



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

19326

cep
tablas
progr.
mms

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA
AMERICA LATINA Y EL CARIBE
PNUD/UNESCO/ONUDI
RLA/83/003**

Contrato No. 91/144

**Proyecto: Producción masiva de anticuerpos
monoclonales: un esfuerzo compartido en
América Latina**

Segundo Año de Actividades

País: Uruguay

Informe Técnico Final

INFORME FINAL

PROYECTO DP/RLA/83/003

**"Producción masiva de anticuerpos monoclonales:
Un esfuerzo compartido en Latinoamérica".**

**Prof. Alberto Nieto (M.Sc., Ph.D.)
Cátedra de Inmunología
Facultad de Química
Universidad de la República
Montevideo - URUGUAY**

AGOSTO 1991

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PNUD/UNESCO/ONUDI
PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE**

Introducción

Este informe corresponde a las actividades desarrolladas durante el período Abril 1991 a Agosto 1991 (Mes 7 al Mes 11) de ejecución del proyecto DP/RLA/83/003 (Contrato N° 90/144) que comenzó el 27 de Setiembre de 1990.

Los objetivos a alcanzar en este periodo están especificados en el ítem "Servicios requeridos del Contratista" (ítem 3 de los Términos de Referencia) y su cronograma de ejecución en el "Calendario de actividades" (ítem 4 de los Términos de Referencia).

El presente informe está organizado con el objeto de permitir la evaluación externa del grado de avance en el cumplimiento de las mencionadas actividades. Por esta razón el Cuerpo del informe está subdividido de acuerdo a esas actividades.

Cuerpo

Actividad B

Se adquirió el resto del suero fetal bovino (8/7/91)

Actividad C

C.6 Se adjunta copia (Anexo II) del informe de la pasantía de la Q.F. Baz en el CIGB (1/2/91 - 3/5/91).

Actividad D

Se culminó el procesamiento de los datos experimentales y la elaboración del Informe Técnico Final (Anexo III).

Actividad E

Se realizará la reunión los días 2 y 3 de Setiembre en Sao Paulo a la que asistirá el Prof. Julio Battistoni en representación del responsable del proyecto (Dr. A. Nieto).

Se deja constancia que el aviso al Dr. Quinteros (Coordinador) de la fecha de la reunión nos llegó con menos de 1 mes de anticipación y como no estaba prevista para estas fechas el Dr. Nieto ya tenía adquiridos compromisos imposterables que le harán imposible asistir. Esta información le fué suministrada al Dr. Quinteros por faxes de fechas 7/8/91 y 23/8/91.

Actividad F

F.2 Se envía este informe con fecha 30 de Agosto de 1991 para ser entregado al Dr. Quinteros en la reunión de Sao Paulo.

Sección Final

En este período se ha completado exitosamente el entrenamiento de la becaria Q.F. Adriana Baz en el CIGB en La Habana, quien, junto al Lic. Hernán Carol que fuera previamente serán los responsables de transferir la tecnología al laboratorio de producción masiva que, como explicamos en el informe final del año pasado, funcionará en nuestra Cátedra para preparar OKT3 para ser usado en la inmunosupresión del rechazo agudo de transplantes renales en Uruguay ahorrándole al sistema sanitario público uruguayo un 70 % del costo de ese tratamiento.

En ese sentido se avanzó en dos áreas :

- a) Se está construyendo en nuestra Cátedra (finalización prevista de la obra Octubre 1991) un laboratorio de cultivos celulares de 80 m2 con un área de 7 m2 específicamente acondicionada para la instalación del bioreactor y otros equipamientos involucrados en la producción masiva de monoclonales.
El Lic. Leonardo Matteo (M.Sc.), becario del proyecto ha colaborado con el responsable de la obra Arq. U. Torrado en los detalles de diseño de esta área que dispondrá de un sistema centralizado de tratamiento y filtrado de aire de clase 100/Federal Standard 209 B.
- b) Se seleccionó al Q.F. Gualberto González, que es un Químico Farmacéutico con experiencia en el área industrial de producción de material estéril de uso biológico, para hacerse responsable de la puesta en marcha de esa Unidad.
El Q.F. González fué entrenado en nuestra Cátedra durante 6 meses en técnicas básicas de preparación de hibridomas y purificación de anticuerpos monoclonales con la participación activa de los becarios del proyecto. A posteriori se hicieron con éxito gestiones para que el Q.F. González vaya a hacer una estadía de entrenamiento de 6 meses en tecnología de anticuerpos monoclonales al Departamento de Inmunología del Biomedical Center de la Universidad de Uppsala (Suecia) bajo la dirección del Dr. S.O. Gronvik.
Al retorno al Uruguay del Q.F. González estará instalado el laboratorio y esperamos contar con la financiación necesaria para la adquisición del biorreactor para comenzar la ejecución del proyecto de producción de OKT3.

Concluyendo, se valora que el proyecto ha permitido entrenar científicos en esta área de la biotecnología y que con el esfuerzo adicional de la Universidad Uruguay se han puesto ya en marcha acciones que aseguren la continuidad del esfuerzo comenzado con este proyecto.

Anexo I

Informe Financiero

El saldo en el proyecto a la fecha de entrega del informe del Primer Semestre era de U\$ 217,50.

Los gastos en el Segundo Semestre fueron los siguientes:

Materiales y Suministros

| | |
|--|---------|
| Suero fetal bovino (Factura: Oscar Alberto Pellado S.A : 8/7/91) | U\$ 480 |
|--|---------|

Gastos de Comunicaciones

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| Faxes (4.66 minutos a U\$ 4.9/min.) | U\$ 22,80 |
| Teléfono (4 " " " " ") | U\$ 19,60 |

Total gastado en este semestre U\$ 522.40 lo que representa haber gastado U\$ 304,90 más que lo disponible. Este exceso de gasto se ha adelantado de otros fondos para ser devuelto con cargo a los U\$ 1600 que llegarán luego de la aprobación de este informe final.

Oscar Alberto Pellado S.A.
 IMPORTACION - EXPORTACION

BUENOS AIRES Julio 8 de 1991

SEÑOR/ES Facultad de Química

DOMICILIO Cátedra de Inmunología - Dr. Alberto Nieto

GANAN: 6690/1-10/2
 IVA: NO RESPONSABLE
 INC. BRUTO: 676144-01
 JUBILACIONES: 14-2510

NOTA DE DEBITO

NOTA DE CREDITO

FACTURA N° 0271

| CANT. | DESCRIPCION | PRECIO UNIT. | PRECIO TOTAL |
|---|--|---------------|---------------|
| 4 | (CUATRO) Frascos de 500 ML. c/u, conteniendo SUERO FETAL BOVINO ESTERIL CERTIFICADO (BIOSER), pertenecientes al lote control 890.511. Total : 2 Litros.- | U\$S 120.- | U\$S 480.- |
| | TOTAL : | | 480.- |
| | SON DOLARES ESTADOUNIDENSES : CUATROCIENTOS OCHENTA.- | | |
| CONDICIONES DE PAGO: CONTADO CONTRA ENTREGA | | | U\$S 480.- |

Informe confirmación transmisión

Nu. : 004
Receptor : 005255311151
Transmisor : INMUNOLOGIA-URUGUAY
Fecha : May 20.91 12:47
Hora : 00'48
Modo : Norm.
Pgs. : 01
Result. : OK

*Escuela
a
Quintero*

Informe confirmación transmisión

Nu. : 004
Receptor : 005255311151
Transmisor : INMUNOLOGIA-URUGUAY
Fecha : May 13.91 12:43
Hora : 01'46
Modo : Norm.
Pgs. : 01
Result. : OK

*Escuela
a
Quintero - Mexico*

Informe confirmación transmisión

Nu. : 007
Receptor : 005255311151
Transmisor : INMUNOLOGIA-URUGUAY
Fecha : May 10.91 15:43
Hora : 01'08
Modo : Norm.
Pgs. : 01
Result. : OK

*Escuela
a*

Informe confirmación transmisión

Nu. : 002
Receptor : 005255311151
Transmisor : INMUNOLOGIA-URUGUAY
Fecha : Ago 07.91 11:33
Hora : 00'50
Modo : Norm.
Pgs. : 01
Result. : OK

Quintero

Informe confirmación transmisión

Nu. : 005
Receptor : 005255311151
Transmisor : INMUNOLOGIA-URUGUAY
Fecha : Ago 23.91 18:43
Hora : 01'14
Modo : Norm.
Pgs. : 01
Result. : OK

Quintero

Anexo II

PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:

"UN ESFUERZO COMPARTIDO EN AMERICA LATINA"

INFORME TECNICO:

"PRODUCCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL OKT3"

Q.F. ADRIANA BAZ (Montevideo, URUGUAY)

Lic. MONIKA MERINO (Guayaquil, ECUADOR)

A) CULTIVO DEL HIBRIDOMA OKT3

I- Estacionario

El hibridoma OKT3 fue cultivado en Cátedra de Inmunología (Facultad de Química, Montevideo, Uruguay) en IMDM (Sigma, USA) + 20 % suero fetal (Bioser, Argentina) a 37°C y 5% CO₂, en cultivo estacionario, a partir del cual 20 millones de células viables fueron transportadas a la División Hibridomas y Modelos Animales (CIGB, La Habana, Cuba).

Debido a que el medio seleccionado para la realización del trabajo fue DMEM (Gibco) se procedió a la adaptación del hibridoma al mismo. El proceso de adaptación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente esquema:

Se sembraron dos frascos de cultivo con una concentración de células de 200.000 células/ml (C/ml), manteniéndose la concentración en este valor durante 9 días. En el día 9 se determinó % de viabilidad en ambos frascos, por exclusión con trypan blue.

| Frasco | Tiempo (días) | | | | |
|--------|---------------|-------|-------|--------|--------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 |
| 1 | A 90% | A 80% | A 50% | A 30 | -- |
| | B 10% | B 20% | B 50% | B 70% | B 100% |
| 2 | A 90% | A 80% | A 50% | A 30 % | -- |
| | C 10% | C 20% | C 50% | C 30% | C 100% |

A: IMDM + 20 % Suero fetal (medio original)

B: DMEM + 20 % Suero de ternera (ST) (Cubavet)

C: DMEM + 20 % Suero de ternera + 3 % HECS (CIB)

El % de viabilidad en ambos frascos fue superior a 90 %, por lo que se consideró que la adaptación de la línea había sido satisfactoria y que podía prescindirse de la adición de HECS al medio de cultivo. Posteriormente se redujo en forma gradual el % de ST.

Las condiciones de cultivo para el desarrollo de todo el plan de trabajo descrito en Introducción (salvo que se especifiquen otras condiciones) fueron las siguientes:

DMEM + 10 % ST + penicilina (100 UI/ml) + estreptomina (50 µg/ml) + glutamina (2 mM) + piruvato (1 mM), 37°C y 5 % CO₂.

A partir de células provenientes de cultivo estacionario se procedió a:

i- formación de un banco celular a - 70°C.

Con el fin de tener una reserva de la línea se congelaron células provenientes de cultivo estacionario y cuya viabilidad no fuera inferior a 85 %. Luego de centrifugar las células a 900 rpm, durante 10 minutos, el pellet se suspendió en DMEM + 20 % ST + 9 % DMSO (Fluka), a una concentración de 3-10 millones C/ml. Se congeló a - 70°C.

ii- inoculación en ratones Balb/c

Con el objetivo de eliminar una posible contaminación con Mycoplasma y determinar el rendimiento de producción de anticuerpo monoclonal en ascitis se inoculó el hibridoma en ratones Balb/c de acuerdo a los siguientes protocolos:

P I:

- Día 0- sensibilización intraperitoneal de 10 ratones Balb/c (♂) de 9-10 semanas de edad y 24 g de peso, con 0.5 ml de aceite mineral.
- Día 6- inoculación intraperitoneal con 3 millones de células/animal en DMEM + penicilina + estreptomycin (SL).
- Día 12- no se observó producción de ascitis en ningún animal.

P II:

- Día 0- sensibilización intraperitoneal, de 10 ratones Balb/c (♂) de 9-10 semanas de edad y 24 g de peso, con 0.5 ml de aceite mineral.
- Día 10- inoculación intraperitoneal de 5 animales con 4 millones de células/animal en SL y 5 animales con 5 millones de células/animal en SL.
- Día 15- no se observó producción de ascitis en ningún animal.

P III:

- Día 0- sensibilización intraperitoneal, de 10 ratones Balb/c (♂) de 9-10 semanas de edad y aproximadamente 24 g de peso con 0.5 ml de aceite mineral.
- Día 10- inoculación intraperitoneal con 10 millones de células/animal, en SL.
- Día 15- no se observó producción de ascitis en ningún animal.

iii- test de presencia de Mycoplasma

Para la detección de presencia de Mycoplasma se partió de células previamente cultivadas en medio sin antibiótico durante 8

días. El análisis fue realizado por personal del Centro de Salud Animal (CENSA) mediante proceso de hibridización con sondas comprobándose ausencia de Mycoplasma en la línea celular OKT3.

II- Cultivo en suspensión

Se estudió el comportamiento del hibridoma en cultivo en suspensión y encapsulado en alginato como posibles sistemas para la preparación del inóculo para el biorreactor.

Primeramente se realizó un cultivo del hibridoma en frasco spinner, sembrándose en una concentración inicial de 200.000 C/ml en un volumen de 300 ml de medio de cultivo. Cada 48 horas se determinó concentración de inmunoglobulinas (Igs) por ELISA, consumo de glucosa (Test Glucosa HK, Sigma), concentración de células y % de viabilidad, obteniéndose los siguientes resultados:

-Cultivo en suspensión-

| Tiempo (días) | Conc. celular (C/ml) (*) | Viabilidad % | Conc. Igs (µg/ml) | CG (mg/día) |
|---------------|--------------------------|--------------|-------------------|-------------|
| 0 | 0.20 | 98 | -- | -- |
| 2 | 0.25 | 51 | 25 | 1.6 |
| 4 | 1.20 | 53 | 19 | 0.7 |
| 6 | 1.10 | 48 | 23 | 0.6 |

(*)- expresada en millones/ml.

Posteriormente se cultivó el hibridoma encapsulado en alginato. La encapsulación se realizó con alginato 1.6 % (Bellco) a una concentración de 1 millón de C/ml de 1 millón de C/ml.

Las perlas así formadas se suspendieron en 170 ml de medio de cultivo, en spinner de 250 ml. Cada 48 horas se determinó concentración de inmunoglobulinas, consumo de glucosa, concentración de células y % de viabilidad. En este sistema se obtuvo:

-Cultivo en perlas de alginato-

| Tiempo (días) | Conc. celular (C/ml alg.) (*) | Viabilidad % | Conc. Igs (µg/ml) | CG (mg/día) |
|---------------|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------|
| 0 | 1.2 | 90 | -- | -- |
| 2 | 1.3 | 57 | 30 | 1.1 |
| 4 | 2.3 | 27 | 35 | 1.6 |
| 6 | 2.1 | 25 | 28 | 1.6 |

(*) expresada en millones/ml

-ELISA para determinación de concentración de Igs.

