



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> 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](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

19322

27p.  
L. G. W.  
K. G. W.

PROYECTO "PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS  
MONOCLONALES".

PNUD/UNESCO/CNUDI

RLA 85 / 003

REALIZADO DEL 1 DE JULIO AL 30 DE SEPTIEMBRE  
DE 1981

CENTRO DE REFERENCIA: CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
INSTITUTO BUTANTAN  
SAG PAULO - BRASIL

PARTICIPANTES: NONCIADA SALMA E. (VENEZUELA)  
GABRIEL L. FISZMAN (ARGENTINA)  
EDUARDO GONZALES D. (BOLIVIA)

## 1.- INTRODUCCION.-

El objetivo de esta etapa fue la de producir masivamente un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno A del grupo sanguíneo humano. Para este propósito se utilizó el hibridoma B2-C114 obtenido en el Centro Oncológico de Medicina Nuclear (Instituto Roffo, Buenos Aires - Argentina) y un hibridoma obtenido en INCOR (São Paulo - Brasil).

Simultáneamente fue de nuestro interés la obtención masiva de un anticuerpo monoclonal (AcM) en condiciones apirógenas para uso terapéutico. Para este fin, se utilizó el hibridoma OKT3 de la ATCC el cual está siendo escalado en este centro de referencia.

## 2.- PRODUCCION DE ANTI - A.-

El escalado de este AcM se realizó en los siguientes sistemas:

- . Bioreactor Air lift (Bellico-Biotechnology)
- . Encapsulación en alginato de sodio (Bellico-Biotechnology).
- . Fibra hueca (AMICON)
- . Cultivo en Batch.

### 2.1. Bioreactor Air lift.-

#### 2.1.1. Descripción del aparato.-

Se utilizó el bioreactor air-lift de Bellico, consistente en una cámara de crecimiento dentro de la cual son cultivados los hibridomas. Esta cámara es continuamente aireada o gaseada con 5% CO<sub>2</sub>, desde la base mediante una columna

na de burbujeo ascendente que permite la oxigenación y homogenización del sistema.

La entrada y salida de medio de cultivo, y el suministro de aire al bioreactor es realizada automáticamente mediante bombas peristálticas controladas por un microprocesador programable.

La temperatura del sistema es mantenida mediante la recirculación de agua a 37°C alrededor de la cámara de crecimiento.

El pH es regulado mediante la adición de NaOH o HCl por bombas peristálticas programadas automáticamente.

El oxígeno disuelto, temperatura y el pH son seguidos continuamente mediante un registrador gráfico.

### 2.1.2. Montaje del Bioreactor.-

Se realizarón los siguientes pasos:

- . Ensamblado de todos los componentes del sistema, con la inclusión de pequeños cilindros de vidrio dentro de la cámara de crecimiento, para el aumento del área de adherencia celular.
- . Test de control de presión interna de la cámara de crecimiento.
- . Esterilización por autoclave (50 min.).
- . Acoplamiento de la cámara de crecimiento al resto del bioreactor en el área estéril.
- . Circulación de medio RDF (RFMI-1640, DMEM y F12 1:1:1), sin suero fetal de bovino (SFI).
- . Regulación, programación y control del funcionamiento del sistema.

### 2.1.3. Inoculación y seguimiento del proceso.-

Previa a la inoculación del bioreactor, se extrajeron muestras de medio de cultivo circulante, para determinar citotoxicidad del sistema. Paralelamente se utilizó un control de medio y suero del mismo lote.

Se inocularon  $10^9$  células (crecidas en spinner) en un volumen de 1 litro de medio RDF con 10% SFF, glutamina 2 mM, gentamicina 40 ug/ml, B-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M y 0,2% de etanol, completando a un volumen final dentro de la cámara de crecimiento de 3 litros. A continuación se realizaron ciclos de entrada de aire a la cámara de crecimiento para la distribución homogénea de las células en los cilindros de vidrio.

Posteriormente se programaron los ciclos de aeración, entrada y salida de medio de acuerdo a los parámetros metabólicos del hibridoma.

Diariamente se extrajo una muestra a partir de la cual se determinaron los siguientes parámetros: concentración de glucosa y lactato, así como viabilidad celular.

Los sobrenadantes obtenidos fueron centrifugados a 7000 rpm durante 30 minutos a 4°C, luego filtrados por AP 20 y determinada su actividad mediante título de hemaglutinación directa en microplaca. No se determinaron las concentraciones de anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo ya que no se optimizó el ELISA para este isotipo de inmunoglobulina (IgM). Posteriormente estos sobrenadantes fueron concentrados cerca de 10 veces mediante un sistema de ultrafiltración tangencial (MINITAN - Millipore).

### 2.1.4. Resultados.-

Desde un comienzo se observó un considerable aumento del

número de células, las cuales crecían tapizando la su perficie de los cilindros de vidrio.

Durante el cultivo, el SFB fue disminuído en su concen tración y cambiado paulatinamente a suero de caballo (HS), con objeto de disminuir los costos del suero y mantener niveles altos de productividad.

Con la finalidad de economizar el medio de cultivo, se determinó si los sobrenadantes obtenidos podrían ser reutilizados en el sistema, siendo previamente testados su capacidad de crecimiento celular en placas de 24 pozos. Para ello se reciclaron los sobrenadantes los cuales fueron suplementados con glutamina, glucosa y 1% de HS. Dado que estos sobrenadantes presentaron un considerable número de células, y el título de anticuerpos no incrementó, se decidió no reciclar y con tinuar la alimentación con medio fresco.

Para mantener la concentración de glucosa en niveles altos, se aumentó a partir del día 7 en el medio de cultivo de entrada de 2,6 gr/lt a 4,7 gr/lt., lo que permitió mantener dicha concentración cercana a 300 mg/dlt. durante el transcurso del cultivo.

La perfusión de medio fue modificada de acuerdo a la concentración de glucosa y lactato presente en el me dio de cultivo.

En la tabla N° 1 y gráfico N° 1, se muestran los pará metros determinados a lo largo de todo el proceso de producción en el air-lift.

Como puede observarse el pH varió fundamentalmente en tre 6,7 y 7,2.

Los primeros dos días del cultivo, el sistema fue gaseado con 5 % de CO<sub>2</sub> en aire, ya que el metabolismo de

las células fue suficiente para mantener el pH en los valores apropiados.

En un comienzo el oxígeno disuelto estuvo aproximadamente en 100%, para luego mantenerse cerca del 20% durante el período restante.

Hasta la fecha el bioreactor lleva 35 días y continúa en funcionamiento. Durante este período el bioreactor consumió 150 litros de medio RDF, 3,5 litros de SFB y 6.3 litros de HS.

