato, se cultivó el hibridoma CB-1FNA 2-4, productor del AcM contra interferón alfa, en membrana de diálisis.

Metodología

a. Preparación del inóculo: se descongelaron ampulas del hibroma mencionado, el que fue cultivado en medio RPMI-1640/10% ST. Se prepararon 2 inóculos de 10 y 15 x 10E6 células totales.

b. Tratamiento de los sacos de diálisis (SD): se utilizaron SD de 2.4 cm de diámetro, 7.0 cm de longitud y un cut off de peso molecular de 14 kD. Con el objeto de eliminar sustancias tóxicas (glicerol, metales pesados, cultivos, etc) se les sometió al siguiente proceso de lavado:

- b.1. Dos en etanol al 50%
- b.2. Dos en bicarbonato de sodio 10 mM.
- b.3. Dos en EDTA 1 mM.
- b.4. Dos en agua destilada.

Los lavados fueron de 1 hora cada uno. Posteriormente los SD fueron almacenados en ácido acético 10% a 4 C.

c. Montaje: los SD, lavados según b.4, fueron anudados en uno de sus extremos con hilo estéril mientras que en el otro se colocó una cánula de plástico para facilitar la manipulación en la siembra del inóculo. Luego de esterilizarlos durante 2 horas en agua a ebullición, los SD fueron llenados con 10 y 15 x 10E6/10 ml RPMI-1640/10%ST, respectivamente. Posteriormente, previo anudado con hilo estéril del extremo abierto, se les retiró la cánula y fueron colocados en tubos de 26 cm x 4 cm con 50 ml de RPMI-1640/10% ST. La incubación se realizó con agitación en un sistema de rotación (roller) de 1 revolución cada 30 seg 37 a C.

d. Mantenimiento de los cultivos: dado la activa metabolización del medio de cultivo, este fue renovado cada 24 horas. Se extrajo una alícuota diaria para medición del consumo de glucosa y de la salida de células al sobrenadante. Los SD de 15 y 10 x 10E6/10 ml fueron abiertos a los 4 y 6 días, respectivamente, para determinar número de células, viabilidad y concentración de Ig.

Resultados

En la tabla numero 2 se muestran los resultados obtenidos al medir el consumo de glucosa para ambos SD.

TABLA # 2

Días en cultivo	Consumo de glucosa (mg/ml)	
	1*	2**
1	0.4	0.79
2	0.82	1.13
3	1.0	0.9
4	0.9	0.77
5	ND	-
6	1.08	-

* CB-1FNA 2-4 1.0 x 10E6 cels/ml.

**CB-1FNA 2-4 1.5 x 10E6 cels/ml.

ND: no determinado

Los valores de consumo de glucosa tienen vital importancia en el seguimiento de los cultivos, puesto que los otros parámetros estudiados solo es posible determinarlos una vez finalizada la experiencia.

Con respecto a los resultados obtenidos al determinar el número de células, viabilidad y la concentración de Ig, estos se muestran en la tabla #3:

TABLA # 3

	1*	2*
# de cels x 10E6	52.5.	23.5
viabilidad %	80.3	48.5
[Ig] mg/ml x 10 E ⁻¹	2.97	2.64

1* CB-1FNA 2-4 1.0 x 10E6 cels/ml.

2**CB-1fna 2-4 1.5 x 10E6 cels/ml.

Evidentemente que los resultados obtenidos con este sistema de cultivo son bastante auspiciosos. Si bien se trabajó con un hibridoma distinto al usado en los experimentos de encapsulación con alginato, probablemente la producción de Ig en SD sería mayor. Experimentos en curso, en los cuales se comparan ambos sistemas de cultivo usando el mismo hibridoma, tienden a demostrar esto.

Por otro lado la baja viabilidad obtenida en 2* (48.5%), se debe probablemente a que no hubo cambio de medio el día anterior.

3. Purificación de Anticuerpos Monoclonales

3.1 Purificación de anticuerpos monoclonales por Proteína-A Sepharosa

Introducción

Se purificó un anticuerpo monoclonal (AcMo) secretado por el hibridoma CB-HEP1 a partir de fluido ascítico (Ver 2.1). El esquema general de purificación utilizado fue el siguiente:

- (A) Filtración
- (B) Precipitación con Sulfato de Amonio
- (C) Desalinización
- (D) Afinidad

Metodología

(A) Filtración:

Los líquidos ascíticos (LA) descongelados a 37 C fueron filtrados por gasa y algodón simultáneamente a temperatura ambiente. Si bien el proceso de filtrado a través de papel filtro permite obtener un producto de mayor limpidez, es excesivamente lento. Se filtraron líquidos ascíticos correspondientes a los lotes 22-25 con un volumen aprox. a 2 litros cada uno. De cada lote separamos una alícuota (Código A).

(B) Precipitación con Sulfato de Amonio:

Los LA filtrados fueron precipitados a temperatura ambiente por agregado de sulfato de amonio sólido a razón de 313 gr. de sal por litro de LA para obtener una concentración final del 50%. Luego de dejar reposar el precipitado por 2 horas a 4 C se centrifugó a 6500g a 4 C. Separamos una alícuota del sobrenadante del supercentrifugado (Código SC). El precipitado fue resuspendido en sulfato de amonio al 50% en un volumen igual al 30% del inicial y centrifugado en las mismas condiciones. El precipitado final fue resuspendido en PBS, a un volumen igual al 25% del inicial y separado una alícuota del mismo (Código AP).

(C) Desalinización:

El desalado de las muestras obtenidas en (B) se realizó por cromatografía de filtración en Sephadex-G25. La columna de gel se equilibra en PBS a 4 C monitoreando el eluato por medición de la densidad óptica en Uvicord acoplado a un registrador.

