



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

19488

~~TECH~~ ~~SECRET~~
MONOCLONALES 510/143

BRASIL

1981 MAR 25

2/15/81

20p.

tablas

replu

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

PRUD / UNESCO / ONUDI

RLA / 83 / 003

CENTRO DE REFERENCIA : CENTRO DE BIOCIOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO - BRASIL

PARTICIPANTES:

BARBA T. ROCA (ECUADOR)

CUEVAS L. HERNANDEZ (BOLIVIA)

SALMA E. HERNANDEZ (VENEZUELA)

FEBRERO - MARZO 1991

INFORME TÉCNICO

Programa de capacitación personalizada en producción masiva de anticuerpos monoclonales

Actividades del programa de entrenamiento:

I.- SEMINARIOS

Se discutieron los siguientes temas:

- 1.- Métodos de cultivo celular y producción masiva de anticuerpos monoclonales.
- 2.- Producción en gran escala de anticuerpos monoclonales murinos, usando bioreactores de fibra hucca.
- 3.- Métodos de purificación de anticuerpos monoclonales.
- 4.- Anticuerpos monoclonales de segunda generación.
- 5.- Control de calidad en la producción de anticuerpos monoclonales.
- 6.- Vacunas anti-idiotípicas.

II.- TRABAJO PRÁCTICO

Durante el trabajo práctico usamos 2 tipos de hibridomas; el anti-B y el GMT3.

Las etapas del trabajo práctico fueron las siguientes:

- 1.- Expansión de los hibridomas :-Se expandieron los correspondientes hibridomas ,tanto en frascos de cultivo como en spinner.
- 2.- Estudio de los parámetros metabólicos : El objetivo fue establecer las condiciones de cultivo del hibridoma anti-B, que permitan una mejor estabilidad de las células ,así como una óptima producción de anticuerpos monoclonales.

Metodología:

De las células expandidas en el punto 1, fueron inoculados 16 frascos de cultivo (T-25) con 1×10^5 cel./ml, en un volumen final de 10 ml de medio RPMI-1640 ,10 % FCS mas gentamicina 40 ug/ml ,adicionalmente se incluyeron 2 frascos de cultivo con 10 ml de medio libre de células como control.

Los frascos fueron incubados en estufa a 37°C con 5% de CO₂. A partir de las 2 horas y diariamente se determinaron los siguientes parámetros : pH, concentración de glucosa, concentración de lactato, densidad celular y viabilidad, así como la presencia y actividad de anticuerpos monoclonales.

El pH se determinó en un potenciómetro, la glucosa mediante el método de la glucosa oxidada (Kit Bioclin Glucose-god-clin). La determinación de lactato fue mediante el test enzimático piruvato/lactato (Kit Sigma). El número de células fue determinado realizando conteo celular en cámara de Neubauer, y la viabilidad celular por exclusión en azul de tripano.

La presencia de los anticuerpos monoclonales fue medida por el ensayo inmunoenzimático ELISA en placas de polivinilo sensibilizadas con anti-mouse Ig G. La actividad del mismo fue realizada por hemaglutinación directa, usando eritrocitos del grupo B.

Resultados:

En la tabla 1 y figura 1 se muestran los resultados obtenidos:

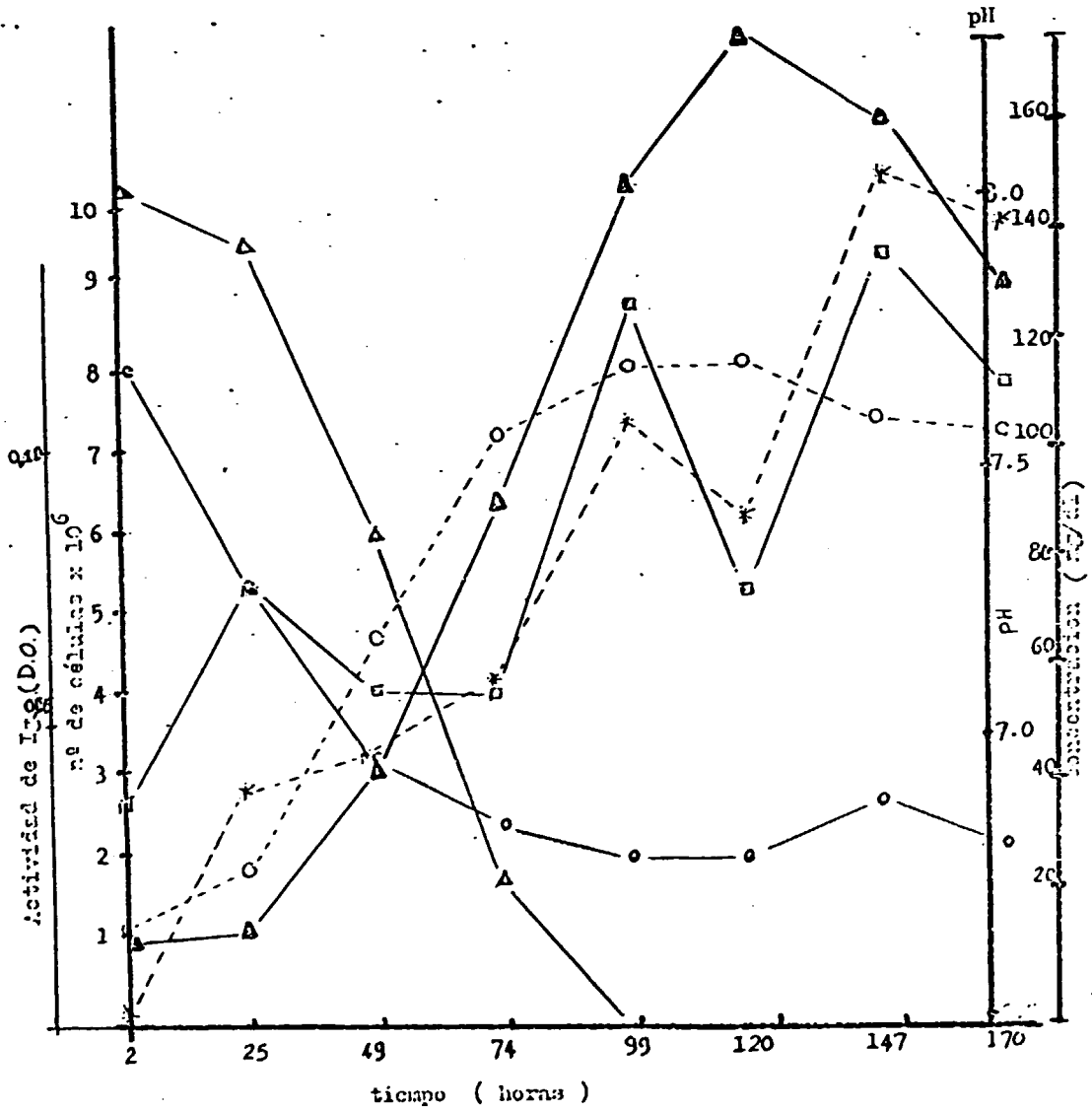
TABLA 1

Los datos presentados son el promedio de determinaciones por duplicado.

tiempo (hrs)	pH	nº de células (totalcs)	viabilidad %	Glucosa mg/dl	Lactato mg/dl	ELISA E_{492nm}	Título Hemaglut.
2	7.71	9.75×10^5	100	152.15	18.43	0	0
25	7.31	1.13×10^6	100	143.90	39.47	0.05	32
49 ^{1/2}	6.93	3.19×10^6	100	89.89	71.80	0.05	32
74 ^{1/2}	6.86	6.3×10^5	100	26.55	198.53	0.059	4096
99	6.8	1.03×10^7	100	0.0	120.09	0.133	4096
120 ^{1/2}	6.8	1.28×10^7	83.7	0.0	119.25	0.07	2048
147	6.9	1.1×10^7	96.8	0:0	110,0	0.141	8192
170	6.82	6.9×10^6	85.6	0.0	197.60	0.117	1024

*Los datos presentados corresponden a la presencia de Ig G en las respectivas muestras. Considerándose como indicador positivo unidades superiores a 0.05

CURVA METABOLICA



Δ nº de células ; ● pH ; Δ [glucosa] ; ○ [lactato]
 □ IgG puro ; * IgG 1/25(DO)

Del análisis de los datos obtenidos podemos determinar:

- a) El tiempo de duplicación celular es de aproximadamente 24 horas, encontrándose la máxima densidad a las 120 horas de cultivo (1.28×10^7 células).
- b) Particiéndose de una concentración de glucosa inicial de 153.5 mg/dl, el consumo máximo se encontró a las $74\frac{1}{2}$ horas (126,95 mg/dl) correspondiendo al momento de crecimiento celular en fase exponencial. A concentraciones de glucosa inferiores a 26.55 mg/dl las células entran en fase estacionaria.
- c) A medida que las células están en fase de crecimiento exponencial, observamos un aumento paralelo de las concentraciones de lactato en el medio, directamente relacionado con un descenso del pH y [glucosa].
- d) La producción de anticuerpos monoclonales ocurre durante la fase de crecimiento exponencial y se mantiene durante la fase estacionaria y al inicio del declive. La presencia y actividad de anticuerpos se encontró entre las 90 y 147 horas.

3) Entrenamiento en la tecnología de cultivo masivo de híbridos "in vitro"

3.1 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES POR CULTIVO EN FIBRA MUESA VITAFIBER (AMICON)

El sistema Amicon constituye un método alternativo de producción masiva de anticuerpos monoclonales. El mismo está constituido por: a) un cartucho formado por unidades de fibra, con 2 compartimientos: el espacio intracapilar o lumen de las fibras, y el espacio extracapilar, donde se presenta el crecimiento celular en alta densidad; b) un spinner con medio (reservorio); c) bomba de circulación; d) tubos de goma y filtros; e) y un agitador magnético. Todo este sistema colocado a 37°C .