Los sobrenadantes obtenidos presentaron un título de hemaglutinación que varió entre 64 y 128. Estos una vez concentrados, alrededor de 10 veces, aumentaron su título superior a 1024. Este anticuerpo monoclonal no fue purificado puesto que será utilizado para el diagnóstico de grupo sanguíneo en bancos de sangre, donde no se requiere de alta pureza.

## 2.2. Encapsulación en alginato de sodio.-

### 2.2.1. Metodología.-

Se encapsuló el hibridoma (el cual fue expandido en spinner) a una concentración de  $1,5 \times 10^6$  cel/ml de alginato de sodio (Bellco-Biotechnology) siendo la concentración final 1%. Para la formación de las perlas se empleó una solución de  $\text{CaCl}_2$  125 mM, glucosa 2,5 mM y hepes 25 mM pH 7,2. El medio utilizado fue DMEM 1,5% SFB, modificando dicha concentración de suero durante el cultivo de acuerdo a la densidad celular.

El cultivo se mantuvo en un spinner con 500 ml de medio de cultivo, donde las perlas ocuparon aproximadamente 130 ml. El mismo se incubó a 37°C a 5%  $\text{CO}_2$  con

agitación de 15 rpm.

Diariamente se realizaron determinaciones de pH, concentraciones de glucosa y lactato, N° de células por gramo de perlas, viabilidad celular mediante la disolución de las perlas y actividad de anticuerpos por hemaglutinación.

Los sobrenadantes fueron centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos y concentrados por ultrafiltración tangencial (MINITAN - Millipore).

#### 2.2.2. Resultados.-

Se presentan en la tabla N° 2 y gráfico N°2.

Al tercer día de cultivo se observaron pequeños acumulos de células en el interior de las perlas. Dichas agrupaciones de células fueron formando "canales radiales" que se engrosaron y aumentaron en su número al transcurso de los días. (ver fig. 1)

Hasta la fecha el cultivo se mantiene en activa fase de productividad.

#### 2.3. Fibra hueca.-

##### 2.3.1. Metodología.-

Se realizaron 3 cultivos en fibra Amicon (VF2-036 - 650691), inoculando  $4 \times 10^8$  células previamente expandidas en spinner en un volumen de 5 ml de medio de cultivo (RDF 10% CPSR-3 SIGMA). La circulación de medio a través del sistema fue entre 60 - 100 ml/min. El



control de las condiciones del cultivo se realizó midiendo los siguientes parámetros: pH, concentraciones de glucosa y lactato. Periodicamente se removió medio del ECS y se determinó viabilidad celular.

#### 2.3.2. Resultados.-

En las 3 experiencias se observó que en los primeros días de cultivo, los parámetros metabólicos no mostraron variación, y a partir del cuarto día el descenso de la viabilidad celular. Posiblemente esto sea debido a una adaptación inadecuada de las células al sistema o a defectos propios de la fibra.

#### 2.4. Cultivo en batch.-

Con el objeto de determinar la eficiencia de crecimiento y productividad en estos sistemas, el hibridoma fue cultivado en suspensión en spinners de 0,5 y 8 litros.

El medio de cultivo utilizado fue RDE con 10% de SFB para el spinner de 8 litros y CPSP-3 (SIGMA) al 10%, con la adición del suplemento OPTIMAL (GIBCO), en el spinner de 0,5 litros.

Las determinaciones diarias de N° de células, viabilidad celular y actividad del anticuerpo se detalla en las tablas N° 4 y 5.

Es importante destacar que el spinner de 0,5 lts. tuvo problemas con la agitación, lo cual no permitió mantener la viabilidad durante un tiempo más prolongado, como era de esperarse, por la adición del OptiMAB. (Suplemento que aumenta la productividad en los

cultivos).

Durante los primeros cuatro días de cultivo del spinner de 8 lts., la densidad celular fue en paulatino aumento. A partir del 5to. día, donde se aumentó el volumen final de 5 a 9 lts., la densidad celular fue en descenso hasta el fin del cultivo. Esto podría adjudicarse a un insuficiente intercambio gaseoso en el sistema.

Los títulos de hemaglutinación en ambos spinners alcanzaron un valor de 32. Los sobrenadantes de ambos spinners fueron centrifugados por ultrafiltración tangencial 50 veces.

### 3. PRODUCCION DE OKT3.-

#### 3.1. Encapsulación en alginato de sodio.-

La metodología de encapsulación del hibridoma OKT3, y los parámetros tomados para su seguimiento, fue la misma que se describe para la producción de anti-A (ver 2.2.1). La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes fue determinada por ELISA sensibilizando las placas con anti-IgG de ratón.

Los resultados mostraron que la concentración de anticuerpos fue en aumento la primera semana, para luego mantenerse alrededor de 70 ug/ml. hasta el último día de cultivo. (ver tabla N°3 y gráfico N°3).

El patrón de crecimiento celular en el interior de

las perlas fue similar al descrito por anti-A (ver fig. 1).

En los 15 días de cultivo el consumo de medio fue de 4,37 lts. y 226. mls de SFB. Los sobrenadantes obtenidos fueron concentrados cerca de 10 veces por ultrafiltración tangencial y purificados por proteína A - Sepharosa en forma apirogénica como se detalla a continuación.

Previo a la purificación, las mangueras fueron despirogenizadas pasando NaOH 0,5 N y la resina reconstituida con buffer Tris 0,05 M / NaCl 0,15 M, pH 8,6 con timerosal 0,02%. Los sobrenadantes concentrados y filtrados por 0,22 u. (600 ml), fueron aplicados a una columna apirogénica XK-16 (Pharmacia) a 4°C, conteniendo aproximadamente 40 ml de proteína A-Sepharosa.

Después del pasaje de la muestra, se lavó con el mismo buffer, hasta recuperar la línea de base. La elución se realizó consecutivamente con los siguientes buffers:

- a) Fosfato 0,05 M / NaCl 0,15 M pH 7.
- b) Glicina 0,05 M / NaCl 0,15 M pH 2,8.
- c) Glicina 0,05 M / NaCl 0,15 M pH 2,3.
- d) Tris 0,05 M / NaCl 1 M pH 8,6.

El flujo utilizado en la columna fue de 0,6 ml /min. Como era de esperarse la fracción de anticuerpo fue eluida con el buffer b, neutralizadas con Tris 1 M pH 10,5 y posteriormente dialisadas contra PBS pH 7,2 0,02% de timerosal.

La purificación fue monitoreada por UV y registrada gráficamente. Se recolectaron las fracciones no unidas a la columna (flow through 1 y 2), una muestra ob

tenida con el buffer a y el pico de anticuerpo de acuerdo al registro de la corrida cromatográfica (ver fig. 2).

La pureza de los diferentes eluatos fue comprobada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % en presencia de SDS en condiciones reductoras (ver fig. 3) y la concentración de proteína e IgG por Lowry y ELISA respectivamente.

