



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

19159

398
proyectos

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

Contrato No. 89/60

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

Primer Año de Actividades:

País: Cuba

Informe Técnico Final

1/30

**"PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES. UN
ESFUERZO COMPARTIDO EN LATINO AMERICA".**

INFORME DE EJECUCION #4. Octubre-Diciembre de 1990

Este es el cuarto y último informe de ejecución de la fase de adiestramiento del Proyecto, por parte del Laboratorio de Referencia ubicado en la División de Hibridomas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana, Cuba. Incluye los resultados del adiestramiento de los representantes de cuatro países (Venezuela, Ecuador, Chile y Argentina) durante el periodo comprendido entre el 1 de octubre y mediados de diciembre de 1990. Su composición es: Gestiones de Compra de Equipos y Materiales, Desarrollo del Entrenamiento, Conclusiones y Anexo (informe de los estudiantes).

Presupuesto, y Gestiones de Compra de Equipos y Materiales

Está en ejecución la recepción de materiales correspondientes a los dos pagos restantes de 1990 (USD 9100.00 y USD 9000.00). Se acaba de recibir el primer pago por USD 16,000.00 correspondiente al contrato para 1991, recién firmado. Se comenzará de inmediato el proceso de solicitud de ofertas y contrataciones.

Desarrollo del Entrenamiento

No se presentaron dificultades en el comienzo del adiestramiento y el curso comenzó en la primera semana de octubre con los estudiantes: Monika Merino (Ecuador), Nunciada Salma (Venezuela), Rodrigo Ramos (Chile) y Alberto Horenstein (Argentina).

El trabajo se desarrolló en lo esencial acorde con la programación reestructurada para ocho semanas, según la sugerencia del segundo grupo, y las semanas adicionales se cubrieron con aspectos de la preferencia de cada estudiante. En el curso participaron ocho investigadores y siete técnicos de la División de Hibridomas, y se desarrollaron los siguientes aspectos:

(a) Teoría.-

Los estudiantes recibieron las siguientes conferencias:

1. Aspectos generales sobre la tecnología anticuerpos monoclonales (AcM).
2. Proyectos de Trabajo de la Agrupación de Hibridomas y del CIGB.
3. Uso de ratones híbridos para aumentar la producción de AcM.
4. Uso de reactores de fibra hueca para producir AcM.
5. Sistemas de ensayo para AcM.
6. AcM por ingeniería genética.
7. AcM bifuncionales.
8. Producción de AcM en bioreactores homogéneos.

Las estudiantes impartieron los seminarios estipulados en el programa, a partir de un paquete de artículos fundamentales sobre generación y producción

de AcM; estos fueron:

1. Aspectos generales sobre el cultivo masivo
2. Obtención de ascítis para la producción de AcM
3. Encapsulación de hibridomas en alginato
4. Métodos generales para la purificación de anticuerpos
5. Fusión celular para la producción de hibridomas murinos
6. AcM humanos
7. Dos artículos seleccionados por los estudiantes

También los estudiantes asistieron a los seminarios teóricos semanales de la División de Hibridomas sobre temas diversos que incluyen investigaciones sobre producción, purificación, aplicación y nuevas tecnologías en AcM.

Efectuaron visitas de trabajo al Instituto de Oncología y Radiobiología de la Habana, y al Centro Nacional de la Vacuna Antimeningocócica.

(b) Práctica (34 horas semanales):

Las estudiantes realizaron las siguientes actividades:

1. Aspectos generales sobre el cultivo de hibridomas:

Descongelación de hibridomas. Preparación de medios de cultivo. Valoración del crecimiento del hibridoma en ambos medios. Montaje de ELISA para el testaje de los sobrenadantes. Congelación de hibridomas para banco celular. Clonación de células de hibridoma. Fusiones demostrativas.

2. Cultivo de hibridoma "in vivo":

Inoculación de hibridomas en ratones BALB/c. Evaluación del prendimiento. Obtención de líquido ascítico. Procesamiento y almacenaje del líquido ascítico para su posterior purificación. Ensayo de las condiciones óptimas de unión de anticuerpos a diferentes matrices cromatográficas. Evaluación de las condiciones óptimas de elución de anticuerpos. Purificación de ascítis. Control de calidad.