Desarrollo

- a) Montaje del sistema: Se realizó en condiciones estériles

bajo flujo laminar . Se permitió la circulación de un litro de medio RPMI-1640 con gentamicina y 10 mM HEPES, libre de suero durante 72 horas con el objeto de eliminar compuestos tóxicos.

b) Preparación y siembra del inóculo : El hibridoma expandido como se indicó en la parte inicial de este informe, ^(el anticuerpo 3A1-8) fue inoculado al espacio extracapilar de la fibra (ECS) a una concentración de 4.37×10^8 células/ 5 ml de medio de cultivo.

c) Condiciones de la corrida

c.1) La velocidad del medio a través del sistema se inició con 60.12 ml/ min , aumentándose desde las 144 horas hasta el final de la corrida a 106.93 ml/ min. La dirección del flujo fue invertida inicialmente cada 24 horas ; cuando la densidad celular fue considerable, el mismo fue cambiado cada 12 horas.

Se reemplazaron los filtros cuando se observó marcada pulsación de los tubos de goma.

c.2) Al inicio de la corrida se utilizó medio RPMI con 10 % de suero fetal bovino , siendo reducido al 5% a partir de las 120 horas .De acuerdo a los parámetros metabólicos medidos en el espacio intracapilar (medio metabolizado) se realizaron los cambios necesarios de medio fresco.

d) Parámetros medidos: El control de las condiciones de cultivo se realizó midiendo los siguientes parámetros :

d.1) Diariamente pH, concentraciones de glucosa y lactato.

d.2) Periódicamente se removió medio del ECS y se determinó la actividad del producto por hemaglutinación directa.

Resultados

Se presentan tabulados los parámetros medidos en el espacio intracapilar durante la corrida

Tabla 2:

tiempo(horas)	pH	glucosa mg/dl	lactato mg/dl
0	7.43	151.2	17.9
42	7.22	82.46	68.7
55.2	7.04	80.79	74.8
68	7.04	63.75	91.8
92	7.00	52.12	96.3
118.5	6.91	95.51	87.95
142.5	6.95	64.97	82.42
164	6.99	84.86	-
184	6.89	73.07	-
210	6.71	36.22	96.29
232	7.12	109.5	51.54
264	-	145.2	0.839?
283.3	6.97	75.54	76.23
307.17	-	89.55	62.03
331.35	7.06	99.08	60.11
354.15	6.96	81.51	73.21
376	6.99	110.5	60.57
403.05	6.97	96.29	76.03
425.04	6.97	93.92	102.9
449	6.98	82.11	79.31
471.1	7.01	95.66	70.13
504.45	6.91	74.73	85.97
519.5	6.85	92.34	78.82
543	6.87	80.44	76.96
567	6.98	82.38	73.85
574	6.91	40.44	82.90

Tabla 3

Se presenta tabulada la actividad del producto:

tiempo (horas)	volumen extraído (ml)	título de hemaglutinación
92	5	128
118.5	5	480
232	20	1920
307.17	15	7680
400.05	15	7680
449	15	3840
543	20	4194304
574	50	131072

De los parámetros medidos podemos observar:

- a) Desde el inicio del proceso se observó un metabolismo alto, indicando que no se presentó una fase de latencia.
- b) Las concentraciones de glucosa y lactato en el medio intracapilar, fueron mantenidas dentro de un rango promedio que permitió un crecimiento celular y acumulación de Ac No.
- c) De acuerdo a los títulos de hemaglutinación obtenidas para las diferentes cosechas del M2F, podemos deducir que la concentración de anticuerpos monoclonales fué en aumento progresivo.

3.2) ENCAPSULACION EN ALGINATO DE SODIO

Otro método alternativo para la producción masiva de AdMo es el encapsulamiento de la células en alginato de sodio .

El encapsulamiento permite obtener mayores concentraciones celulares, puesto que se aumenta el área de crecimiento .Esto hace posible aumentar la producción de los anticuerpos monoclonales.

Metodología

Metodología

En este caso se utilizó el hibridoma OKT3, el cual fue expandido en spinner. Alcanzando la densidad celular esperada (60×10^6 cel), las células fueron centrifugadas a 300 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 30 ml de medio DMEM 10% HS. Esta suspensión celular fue mezclada con igual volumen de una solución de alginato de sodio al 2% y luego transferida a una jeringa con aguja 22^I/2 G. La mezcla fue goteada en forma uniforme sobre una solución de cloruro de calcio 125 mM (180 ml) colocada en un agitador magnético a velocidad mínima. Las perlas fueron lavadas sucesivamente con medio Mc Coy y finalmente resuspendidas en un medio DMEM 10% HS y cultivadas en un frasco spinner de 250 ml de capacidad.

Diariamente se realizaron las siguientes determinaciones:

pH, concentraciones de glucosa, lactato y actividad de AcCo. También se determinó el número de células / gramo de perlas y viabilidad celular, para lo cual las mismas fueron disueltas en un volumen adecuado de ETA 50mM.