Se sensibilizaron placas de microtitulación (Titertek) con anti-Ig de ratón obtenida en conejo, durante 3 horas a 37°C. Se bloqueó con PBS-leche 2 % por 1 hora a 37°C. Luego de lavar con PBS-Tween 0.05 % (PBS-T), se sembraron 100 µl/pocillo de diluciones de las muestras en PBS-Tween 0.05 %-leche 2 % (PBS-T-L), incubándose por 3 horas a 37°C. Posteriormente se lavó con PBS-T y se agregó 100 µl/pocillo de una dilución adecuada de anti-Ig ratón conjugadas a peroxidasa, en PBS-T-L. Luego de incubar con el conjugado por 1 hora a 37°C, se agregó 100 µl/pocillo de sustrato para peroxidasa (OPD) y se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2N. Se leyó la densidad óptica a 492 nm en un lector de ELISA (Titertek Multiskan). La concentración de Igs en las muestras se expresaron referidas a una solución de IgG de ratón de concentración conocida tomada como estándar.

B) ESTUDIO DE LOS PARAMETROS METABOLICOS DEL HIBRIDOMA EN CULTIVO ESTACIONARIO

Debido a que las características metabólicas de la línea en las fases de crecimiento y producción deben determinarse para permitir un mejor control del proceso de producción en biorreactor, se siguió el esquema:

- se sembraron 16 frascos de cultivo con una concentración inicial de 100000 C/ml incubándose a 37°C y 5 % CO₂ durante 8 días. Los parámetros determinados, diariamente y por duplicado, fueron viabilidad, consumo de glucosa, pH y concentración de inmunoglobulinas. Los resultados se muestran en la Figura 1.

C) PRODUCCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL OKT3 EN BIORREACTOR DE FIBRA HUECA

I) Descripción breve del equipo:

Se utilizó un biorreactor Acusyst-R (Endotronics), el cual consta de un cartucho de fibras huecas que definen dos compartimentos, el espacio intracapilar (EIC) y el extracapilar (EEC). Las células crecen en EEC y en este queda retenido el anticuerpo monoclonal que secretan ya que las fibras tienen un cut-off de 10.000 D. Se produce de esta forma un libre pasaje de metabolitos y nutrientes entre un espacio y otro, exceptuando aquellas moléculas de peso molecular mayor de 10.000. El equipo posee, además, un reservorio de medio conectado, por un lado a la

bomba de medio (BM) , la cual controla la entrada de medio fresco al EIC y salida de medio circulante (metabolitos), y por otro lado a la bomba de circulación (BC) que controla el suministro de oxígeno al cultivo. El cambio en el sentido de circulación de medio por el EIC es otro parámetro posible de ser controlado seleccionando el tiempo de ciclaje (CT) en el sistema. Al reservorio se inyecta aire mezclado con CO₂, el % de este en la mezcla puede controlarse con el nivel del rotámetro del equipo. Este % es utilizado para mantener el pH del cultivo en el valor deseado.

El cartucho está conectado también a la bomba de factor (BF) que controla simultáneamente la entrada de medio al EEC así como la velocidad de salida de la cosecha.

En resumen, seleccionando las velocidades de circulación por las tres bombas se controla, suministro de nutrientes y oxígeno, salida de metabolitos y cosecha de anticuerpo secretado.

Existen salidas de donde pueden extraerse muestras del medio IC y EC. El muestreo de IC se utiliza para determinar los niveles de glucosa y el pH en el medio circulante (debe realizarse diariamente), mientras que las muestras del EC permiten estimar el estado de las células en el cartucho (viabilidad, células en división, etc).

NOTA: en este proceso con el fin de asegurar al máximo la esterilidad del sistema se intercalaron filtros de fibra h₂O₂ de 0.22 μ (Media-Kap), entre los frascos de alimentación de IC y EC y el biorreactor. Además todas las operaciones de cambio de medios y extracciones de muestras se realizaron en flujo laminar.

II) Operaciones previa inoculación y durante el proceso de producción

- 1- Cultivo de las células en medio sin antibiótico 24 horas antes de su inoculación.
- 2- Lavado del espacio IC con la finalidad de eliminar el glicerol que cubre las fibras el cual es citotóxico.
- 3- Tratamiento del EC con medio suplementado con suero, este proceso prepara el sistema para la inoculación proporcionando a las células los factores de adhesión presentes en el suero.
- 4- Test de citotoxicidad: permite determinar si el medio circulante en el sistema tiene alguna acción citotóxica. Se extrajeron 10 ml de medio del espacio IC en los cuales se sembraron 2 millones de células. Se realizó, en paralelo un control con medio del mismo lote. Los cultivos se observaron cada 24 horas para la detección de alguna actividad

citotóxica, durante 72 horas.

Test de esterilidad: este ensayo permite determinar si se ha contaminado el sistema en las operaciones previas a la inoculación. Se llevó a cabo simultáneamente al anterior. Se extrajeron 10 ml de medio del espacio IC y se incubaron a 37°C por 72 horas. Se realizó, en paralelo un control con medio del mismo lote. La presencia de contaminación se analizó por observación microscópica.

5- "Set-up" del equipo.

Las condiciones iniciales del equipo fueron:

| | |
|---------|------------|
| BM | 20 ml/h |
| BC | 100 ml/min |
| BF | 3 ml/h |
| T | 37 °C |
| Ciclaje | 0 min |

Con estos parámetros fijos se ajustó el rotámetro a un nivel tal que el pH inicial fuera estable y de 7.3. Luego de estabilizado y previo a la inoculación se fijó la BF en 0.

6- Preparación del inóculo

Durante los días previos a la inoculación se siguió un estricto control del cultivo estacionario, determinándose diariamente concentración celular y viabilidad en cada frasco de cultivo. El valor de concentración celular se mantuvo mediante expansión del cultivo entre 200.000-300.000 C/ml, ya que en este rango las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial.

Un día antes de la inoculación las células se cultivaron en medio sin antibiótico, y por % viabilidad se seleccionaron 14 frascos de cultivo que contenían 30-40 millones de células/frasco y viabilidad de 85-99 %.

Antes de la inoculación y luego del setup del equipo las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. El pellet se resuspendió en 100 ml de medio EC determinándose número de células y viabilidad. Se volvió a centrifugar a 1000 rpm durante 10 min y el pellet se resuspendió en 35 ml de medio EC.

El inóculo obtenido consistió en 500 millones de células y 94 % de viabilidad.

7- Inoculación

Con la BF en 0, se cerró la conexión entre el biorreactor y la línea de cosecha. La suspensión celular (35 ml) se transfirió a una jeringa de 50 ml y se inoculó al espacio EC, seguido de la inyección de 10 ml de medio EC. El proceso de inoculación se realizó en 15 min. El pH se controló 2 h post-inoculación siendo de 7.3.

- 5- Extracción diaria de muestras de IC, determinación del consumo de glucosa y medida de pH.
- 6- Extracción periódica de muestras de EC en función de los parámetros anteriores, crecimiento celular, concentración de inmunoglobulinas (Igs) en las cosechas, etc.
- 7- Cambio de frascos, de alimentación y deshecho de medio IC y de alimentación de EC y cosecha, según indican las Tablas 2 y 3 respectivamente.
- 8- Tratamiento de las cosechas: Se centrifugaron a 3000 rpm, por 10 minutos, el pellet se resuspendió en medio de cultivo y observó microscópicamente para determinar viabilidad celular, presencia de células en división, contaminación, etc. Las cosechas se conservaron a -20°C hasta su purificación, en todas se determinó concentración de inmunoglobulinas murinas (ELISA).

III) Medios de cultivo utilizados:

Medio IC: DMEM + glutamina (2 mM)/piruvato (1 mM) + penicilina (100 UI/ml)/estreptomicina (50 $\mu\text{g/ml}$)

Medio EC: DMEM + 10 % ST + glutamina (2 mM)/piruvato (1 mM) + penicilina (100 UI/ml)/estreptomicina (50 $\mu\text{g/ml}$).

En la Tabla 3 se especifican otros componentes que se adicionaron a estos medios y en qué momento del proceso.

IV) Esquema seguido para inoculación:

- Día - 2: ensamblado del biorreactor, esterilización e instalación. Lavado del espacio IC durante 24 horas.
- Día - 1: tratamiento del espacio EC con suero. Muestreo para test de citotoxicidad y esterilidad. Cultivo de las células en ausencia de antibiótico.
- Día 0: inoculación, selección de nivel de rotámetro hasta estabilización del pH en 7.3.

9

| TIEMPO (días) | PROCESO | PARAMETROS BIORREACTOR | | | |
|------------------|--|------------------------|----------------|--------------|-----|
| | | BM (ml/h) | BC (ml/min) | BF (ml/h) | pH |
| - 2 | ensamblado esterilización lavado IC | 400 | 500 | 50 | -- |
| - 1 | tratamiento EC test citotoxicidad esterilidad | 20 | 100 | 50 | 7.3 |
| - 0 | inoculación | | | | |

V) CONTROL DEL PROCESO Y RESULTADOS

El proceso se controló mediante la extracción diaria de muestras del espacio intracapilar para determinación de consumo de glucosa y pH. Cada 48-72 horas se extrajeron muestras del espacio extracapilar.

Al día 5 post-inoculación se comenzó la circulación de factor por el espacio extracapilar y por lo tanto la cosecha.

En la Tabla 1 se muestra la estrategia de control y los parámetros determinados a lo largo de todo el proceso de producción en el biorreactor.

La Tabla 2 detalla el tiempo de recolección de las cosechas, el volumen y concentración de inmunoglobulinas de las mismas.

La Tabla 3 resume las operaciones y observaciones realizadas durante el proceso.

La observación periódica del cartucho y la toma de muestras del espacio extracapilar permitieron estimar, junto con los parámetros medidos la evolución del cultivo. Durante los primeros 5 días se pudo visualizar una considerable velocidad en el crecimiento del híbrido. El día 3 post-inoculación se efectuó una extracción de muestra del espacio extracapilar, observándose gran número de células de aspecto viable así como también numerosas células en proceso de división.

A partir del día 7 se observó una detención en el crecimiento celular. La extracción EEC realizada en el día 9 no mostraba una cantidad significativa de células viables.

El día 12 se adicionó HECS al medio extracapilar, y se detectó una posible contaminación en el EEC, y por lo tanto se realizaron extracciones del espacio extracapilar cada 48-72 horas.

Se confirmó contaminación bacteriana el día 19 en el EC, aumentándose al doble la concentración de Pen-Estr. en el medio IC, y adicionándole Kanamicina (100 µg/ml). El tratamiento con Kanamicina se continuó por 72 horas.

La observación de las cosechas tratadas como se describe anteriormente demostró:

La cosecha 2 presentaba mayor cantidad de células muertas que la 1, en cambio en la cosecha 4 se volvió a encontrar un alto número de células de aspecto viable.

La cosecha No 11 fue la primera con una turbidez considerable, el pellet obtenido luego de su tratamiento se resuspendió en medio de cultivo y se incubó a 37°C por 24 horas. Pudo comprobarse una contaminación por bacterias en esta cosecha.

Las cosechas siguientes presentaban todas una ligera turbidez.

En el pellet obtenido a partir de la cosecha 15 se observó gran cantidad de células no viables y bacterias.

TABLA 1

| TIEMPO (dias) | BM (ml/hr) | BF (ml/hr) | BC (ml/min) | TC (min) | pH | R | CG (mg/hr) |
|------------------|---------------|---------------|----------------|-------------|-----|----|---------------|
| 0 | 20 | 0 | 100 | 0 | 7.3 | 28 | -- |
| 1 | 20 | 0 | 100 | 0 | 7.4 | 28 | 61 |
| 2 | 20 | 0 | 100 | 0 | 7.5 | 20 | 40 |
| 3 | 20 | 0 | 100 | 0 | 7.5 | 19 | 46 |
| 4 | 30 | 0 | 100 | 0 | 7.5 | 19 | 83 |
| 5 | 30 | 1 | 100 | 0 | 7.4 | 19 | 72 |
| 6 | 30 | 1 | 100 | 0 | 7.5 | 19 | 67 |
| 7 | 150 | 3 | 200 | 720 | 7.5 | 19 | 72 |
| 8 | 200 | 2 | 400 | 720 | 7.5 | 23 | 64 |
| 9 | 200 | 2 | 300 | 720 | 7.4 | 28 | 70 |
| 10 | 200 | 2 | 300 | 300 | 7.5 | 28 | 60 |
| 11 | 200 | 2 | 300 | 300 | 7.3 | 28 | 250 |
| 12 | 200 | 4 | 400 | 300 | 7.3 | 28 | 108 |
| 13 | 200 | 4 | 400 | 150 | 7.4 | 28 | 116 |
| 14 | 250 | 4 | 400 | 150 | 7.4 | 28 | 99 |
| 15 | 250 | 4 | 400 | 100 | 7.4 | 28 | 64 |
| 16 | 250 | 4 | 400 | 100 | 7.5 | 28 | 136 |
| 17 | 300 | 4 | 400 | 60 | 7.3 | 28 | 87 |
| 18 | 300 | 4 | 400 | 60 | 7.4 | 28 | 106 |
| 19 | 300 | 6 | 400 | 60 | 7.5 | 28 | 119 |
| 20 | 350 | 6 | 400 | 60 | 7.4 | 28 | 82 |
| 21 | 400 | 6 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 240 |
| 22 | 400 | 6 | 500 | 12 | 7.4 | 28 | 260 |
| 23 | 400 | 6 | 500 | 12 | 7.4 | 28 | 320 |
| 24 | 400 | 6 | 500 | 12 | 7.4 | 28 | 600 |
| 25 | 400 | 6 | 500 | 12 | --- | 28 | 420 |
| 26 | 400 | 8 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | --- |
| 27 | 400 | 8 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 440 |
| 28 | 400 | 8 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 240 |
| 29 | 400 | 8 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 200 |
| 30 | 400 | 8 | 500 | 12 | 7.4 | 28 | 240 |
| 31 | 400 | 3 | 500 | 12 | 7.2 | 28 | 280 |
| 32 | 400 | 3 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 300 |
| 33 | 400 | 3 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 190 |
| 34 | 400 | 3 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 120 |
| 35 | 400 | 3 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 270 |
| 36 | 400 | 3 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 100 |
| 37 | 400 | 3 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 150 |
| 38 | 400 | 3 | 500 | 12 | 7.3 | 28 | 150 |
| 39 | 400 | 3 | 500 | 12 | --- | 28 | --- |
| 40 | | | | | | | |

Fin del Proceso

BM: bomba de medio
 BC: bomba de circulación
 BF: bomba de factor

CT: tiempo de ciclaje
 R: nivel de rotámetro
 CG: consumo de glucosa

TABLA 2

| Tiempo (días) | cosecha No | Volumen (ml) (*) | Concentración Igs ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------|------------|------------------|--|
| 8 | 1 | 100 | 235 |
| 10 | 2 | 200 | 60 |
| 12 | 3 | 200 | 100 |
| 14 | 4 | 200 | 52 |
| 16 | 5 | 200 | 42 |
| 19 | 6 | 250 | 73 |
| 20 | 7 | 100 | 41 |
| 22 | 8 | 400 | 63 |
| 24 | 9 | 400 | 120 |
| 26 | 10 | 400 | 33 |
| 27 | 11 | 200 | 38 |
| 28 | 12 | 200 | — |
| 29 | 13 | 200 | 41 |
| 30 | 14 | 180 | 57 |
| 33 | 15 | 180 | 100 |
| 35 | 16 | 200 | 74 |
| 37 | 17 | 200 | 98 |
| 39 | 18 | 500 | 45 |
| 40 | 19 | 150 | 40 |

(*) En algunas cosechas el volumen excede al que debería haberse cosechado de acuerdo a la velocidad en la BF, esto se debió a que se mantuvo parcialmente la misma en valores mayores que los indicados en la Tabla 1 en general luego del cambio de filtros.