3. Cultivo de hibridoma "in vitro":

Encapsulación de hibridomas en perlas de diferentes concentraciones de alginato de calcio. Seguimiento de parámetros tales como viabilidad y concentración celular, y producción de anticuerpos, en diferentes condiciones de cultivo. Montaje de un biorreactor de fibra hueca (Acusyst R) y cultivo de hibridomas inmovilizados. Cultivo de hibridomas en sacos de diálisis. Purificación de AcM a partir de sobrenadante.

Conclusiones

1. Se cumplieron los objetivos estipulados en el proyecto. Las estudiantes adquirieron un basamento teórico y práctico que les permite comenzar de inmediato la producción de AcM mediante cultivo. El modelo explotado fue el de la encapsulación de los hibridomas en alginato de calcio, y su mantenimiento en frascos "spinner", tecnología asequible a laboratorios sin grandes recursos. También se hizo evidente que el cultivo en sacos de diálisis puede ser empleado en los laboratorios para pequeñas producciones. Los alumnos se

relacionaron además con el bioreactores Acusyst-R de fibra hueca, comprobando su funcionamiento, y recibieron un entrenamiento en los principios y métodos cromatográficos fundamentales para la purificación de AcM.

2. El programa incluyó opciones adicionales y los alumnos adquirieron además formación teórica y práctica que les permite abordar la propagación de los hibridomas "in vivo", en ratones BALB/c, y purificar los AcM a partir del ascitis tumoral producido en ellos. También vieron procedimientos de fusión para la generación de hibridomas de ratón, y transformación de linfocitos humanos para para la producción de líneas permanentes que secreten AcM humanos.

3. Sin duda alguna, este fue el mejor de todos los grupos que han asistido al adiestramiento, destacándose por su armonía, dedicación al trabajo y al estudio, seriedad en la preparación de las conferencias y seminarios asignados y resultados experimentales. Las relaciones personales establecidas con el colectivo de la División de Hibridomas fue también excelente.

4. Los alumnos terminaron su trabajo enviando un manuscrito de artículo de técnicas a la Revista Biotecnología Aplicada, referente a procedimientos de purificación de anticuerpos monoclonales de ratón.

5. Las dificultades que se habían presentado durante los anteriores períodos de adiestramiento, referentes a una insuficiente atención de los apartamentos donde se alojan los estudiantes, fueron totalmente superadas.



Jorge V. Gavilondo Cowley, Ph.D.
Jefe, División de Hibridomas,
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Ave 31 entre 158 y 190, Apartado 6162, Cubanacán,
La Habana, CUBA. Telex: 512330 ING GEN CU, 511072 CUBA CIB
Tlef: 53-7-218654, 201409, 201308

La Habana, Cuba, diciembre 19, 1990

**CENTRO
DE INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA**

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

**PNUD/UNESCO/ONU
RLA 83 /003**

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

**PARTICIPANTES: MONIKA MERINO E. (ECUADOR).
NUNCIADA SALMA E. (VENEZUELA).
RODRIGO RAMOS M. (CHILE).
ALBERTO L. HORENSTEIN. (ARGENTINA).**

OCTUBRE - DICIEMBRE 1990.

INFORME TECNICO

PROGRAMA DE CAPACITACION PERSONALIZADA EN PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

I. ASPECTOS TEORICOS

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

1. Conferencias:

a. La tecnología de anticuerpos monoclonales (AcM). Aspectos generales. Proyectos de la División de Hibridomas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Aspectos generales del cultivo de hibridomas. Reactores de Fibra Hueca para producir AcM.

b. Uso de líneas de ratones para la producción de AcM.

c. Características de los AcM según su empleo. Uso de AcM en la purificación de moléculas diversas.

d. Ensayos para AcM.

e. AcM por Ingeniería Genética.

f. AcM bifuncionales.

g. Producción de AcM en bioreactor a burbujeo.

2. Seminarios:

a. Encapsulación de hibridomas en alginato. Cultivo de hibridomas en saco de diálisis.

b. Métodos generales de purificación de AcM.

c. Fusión celular para la obtención de AcM.

d. AcM humanos.

e. Estudio del efecto de nutrientes en el cultivo de hibridomas y producción de AcM (relacionado por los participantes).

f. Uso de vectores (shuttle vectors) en la generación de AcM bispecíficos. (Seleccionado por los participantes).