Resultados:

Se presentan en la tabla 4:

Tabla 4

días de cultivo	pH	Glucosa mg/dl	nº de cel / g de alginato	viabilidad (%)	presencia de clúster (células)
0	7.4	364,9	—	—	—
2 (horas)	7.4	311,6	—	—	—
1	7.33	275,7	$4,4 \times 10^6$	79,6	25
2	7.13	160,1*	$8,97 \times 10^5$	63,6	125
3	7.32	304,9	$7,73 \times 10^5$	90	625
4	7.97	180,2*	$2,66 \times 10^6$	80,9	625
5	7.22	165,1*	$3,78 \times 10^6$	86,53	3125
6	7.03	150,1*	$1,07 \times 10^6$	54,7	15.125
7	6.95	102,6*	$2,17 \times 10^6$	72	>78.125
8	6.68	nd	$2,53 \times 10^6$	82,8	>78.125

nd no determinado

* se realizó el cambio de 100 ml de medio fresco.

** Se determinó la presencia de anticuerpos mediante la técnica de ELISA sensibilizando con anti-IgG de ratón.

Observación: a partir del 4º día, se observó la presencia de clústers en el interior de las perlas.

La determinación de lactato no fue determinada.

3.3) CULTIVO DE HIBRIDOMAS EN SACO DE DIALISIS

Otra técnica desarrollada para el cultivo de células a altas densidades y concentración de un producto en forma pura y a un costo bajo, ha sido el cultivo en sacos de diálisis.

Metodología:

a) Inóculo: Se trabajó con dos hibridomas: el anti-B y el OKT3, siendo el inóculo del hibridoma OKT3 1.5×10^6 cel./ ml en un volumen final de 10 ml de medio RPMI 10 % HS, y el del anti-B 0.4×10^6 cel / ml en un volumen final de 10 ml de medio RPMI-1640 con 10 % de HS.

b) Tratamiento de los sacos de diálisis: Se utilizaron sacos de 2.4 cm de diámetro por 7 cm de longitud y un cut off de 14 Kd.

Con el objeto de eliminar sustancias tóxicas (glicerol sulfuros, metales pesados, etc) se sometieron los sacos al siguiente proceso de lavado :

b.1) Dos veces en etanol al 50 %.

b.2) Dos lavados en bicarbonato de sodio 10 mM.

b.3) Dos en EDTA 1mM.

b.4) Dos en agua destilada.

Los lavados fueron de una hora cada uno y en agitación. Dichos sacos de diálisis fueron almacenados en ácido acético al 10 % a 4°C.

c) Montaje: Los sacos de diálisis lavados fueron anudados en uno de sus extremos, mientras que en el otro se colocó una cánula de plástico con el fin de facilitar la manipulación. Luego se esterilizaron 2 horas en agua destilada a ebullición. Estos sacos fueron inoculados con las células en la concentración establecida y luego anudadas con hilo estéril, retirándose la cánula. Los sacos fueron introducidos en tubos de 21 cm de largo por 4 cm de diámetro con 50 ml del medio de cultivo.

La incubación se realizó en agitación en sistema de rotación a velocidad mínima a 37°C.

Resultados

En la tabla nº 4 se muestran los resultados obtenidos al medir consumo de glucosa para ambos sacos de diálisis

Tabla nº 4

Días de cultivo	Concentración de Glucosa* (mg/dl)	pH *	Concentración de Glucosa** (mg/dl)	pH **
0	364.9	7.4	157.5	7.7
1	321.9	7.3	127.1	7.53
2	311.4	7.33	131.1	7.4
3	273.2	7.4	102.6	7.14
4	258.3	7.22	n.d.	7.02
5	188.3	7.22	-	-
6	306.3	7.5	-	-

* OKT3, inóculo 1.5×10^5 cel/ml.

** anti-B, inóculo 0.4×10^6 cel/ml.

Los datos sobre la concentración de glucosa en el medio fuera del saco de diálisis son de importancia en el seguimiento de los cultivos, ya que es el único parámetro que puede ser determinado.

El número de células, viabilidad y actividad de anticuerpo se determinaron finalizada la experiencia, en la tabla nº 5 se muestran dichos resultados:

Tabla nº 5:

	OKT3	α -B
nº de células $\times 10^6$	50	40
% de viabilidad	83,3	84,2
Anticuerpo	D.O. en ELISA > que el límite superior (hasta dilución: 78125)	Título de hemaglutinación: 43046721.

4) PURIFICACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL POR PROTEINA A-SEPHAROSA

Se realizaron 3 purificaciones del AcMo anti-B a partir de los medios del espacio extracapilar de la fibra hueca (AMICON).

Metodología

Las muestras de cada purificación previa filtración por 0.22 μ fueron pasadas por una columna C10/10 (Pharmacia) conteniendo 10 ml de proteína A-Sepharosa. Una vez equilibrada con el buffer Tris 0.05 M/ 0.15 M NaCl pH 8.6 hasta alcanzar la línea base, pasamos la muestra con un flujo volumétrico de 0.8 ml/min. Después de pasar la muestra, se lavó con el mismo buffer hasta recuperar la línea base. A esta fracción no unida de la columna se denominó Ft (flow through).