La cromatografía de afinidad en proteína -A permitió alcanzar un alto nivel de pureza, obteniéndose 75 mgs. (Lowry) de OKT3 puro apirogénico. En estos momentos se están realizando los tests de pirogenicidad, presencia de DNA murino, etc para el envasado final.

#### 4. DISCUSION Y CONCLUSION.-

El bioreactor air-lift ha sido un sistema eficiente en la producción del anticuerpo monoclonal anti-A. Este hibridoma se adaptó eficientemente al cultivo en gran escala, no mostrando inconvenientes en el crecimiento con sueros de diferentes orígenes y concentraciones.

Una vez programado, el manejo del bioreactor es sencillo y de poca probabilidad de contaminación.

La inclusión de cilindros de vidrio dentro de la cámara de crecimiento ha sido una buena opción ya que ha permitido el crecimiento en altas densidades celulares. Es importante mantener en niveles adecuados el burbujeo de aire, para evitar el arrastre de células

que saldrían durante el intercambio de medio.

Un inconveniente de este bioreactor es el procesamiento de grandes volúmenes de sobrenadantes los cuales deben ser centrifugados y concentrados diariamente.

Hasta el presente se han obtenido cantidades considerables de sobrenadantes concentrados del ACM anti-A. Estos sobrenadantes presentan títulos de hemaglutinación adecuada para su utilización directa en la determinación de grupo sanguíneo en bancos de sangre.

En relación a nuestra experiencia de encapsulación en alginato de sodio, consideramos que se ha obtenido una cantidad significativa de anticuerpo a mediana escala. Sin embargo, la producción en batch no ha representado una alternativa tan eficiente como la anterior.

Con respecto a la purificación apirógena de OKT3 por proteína -A Sepharosa, se obtuvo un alto grado de pureza (como puede observarse en los SDS-PAGE) y buen rendimiento.