El Flujo Volumétrico (FV) de la columna utilizada (30 x 53 cm) fue de 1 litro/hora, lo que permitió obtener un Flujo Lineal (FL) de 12.74 cm/hora calculado según la ecuación siguiente:

$$FV = FL \times A \quad \text{siendo } A = \text{Sección de la columna.}$$
$$A = 78.5 \text{ cm}^2.$$

Para acelerar el proceso de desalado, usamos en paralelo otra columna de Sephadex-G25 (5 x 90 cm) trabajando con el mismo FL de la columna anterior. Se colecta el eluato protéico a temperatura ambiente hasta observar un aumento en la conductividad del mismo. Alícuotas del eluido recogido fueron separadas (Código PD).

(D) Afinidad:

La muestra desalinizada fue pasada por columna XK50/30 (Pharmacia) conteniendo 100 ml de Proteína A Sepharosa. Una vez equilibrada en tampón PBS pH 8.0 pasamos la muestra desalinizada con un flujo volumétrico de 400 ml/h (flujo lineal 20.4 cm/h). Después de pasar la muestra, lavamos con el mismo tampón de equilibrio hasta que el monitor UV recuperó la absorbancia o línea de base original. Una alícuota de la fracción no unida a la columna fue separada (Código NB).

Los anticuerpos fueron eluidos con tampón citrato 0.1M

pH 4.0 y neutralizado el eluido con Tris Base hasta pH 7.0 lo cual fue verificado con papel indicador. Una alícuota de este eluido fue obtenida (Código E). Posteriormente la columna fue lavada con el mismo tampón de equilibrio.

Considerando por una parte que este laboratorio, en purificaciones recientes, había reportado un descenso en los rendimientos porcentuales de recuperación de inmunoglobulina y por otra, que los valores de absorbancia registrados en los cromatogramas de los eluatos obtenidos a pH 4.0 también habían disminuido, decidimos modificar el protocolo. Para ello realizamos la elución con tampón citrato 0.1M a pH 3.0. Con esta variación aumentó significativamente la recuperación de anticuerpo eluido. A modo de ejemplo, citamos los resultados experimentales correspondientes a la purificación de anticuerpo a partir del LA del lote #23 (Figura 2).

Las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación (alícuotas Código LA, SC, AP, PD, NB y E) fueron ensayadas en su concentración protéica por el método de Lowry y en su actividad específica por ELISA con placas E.I.A. recubiertas con antígeno específico del virus de hepatitis.

La pureza de los diferentes eluatos fue comprobada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5% en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones nativas y reductoras.

3.1 Purificación de anticuerpos monoclonales por intercambio iónico.

Introducción

El notorio aumento en la demanda de anticuerpos monoclonales (AcM) en el diagnóstico y la terapéutica, ha obligado a producirlos en forma masiva. Siendo todavía el fluido ascítico de ratón, su principal fuente de obtención, la optimización de los métodos de purificación ha sido motivo de numerosos estudios. Los mínimos involucran métodos cromatográficos, siendo actualmente el de mayor difusión la cromatografía de afinidad. Sin embargo, esta presenta algunas limitaciones.

Dentro de los métodos descritos como alternativa a la cromatografía de afinidad, se encuentra la cromatografía de intercambio iónico. En este informe se reporta el empleo de una columna de intercambio aniónico en la purificación de un AcM murino. Se optimizaron las condiciones del proceso con el fin de maximizar la capacidad de adsorción específica de la resina, para su aplicación en la purificación de AcM en gran escala.

Metodología

Anticuerpo Monoclonal

Se empleó el AcM murino CB-Hep1, isotipo IgG2b, dirigido contra la proteína S del virus de la hepatitis (pHBsAG). El mismo fue obtenido a partir de líquido ascítico (LA) de ratones híbridos OFxBalb/c, previamente sensibilizados con aceite mineral e inoculados con el hibridoma productor.

Tratamiento del líquido ascítico

Los LA recolectados por punción múltiple fueron centrifugados, filtrados por gasa y algodón y precipitados con sulfato de amonio al 50%. A los efectos de ajustar la fuerza iónica de la muestra a las condiciones apropiadas a la resina de intercambio aniónico a utilizar, el LA tratado fue pasado por una columna 30/53 de Sephadex G-25 (Pharmacia). La fracción protéica desalada se eluyó con tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.6.

Purificación del Anticuerpo Monoclonal

El AcM fue procesado mediante cromatografía de intercambio aniónico en una matriz de DEAE-Sephacel (Pharmacia) empacada en una columna de 19 x 2.5 cm equilibrada con Tris-HCl 20mM pH 7.6. Una vez sembrada la muestra, las proteínas no enlazadas fueron lavadas con dos volúmenes de columna. Las fracciones adsorbidas fueron eluidas mediante un sistema de gradiente lineal de 540 ml de 0 a 200 mM ClNa/Tris-HCl 20mM pH7.6; o discontinuo (60, 85 y 500 mM ClNa/Tris-HCl 20 mM pH7.6). Se seleccionó un flujo volumétrico de 25ml/h. Las fracciones fueron colectadas con monitoreo directo del proceso de elución a 280 nm (Uvicord, Pharmacia).

Ensayos Analíticos

La concentración protéica de las fracciones obtenidas

en el proceso de purificación se determinó por el método de Lowry. Como criterio de pureza de las muestras obtenidas se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Se emplearon geles al 12.5% en condiciones reductoras siguiendo el método de Laemmli. Estos fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie R-250 y analizados posteriormente por densitometría (Hitachi) para determinar la concentración protéica relativa de inmunoglobulina (Ig) en cada uno de los eluatos.

La presencia de AcM específico se determinó por ensayo inmunoenzimático (ELISA) en placas de policloruro de vinilo (Dynatech). Estas fueron sensibilizadas durante 20 min a 50 C con 5 ug/ml de pHBsAg en NaHCO₃ 100 mM, pH 9.6 y lavadas 3 veces con PBS-0.05% Tween20. Las placas, conteniendo 100 ul/pozo de cada una de las fracciones eluidas de la columna de DEAE-Sephacel, fueron incubadas 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Previo lavado de las mismas, en las condiciones ya descritas, se incubaron con inmunoglobulina de conejo anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa por 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos inmunes fueron revelados con 100 ul/pozo de solución sustrato (5 ul de H₂O₂, 5 mg de o-fenilendiamina y 10 ml de solución tampón citrato 50 mM, pH 5.5). La reacción fue detenida con 50 ul/pozo de SO₄H₂ 250 mM y la absorbancia medida a 492 nm (Titertek Multiskan).