Debido a que no conocíamos el isotipo del AcMo a purificar, se realizó la elución sucesiva con diversos buffers: a) buffer fosfato 0.05 M/ 0.15 M NaCl, pH 7.0; b) buffer citrato 0.05 M / 0.15 M NaCl, pH 5.5; c) buffer acetato 0.05/0.15 M NaCl, pH 4.3 y d) buffer glicina 0.05 M/ 0.15 M NaCl pH 2.3. El anticuerpo eluido fue neutralizado con Tris base hasta pH 7.0.

Posteriormente la columna fue lavada con buffer Tris 0.05M/ 1M NaCl pH 8.6, buffer d y por último con buffer de equilibrio. Las fracciones obtenidas fueron dializadas en PBS pH 7.2 por 48 horas. Las fracciones obtenidas de cada purificación fueron ensayadas en su actividad biológica por hemaglutinación directa, y la pureza de los diferentes eluatos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5% en presencia de SDS en condiciones nativas y reducidas y en algunos casos en geles de gradientes de 3-25% Phast-System (Pharmacia).

Resultados

1) Primera purificación: Fueron purificados 15 ml de una

mezcla de ECS (118 y 232 horas) en las siguientes condiciones

-velocidad de registro 0.15 cm/ min.

-flujo volumétrico 0.8 ml/min.

En la figura nº 2 se muestra el cromatograma de la primera purificación, en la figura 3 se muestra los SDS-PAGE al 12.5 % y en gradiente 8-25 % (Phast-System) en condiciones reducidas y teñidas con plata, mostrándose una baja concentración del anticuerpo purificado.

2) Segunda purificación: Fueron purificados 33 ml de una mezcla de ECS (331 h, 449 h y 543 h) en las siguientes condiciones :

velocidad del registro: 0.05 cm/min

flujo volumétrico :0.4 ml/min

Puesto que en la primera purificación no hubo elución de picos con buffer fosfato, este fue eliminado de los pasos de elución .

En la fig. 4 se observa el cromatograma de la segunda purificación, mostrándose la secuencia de elución con los distintos buffers. En la fig 5 se muestra el SDS-PAGE, 12.5 % en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue. Se observa alta concentración del AcMo.

3) Tercera purificación: Fueron purificados 40 ml del ECS de 574 h en las siguientes condiciones.

- velocidad de registro:0.05 cm/min.

- flujo volumétrico:0.4 ml/min.

En esta purificación se utilizó ^{para} elución del pico del anticuerpo, buffer citrato con pH 3.5 el cual es menos drástico que el uso de glic. na pH 2.3.

En la figura 6 se muestra el cromatograma de la tercera purificación, donde se observa la secuencia de elución con los distintos buffers.

En la fig. 7 se muestra el SDS-PAGE al 12.5 % en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue: También observamos alta concentración del AcMo.

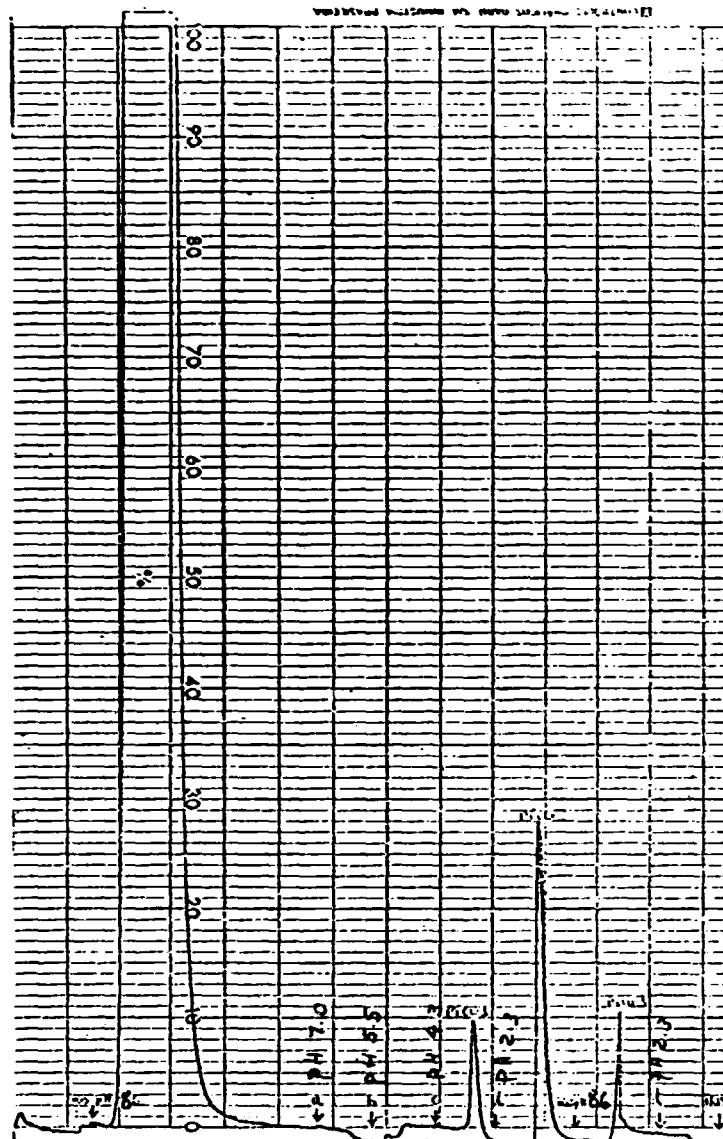


FIGURA nº 2 Cromatograma de la purificación nº 1.