TABLA 3

| Tiempo (días) | Operaciones y Observaciones realizadas durante el proceso |
|------------------|--|
| 6 | Taponamiento de filtro de medio EEC.- |
| 7 | Taponamiento de filtro de medio EIC |
| 12 | Adición 3 % HECS a medio EEC. |
| 19 | Adición Kanamicina y duplicación [pen-estr] al medio EIC. |
| 20 | Idem anterior. |
| 21 | Idem anterior. |
| 23 | Adición 3 % HECS a medio EEC. |
| 26 | Formación cristales en conexión de entrada al EEC del cartucho. Taponamiento de filtro de medio EEC. |
| 30 | Adición 3 % HECS a medio EEC. |
| 35 | Idem anterior. |
| 38 | Formación cristales idem día 26. |
| 40 | Desconexión del biorreactor. |

D) PURIFICACION Y CONTROL DEL ANTICUERPO MONOCLONAL OBTENIDO

I) Técnicas usadas en el control del anticuerpo OKT3:

- * Determinación de concentración de proteínas totales por Lowry.
- * Determinación de concentración de Igs murinas por ELISA.
- * Determinación del nivel de pureza por SDS-PAGE y densitometría.
- * Determinación de especificidad por IFI.
- * Determinación de presencia de ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa.
- * Determinación de concentración de Proteína A (ELISA).
- * IFI

Como células CD3+ se utilizaron ya sea linfocitos humanos periféricos separados de sangre fresca por gradiente de Ficoll (Pharmacia), ya sea líneas celulares T (Molt-4, Jurkat, provenientes del Centro de Investigaciones Biológicas).

La técnica se realizó en microplacas de 96 pocillos. Se incubó por 30 minutos a 4°C, 50 µl/pocillo de las muestras a ensayar con 500.000 células/pocillo. Luego de lavar 3 veces con PBS-BSA 0.1 % se incubó por 30 minutos a 4°C, con 50 µl/pocillo de una dilución adecuada de anti-Ig ratón conjugada a fluoresceína. Se determinó % de células fluorescentes en cada muestra. En cada ensayo se introdujo un control positivo, un control negativo y un blanco.

* Determinación de concentración de Proteína A

Considerando que la Proteína A puede ser un contaminante importante en los eluatos obtenidos luego de la cromatografía se realizó una determinación de la misma por ELISA. Para ello se siguió el mismo esquema que para determinación de Igs murinas con algunas modificaciones. Se sensibilizó con anticuerpos anti-Proteína A obtenidos en carnero, y se reveló con los mismos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina. Se utilizó una solución de Proteína A de concentración conocida como estándar.

II) Procedimiento

Los anticuerpos monoclonales OKT3 se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo estacionario y de cosechas de biorreactor. Los sobrenadantes se utilizaron para ensayar las

condiciones de purificación y control del monoclonal obtenido.

Para ello se partió de sobrenadante de un cultivo estacionario

de 48 horas (V= 1000 ml) el cual se precipitó con sulfato de amonio (50%). Luego de dejar estacionado por 2 horas a 4°C, el precipitado fue centrifugado a 6500 rpm, 4°C durante 20 minutos. Posteriormente se lavó 2 veces con sulfato de amonio 50% y se centrifugó en las mismas condiciones. El precipitado se disolvió en 200 ml de PBS, se centrifugó a 6500 rpm, 4°C durante 20 minutos y se realizó una gel filtración por Sephadex G-25 (Pharmacia), para eliminar el sulfato de amonio usando Tris 20 mM/ NaCl 150 mM pH 7.5 como tampón de corrida. El eluato se concentró por ultrafiltración hasta un volumen final de 50 ml. Posteriormente, a 20 ml de eluato concentrado se le realizó una cromatografía de afinidad en Proteína A-Sepharose (Pharmacia), adsorbiendo la muestra en tampón glicina 1.5 M/ NaCl 3 M pH 8.6, eluyendo consecutivamente con los siguientes tampones citrato a pH: 6; 5; 4 y 3. Se obtuvieron picos de elución a pH 6, 5 y 3. A cada uno de los eluatos se les determinó concentración Igs, pureza y especificidad.

Los resultados mostraron que la mayor cantidad de Igs se recuperaban en el eluato a pH 5, donde además se encontraba la actividad específica. No se observó bandas de contaminantes importantes en esta fracción.

Consecuentemente el método seleccionado para la purificación del anticuerpo monoclonal a partir de las cosechas de biorreactor siguió el esquema:

A) Cromatografía de Afinidad en Proteína-A(*)

- a- Filtración de cosechas por membrana 0.22 μ , dilución al medio con tampón glicina 1.5 M/NaCl 3 M, pH 8.6 (tampón 1), o PBS pH 7.4.
- b- Lavado de la columna de Proteína-A Sepharose con tampón citrato pH 3.
- c- Neutralización de la columna con tampón 1.
- d- Aplicación de la muestra (90% de la capacidad de la columna).
- e- Lavado de non-bound con tampón 1, o PBS.
- f- Elución con tampón citrato pH 6.
- g- Elución con tampón citrato pH 5.
- h- Retomar en paso b.

(*) Se utilizó Proteína A producida en Cuba.

Como método de disminuir la adsorción de IgG bovina del ST a la Proteína-A, se usó en las últimas purificaciones PBS pH 7.4 como tampón de acoplamiento (6).

Los eluatos a pH 5 y 6 fueron neutralizados con Tris. Se les controló pureza, [Igs], proteínas totales y especificidad.

B) Gel Filtración por G-25

Este paso se realizó para cambio de solución tampón en los eluatos obtenidos a pH 5, usando Tris 20 mM/NaCl 150 mM, pH 7 como tampón de corrida.

C) Concentración

Todos los eluatos obtenidos a pH 5 se concentraron por ultrafiltración y se congelaron a -20°C . Se filtró por membrana de poro 0.22μ y se liofilizó. Parte de este pool (OKT3 PE) se utilizó para las etapas que se describen a continuación.

D) Intercambio Iónico en DEAE-52

Se realizó este intercambio con el fin de eliminar algunas proteínas que se encontraban contaminando el producto final obtenido en C (OKT3 PE). Se siguió el esquema:

- tampón de acoplamiento: Tris 20 mM, pH 8.5
- aplicación de la muestra diluida en tampón de acoplamiento hasta presentar una conductividad similar al tampón de acoplamiento.
- elución con Tris 20 mM/ NaCl 60 mM.
- elución con Tris 20 mM/ NaCl 100 mM.
- elución con Tris 20 mM/ NaCl 500 mM.
- regeneración de la matriz con Tris 20 mM.

A los eluatos se les determinó concentración total de proteínas, [Igs], pureza, presencia de DNA.

E) Intercambio Iónico en DEAE-Sephacel

Se realizó este intercambio con el objetivo de eliminar los contaminantes que no pudieron ser eliminados en el paso anterior. Se siguió el esquema:

- tampón de acoplamiento: Tris 20 mM, pH 8.5
- aplicación del eluato NaCl 60 mM del paso C, diluido en tampón de acoplamiento hasta presentar una conductividad similar al mismo.
- elución con Tris 20 mM/NaCl 60 mM.
- elución con Tris 20 mM/NaCl 100 mM.
- elución con Tris 20 mM/NaCl 500 mM.
- regeneración de la matriz con Tris 20 mM.

F) Gel Filtración en Sephacryl-300 (Pharmacia)

Debido a que el % de pureza de la fracción 1 obtenida luego del intercambio iónico con DEAE-52 y del OKT3 PE eran similares se usó parte de este último sin liofilizar para ensayar otro paso de purificación que pudiera eliminar los contaminantes. Para ello se

realizó una gel filtración en Sephacryl-300 usando Tris 20 mM pH

8.5 como tampón de corrida.

III) RESULTADOS

La Figura 2 muestra el esquema de purificación seguido y en la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en el primer paso (cromatografía de afinidad en proteína A). Como puede observarse algo de anticuerpos detectables por ELISA eran eluidos a pH 6.

Cabe señalar que para las cromatografías hechas con PBS pH 7.4 como tampón de acoplamiento se obtuvo un eluato a pH 6 mucho menor, que para aquellas en las que se usó tampón pH 8.6.

La Figura 5 muestra la densitometría obtenida luego de electroforesis SDS-PAGE para el OKT3 PE previo a su liofilización. Como puede observarse aun se encontraban bandas de contaminantes (albúmina, transferrina, proteína A) que según el densitograma constituían el 33 % de la muestra total. A esta misma muestra se le determinó contenido en Proteína A obteniéndose un valor de 25 ng/ml.

El ensayo de IFI mostró para todos los eluatos obtenidos a pH 5 (en todas las cromatografías realizadas), que en esta fracción se concentraba la mayor especificidad (más de 85 % de las células eran reconocidas por dicha fracción). El patrón de fluorescencia obtenido se caracterizó como puntos en los "bordes" de la célula, distribuidos no uniformemente en todo el perímetro. Este patrón fue similar al obtenido con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 IOR-T3 (producido por el INOR).

Los resultados obtenidos luego del intercambio iónico en DEAE-52 se muestran en la Figura 4 y los densitogramas de cada eluato en las Figuras 6, 7, 8 y 9. Puede comprobarse que una cantidad importante de gamaglobulinas "no murinas" (no revelables por ELISA) fueron eluidas con NaCl 100 y 500 mM.

La determinación de presencia de ácido nucleico se realizó a los tres eluatos obtenidos del intercambio iónico, a la cosecha 17 y al OKT3 PE. Los resultados mostraron presencia de ácido nucleico en todas las muestras excepto el eluato de intercambio iónico obtenido con NaCl 60 mM.

El intercambio iónico en DEAE Sephacel no resultó adecuado para separar las proteínas contaminantes.

La gel filtración en Sephacryl-300 permitió eliminar las proteínas contaminantes, obteniendo una única fracción que por electroforesis y posterior densitometría presentó una pureza de

100 % (Figura 10 y 11).

A continuación se resumen los resultados de % pureza obtenidos en cada paso de purificación, para la fracción OKT3 PE, las fracciones obtenidas del intercambio iónico con DEAE-52 y la fracción obtenida en gel filtración con Sephacryl-S-300 high resolution.

| Fracción | % (CP+CL) | % C | PT (mg/ml) |
|-----------|-----------|-----|------------|
| OKT3 PE | 85 | 15 | 8.7 |
| N B | 24 | 76 | 0.1 |
| F 1 | 81 | 19 | 0.4 |
| F 2 | 51 | 49 | 0.1 |
| F 3 | 63 | 37 | 0.1 |
| Sephacryl | 100 | 0 | 2.7 |

CP: Cadena Pesada
CL: Cadena Liviana

C: Contaminantes
PT: Proteínas Totales

De la tabla anterior se puede resumir lo siguiente:

- mg anticuerpo obtenido en las cosechas: 290 mg
- mg de anticuerpo OKT3 liofilizado: 297 mg/ pureza 85 %
- mg de anticuerpo luego de gel filtración: 32 mg/pureza 100 %.
- Rendimiento en purificación: aproximadamente 100 %.

DISCUSION

I- Partes A, B y C

Considerando el objetivo de esta etapa del Proyecto la inoculación del anticuerpo monoclonal en animales se realizó con el fin de analizar la producción en ascitis y compararla con la del biorreactor. Una vez que el primer protocolo de inoculación no dio resultados positivos se ensayaron consecutivamente los otros dos descritos en la parte experimental. El hecho de haber obtenido un 0% de prendimiento de ascitis, sin observar tampoco el desarrollo de tumor sólido en los animales podría explicarse por una pérdida en la clonalidad en la línea o por el uso de un protocolo de inoculación inadecuado. Ambas hipótesis deberían ser estudiadas, la primera realizando un clonado de la línea determinando si la población aun continúa siendo cerrada y la segunda utilizando otras condiciones en el protocolo de producción de ascitis (Ej: otros irritantes, usar animales suprimidos, etc.).

El cultivo del híbrido en suspensión se caracterizó por una muy baja viabilidad. Como primeramente se realizó un cultivo en frasco spinner y se obtuvo (48 h post-siembra) un descenso significativo en la viabilidad (resultado reproducido en dos experimentos independientes), se supuso que la agitación podría constituir un factor negativo para el cultivo. Por esta razón se procedió a realizar un encapsulamiento de las células en alginato, esperando que el microambiente de las perlas de alginato protegiera a las células de la agitación. Debido a que en este sistema también se produjo un descenso en la viabilidad y que (ste podría deberse a alguna acción citotóxica del alginato, no puede asegurarse cuál (o cuáles) pudieron haber sido los factores responsables de la muerte celular. Mediante el agregado de perlas de alginato a un cultivo estático podría comprobarse si (ste pudiera ser citotóxico. Los resultados de disminución en la producción de Igs y en el consumo de glucosa para el primer cultivo son concordantes con la progresiva muerte celular. Sin embargo, en el cultivo con alginato este descenso no es marcado, suponiéndose que tanto las Igs producidas como el consumo de glucosa eran mantenidos por las células que escapaban de las perlas y que se encontraban diariamente libres en el medio.

Ambos sistemas fueron descartados como forma de preparar el inóculo para el biorreactor, ya que con ninguno de ellos fue posible la obtención del número de células necesarias y con la viabilidad requerida. Por ello se seleccionó el cultivo estacionario para la preparación del inóculo, para el cual se había determinado que las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial y con alta viabilidad, si se mantenían a una concentración entre 200.000-300.000 C/ml.