Resultados

A los efectos de obtener una mejor separación entre el AcM y las proteínas contaminantes se procedió a ajustar las condiciones de retención de las distintas proteínas en la columna de DEAE-Sephacel con un gradiente continuo de fuerza iónica creciente. Las figuras 3a-b muestran el perfil de elución obtenido mediante un gradiente lineal de 0-200 mM de ClNa y las SDS-PAGE de los picos cromatográficos. El análisis electroforético muestra que en el pico 2 de la cromatografía fue colectada gran parte de la Ig presente en la muestra sembrada. Por densitometría se demostró que sólo el 62% de la Ig total colectada eluye en dicha fracción. En la figura 4 se observa que el 87% de la proteína presente en dicho pico corresponde a Ig, la cual posee el 72% de la actividad específica recuperada.

Dado que todas las proteínas del LA se unen a la columna, reduciendo la capacidad de adsorción de la resina, y considerando que en nuestras condiciones experimentales las Ig

eluyen con una fuerza iónica mayor de 60 mM ClNa, se decidió optimizar este método de purificación incrementando la fuerza iónica inicial. La figura 5 muestra el perfil de elución obtenido con un gradiente lineal de 60-200 mM ClNa. Se observa que, a diferencia de la experiencia anterior, en las condiciones de equilibrio eluyen dos fracciones protéicas. Mediante SDS-PAGE (figura 5^a) demostramos que la primera de ellas corresponde homogéneamente a transferrina (carril 1), y la segunda a Ig (carril 2). Al aumentar el gradiente salino eluye una tercera fracción, que demostró en la electroforesis corresponder a Ig (carril 3). Si bien en la figura 6 se observa que estas dos últimas fracciones poseen Ig, con actividad específica, la densitometría mostró que la fracción 3 concentra el 82% del total de la Ig eluida, con un 85% de pureza. Es interesante hacer notar que la Ig colectada en la fracción 4 carece de actividad específica.

A los efectos de extender estos resultados de laboratorio a un subsiguiente proceso de escalado se encaró la purificación del AcM mediante la aplicación de un gradiente discontinuo de ClNa en las columnas utilizadas en los experimentos anteriores. El perfil de elución obtenido se muestra en la figura 7. Las tres fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis observándose que la Ig eluye en las fracciones 2 y 3. Del análisis posterior por densitometría se demostró que estas contienen el 50% y el 46%, respectivamente, del total de Ig eluida. Aun cuando ambas fracciones presentaron actividad específica similar (figura 8), con la fracción 3 eluyen proteínas contaminantes.

Dado que con 85 mM de ClNa en el gradiente discontinuo queda retenida el 46% de la Ig, se incrementó la fuerza iónica de este paso a 100 mM ClNa. Al mismo tiempo y en función de los objetivos propuestos, se escaló el proceso en un factor de 6 empleando una columna de 5 x 30 cm (Pharmacia). La figura 9 muestra el cromatograma y la electroforesis correspondiente a este experimento. La Ig se eluyó en la fracción 2 con un nivel de pureza adecuado. De la figura 10 se observa que esta representa el 93.5 % del total de Ig eluida.

CONCLUSIONES

Las actividades teóricas y prácticas planificadas por la Agrupación de Hibridomas de este Centro de Referencia para ser desarrolladas fueron cumplidas.

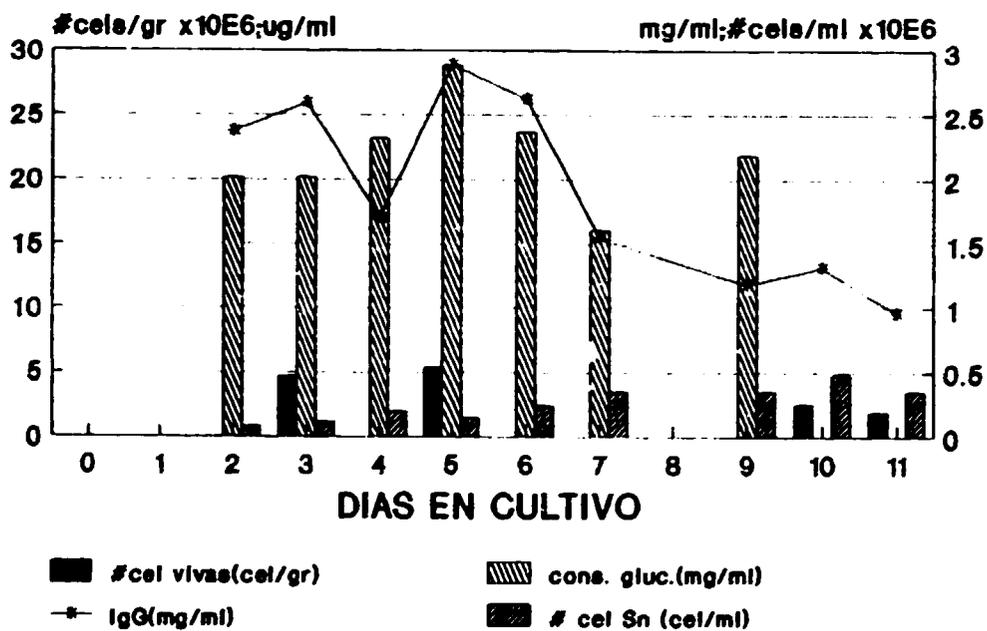
Con respecto al trabajo experimental, hemos adquirido la capacitación necesaria en la producción masiva de AcM, especialmente en lo que a cultivo de hibridomas en perlas de alginato de Calcio se refiere. También hemos realizado el montaje de una técnica alternativa como es el cultivo de hibridomas en sacos de diálisis. Los resultados obtenidos con este sistema, aunque preliminares, parecen ser auspiciosos. Experimentos en curso tienden a confirmarlo. En lo que al bioreactor Acusyst-R respecta, las actividades fueron fundamentalmente demostrativas. Al respecto, el proyecto original contempla una técnica que los participantes trabajarán en el próximo año de cultivo.