TAPLA N° 1

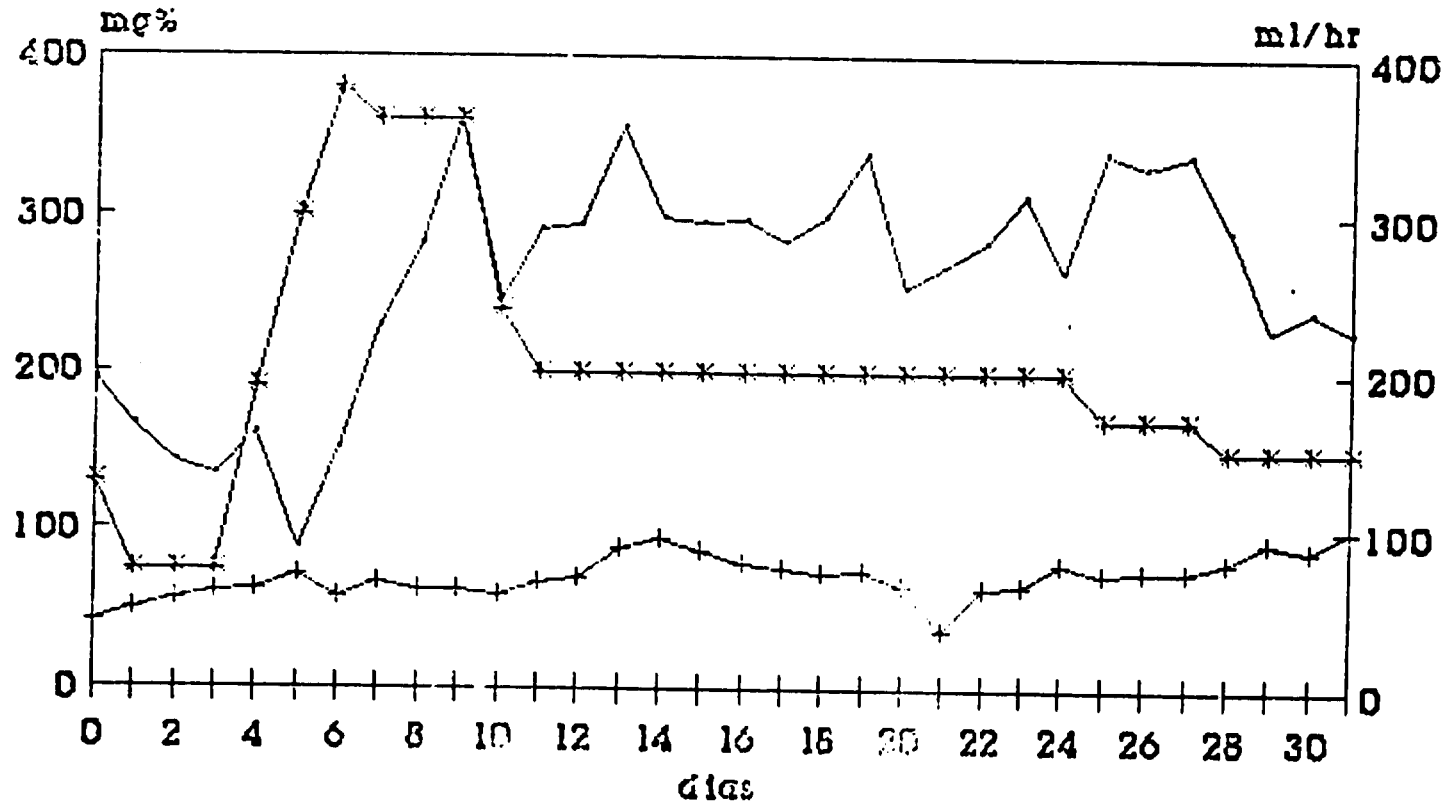
PRODUCCION DEL ANTI-A EN AIR LIFT

<u>DIAS</u>	<u>pH</u>	<u>DO</u>	<u>GLU</u>	<u>LAC</u>	<u>PF</u>	<u>TH</u>	<u>SS</u>
0	7,3	151,6	195,2	42,4	120-150	64	10°
1	7,3	121,9	165,5	49,4	70-80	64	10°
2	7,2	61,4	142,3	54,6	70-80	64	10°
3	7,0-7,2	60,2	134,1	60,7	70-80	64	10°
4	7,0-7,2	66,9	160,9	61,7	180-200	64	10°
5	7,2	41,6	87,8	71,4	280-380	64	10°
6	6,6-7,2	59,7	152,4	57,4	360-380	64	7,5°
7	7,1	40,0	227,7	66,8	380	64	5°
8	6,9-7,2	45,4	281,2	61,7	360	32	5°
9	6,9-7,2	33,7	302,2	62,1	360	64	5°
10	6,5-7,2	16,7	245,7	59,0	360	64	2,5°+2,5*
11	6,6-7,2	19,0	290,8	66,0	240	64	2,5°+2,5*
12	6,8-7,2	14,2	293,3	71,2	200	64	2,5°+2,5*
13	6,7-7,2	23,4	355,1	87,6	200	64	2,5°+2,5*
14	6,7-7,2	23,0	298,0	94,8	200	64	2,5°+2,5*
15	6,8-7,1	18,0	294,5	86,1	200	64	2,5°+2,5*
16	6,7-7,1	12,0	296,0	78,9	200	64	1,5°+3,0*
17	6,8-7,1	9,6	283,0	76,0	200	64	1,5°+3,0*
18	6,9-7,1	17,4	297,5	72,0	200	64	1,0°+4,0*
19	6,7-7,1	5,0	338,5	75,4	200	64	1,0°+4,0*
20	6,7-7,1	20,5	253,0	65,0	200	64	1,0°+4,0*
21	6,7-7,1	25,0	nd	58,4	200	64	1,0°+4,0*
22	nd	nd	282,0	63,0	200	64	5*
23	6,9-7,1	15,0	312,0	64,8	200	64	5*
24	7,1-7,2	20,0	264,2	79,4	200	64	10*
25	7,0	16,8	340,0	73,0	170	128	10*
26	6,7-7,1	10,0	350,2	75,8	170	128	10*
27	6,7-7,1	10,0	338,5	74,4	170	128	10*
28	7,0	20,4	289,8	81,8	150	128	10*
29	6,6-7,1	10,0	227,1	93,4	150	128	10*
30	6,7-7,1	5,0	239,0	88,4	150	128	10*
31	6,7-7,1	10,9	227,0	100,2	150	128	10*
32	7,0	74,6	247,0	nd	150	128	10*
33	6,7-7,1	10,0	227,3	nd	150	128	10*
34	7,0	10,0	208,3	nd	150	128	10*

TABLA N°1 (Referencias)

DO: Oxígeno disuelto (1)  
GLU: Concentración de glucosa (mg/dlt.)  
LAC: Concentración de lactato (mg/dlt.)  
PF: Perforación (ml/hr.)  
TH: Título de hemaglutinación  
1S: Suero (1)  
S°: Suero fetal bovino  
S\*: Suero de caballo

# PRODUCCION DE AcMc ANTI-A EN AIRLIFT CURVA METABOLICA



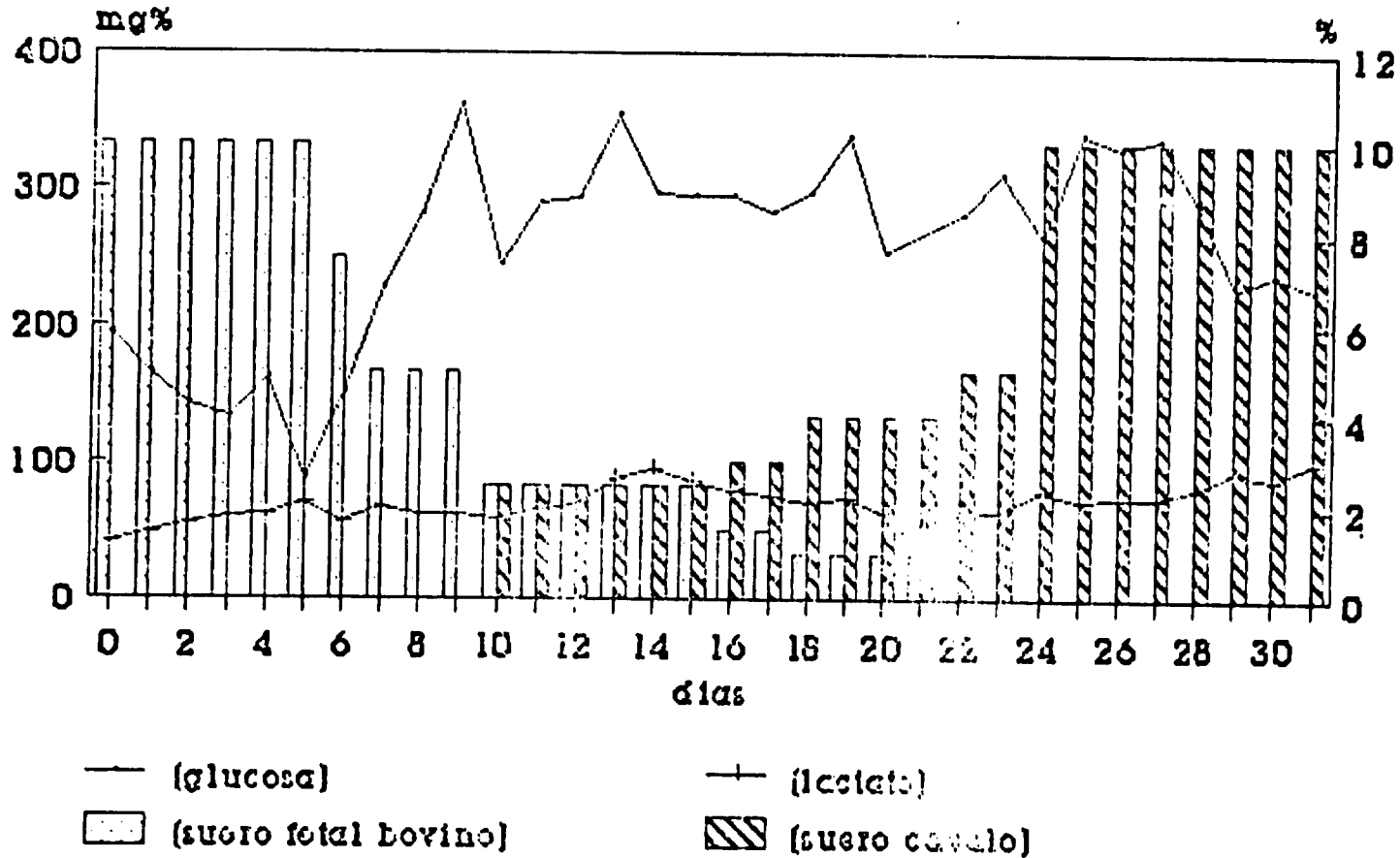
— (glucosa)    + (lactato)    \* perfusion medio