Los resultados de la curva metabólica muestran que cuando en el medio se alcanza una concentración de glucosa remanente de 1.5

mg/ml y un pH de 6.9, las células se encuentran en fase de producción. Estos valores de pH y glucosa debían ser manejados en el cultivo en biorreactor para seleccionar la fase de producción una vez superada la de crecimiento.

El proceso en biorreactor tuvo como aspecto no esperado el mantenimiento del pH sin necesidad de variar el nivel del rotámetro y un CG que se mantuvo en bajos niveles durante el mismo, aun cuando el sistema se encontraba contaminado.

La detención en el crecimiento observada alrededor del día 7 acompañada de la estabilización en CG, indicaban que una alta proporción de células habían muerto. Los factores que llevaron a esta muerte celular sin duda fueron la baja velocidad de la bomba de circulación (insuficiente suministro de oxígeno) y la baja velocidad de la bomba de medio, ya que, si bien los niveles de glucosa se encontraban por encima de los recomendados, la eliminación de metabolitos pudo no haber sido suficiente. A esto debe sumarse el hecho que los días 6 y 7 se produjo un taponamiento de los filtros de medio EC e IC, respectivamente, dejando al sistema sin circulación de medio por un lapso de varias horas.

No pudo lograrse la recuperación del cultivo en ningún momento a lo largo del proceso, aun cuando al agregar HECS al EC se pudo observar un leve aumento en el CG. Este hecho permitiría suponer que el agregado de HECS desde el comienzo del proceso podría ser beneficioso, aunque no se hallan observado diferencias en el crecimiento con y sin HECS en cultivo estático.

Durante el proceso (día 26 y 38) se observó la oclusión de la conexión de entrada de medio al EEC por la formación de cristales cuyo origen no pudo explicarse y cuya formación no estaba directamente asociada a la adición de HECS al medio EC.

Aunque la contaminación se mantuvo controlada hasta el fin del proceso, probablemente por la adición de Kanamicina y la duplicación de la concentración de penicilina/estreptomicina en el medio IC, pudo tener una acción retardadora en la recuperación de las células. El mantenimiento en el CG y la estabilidad del pH fueron un indicio del control de la contaminación. Estos parámetros también indicaron junto con la disminución en la [Igs] en las cosechas la imposibilidad de recuperación de las células.

Con los resultados obtenidos con este hibridoma puede recomendarse que tanto la bomba de medio como la de circulación deben fijarse en valores más altos desde el comienzo del proceso, aun cuando se sobrepase el nivel de glucosa requerido. También sería conveniente realizar un control del nivel de metabolitos (ácido láctico) y del suministro de oxígeno. La circulación de factor antes del día 5 también podría ser beneficiosa para introducir el cultivo en fase de crecimiento.

II- Parte D

La cromatografía de afinidad en Proteína-A permitió alcanzar un nivel de pureza de solamente 85 % (Figura 5), de todas formas, debe considerarse que aunque en este caso particular el anticuerpo a purificar no constituía la proteína mayoritaria en las cosechas el grado de purificación que se obtuvo fue significativo, por lo que se justificaría incluir este paso como el primero en el esquema de purificación. Este porcentaje podría, no obstante mejorarse con un lavado más prolongado de la columna entre la elución con pH 6 y pH 5. El uso de PBS pH 7.4 también evitaría la unión de la IgG del ST a la Proteína-A, por lo que sería aconsejable, en este caso particular en que el monoclonal es de subclase IgG2a, utilizar como tampón de acoplamiento PBS pH 7.4.

El contenido en Proteína-A en la muestra OKT3 luego de la cromatografía será importante en función del uso del anticuerpo, se ha demostrado que la gel filtración permitiría su eliminación lo cual no descarta el posible uso de otros métodos más ventajosos.

Como se ha dicho anteriormente se intentó eliminar los contaminantes con intercambio iónico en DEAE-52. Los resultados que se ven en la Figura 4 muestran que gamaglobulinas no revelables en el ELISA utilizado ("no murinas") eran eliminadas del pool de anticuerpos a purificar, ya que eluían con NaCl 100 y 500 mM. De todas formas puede observarse que aun restaban proteínas contaminantes en el eluato NaCl 60 mM, según muestra el densitograma obtenido de esta fracción. La Figura 7 muestra que no hubo aumento de pureza luego del intercambio en esta matriz. Sin embargo sí puede decirse que ésta funcionaría adecuadamente para eliminar el ADN contaminante, ya que el mismo fue eluido a concentraciones de NaCl mayores de 60 mM.

El intercambio iónico en DEAE-Sephacel no debería incluirse ya que no mejora la pureza del producto final.

En cuanto a la gel filtración en Sephacryl-300, debe observarse que el nivel de pureza alcanzado es satisfactorio. Sin embargo debe tenerse en cuenta que se pierden en este paso aproximadamente 10 % de anticuerpos. La elección de este paso en la purificación dependerá del balance entre pureza que debe presentar el anticuerpo y rendimiento requerido para el proceso.

Es importante hacer notar que si bien la gel filtración podría constituir un método ideal para alcanzar una pureza suficientemente alta, presentaría serios inconvenientes a la hora del escalado en la producción. Dichos problemas no se presentaron

en esta purificación ya que se trabajó con cantidades totales de proteínas del orden de mgs. Cabe notar que la gel filtración realizada a 40 mg de proteínas consumió aproximadamente 18 horas, a este tiempo debe sumársele el tiempo utilizado en la concentración del eluato (factor de dilución de 60) 5 horas. De todas formas y de acuerdo con los resultados la gel filtración debe tenerse como una herramienta posible para alcanzar un elevado grado de pureza al final del proceso de purificación cuando otros métodos no serían útiles.

Debe considerarse que en el cálculo de rendimiento de purificación se comparó [Igs] murinas determinadas por ELISA en las cosechas determinadas por ELISA con cantidad total de proteínas en el producto final purificado determinadas por Lowry (corrigiendo por el % de pureza del anticuerpo obtenido por densitometría), siendo que ambos métodos de determinación de proteínas no son enteramente comparables, el rendimiento calculado representa solamente un valor aproximado.

De acuerdo a estos resultados el esquema de purificación que puede plantearse para este anticuerpo monoclonal sería:

- a- Cromatografía de Afinidad en Proteína-A
 - Controles: Proteínas totales
 - Actividad
 - Igs totales
 - Pureza
 - Ácidos nucleicos
- b- Intercambio iónico en DEAE-52
 - Controles: idem a
- c- Gel filtración en Sephacryl-300
 - Controles: idem a

Un esquema como este implicaría una pérdida de anticuerpos del 10 %, la mayoría en el paso de gel filtración, por lo que se obtendría aproximadamente un 90 % de rendimiento con 100 % de pureza.

No debe obviarse que estos pasos deberían ser optimizados para este monoclonal con el fin de analizar la posibilidad de eliminar alguno de ellos sin afectar rendimiento y pureza obtenidos.

CONCLUSIONES

No obstante la imposibilidad de obtener una producción de anticuerpo monoclonal acorde a la escala que permite el cultivo en biorreactor de fibra hueca, este no debe descartarse para tal fin. Debe considerarse que el rápido crecimiento observado durante la primera semana y el aspecto de las células que se extrajeron del EEC, así como la [Igs] de la primera cosecha, estarían sugiriendo que el cultivo en biorreactor constituye un sistema adecuado para la producción masiva del anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma OKT3. Deben, sin embargo, determinarse las condiciones de cultivo para este hibridoma que permitan controlar adecuadamente el proceso y alcanzar la fase de crecimiento para mantener a las células posteriormente en fase de producción.

En cuanto a la purificación pudo establecerse un esquema tentativo de purificación que rendiría un anticuerpo de alta pureza (100 %) y con buen rendimiento (90 %). Debería, sin embargo, realizarse un control más estricto al producto final en función del uso del OKT3, así como también incluir un sistema de cuantificación del mismo (ELISA celular).

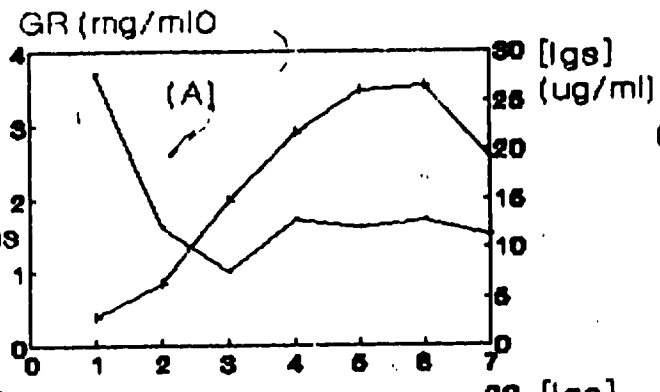
Considero particularmente que este entrenamiento ha cumplido los objetivos propuestos permitiéndome la asimilación de los aspectos básicos concernientes a la producción masiva y purificación de anticuerpos monoclonales, contando con el excelente equipamiento y personal capacitado que ofrece el CIGB.

AGRADECIMIENTOS

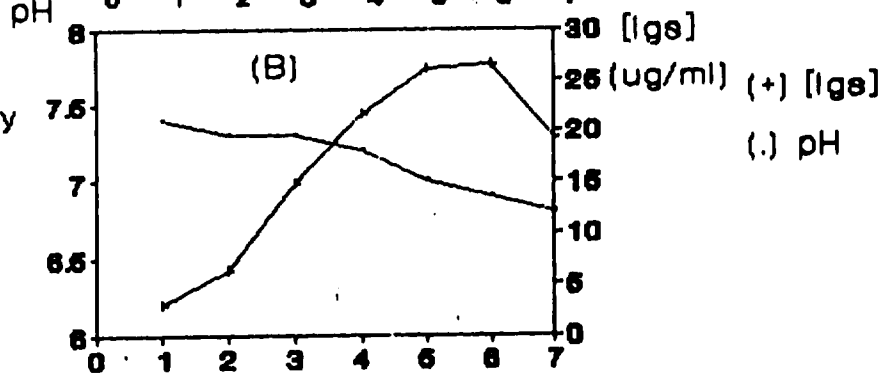
En primer lugar debo agradecer a todos y cada uno de los compañeros de la División Hibridomas y Modelos Animales ya que han sabido transferirme su experiencia en la producción y purificación de anticuerpos monoclonales y me han brindado constantemente una valiosa crítica objetiva al trabajo desempeñado. Corresponde además que reciban mi más profundo agradecimiento por el excelente ambiente laboral y el apoyo humano que he recibido de cada uno durante este período en el CIGB.

Agradezco también la colaboración del Dr. Araia (CIB), de la Dra. Ma. Elena Faxas (INOR) y del personal del CENSA.

(A): Comparación entre glucosa remanente en el medio (GR) y producción de Inmunoglobulinas ([igs]).



(B): Comparación entre pH y producción de Igs.



(C): Comparación entre pH y % de viabilidad (% V).

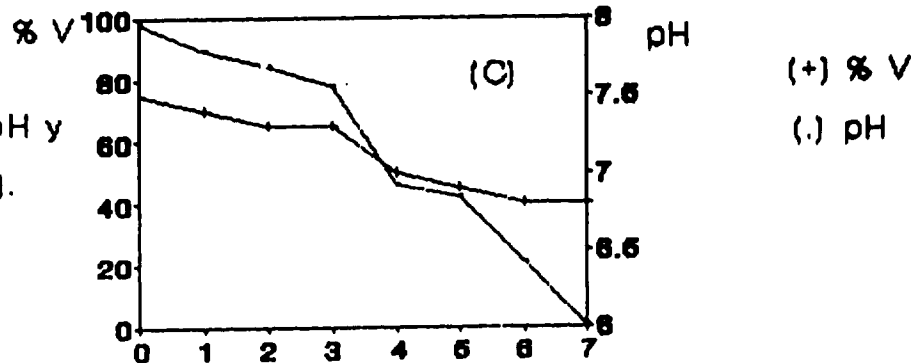


FIGURA 1

DIAGRAMA DE FLUJO DE PURIFICACION

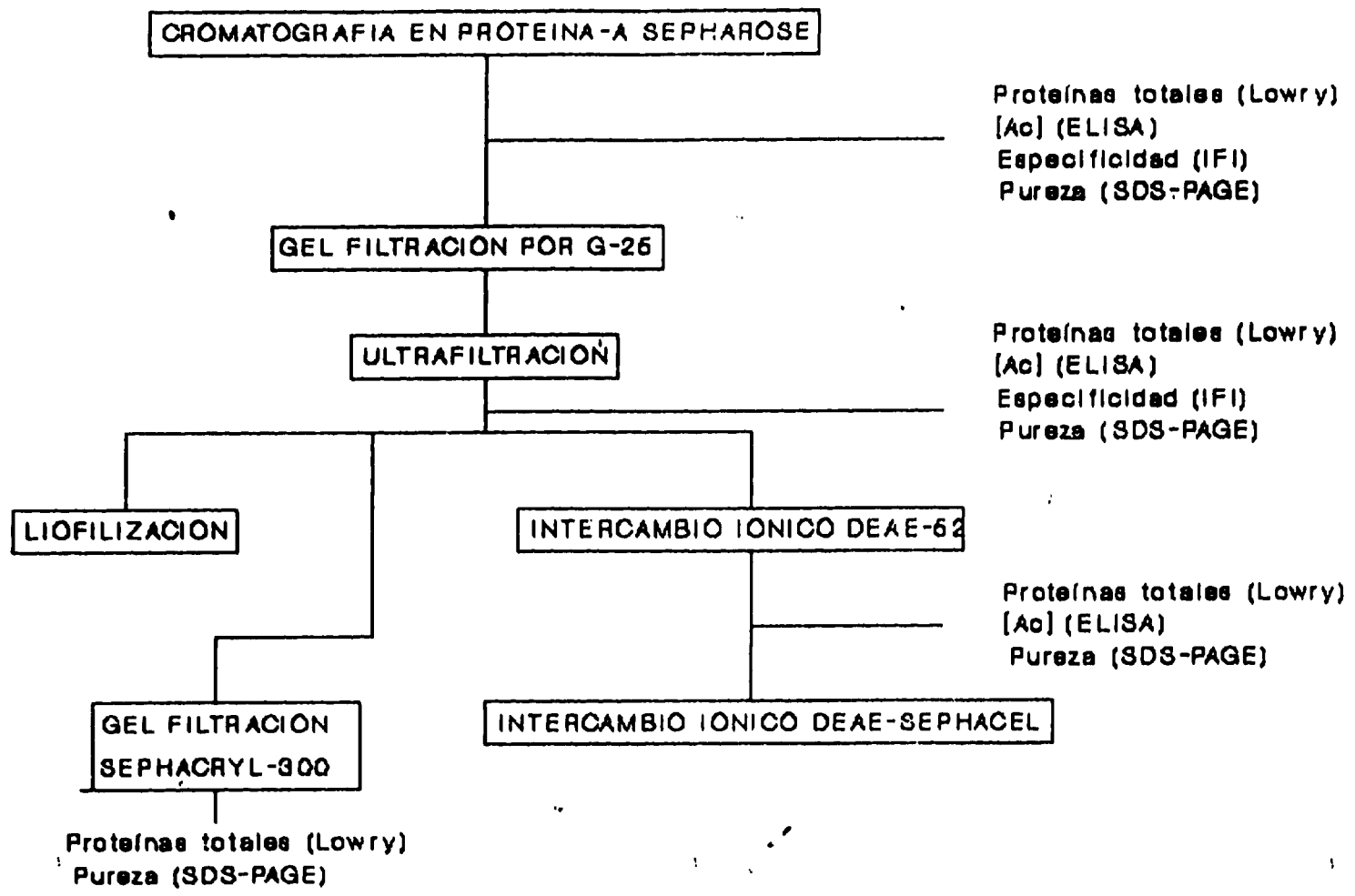
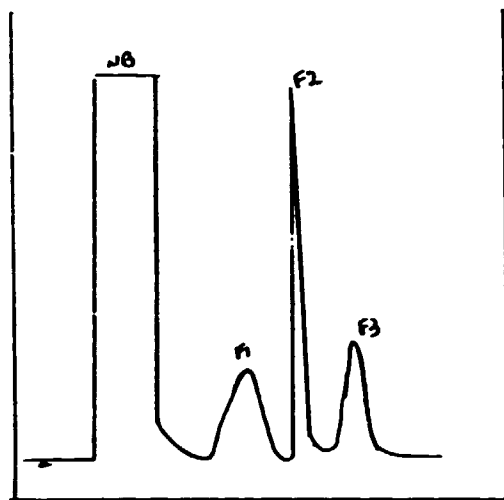