volumen de la muestra 15 ml ; buffer de union: tri^a 0.05 M
 pH 8.6 ; buffers de elución: 1º fosfato 0.05 M/0.15 M NaCl,
 pH 7.0; 2º citrato 0.05M/0.15 M NaCl, pH 5.5; 3º acetato 0.05 M/
 0.15 M NaCl, pH 4.3; 4º glicina 0.05 M/0.15 M NaCl, pH 2.3
 buffer de regeneración: glicina pH 2.3

flujo volumetrico: 0.8 ml/ min

velocidad de registro : 0.15 cm/min

Actividad de h₂O en los picos por hemaglutinación = el pico con acti-
 dad fue el nº 2 con un título de 256.

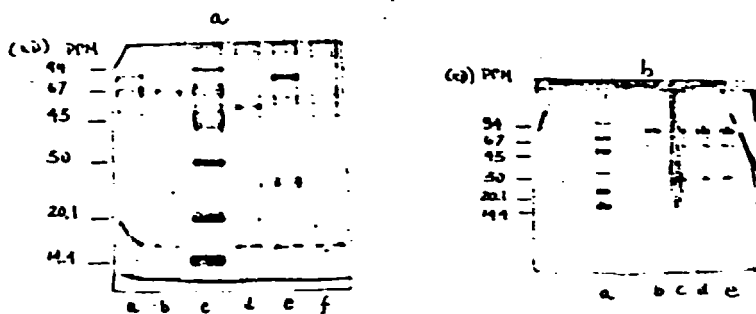


Fig 3 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas:

a) al 12.5 % en condiciones de reducción, teñidas con plata

Los carriles corresponden a:

- canal a: muestra precolumna
- canal b: flow through
- canal c: patrón de peso molecular (MW)
- canal d: pico 1 (pH 4.3)
- canal e: pico 2 (pH 2.3)
- canal f: pico 3 (pH 8.4)

b) en gradiente de 8 a 15 %, bajo 4 condiciones diferentes:

- canal a: patrón de peso molecular (MW).
- canal b: muestra del pico 2 diluida 4/5 en buffer con beta mercaptoetanol y hervida 5 minutos
- canal c: muestra del pico 2 diluida 4/5 en buffer con beta mercaptoetanol y hervida 10 minutos
- canal d: muestra del pico 2 diluida 3/5 en buffer con beta mercaptoetanol y hervida 5 min.
- canal e: muestra del pico 2 diluida 3/5 en buffer con beta mercaptoetanol y hervida por 10 minutos.