II. ASPECTOS PRACTICOS

1. Aspectos generales en el cultivo de hibridomas.

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

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

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

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

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

2. Entrenamiento en tecnología de cultivo masivo

2.1 Producción "in vivo "

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

2.2 Producción "in vitro".

2.2.1 Encapsulación en alginato de sodio

Introducción

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

Metodología

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

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

Encapsulación

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Introducción

El Acusyst-R constituye una alternativa de escalado al

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

Desarrollo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.3 Cultivo de hibridoma en saco de diálisis

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

Metodología

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Purificación de Anticuerpos Monoclonales

3.1 Purificación de anticuerpos monoclonales por Proteína-A Sepharosa

Introducción

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

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

Metodología

(A) Filtración:

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

(B) Precipitación con Sulfato de Amonio:

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

(C) Desalinización:

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

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

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

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

(D) Afinidad:

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

Los anticuerpos fueron eluidos con tampón citrato 0.1M

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

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

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

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

3.1 Purificación de anticuerpos monoclonales por intercambio iónico.

Introducción

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

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

Metodología

Anticuerpo Monoclonal

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

Tratamiento del líquido ascítico

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

Purificación del Anticuerpo Monoclonal

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

Ensayos Analíticos

La concentración protéica de las fracciones obtenidas

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

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

Resultados

A los efectos de obtener una mejor separación entre el AcM y las proteínas contaminantes se procedió a ajustar las condiciones de retención de las distintas proteínas en la columna de DEAE-Sephacel con un gradiente continuo de fuerza iónica creciente. Las figuras 3A y B muestran el perfil de elución obtenido mediante un gradiente lineal de 0-200 mM de ClNa y las SDS-PAGE de los picos cromatográficos. El análisis electroforético muestra que en el pico 2 de la cromatografía fue colectada gran parte de la Ig presente en la muestra sembrada. Por densitometría se demostró que solo el 62% de la Ig total colectada eluye en dicha fracción. En la figura 4 se observa que el 87% de la proteína presente en dicho pico corresponde a Ig, la cual posee el 94% de la actividad específica recuperada.

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

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

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

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

CONCLUSIONES

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

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

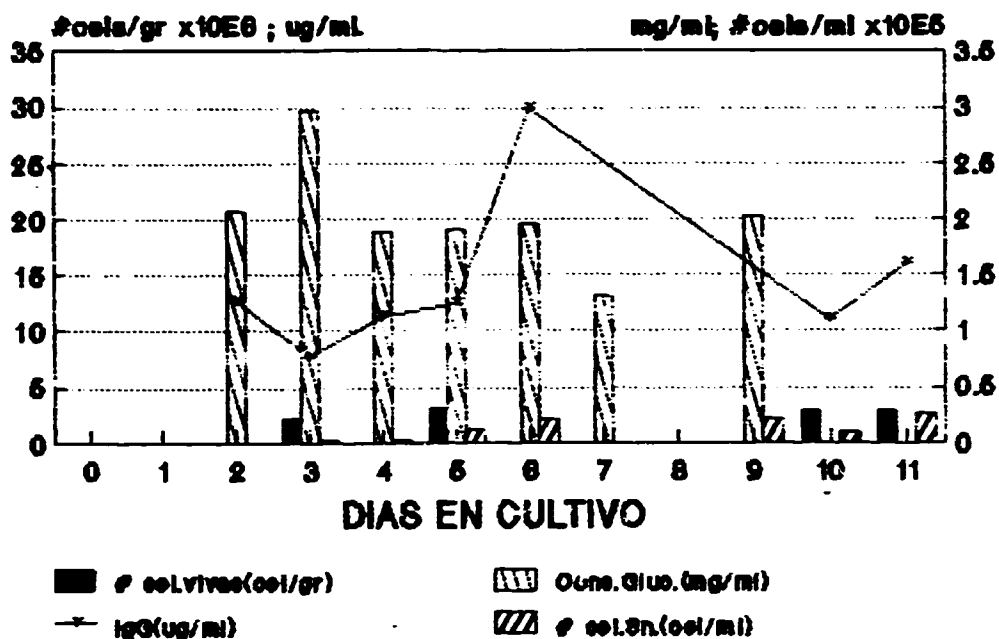
En relación a la purificación de AcM a partir de líquido ascítico se utilizaron las tecnologías de afinidad e intercambio iónico. Con respecto a la purificación con proteína A-Sepharosa, se optimizaron las condiciones de recuperación de los AcM. Los resultados obtenidos por intercambio iónico, resumidos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