Medio de cultivo: DEF



GRAFICO 1b

# PRODUCCION DE AcMc ANTI-A EN AIRLIFT CURVA METABOLICA

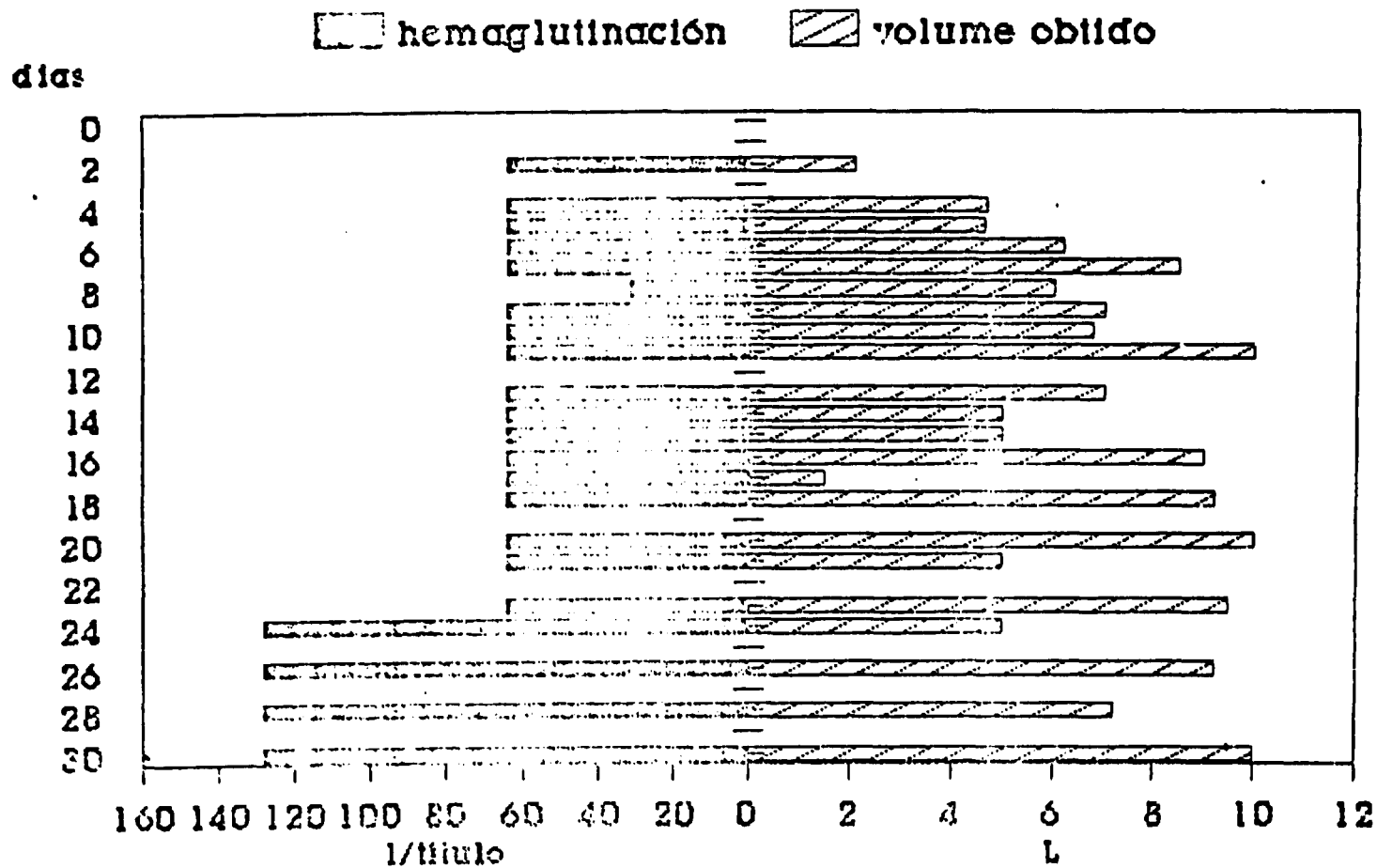


Medio de cultivo: RDF

GRAFICO 1c

# PRODUCCION DE AcMc ANTI-A EN AIRLIFT

hemaglutinación x volumen







Dir 0



Dir ↓



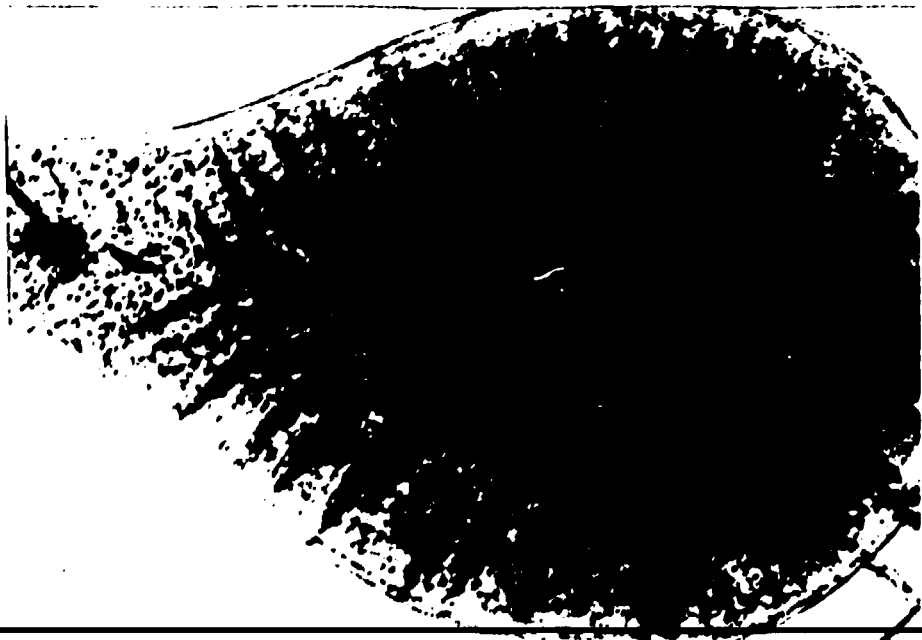
Dir 4



Dis 6



Dis 6



Dis 7

TABLA Nº 2

ENCAPSULACION DEL HIBRIDOMA B2-CL14 EN ALGINATO DE SODIO 1%

<u>DIAS</u>	<u>CG</u>	<u>PL</u>	<u>PH</u>	<u>NC</u>	<u>TH</u>	<u>%SFB</u>	<u>VR</u>	<u>%V</u>
0	0	0	7,5	0,67	0	7,5	0	80,4
1	47	0	7,38	0,76	0	7,5	0	89,1
2	53	0	7,17	2,13	8	7,5	100	82,4
3	74,4	8,6	7,4	1,38	8	7,5	150	68,1
4	29,3	11,2	7,27	3,49	16	7,5	0	74,4
5	100,8	nd	6,87	6,56	16	5,0	200	78,9
6	107,0	34,0	6,79	7,38	16	5,0	200	61,4
7	90,0	29,6	6,89	7,2	16	5,0	200	85,6
8	149,0	38,5	6,85	4,88	16	7,5	200	61,6
9	108,0	29,0	6,95	5,5	16	5,0	300	68,6
10	187,0	nd	6,82	7,25	16	5,0	300	67,9

(Referencias)

CG: Consumo de glucosa (mgr/dlt); PL: Producción de lactato (mgr/dlt); NC: Nº de células por gramo de perlas x 10<sup>6</sup>; TH: Título de hemaglutinación; VR: Volumen de medio retirado (ml) y % V: Porcentaje de viabilidad.