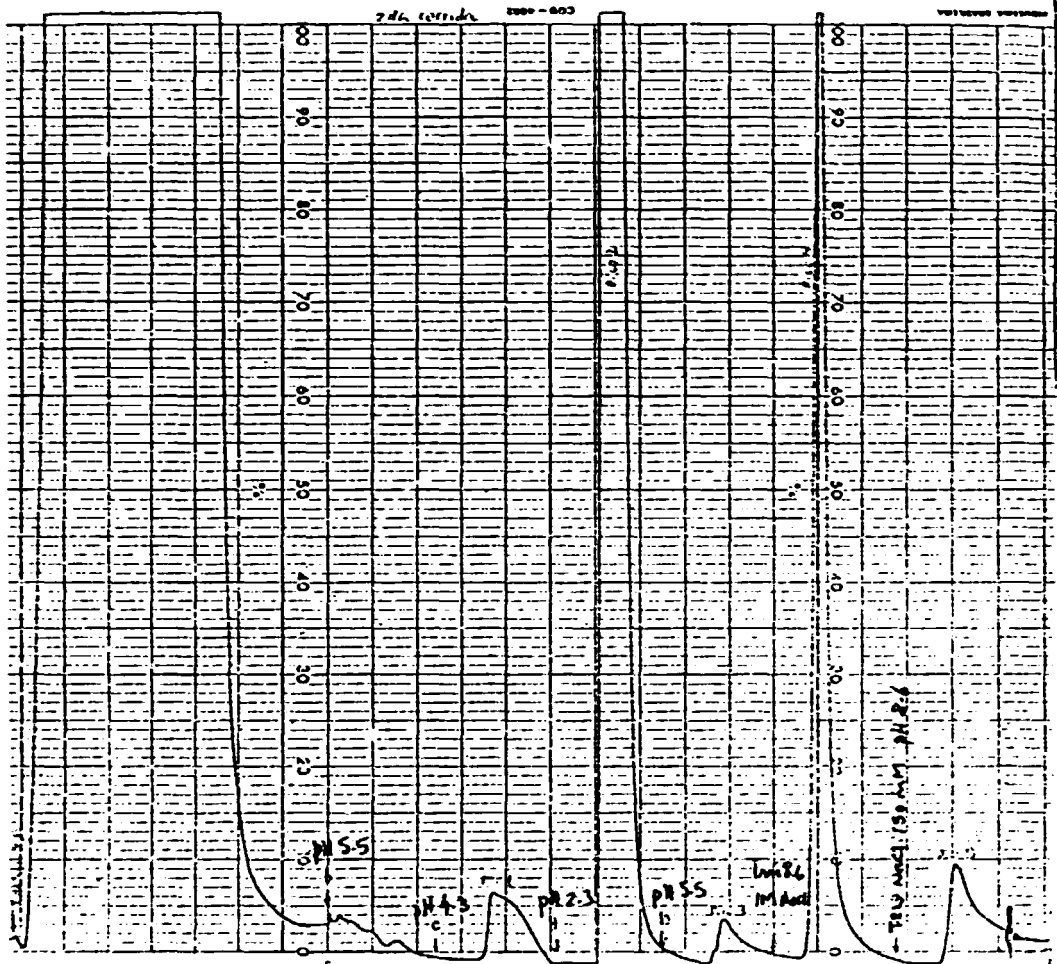


Fig 4 Cromatografía de la purificación nº 2

volumen de la muestra: 33 ml

buffer de unión: tria 0.05 M pH 3.6

buffer de elución: 1º citrato 0.05/0.15 M NaCl, pH 5.5

2º acetato 0.05/0.15M NaCl, pH 4.3

3º glicina 0.05/0.15M NaCl, pH 2.3

buffer de regeneración: glicina, pH 3

flujo volumétrico: 0.4 ml/min

velocidad de registro: 0.05 cm/min.

Actividad de ActH en los picos por hemaglutinación:
se cuenta actividad en los picos 2 (con un título de 1.7×10^{10} y picos 3 (con un título de 64).

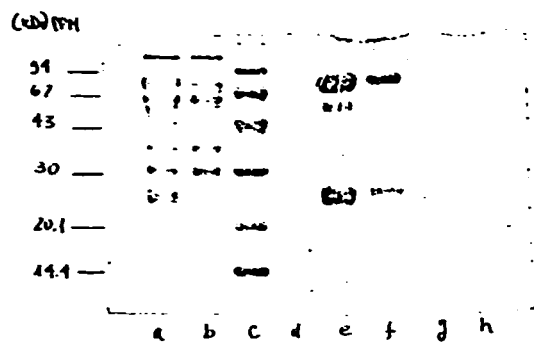


Fig. 5 SIG-PAGE al 12.5% en condiciones de reducción de las fracciones obtenidas de la purificación 2 teñidas con Coomassie Blue

Los canales corresponden a:

- canal a: pre-columna.
- canal b: flow through (Ft).
- canal c: PPH.
- canal d: pico 1 (pH 4.3)
- canal e: pico 2 (pH 2.3)
- canal f: pico 3 (pH 5.5)
- canal g: pico 4 (Tm 1M NaCl pH 8.6)
- canal h: pico 5 (Tm 150mM NaCl pH 8.6)