FIGURA 2

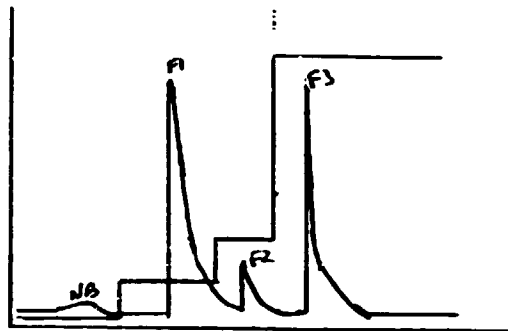


| F N° | [PT] | [Ac] | Act. |
|------|------|------|------|
| N B | 7.2 | ND | - |
| F 1 | 1.0 | 150 | +++ |
| F 2 | 1.8 | 20 | +- |
| F 3 | --- | --- | - |

ND- no detectable

FIGURA 3

Cromatografía en Proteína-A Sepharose. La tabla muestra concentración de proteínas totales (PT) en mg/ml, concentración de Igs ([Ac]) en $\mu\text{g/ml}$ y actividad específica, para el non-bound (NB), y las fracciones 1 (F 1), 2 (F 2) y 3 (F 3).



| F N° | PT | [Ac] |
|------|-----|------|
| N B | 0.1 | ND |
| F 1 | 0.4 | 38 |
| F 2 | 0.1 | ND |
| F 3 | 0.1 | ND |

ND- no detectable

FIGURA 4

Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-52. Se representa esquemáticamente las fracciones eluidas y el gradiente discontinuo de NaCl realizado 80 , 100 y 500 mM (línea escalonada). La tabla muestra los valores de concentración total de proteínas (PT) en mg/ml y concentración de Igs murinas ([Ac]) en µg/ml, para el non-bound, y las fracciones 1 (F 1), 2 (F 2) y 3 (F 3).