En relación a la purificación de AcM a partir de líquido cultivo se utilizaron las tecnologías de afinidad e intercambio iónico. Con respecto a la purificación con proteína A-Sepharosa, se optimizaron las condiciones de recuperación de los AcM. Los resultados obtenidos por intercambio iónico, resumidos en este informe, forman parte de un manuscrito en preparación.

Por otro lado, las actividades teóricas desarrolladas fueron de gran utilidad ya que estuvieron coordinadas de acuerdo a los trabajos prácticos planificados.

No podemos finalizar este informe sin dejar de expresar nuestro agradecimiento a todos los miembros de la Agrupación de Hibridomas y Modelos Animales.

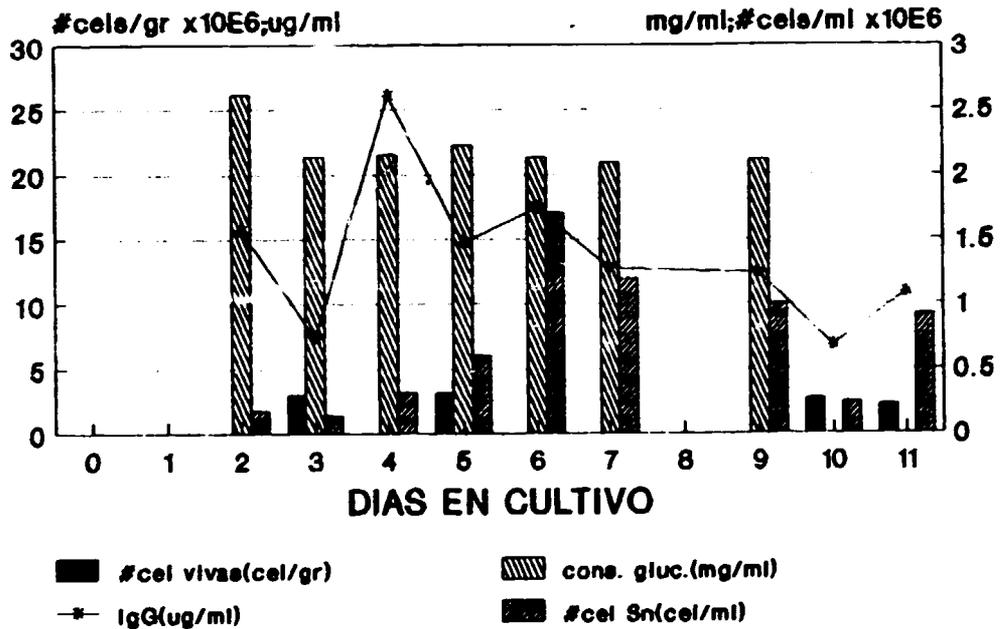
ENCAPSULACION EN ALGINATO DE SODIO 0.8% GELIFICACION EN 50mM CaCl₂. SPINNER 3.



HIBRIDOMA CB-HEP1

Fig 1a

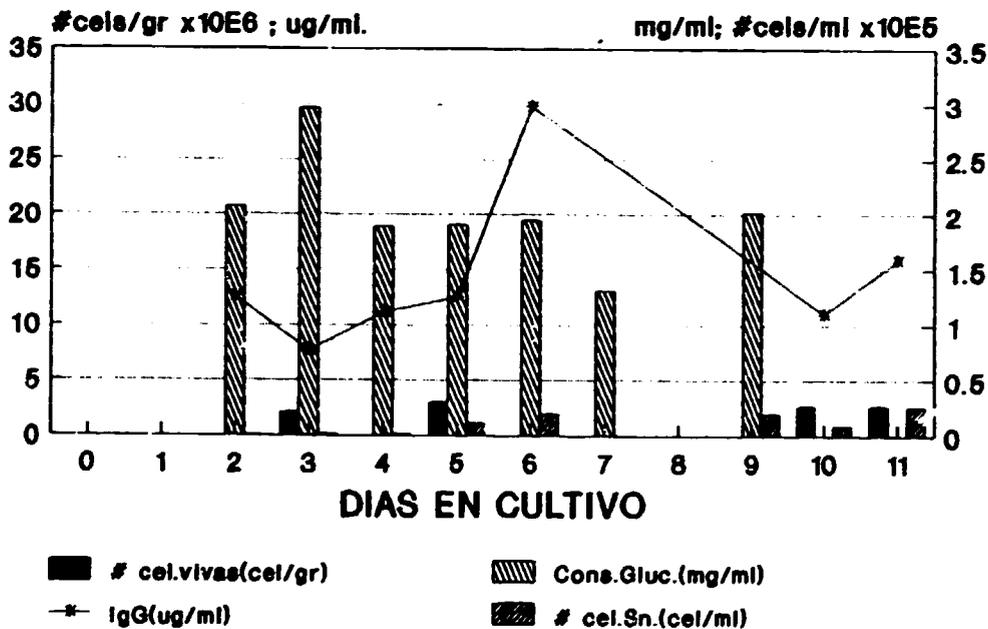
**ENCAPSULACION EN ALGINATO DE SODIO 0.8%
GELIFICACION EN 50mM CaCl₂. SPINNER 5.**



HIBRIDOMA CB-HEP1

Fig 1b

**ENCAPSULACION EN ALGINATO DE SODIO 0.8%
GELIFICACION EN 100 mM CaCl₂. SPINNER 6.**



HIBRIDOMA CB-HEP1.