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

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

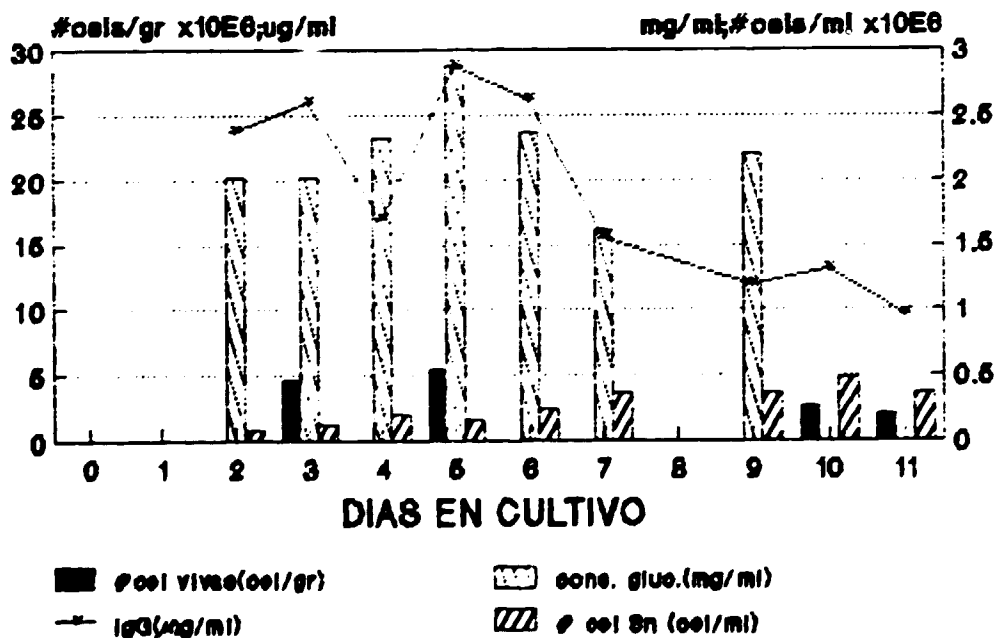
FIGURA 1a-c

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



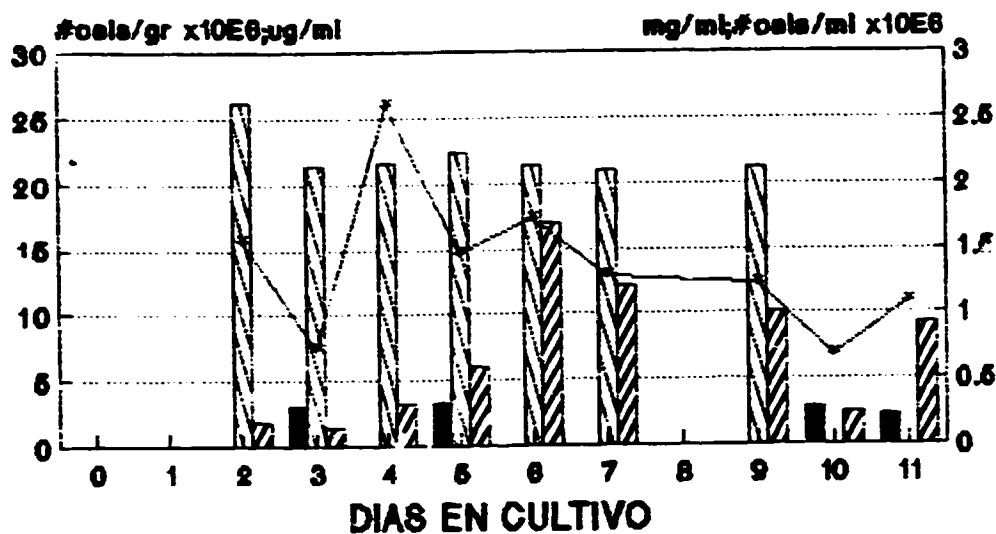
HIBRIDOMA OB-HEP1

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



HIBRIDOMA OB-HEP1

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



■ #cel vivos(#cel/gr)