24577 U.
97 %

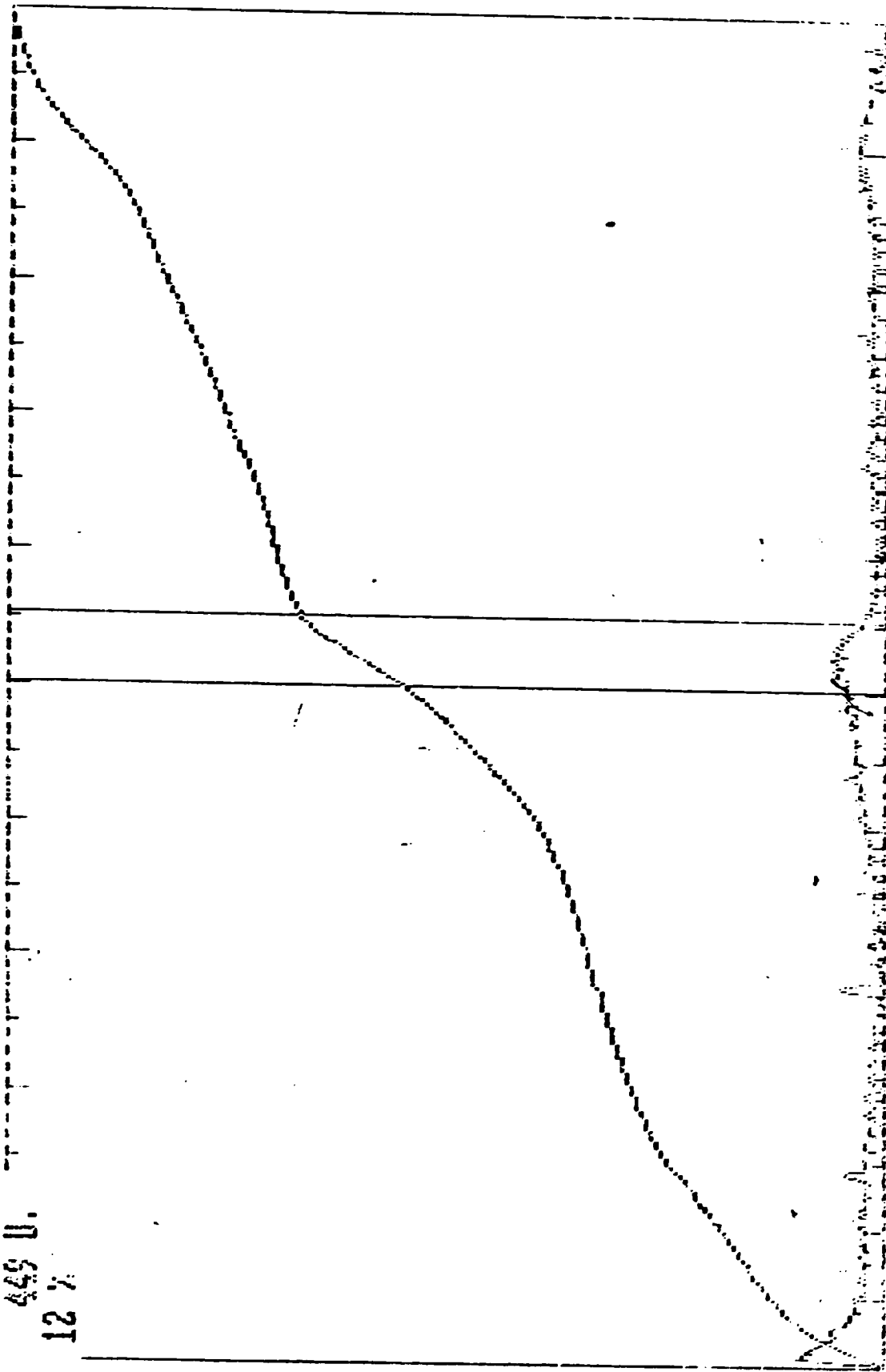


DSN: OKTAPALADJ, NGTIS:
F1:NEW F2:HEUR F3:IKT* F4:MK F5:HF F6:ZDN F7:SUU F8:PIJF F9:DO F10:QUIT

FIGURA 5

449 U.

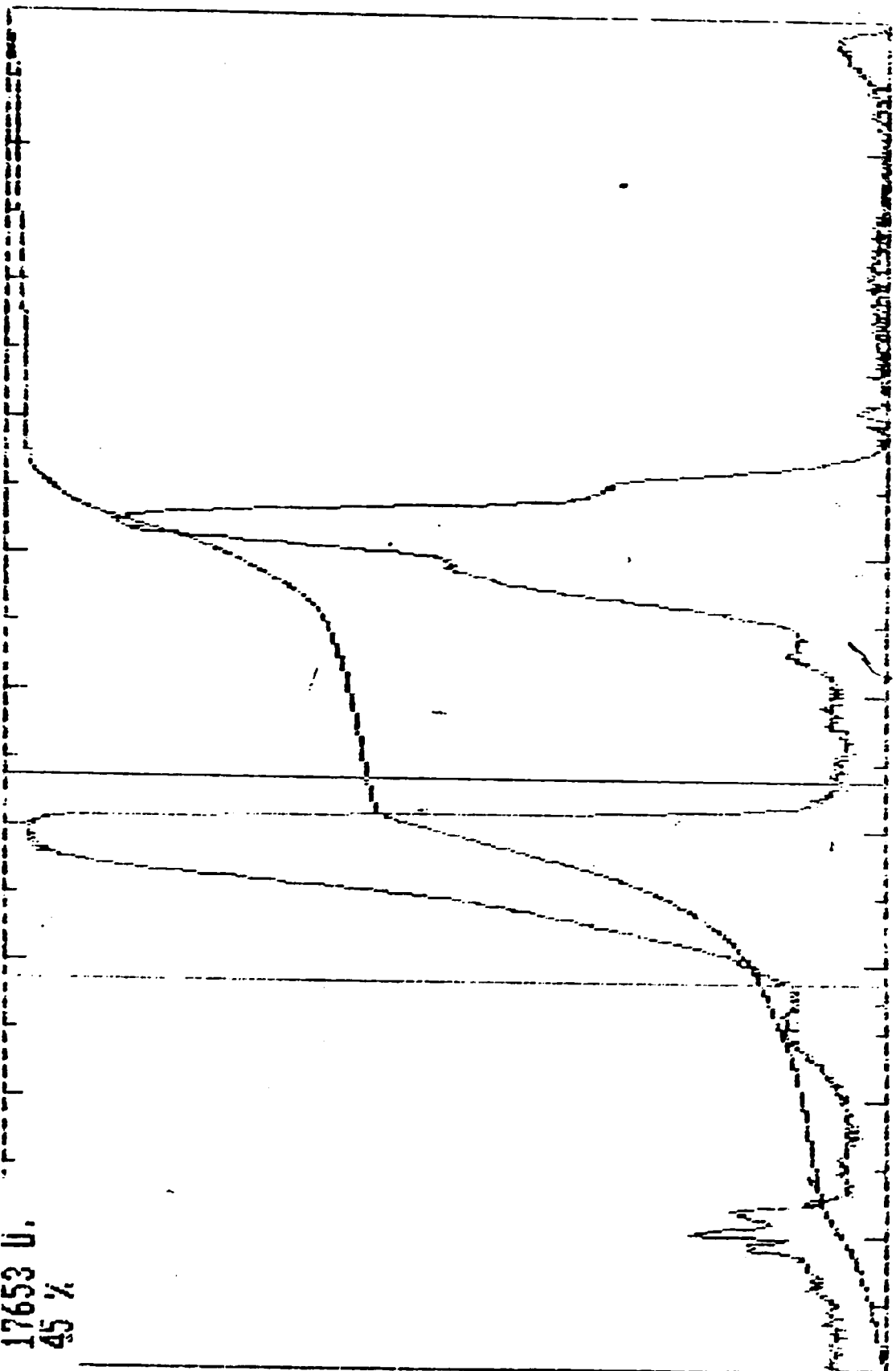
12 7



USN- 0011.600 NOTIS:
F1:NEP F2:NEP F3:INT* F4:MK F5:HF F6:ZUM F7:SAU F8:TIME F9:PC F10:QUIT

FIGURA 6

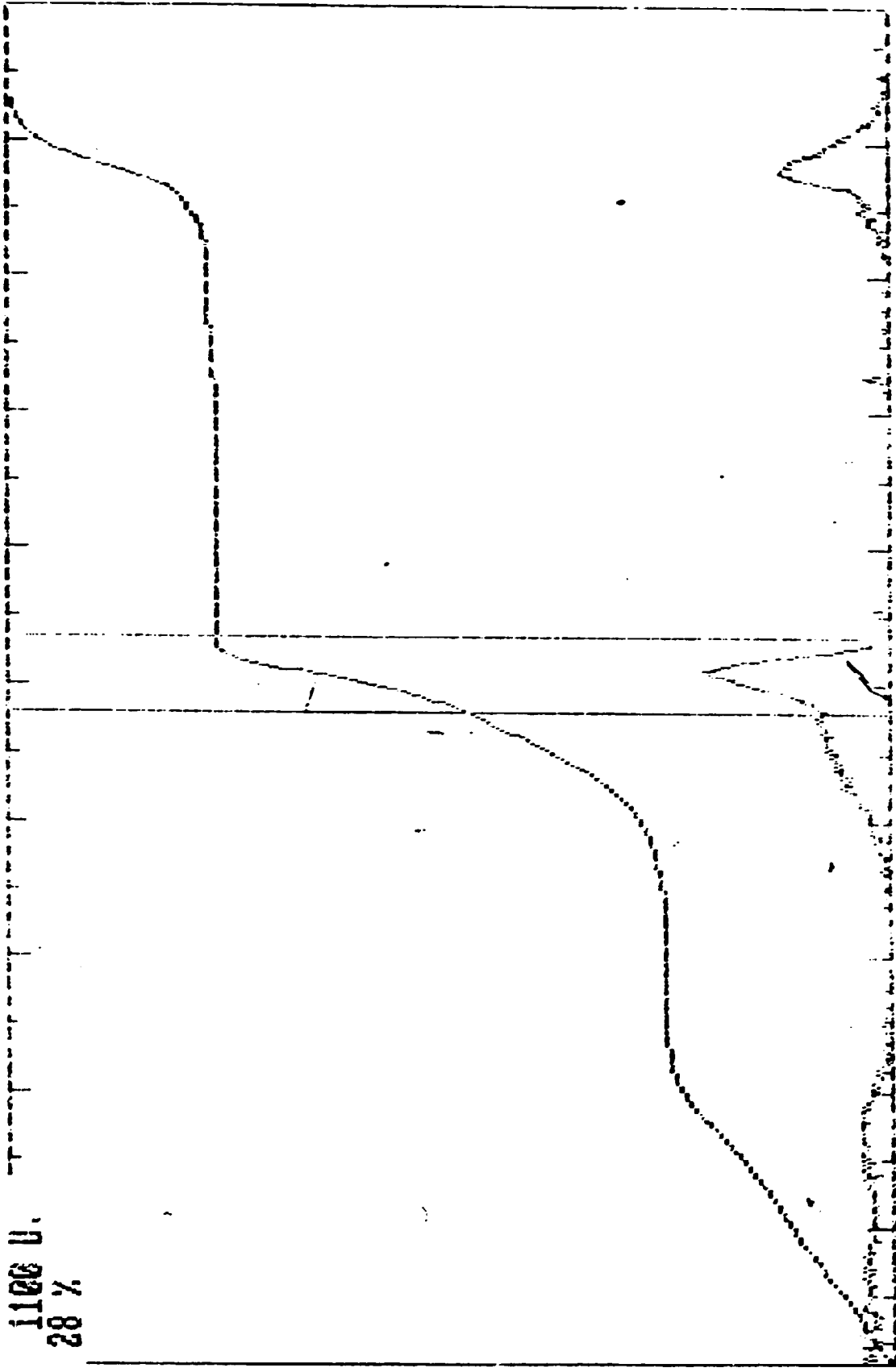
17653 U.
45 %



DSN= F411:ADJ, NOTES:
F1:NEW F2:REQ F3:INTX F4:MH F5:FF F6:ZDM F7:SAV F8:DIBB F9:DO F10:QUIT

FIGURA 7

1100 U.
28 %

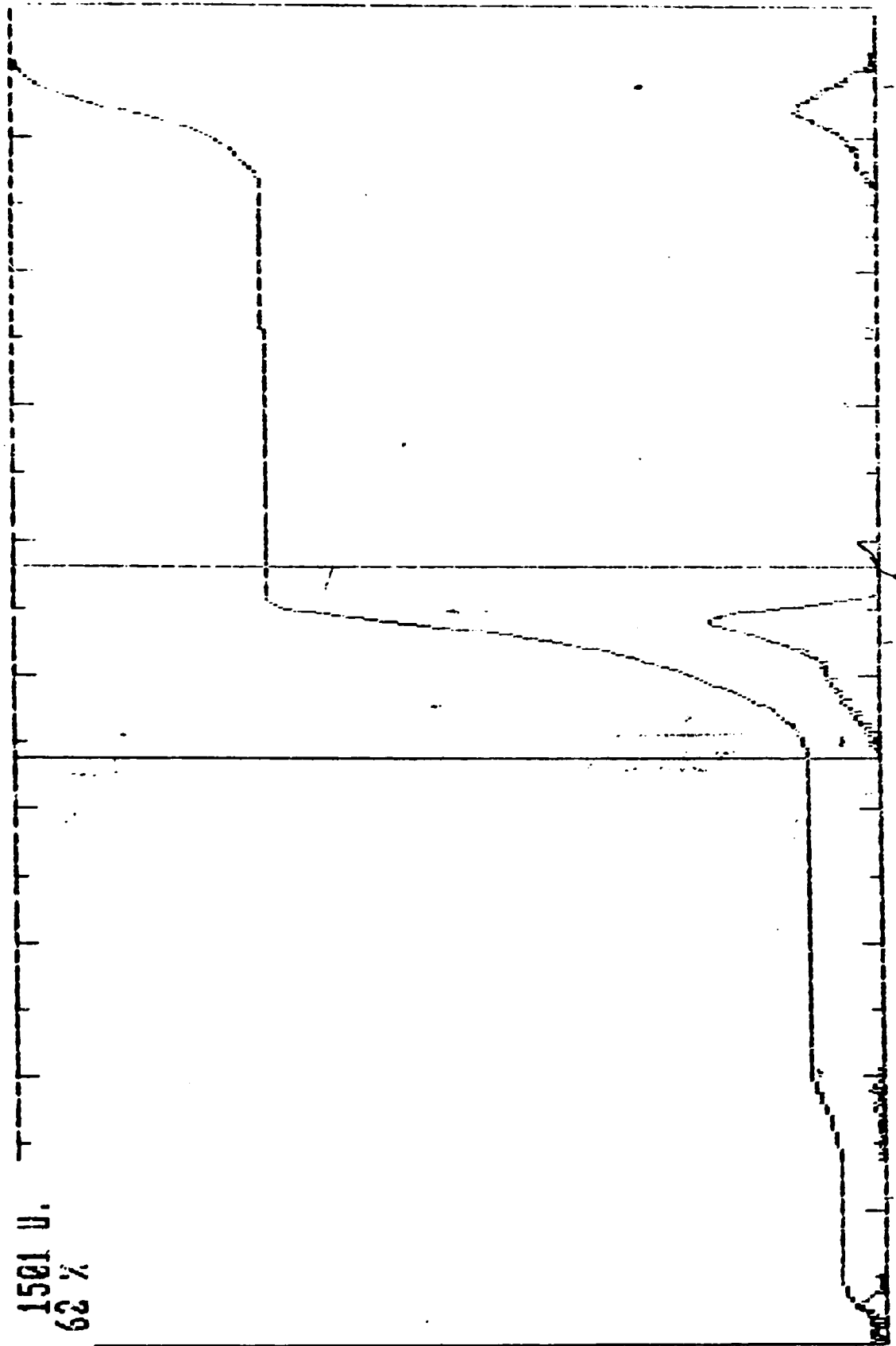


DSN= F311.ADJ, NOTES:

F1:NEW F2:REQ F3:INT F4:AW F5:HE F6:ZUM F7:SAV F8:DINE F9:DO F10:QUIT

FIGURA 8

1501 U.
62 %



DSN: F21:ADJ NOTES:
F1:NEW F2:REV* F3:INT* F4:MW F5:RF F6:ZUM F7:SAU F8:DIRE F9:DO F10:QUIT

FIGURA 9

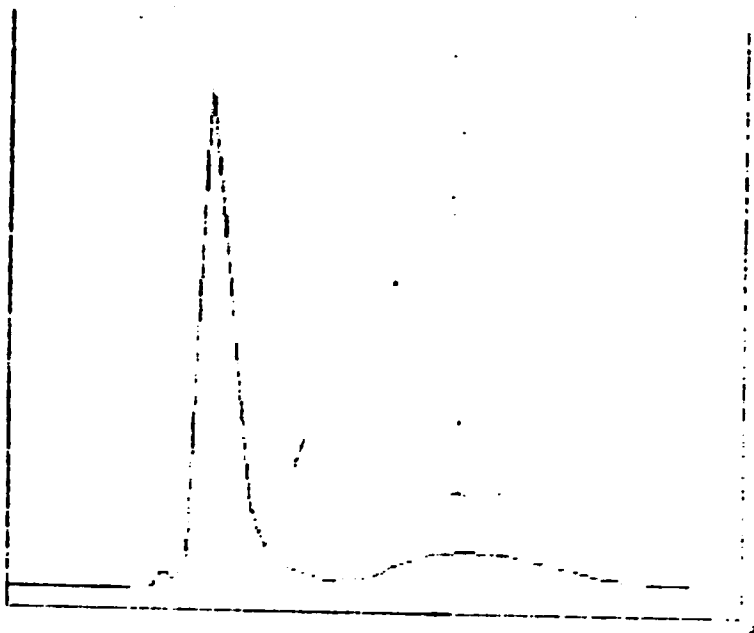
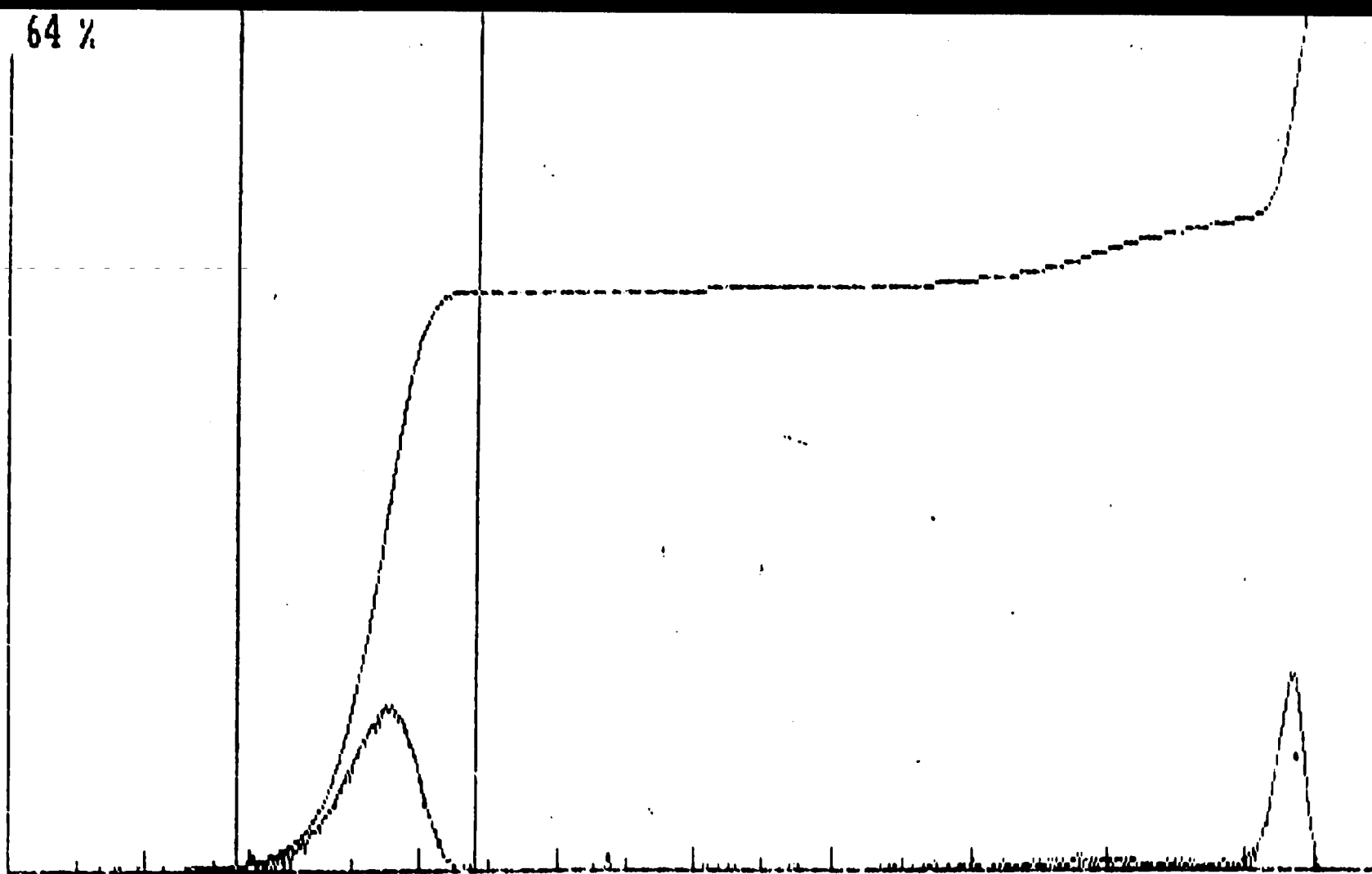


FIGURA 10

Gel filtración en Sephacryl-300.

64 %

FIGURE 11



DSN= SEFACRYL.ADJ, NOTES:

F1:NEW F2:REV* F3:INT* F4:MW F5:RF F6:ZUM F7:SAU F8:DIRE F9:DO F10:QUIT

Anexo III

CARACTERIZACION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA ECHINOCOCCUS GRANULOSUS: RELEVANCIA DEL RECONOCIMIENTO DE EPITOPES GLUCIDICOS

Marina Miguez, Alba Bentancor & Alberto Nieto
Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Inst. de Higiene
Alfredo Navarro 3051
11600 Montevideo-Uruguay

RESUMEN

Sonicado de protoescolex (PES) de E. granulosus se fracciona por cromatografía de afinidad con Con-A Sepharosa analizándose la reacción de 9 AcMo (dirigidos contra ese Ag) con la fracción Con-A reactiva y no reactiva por ELISA. También se ensayaron por ELISA estos AcMo utilizando el Ag tanto tratado con endoglicosidasa F (ENDO-F) como oxidado con peryodato. Se caracterizó un AcMo (A8G2) dirigido contra Ag de superficie de PE. Es de clase IgM exhibiendo en isoelectroenfoque 2 bandas de pI 6,9 y 7.1. En Western Blott tanto contra PES como extracto con detergente MEGA-10 de proteínas de superficie de PE reconoce subunidades entre 116 y 28 kDa y en el segundo caso entre 99 y 21 kDa. La Inmunofluorescencia indirecta (IFI) revela un patrón homogéneo en superficie de PE viables. AcMo de otros laboratorios (C. Muñoz y Siracusano) contra Ag de Líquido Hidático (LH) y otro (Craig) contra oncosferas de E. granulosus, fueron analizados por ELISA usando las fracciones de Con-A Sepharosa y PES oxidado con peryodato. El 90 % de los AcMo analizados muestran especificidad para epítopes glucídicos. AcMos contra distintos Ags de E. granulosus revelan la inmunodominancia de epítopes glucídicos. Se ensayó la capacidad de protección pasiva en ratón del AcMoA8G2 contra una infección secundaria experimental. Los resultados no permiten concluir que existan niveles significativos de protección.

INTRODUCCION

E. granulosus es un cestodo cuya larva causa la hidatidosis afectando

tanto al hombre como animales domésticos, constituyendo una de las zoonosis más importantes en el mundo (McManus & Smyth, 1986). En áreas endémicas (notablemente Uruguay) la infección con este metacestodo constituye un gran problema para la salud pública y es causa importante de pérdidas económicas (Schwabe 1986; Nieto, Ehrlich & McManus 1988). Inmunización protectora contra la infección primaria en ovinos por este parásito, usando oncosferas de E. granulosus es factible de acuerdo con Heath et al. 1981. Sin embargo no hay datos concluyentes sobre protección contra infección secundaria producida por sus PE (Heath 1986). Esta clase de infección es muy frecuente en humanos por resiembra debida a accidentes quirúrgicos. Por estas razones la búsqueda de un inmúnogeno protectoro para prevenir las infecciones secundarias debe llevarse a cabo. Distintos Ag han sido probados en inmunoprofilaxis y 2 de ellos han demostrado ser eficientes : oncosferas enteras y sus productos de excreción-secreción (Heath 1981) ; sin embargo la poca disponibilidad de oncosferas y su alta patogenicidad dificultan el desarrollo de procedimientos de inmunización a gran escala. Han sido demostradas las reacciones cruzadas entre Ag de oncosferas y PE y por esta razón también es importante la caracterización de los Ag compartidos en busca de su actividad protectora.

Es claro que las estructuras glucídicas juegan un rol muy importante en las estrategias de supervivencia de trematodos y nematodos. Los parásitos deben negociar su supervivencia en muy distintos entornos durante su ciclo de vida. En cada estadio, los carbohidratos de superficie o secretados parecen ser muy importantes en la interacción del parásito con su entorno. Sin embargo solo recientemente se han comenzado estudios en carbohidratos de *Schistosoma* y *Toxocara canis* (R.M. Maizels et al 1987, D.W. Dunne 1990, A.J.G. Simpson 1990).