Fig 1c

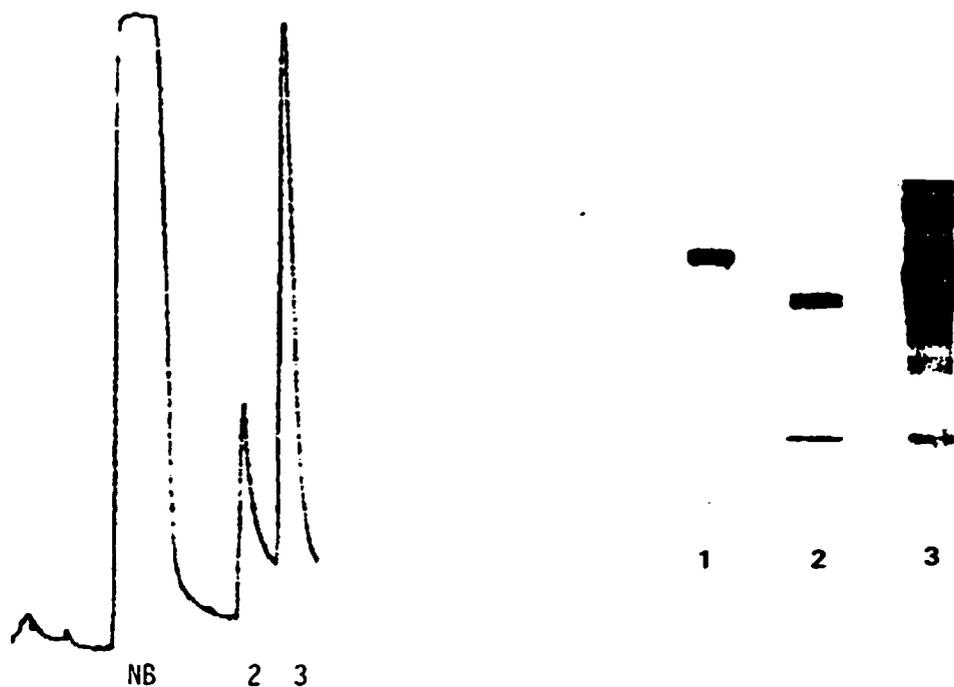


Figura 2 . Columna cromatográfica de Proteína A Sepharosa. Los líquidos asépticos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sephadex G-25 M fueron sembrados en una columna Proteína A Sepharosa de 80 ml. Luego de lavada con PBS pH 8 (Non Bound) fueron eluidas a 4 °C con solución tampón de citrato pH 4 (pico 2) y pH 7 (pico 3) en las siguientes condiciones:

- volumen de muestra: 330 ml
- concentración de la muestra: 22.5 mg/ml
- flujo volumétrico: 360 ml/h
- flujo lineal: 18.4 cm/h
- velocidad de registro: 0.1 mm/min

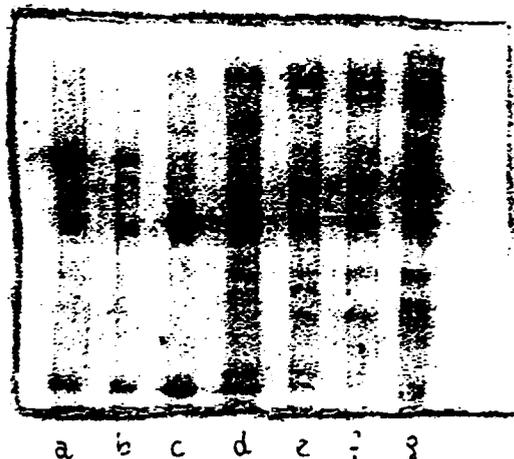
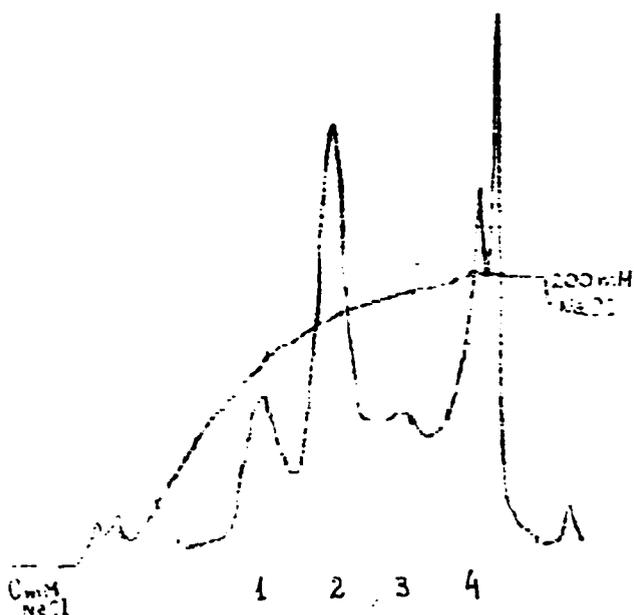