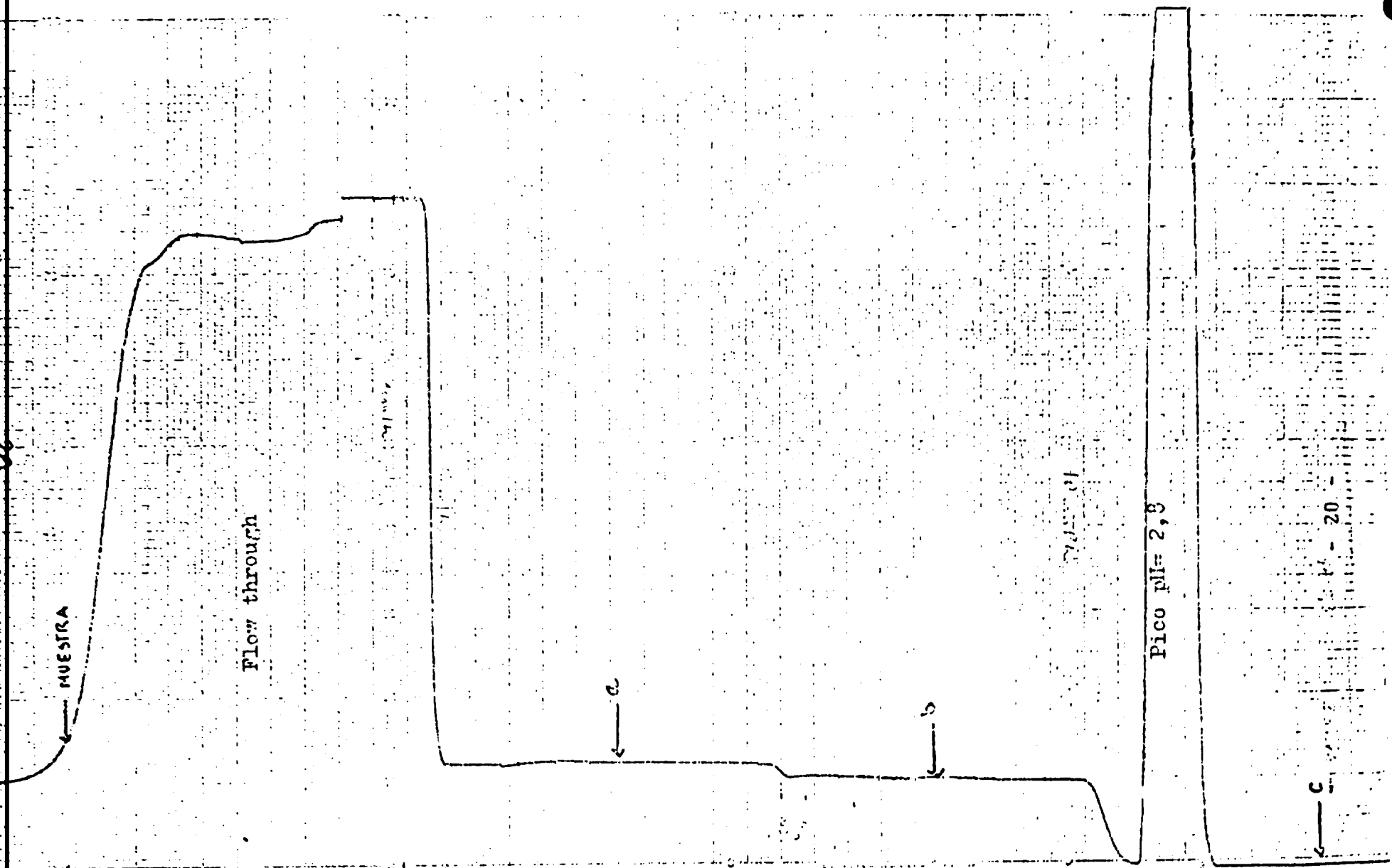
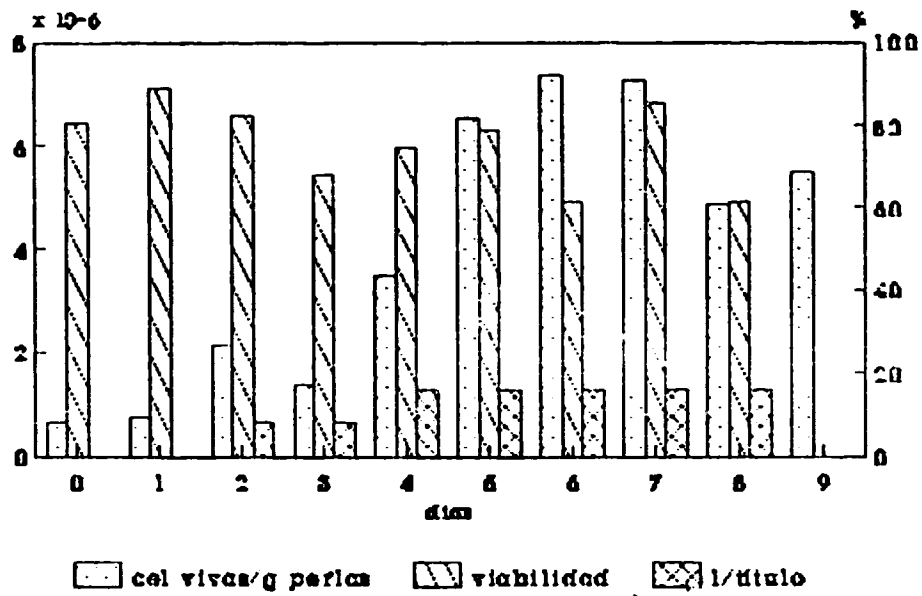
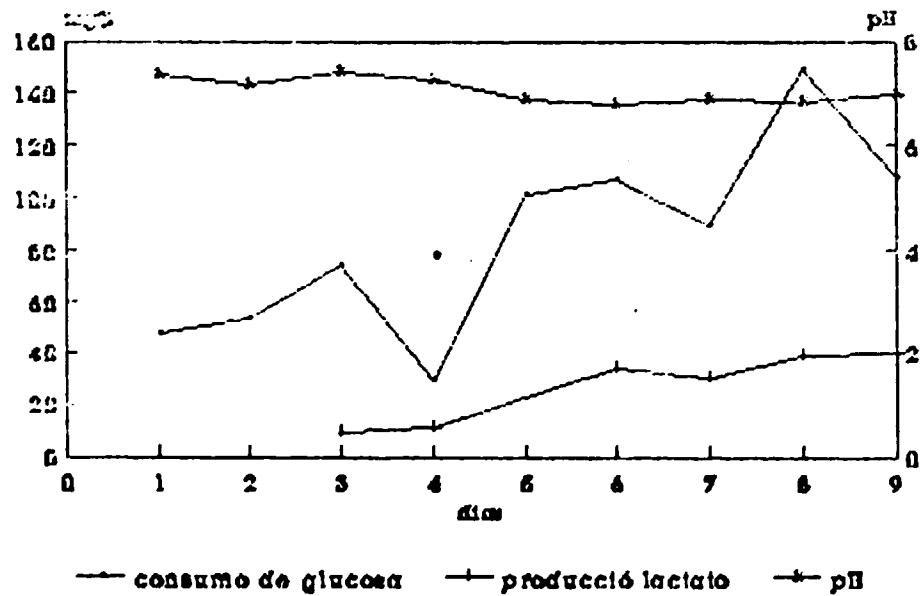