En nuestro laboratorio hemos comenzado a estudiar este problema en E. granulosus para lo cual se obtuvieron 16 AcMo específicos contra Ag presentes en PE. Se estudió la naturaleza química de los epítopes que reconocen 9 de ellos, así como 3 provenientes de otros laboratorios. Se caracterizó en profundidad uno de los 9 AcMo seleccionado por la estabilidad y capacidad de síntesis de la clona correspondiente. Posteriormente se estudió la relevancia del epítipo que él reconoce en relación a la inmunidad del huésped, a través de un experimento de inmunización pasiva en ratón.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Ratones Balb/c obtenidos originalmente de Charles River Breeding Laboratories, Inc. (Wilmington, M.A., USA) y subsecuentemente criados en la Facultad de Química, Montevideo, Uruguay, fueron usados para las inmunizaciones.

ANTIGENOS

Líquido Hidático: Antígenos de líquido hidático (LH) fueron obtenidos puncionando asepticamente quistes hidáticos ovinos recientemente extraídos y aspirando el líquido (conteniendo protoescoleces (PE) y fragmentos de membrana). Los PE se dejaron sedimentar de la suspensión durante 20 minutos a temperatura ambiente y el fluido fue removido cuidadosamente. Inmediatamente se agregan EDTA y azida de sodio al LH hasta una concentración de 5 mM y 0.02%, respectivamente. Posteriormente el LH fue extensivamente dializado contra agua destilada y congelado.

Protoescolex : PE obtenidos de la forma antedicha fueron lavados con solución de sales de Hanks para separar los viables de los no viables y restos de membrana. La viabilidad fue evaluada con Tripan blue y por actividad de células flamígeras. -

Sonicado de PE: PE viables se sonicaron en cuatro ciclos de 15 segundos hasta observar al microscopio desintegración total. Se conserva a -20 °C.

Extracto con detergente MEGA-10 : 70000 PE viables fueron lavados con pepsina 0.025% durante una hora, se lavaron con solución de sales de Hanks y se dejaron decantar. Se agregó detergente MEGA-10 (1% en solución de sales de Hanks), se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. La concentración de proteínas se evaluó por absorbancia a 280 nm o por el método de Bradford.

ISCOM de proteínas de superficie de PE: fueron preparados de acuerdo a Morein et al. (1984).

AcMo A8G2: Se utilizaron ratones hembras Balb/c de entre 12 y 24 semanas de edad. Se administraron por vía intraperitoneal 50 ug de A8G2/ratón 4 horas previo a la infección intraperitoneal con 1000 o 2000 PE según el lote experimental utilizado. Se hicieron extracciones de sangre por vena caudal a los 7, 15, 28 y 46 días. Se sacrificaron todos los ratones (incluidos los de control no tratados con A8G2) a los 180 días y se contaron los quistes midiendo también su diámetro.

INMUNIZACION

Un ratón Balb/c de 8 semanas de edad fue inmunizado según el siguiente protocolo :

día 0 y 30 - se inyectan intraperitonealmente 2000 PE muertos por congelado-descongelado en PBS

día 60 y 64 - se inyecta intraperitonealmente 200 ug PES en Adyuvante Completo de Freund (ACF) (1:1;v/v).

PRODUCCION DE HIBRIDOMAS

Células de mieloma NS0 se fusionaron con las células del bazo del ratón inmunizado, mezclando ambas poblaciones celulares en un tubo de 50 ml usando una relación 2:1. Se centrifugó 10 minutos a 400g y se descartó el sobrenadante. Al pellet se le añadió PEG 1500 50% p/v. Se resuspendió el pellet en 96 ml de HAT-20% FCS y se distribuyó en placas de 24 pozos. Se mantuvieron en HAT aproximadamente 1 semana sustituyendo el 50% del medio cada 2 o 3 días. Posteriormente las clonas sobrevivientes se pasaron a RPMI - 10% FCS y fueron clonadas por dilución límite en placas de 96 pozos.

PRODUCCION DE ASCITIS

Se utilizaron ratones Balb/c para obtener ascitis de acuerdo a Brodeur, Tsang y Larose (1984).

CARACTERIZACION

* ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Se ensayaron los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas por ELISA contra distintos Ags.

Placas de 96 pozos (NUNC, Denmark) fueron sensibilizadas con 100 ul/pozo de una solución : a) 15 ug/ml de PES en PBS , b) 25 ug/ml de LH en PBS, c) 20 ug/ml de extracto MEGA-10 y d) 10 ug/ml de sobrenadante de PE con 10 días de cultivo en RPMI-FCS 10%. Se usaron condiciones de saturación de la superficie de las placas de ELISA (Muñoz et al. 1986) y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Luego de descartar los sobrenadantes se agregó 200 ul/pozo de BSA 1% en PBS e incubó 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 3 veces con 200

ul/pozo de PBS-0.05% Tween 20 y una vez con PBS. Diluciones seriadas de los sobrenadantes de cultivo en 0.05% Tween 20 y 1% BSA en PBS (PBS-T-BSA) fueron sembradas (100ul/pozo) e incubadas 3 horas a temperatura ambiente. Luego de lavadas las placas, una dilución apropiada de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas de oveja y conjugadas a Peroxidasa (Sigma, St. Louis) diluidas en PBS-T-BSA fue sembrada a razón de 100ul/pozo e incubada toda la noche a 4 °C. Después de descartar los sobrenadantes, las placas fueron lavadas y se agregó 200 ul/pozo de solución de sustrato MBTH-DMAB (Ngo & Lenhoff 1980); y se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo por adición de 50ul/pozo de solución 2M de ácido sulfúrico, y la densidad óptica a 600 nm fue medida en un lector Titertek Multiskan Plus (Flow Laboratories, Helsinki, Finland)

*INMUNOBLOTTING

La especificidad de los AcMo fue estudiada por blott realizándose la electroforesis en presencia de mercaptoetanol según método de Laemli (1970), utilizándose como Ag PES, extracto Mega-10 e Iscom. Para la transferencia a nitrocelulosa se utilizó el 2117-250 Novablot Electrophoretic Transfer Kit LKB, las condiciones fueron 250 mA durante 45'.

Posteriormente la membrana fue bloqueada toda la noche en PBS-1% BSA e incubada con sobrenadante de cultivo de AcMo A8G2 toda la noche en heladera. Se agregó conjugado a fosfatasa alcalina anti-IgM de ratón hecho en cabra. Se incubó 2hs a temperatura ambiente y se reveló con el sustrato BCIP-NBT.

*ISOELECTROENFOQUE

Se hizo un gel de agarosa conteniendo sorbitol sobre gel-bond (Schleider and Schuell) usando anfolitos de amplio rango (Pharmalyte

3-10). El aparato usado fué el flat-bed LKB con circulación de agua para refrigeración. Se preenfocó durante 20', luego se detuvo la corrida y se sembraron las muestras y los marcadores (sangre y mezcla de proteínas con PI conocido). Las muestras se aplicaron directamente sobre el gel o embebidas en papel de filtro. El gel se puso luego en solución fijadora (150ml MeOH-57.5g TCA-350 ml H₂O) toda la noche. Se puso en solución equilibradora (300ml EtOH-100ml HAc-600ml H₂O) y luego en solución colorante (Comassie 5g-EtOH 450ml-HAc 100ml-450ml H₂O) por 1 hora. Se destifaron en solución de igual composición que la equilibradora y se secaron con aire frío.

* INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se mezcló una suspensión de PE con sobrenadante de cultivo del AcMo (50 ul de PE + 200 ul muestra). Se incubó 60 minutos a 37 °C, luego se lavó con PBS-T (2 veces) y se microfugó. Se agregó anti-Ig de ratón obtenida en cabra conjugada a fluoresceína (1:100 en PBS). Se incubó 1 hora a 37C, se centrifugó, se lavó 2 veces con PBS-T y se observó con microscopio de fluorescencia.

* OXIDACION SUAVE DE PES CON PERYODATO

1-ELISA: a) Se sensibilizó la placa como se describió anteriormente; b) se realizó un tratamiento de distintos pocillos la misma placa con distintas concentraciones de NaIO₄ (0-20mM) en buffer acetato pH4.5 a temperatura ambiente por una hora; c) luego de un lavado con el mismo buffer, se incubó con NaBH₄ 50mM por 30' a temperatura ambiente; d) luego de lavado con PBS-T se siguió la técnica de ELISA habitual.

2-WESTERN-BLOTT: Después de la transferencia (2117250 Novablot Electrophoretic Transfer Kit LKB) a nitrocelulosa y el bloqueo, se cortaron tiras y se enjuagaron con buffer acetato y expusieron a

distintas concentraciones de NaIO_4 (0.1-20 mM) en buffer pH 4.5 una hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Las tiras control se incubaron en el mismo buffer en la oscuridad. Se enjuagaron con buffer acetato y se expusieron a 50 mM NaBH_4 en PBS durante 30' a 23 °C. Luego se continuó el inmunoblott del modo convencional.

*TRATAMIENTO DEL ANTIGENO CON ENDOGLICOSIDASA F

Para deglicosidar glicoproteínas se trataron 50 ug de PES calentándolo en 50 ul de buffer de solubilización (100mM NaH_2PO_4 , H_2O , 50 mM EDTA, 1% beta-mercaptoetanol, 0.1% SDS, completar a 100ml con H_2O) 2-5' a 95 °C. Se adicionó 2-5 ul de endo-F (SIGMA) diluido 1/100. Luego se agregó 10 ul de Triton X-100 e incubó 4 hs a 37 °C. Se hizo luego un Western Blott con Ag tratado con la enzima y sin tratar, enfrentando ambos al sobrenadante de cultivo de A8G2.

RESULTADOS

Se obtuvieron 16 híbridos específicos contra Ag presentes en PE según screening por ELISA. Solo uno de ellos fue de clase IgG y el resto IgM. Se seleccionó el híbrido de clase IgM de mayor título (A8G2) para completar su caracterización.

El A8G2 reconoce por Immunoblotting: a) subunidades entre 116 y 28 kDa en PES, b) subunidades entre 99 y 21 kDa en moléculas de superficie de PE extraídas con MEGA-10 y c) una sola banda de 67 kDa en Iscom preparados a partir del extracto MEGA-10 (figura 1). En IEE se observa el característico patrón de microheterogeneidad con 2 bandas de pI 6.9 y 7.1 confirmando su monoclonalidad (figura 2). En los ensayos de IFI usando A8G2 y una suspensión de PE viables se puede apreciar fluorescencia homogénea en superficie de los mismos (figura 3 y 4). Por cromatografía de afinidad con Con-A Sepharosa se separó el sonificado de

PE en una fracción reactiva y otra no reactiva. Se analizó por ELISA la reacción contra ambas fracciones de los 9 AcMo de mayor título en el screening así como también la reacción de los 3 provenientes de otros laboratorios (dirigidos contra LH y oncosferas). Se observó que 11 (90%) de los AcMo analizados reaccionan con la fracción reactiva. Se ensayó por ELISA la reactividad de A8G2 con distintos Ags: 1 - no se observa reacción cruzada con LH 2- no reacciona con sobrenadante de PE con 10 días de cultivo, lo que significa que no reconoce Ag de excreción-secreción preparado en esas condiciones

3- reacciona con extracto Mega 10. Se ensayó la reactividad de los AcMo por ELISA e Inmunoblotting contra PES tratado con peryodato en condiciones que destruyen los epítopes glucídicos sin afectar los peptídicos. El efecto de las concentraciones crecientes de NaIO₄ (0-20 mM) usadas para el tratamiento, sobre la unión de los AcMo al Ag se hizo claramente manifiesto a concentraciones iguales o superiores a 10 mM. En esas condiciones se observa anulación de la respuesta en ELISA en el 90% de los casos.

Se ensayó por inmunoblotting la reacción del sobrenadante de A8G2 con PES tanto tratado con ENDO-F como sin tratar, observándose una neta desaparición de las bandas en el primer caso. (Figura 5)

Los resultados del ensayo de inmunización pasiva de ratones con el AcMo A8G2 fueron los siguientes: a) Los ratones tratados exhibieron menor número de QH (0-20 por ratón) y de menor diámetro (0,5 - 5,0 mm) que los observados en los ratones controles (30 - 50 QM de 3 - 5 mm), pero las diferencias no fueron significativas b) los QH en los controles se observaron distribuidos en todo el peritoneo y en los tratados sólo se encontraron en el punto de inoculación infestante.

c) los títulos máximos en ELISA (ver Figura 6) de Ac anti PES se

observan a los 28 días de infestación y fueron de 9-15 U/ml en los ratones tratados y 17-34 U/ml en los controles.

DISCUSION

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el 90% de los AcMo analizados son específicos para epítopos glucídicos, lo que se evidenció por tratamiento del Ag con periodato, con enzima ENDO-F y por la separación por cromatografía de afinidad con Con-A Sepharosa de los Ag ensayados.

Considerando que el AcMo A8G2 reconoce proteínas de superficie de PE extraídas con el detergente no iónico MEGA 10 así como ISCOMs preparados a partir del mismo extracto y exhibe una reacción positiva de IFI con una suspensión de PE viables, se puede sugerir que el AcMo A8G2 está dirigido contra epítopos glucídicos de Ags de superficie de PE.

Esta caracterización sugirió que el AcMo A8G2 podría estar reconociendo un epítipo glucídico relevante de la superficie de PE en relación a la interacción huésped/parásito. Para verificarlo se llevó a cabo un ensayo de inmunización pasiva en ratón con A8G2 con posterior desafío con PE vivos, con el objeto de evaluar su capacidad protectora.