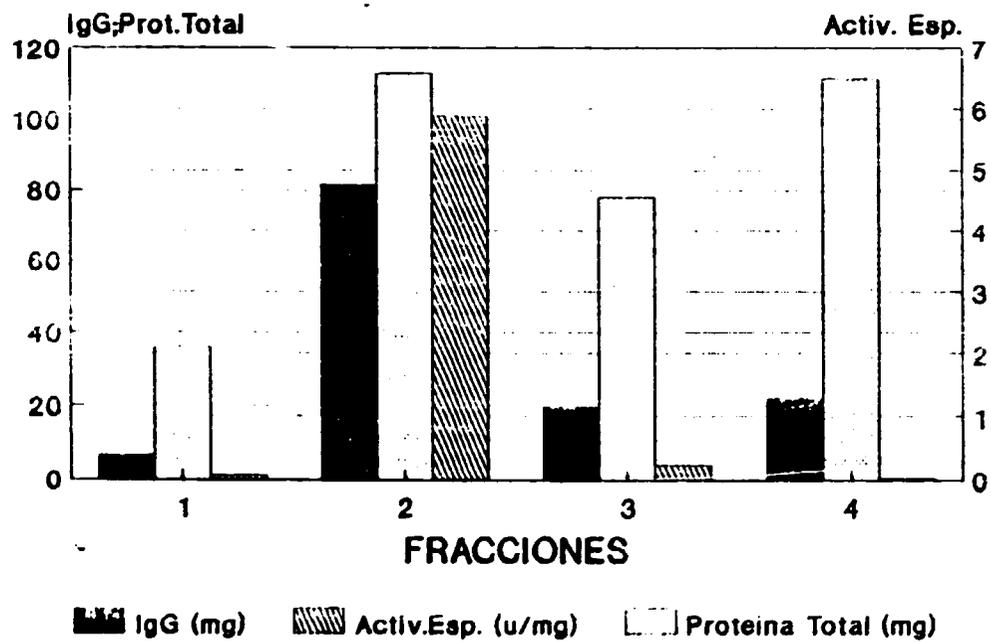
Figura 3. (A) Columna cromatográfica de DEAE-Sephacel. Los líquidos ascíticos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sephadex G-25 M fueron sembrados en una columna de DEAE-Sephacel 2.5/20 cm/cm y eluidos con un gradiente continuo 0-200 mM de ClNa en las siguientes condiciones:

- volumen de muestra: 14.9 ml
- concentración de la muestra: 27.0 mg/ml
- flujo volumétrico: 25 ml/h
- flujo lineal: 5.1 cm/h
- velocidad de registro: 0.2 mm/min
- capacidad de la columna: 4 mg/ml

(B) SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones obtenidas en (A) en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue R-250. Los carriles corresponden a:

- carril a: pico 1
- carril b: entre picos 1 y 2
- carril c: pico 2
- carril d: entre picos 2 y 3
- carril e: pico 3
- carril f: entre picos 3 y 4
- carril g: pico 4.

INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO I



HIBRIDOMA CB-HEP1

Fig. 4.

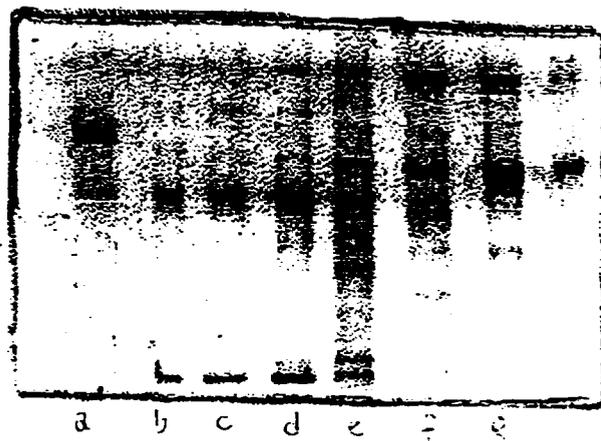
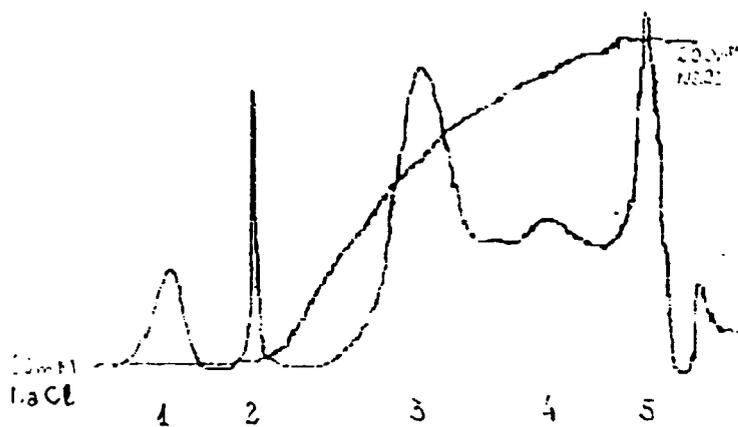


Fig 5

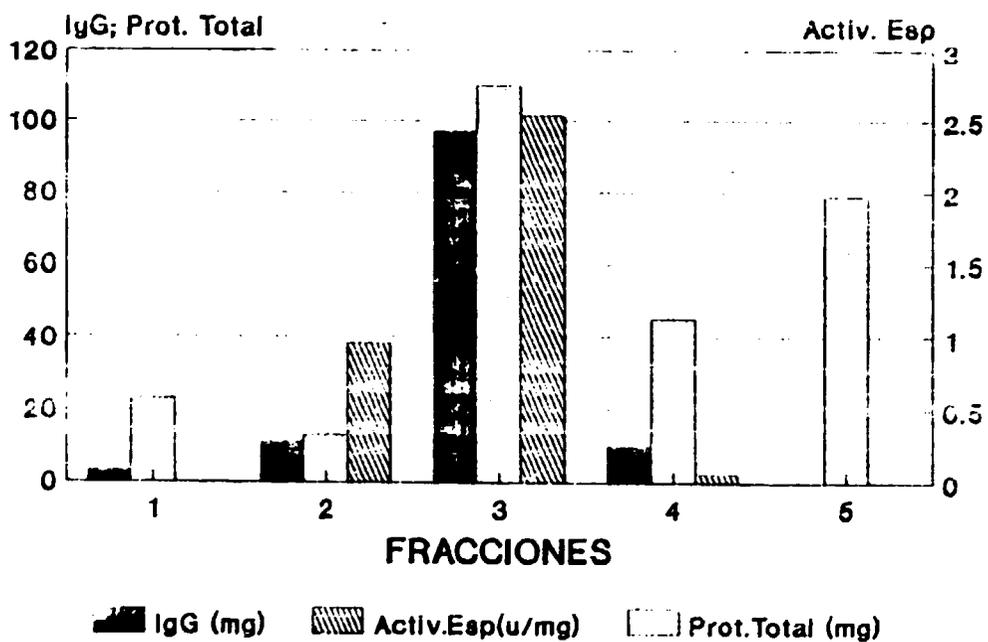
(A) Columna cromatografica de DEAE-Sephacel. Los líquidos ascéticos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sephadex G-25 M fueron sembrados en una columna de DEAE-Sephacel 2.5/20 cm/cm y eluidos con un gradiente continuo 60-200 mM de ClNa en las siguientes condiciones:

- volumen de muestra: 14.9 ml
- concentración de la muestra: 27.0 mg/ml
- flujo volumétrico: 25 ml/h
- flujo lineal: 5.1 cm/h
- velocidad de registro: 0.2 mm/min
- capacidad de la columna: 4 mg/ml

(B) SDS PAGE al 12.5% de las fracciones obtenidas en (A) en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue R-250. Los carriles corresponden a:

- carril a: pico 1
- carril b: pico 2
- carril c: pico 3
- carril d: entre picos 3 y 4
- carril e: pico 4
- carril f: entre picos 4 y 5
- carril g: pico 5

INTERCAMBIO IONICO DEAE-SEPHACEL. EXPERIMENTO II



HÍBRIDO MA C6-HEP1

Fig. 6.

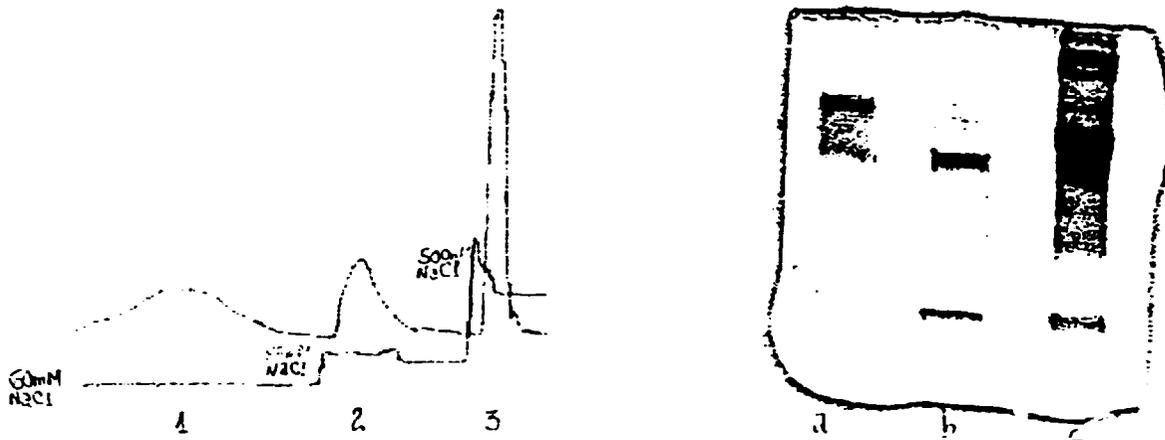


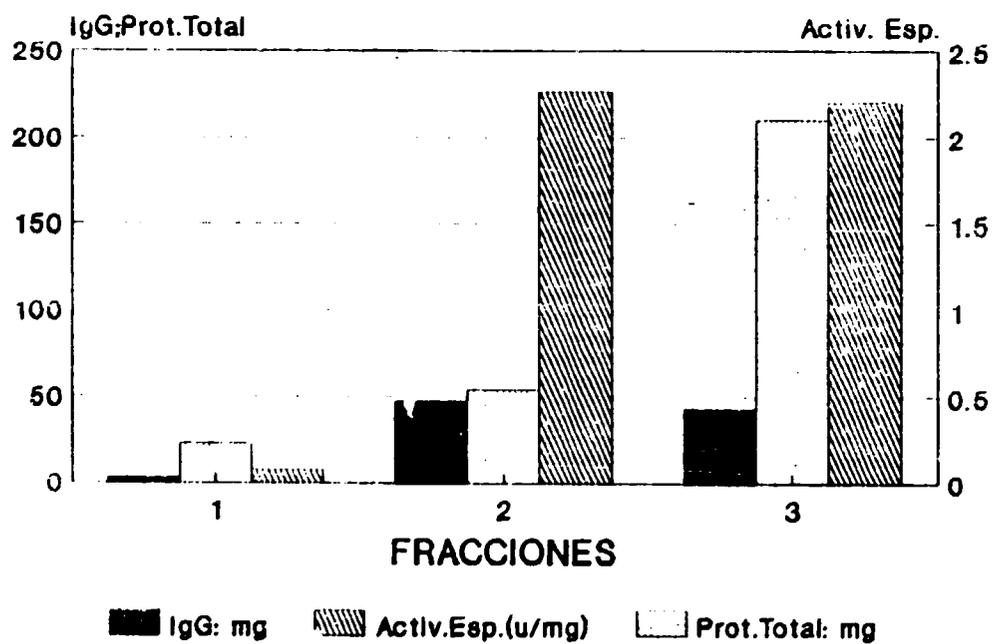
Figura 1. (A) Columna cromatográfica de DEAE-Sephacel. Los líquidos ascéticos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sephadex G-25 M fueron sembrados en una columna de DEAE-Sephacel 2.5/20 cm/cm y eluidas con un gradiente discontinuo: 60, 85 y 500 mM de ClNa en las siguientes condiciones:

- volumen de muestra: 14.9 ml
- concentración de la muestra: 27.0 mg/ml
- flujo volumétrico: 25 ml/h
- flujo lineal: 5.1 cm/h
- velocidad de registro: 0.2 mm/min
- capacidad de la columna: 4 mg/ml

(B) SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones obtenidas en (A) en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue R-250. Los carriles corresponden a:

- carril a: pico 1
- carril b: pico 2
- carril c: pico 3

INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO III



HIBRIDOMA CB-HEP1

Fig 3

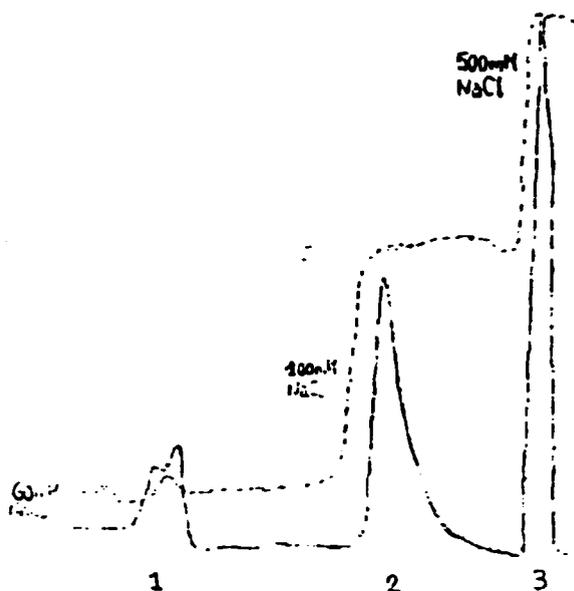


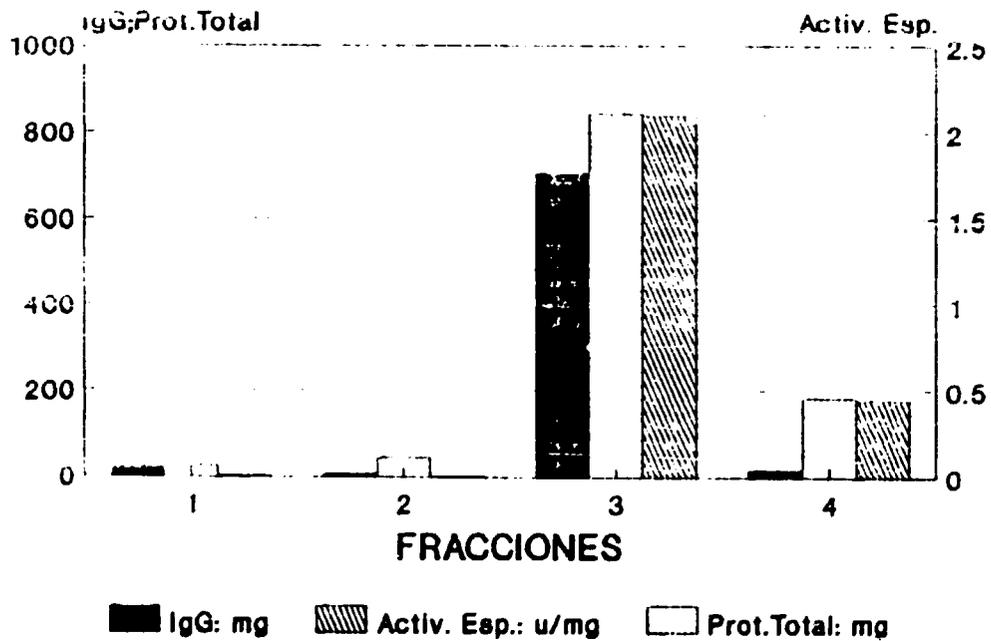
Figura 9 . (A) Columna cromatográfica de DEAE-Sephacel. Los líquidos ascíticos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sphadex G-25 M fueron sembrados en una columna de DEAE-Sephacel 50/30 cm/cm y eluidos con un gradiente discontinuo de 60, 100 y 500 mM de ClNa en las siguientes condiciones:

- volumen de muestra: 146 ml
- concentración de la muestra: 22.5 mg/ml
- flujo volumétrico: 120 ml/h
- flujo lineal: 12.4 cm/h
- velocidad de registro: 0.2 mm/min
- capacidad de la columna: 4 mg/ml

(B) SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones obtenidas en (A) en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue R-250. Los carriles corresponden a:

- carril a y b: pico 1
- carril c : pico 2
- carril d : entre picos 2 y 3
- carril e : pico 3

INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO IV



HIBRIDOMA CB-HEP1

Fig 10

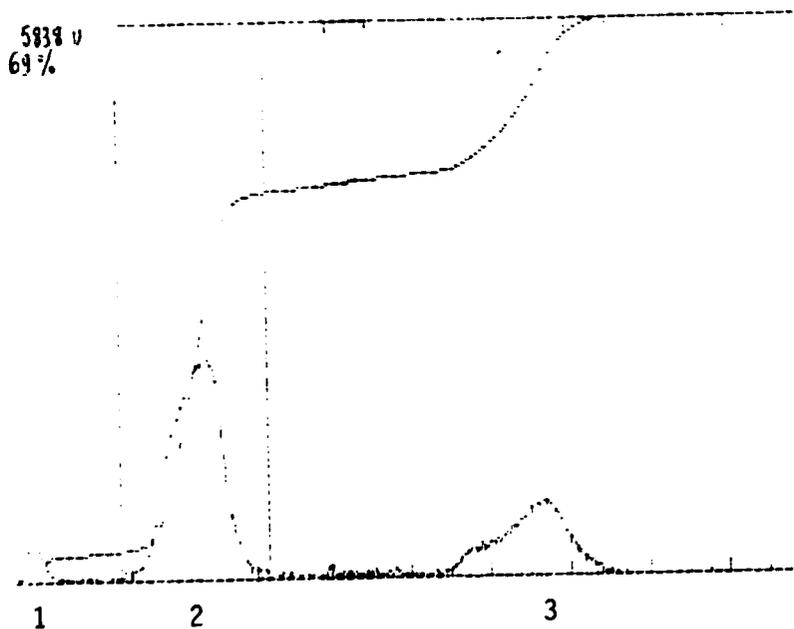


Figura 11. La SDS PAGE al 12.5% mostrada en la figura 9 fue sometida a análisis densitométrico. Se observa el densitograma del carril c de la electroforesis. Las fracciones obtenidas corresponden a:

- pico 1: probablemente, inmunoglobulina no reducida.
- pico 2: cadena pesada de inmunoglobulina (69%).
- pico 3: cadena liviana de inmunoglobulina (26%).