Fig. 2 Cromatograma de la purificación de CH<sub>23</sub>. Volumen de la muestra: 500 ml. Buffer de unión, Tris 0,05M/NaCl 0,15 M, pH=8,6; Buffers de elución: a) Fosfato 0,05 M/NaCl 0,15M, pH= 7; b)Glicina 0,05M/0,15M NaCl, pH=2,8; c) Idem b, pH=2,3 y d) Tris 0,05M/NaCl 1M pH= 8,6. Flujo volumétrico: 0,6 ml/min. Concentración de anticuerpo en el pico pH=2,8: 7 mg/ml.

GRAFICO 2 a - b  
**ENCAPSULACION DEL HIBRIDOMA B2-C114  
 EN ALGINATO DE CALCIO 1%**



Medio de cultivo: DMEM-FC3



Medio de cultivo: DMEM-FC3



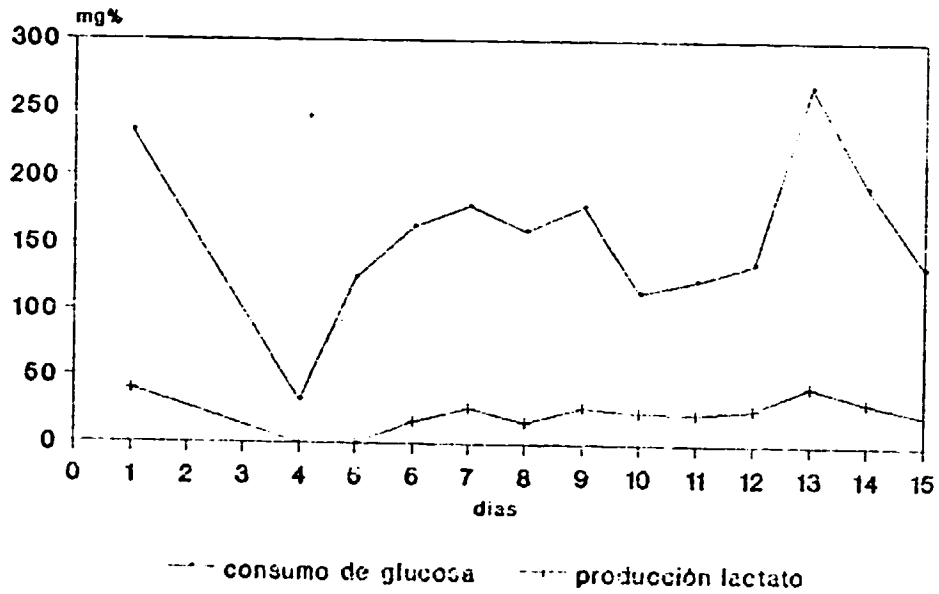
TABLA N° 3

ENCAPSULACION DEL HIBRIDOMA OKT3 EN ALGINATO DE SODIO 1%

<u>DIAS</u>	<u>CG</u>	<u>FL</u>	<u>PH</u>	<u>NC</u>	<u>CA</u>	<u>%SFB</u>	<u>VR</u>	<u>%V</u>
0	0	0	7,8	nd	nd	7,5	0	nd
1	231,7	40,3	7,1	2,06	27	7,5	250	71,8
2	nd	nd	6,9	3,09	32	7,5	250	79,7
3	nd	nd	7,2	1,34	24	7,5	250	77,8
4	32,1	0	7,2	2,7	27	7,5	250	82,3
5	124,9	0	7,0	11,7	36	7,5	250	68,8
6	163,1	10,3	6,8	7,27	44	7,5	300	87,2
7	178,3	26,0	6,8	6,37	65	7,5	300	83,2
8	160,0	15,6	6,91	5,75	62	7,5	300	54,8
9	178,1	26,7	6,84	1,88	78	2,5	300	26,9
10	113,7	24,4	6,97	2,18	78	2,5	300	31,3
11	122,5	22,6	6,9	6,1	54	2,5	200	85,4
12	135,8	23,5	6,9	5,81	71	5,0	370	77,5
13	267,0	45,8	6,8	4,39	57	5,0	250	82,6
14	193,8	31,7	6,9	3,12	68	2,5	250	71,4
15	133,6	23,0	6,9	2,9	79	2,5	300	51,0

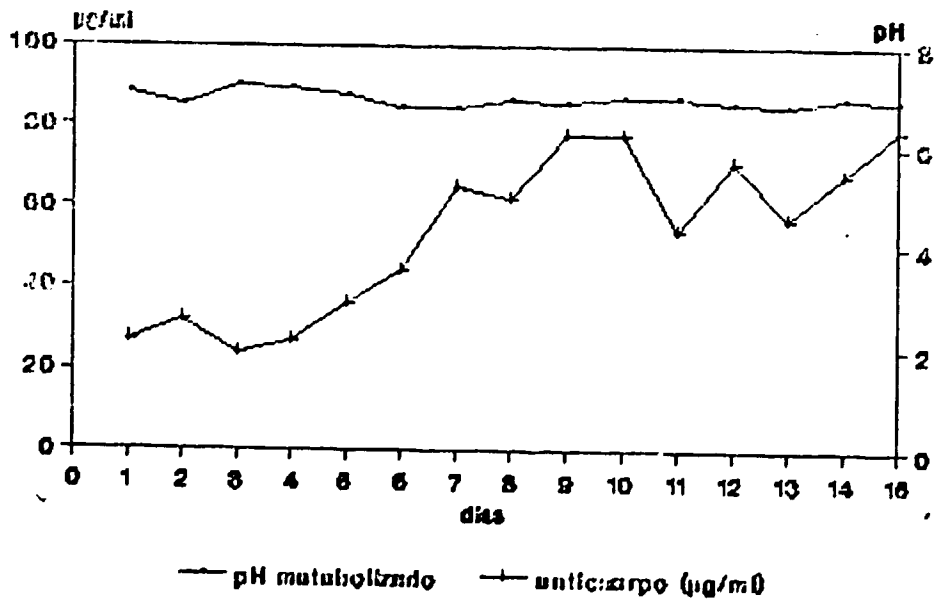
CG: Consumo de glucosa (mg/dlt)  
 FL: Producción de lactato (mg/dlt)  
 NC: N° de células por gr/perlas x10<sup>6</sup>.  
 CA: Concentración de anticuerpo (ug/ml)  
 VR: Volumen de medio retirado (ml)  
 %V: Porcentaje de viabilidad  
 nd: No determinado.