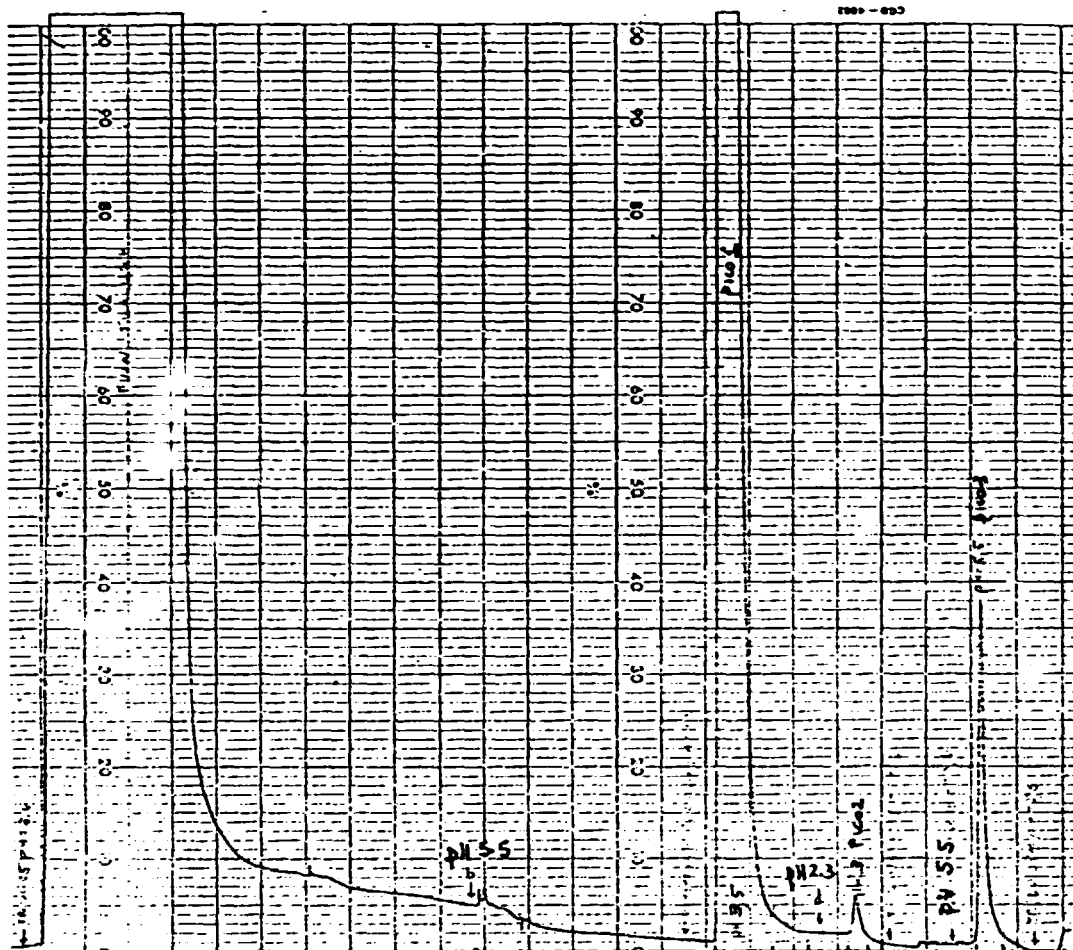


Fig 6. Cromatografía de la purificación nº 1.

volumen de la muestra: 40 ml.

buffer de unión: tria 0.05 M, pH 8.5

buffer de elución: 1º citrato 0.05M/0.15M, pH 5.5
 2º citrato 0.05M/0.15M, pH 8.5
 3º glicina 0.05M/0.15M, pH 2.3

buffer de regeneración: tria 0.05 M, pH 8.5, glicina 0.05M, pH 2.3

flujo volumétrico: 0.5ml/min

velocidad de registro: 0.05 cm / min.

Actividad de λ Ho en los picos por hemaglutinación: se encontró actividad en los picos 1 (con título de 32768) y pico 2 (con título de 64).

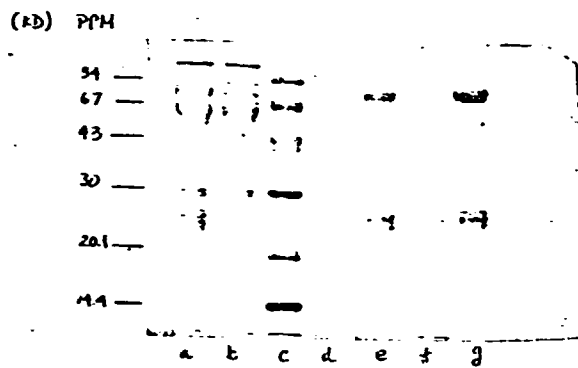


Fig.7 SDS-PAGE al 12,5% en condiciones de reducci3n de las fracciones obtenidas de la purificaci3n 3, te- nidas con Coomassie blue.

Los carriles corresponden a:

- canal a= Pre-columna.
- canal b= Flow Through
- canal c= PPM.
- canal d= Pre-pico 1 (pH 3.5)
- canal e= Pico 1: (pH 3.5)
- canal f= Pico 2. (pH 2.3)
- canal g= Pico 3. (pH 5.5)

CONCLUSIONES

Tanto las actividades teóricas como prácticas fueron culminadas.

Con respecto al trabajo experimental, se adquirió de la experiencia necesaria para la producción masiva de anticuerpos monoclonales. En lo referente al montaje de la fibra huaca (AMICON) hemos obtenido resultados muy positivos, concentrándose el AcMo anti-B con cierto grado de pureza y altos títulos de hemaglutinación. Los resultados obtenidos encapsulando células en alginato, estando aún en curso, han permitido la obtención de AcMo concentrado. También se realizó el montaje de una técnica alternativa, como es el cultivo en sacos de diálisis. Del mismo obtuvimos muy buenos resultados concentrándose bien los AcMo; OKB y α B. partiendo de diferentes inóculos.

Se purificaron los sobrenadantes del EJS de fibra huaca de Amicon por proteína A sepharosa. Se obtuvo un cierto grado de pureza puesto que en los SDS-PAGE aparece una banda entre 67-94 Kd, que posiblemente sean agregados del AcMo, esto no pudo ser confirmado.

AGRADECIMIENTOS

Para concluir el presente informe, queremos manifestar nuestro sincero agradecimiento a la Dra. Ana Maria Moro Furlani por su orientación, enseñanza y amistad.

A Mariateresa Rodríguez, Miriam Nakamura y Mara Lucia Zucheran por su colaboración y amistad en nuestra permanencia en el laboratorio.

También agradecer a la Dra. Celia Dona Salete y a todo el personal de Biotecnología por brindarnos su amistad y lograr que nuestra estadía en el Brasil sea grata.

Muito Obrigado por todo

Nancy, Rosa y Heriberto .