Los resultados de este ensayo sugieren que, aunque A8G2 parece exhibir una protección parcial esta no es significativa. Por esta razón no se justifica proceder a estudiar una metodología de cultivo masivo de este hibridoma.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BRODEUR B.R., TSANG P. & LAROSE Y. (1984) Parameters affecting ascites tumour formation in mice and monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods* 71, 265

CRAIG P.S., HOCKING R.E., MITCHELL G.F. & RICKARD M.D. (1981) Murine Hybridoma-derived antibodies to the processing of antigens for the immunodiagnosis of Hydatid (*E. granulosus*) infection in sheep (1981) *Parasitology* 83, 303

CRAIG P.S., MACPHERSON C.N.L. & NELSON G.S. The identification of eggs of *Echinococcus* by immunofluorescence using a specific anti-oncospherical monoclonal antibody (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 152

DI FELICE G., PINI C., AFFERNI C. & VICARI G. Purification and partial characterization of the major antigen of *E. granulosus* (Antigen 5) with Monoclonal Antibodies (1986) *Molecular and Biochemical Parasitology* 20, 133

DI FELICE G. & SIRACUSANO A. Monoclonal Antibodies for immunodiagnosis of human hydatidosis (1987) *Parasitology Today* 3, 25

DUNBAR B.S. Two-dimensional electrophoresis and Immunological techniques (1988) ed. Plenum Press, N.Y. & London

GALFRE G. & MILSTEIN C. Preparation of Monoclonal Antibodies (1981) *Methods in Enzymology* 73 ed. Academic Press, London

GODING J.W. Monoclonal Antibodies : Principles and Practice (1983) ed. Academic Press, London

GUISANTES J.A. & VICENTE F. Paraffin embedded "*Echinococcus granulosus*" protoescoleces as suitable antigen in the indirect immunofluorescence test for human hydatid disease (1983) *Boll. Ist. sieroter, Milan* 62, 85

HEATH D.D., PARMETER S.N., OSBORN P.J. & LAWRENCE S.B. (1981) Resistance to *E. granulosus*, infection in lambs. *Journal of Parasitology* 67, 797

HEATH D.D. (1986) Immunobiology of *Echinococcus* infection In *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*, ed. R.C.A. Thompson, George Allen & Unwin, London

KYSHE-ANDERSON J. (1984) Electrophotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrilamide to nitrocellulose. Journal of Biophysical and Biochemistry Methods 10,203

LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227, 680

MCMANUS D.P. & SMYTH J.D. (1986) Hydatidosis : Changing concepts in Epidemiology and Speciation. Parasitology Today 2, 163

NGO T.T. & LENHOFF H.M. (1980) A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. Analytical Biochemistry 105, 389

NIETO A., EHRLICH R. & MCMANUS D. (1988) Regional Workshop on Hydatid Disease. Parasitology Today 4, 81

PHARMACIA Affinity Chromatography : principles & methods (1988) Printed in Sweden by Ljungforetagen AB

SHEPHERD J.C. & MCMANUS D. P. Specific and cross-reactive antigens of E. granulosus hydatid cyst fluid (1987) Molecular and Biochemical Parasitology 25, 143

SCHWABE C.W. (1986) Current status of hydatid disease: a zoonosis of increasing importance. In The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease, ed. Thompson R.C.A., George Allen and Unwin, London

ENCUENTRO DE UNO EN EL VENTILADOR CON EL ALMOZAR

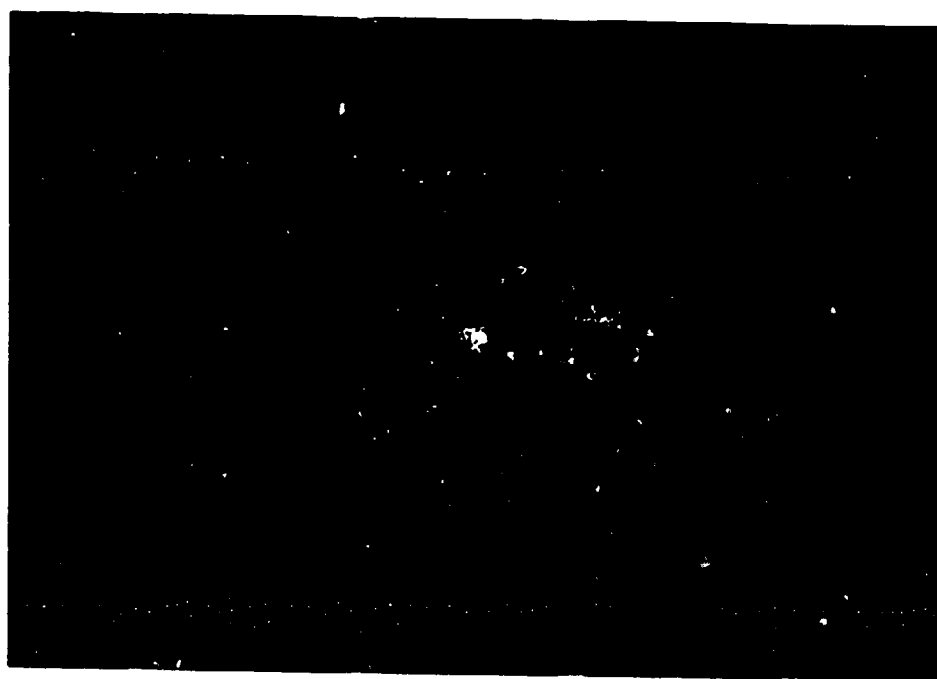


FIGURA 1 : IMMUNOBLOTTING CONTRA DIFERENTES ANTIGENOS DEL ACMD APOD
LINEA : (a) kit de bajos pesos moleculares
(b) PBS
(c) EXTRACCIO MEGA 10
(d) ISCOM



1204

ENCUENTRO DE UNO EN UNO EN EL VIADUCTO CON EL AEREO 2000

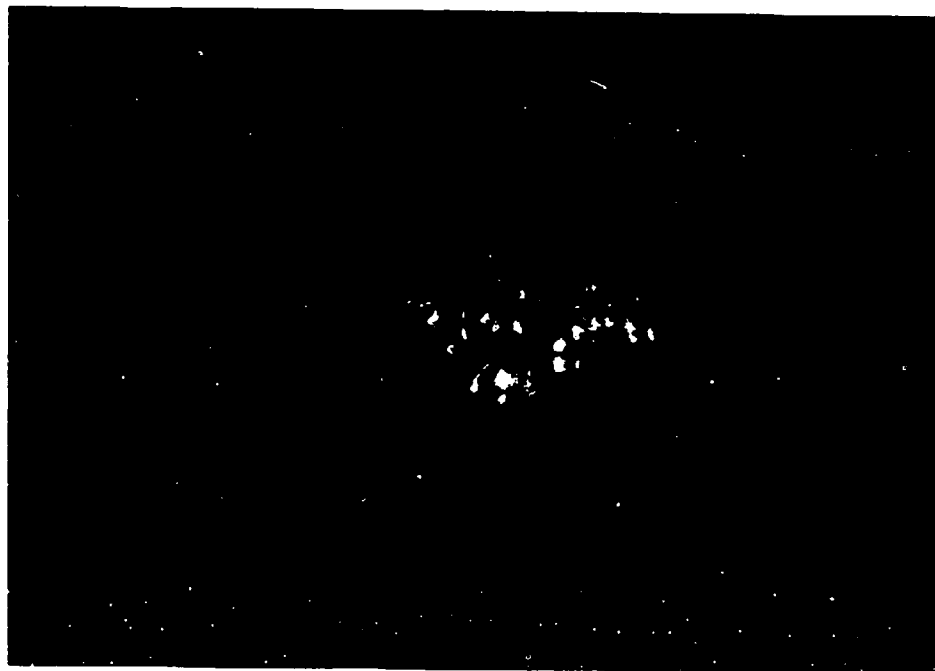
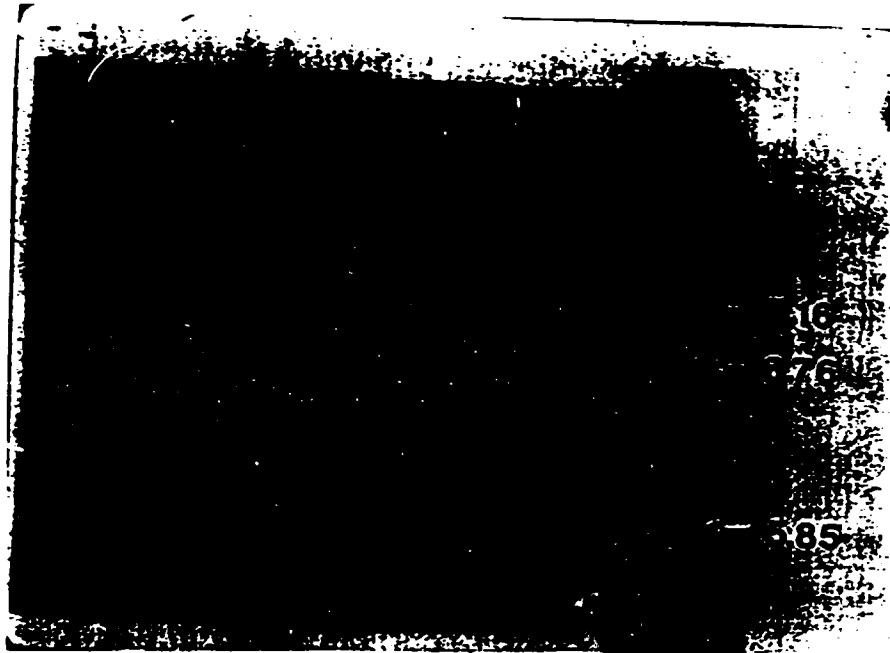


FIGURA 1 : ISOELECTROFORESE DEL ACNO ASG2
LÍNEA 1 (a) control
(b) ACNO ASG2
(c) marcadores de pI



ENCLOSURE TO THE PRESIDENT OF THE UNITED STATES



1. The first image shows a dark, almost black, rectangular area. In the bottom right corner, there is a small white label with the text "Nest".

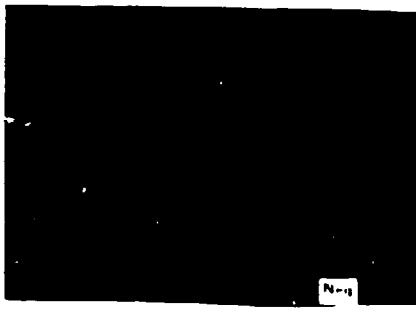
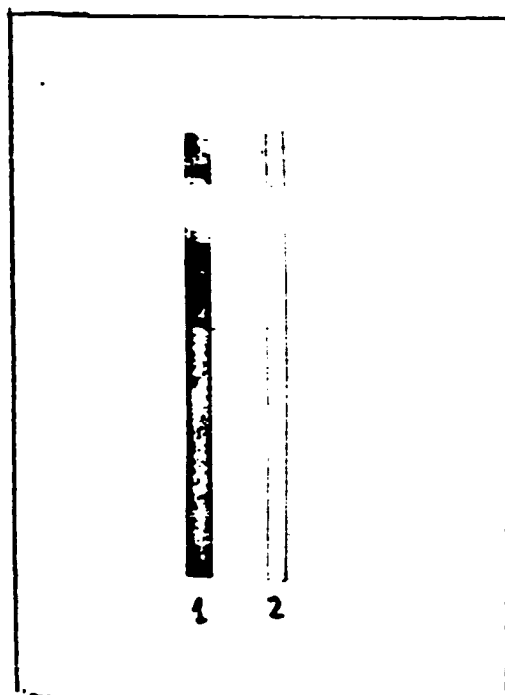


FIGURA 5 : INMUNOBLOTTING DEL AcMo ABG2 CONTRA
PES Y PES TRATADO CON ENDOGLICOSIDASA-F

LINEA 1 : PES
LINEA 2 : PES / ENDO-F



ENSAYO DE PROTECCION PASIVA

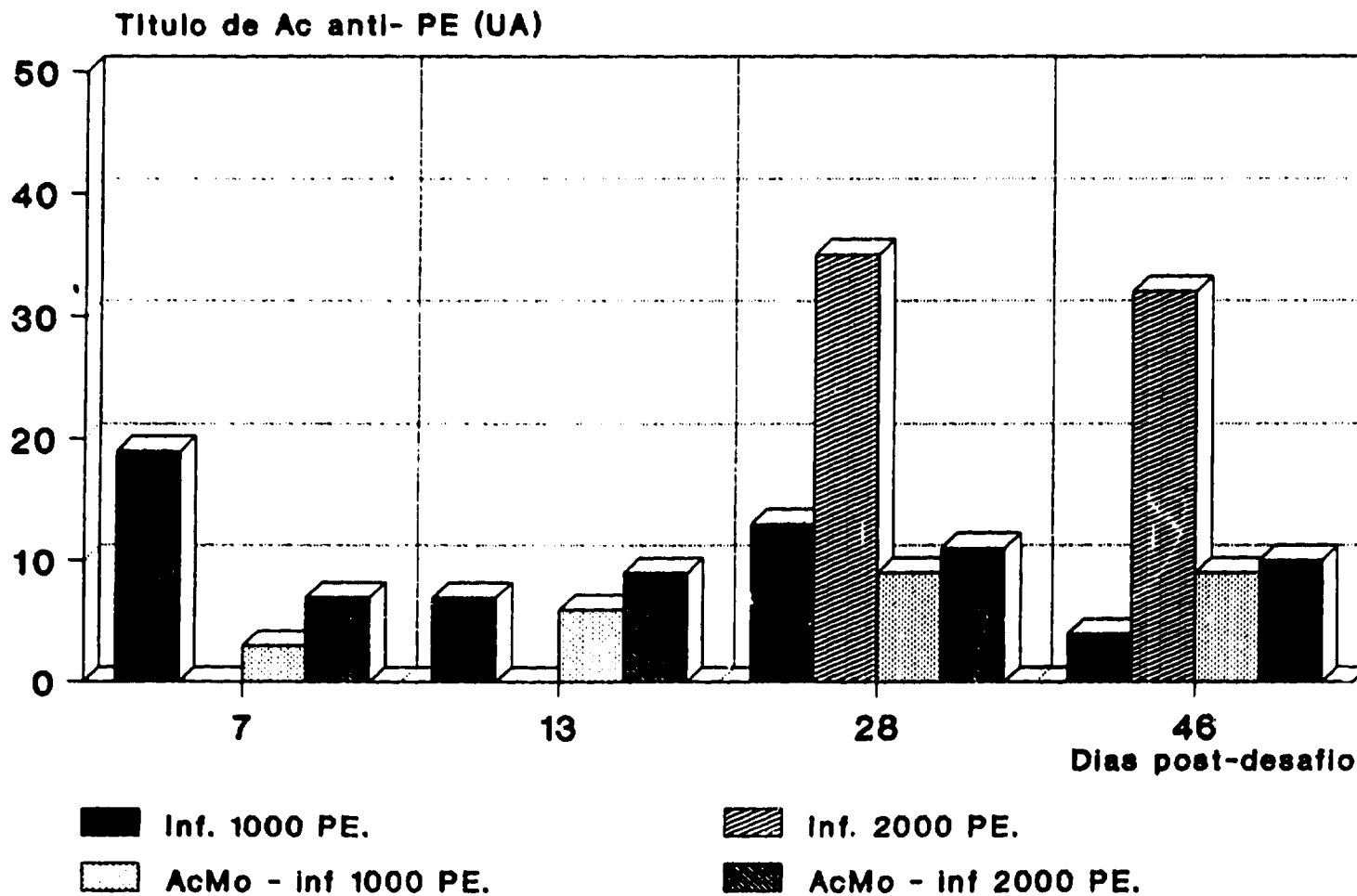


FIGURA 6