GRAFICO 3a  
**ENCAPSULACION DEL HIBRIDOMA OKT3  
 EN ALGINATO DE CALCIO 1%**



Medio de cultura: DME - FCS

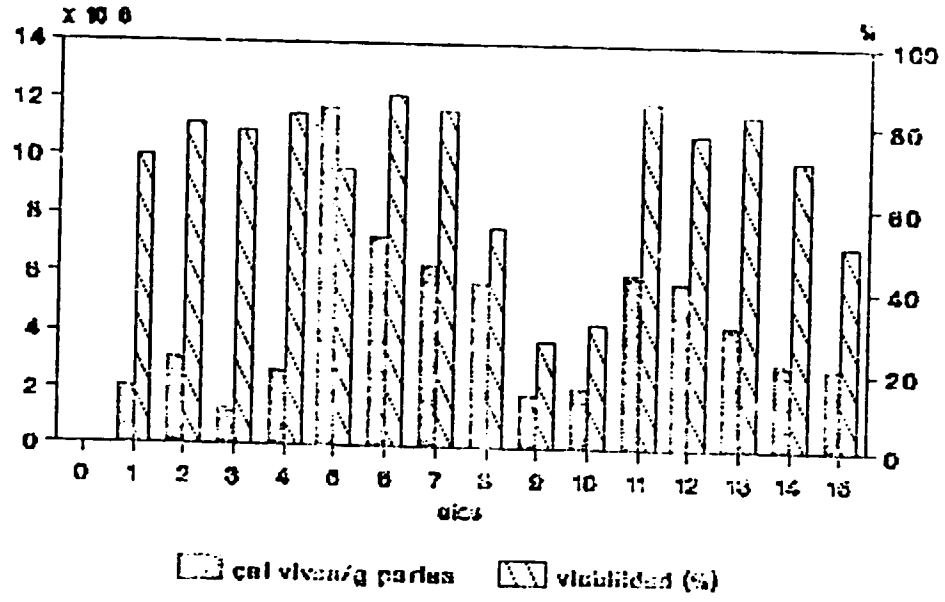
GRAFICO 3b



Medio de cultura: DME - FCS

GRAFICO 3c

### ENCAPSULACION DEL HIBRIDOMA OKT3 EN ALGINATO DE CALCIO 1%



MEDIO DE CULTIVO - F06

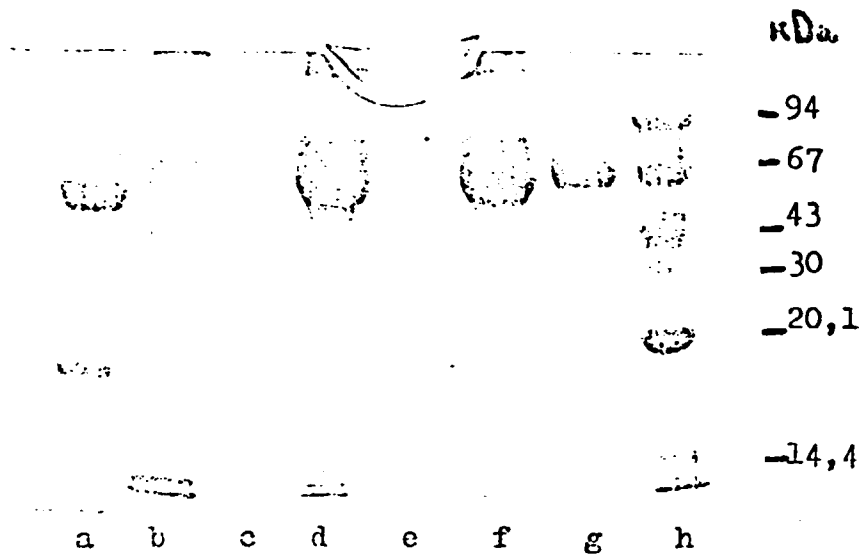


Fig. 3 SDS-PAGE al 12% de las fracciones obtenidas en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue. Los carriles corresponden a:

carril a: Pico a pH= 2,8.

carril b: Muestra a pH= 7,0.

carril c: Flow through 2.

carril d: Flow through 1.

carril e: Ultrafiltrado (sobrante del concentrado).

carril f: Concentrado de los sobrenadantes (Pre-columa).

carril g: Sobrenadante de alginato OKT3 día 9.

carril h: Patrón de peso molecular.

TABLA N° 4  
Spinner de 0,5 lts.

<u>TIEMPO</u> <u>(DIAS)</u>	<u>NC</u>	<u>VIAB</u>	<u>TH</u>
1	0,3*	97,9	nd
2	0,6	97,8	4
3	1,33	95,0	8
4	1,36	84,7	16
5	1,0	80,0	16
6	1,08	78,8	nd
7	0,78	61,6	32
8	0,6	61,5	32
9	0,5	55,0	32
10	0,24	47,9	32
11	0,16	14,0	32

NC: N° de cels/ml ( $\times 10^6$ ).

VIAB: % de viabilidad.

TH: Título de hemaglutinación.

nd: no determinado

\*.- Se partió de una concentración celular de  $3 \times 10^5$  cel/ml en un volumen final de 400 ml. Al tercer día se incrementó el volumen a 500 ml y se adicionó OptiMAb.

TABLA Nº 5  
Spinner de 8 lts.

<u>TIEMPO</u> <u>(DIAS)</u>	<u>NC</u>	<u>VIAB</u>	<u>VOL</u>	<u>TH</u>
1	2,7	90	3	4
2	3,3	94.4	3	4
3	6,7	95	3	8
4	7,0	90.3	5	8
5	4,9	87,6	9	8
6	5,7	80.9	9	8
7	4,0	69.6	9	8-16
8	2,0	52.4	9	16
9	3,4	57	9	16
10	3,3	53.2	9	16
11	2,6	41.4	9	16
12	2,1	41.5	9	16-32
13	2,1	33	9	32

NC: Nº de cels/ml ( $\times 10^5$ )  
 VIAB: % de viabilidad  
 VOL: Volumen final en litros.  
 TH: Título de hemaglutinación.