▨ conc. glu.(mg/ml)

—* IgG(ug/ml)

▧ #cel 5n(#cel/ml)

HIBRIDOMA OS-HEP1

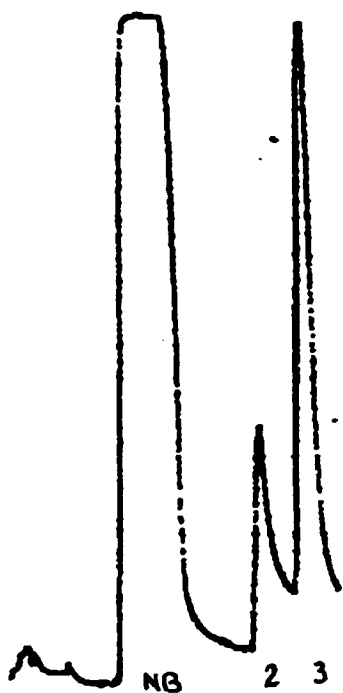


Figura 2 . Columna cromatográfica de Proteína A Sepharosa. Los líquidos ascíticos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sephadex G-25 M fueron sembrados en una columna Proteína A Sepharosa de 80 ml. Luego de lavada con PBS pH 8 (Non Bound) fueron eluidas a 4 °C con solución tampón de citrato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

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

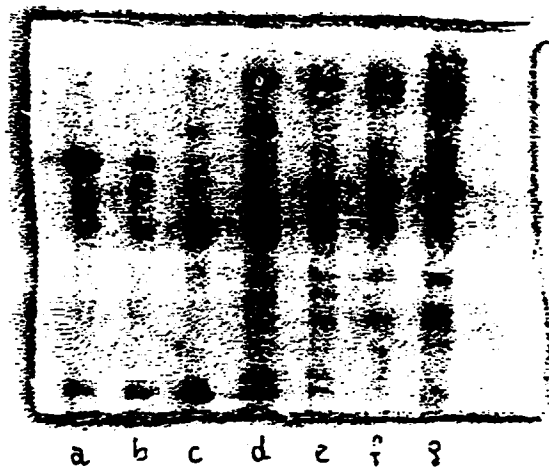
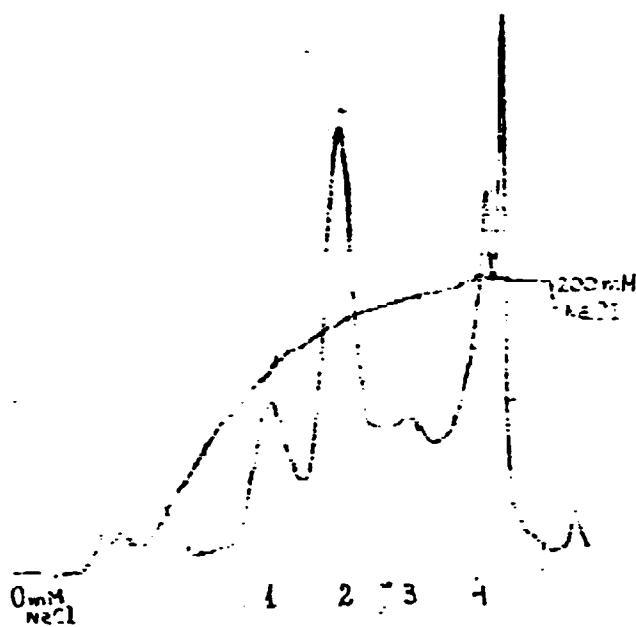


Figura 3 .(A) Columna cromatográfica de DEAE-Sephacel. Los líquidos ascíticos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sephadex G-25 M fueron sombreados en una columna de DEAE-Sephacel 2.5/20 cm/cm y eluïdos con un gradiente continuo 0-200 mM de ClNa en las siguientes condiciones:

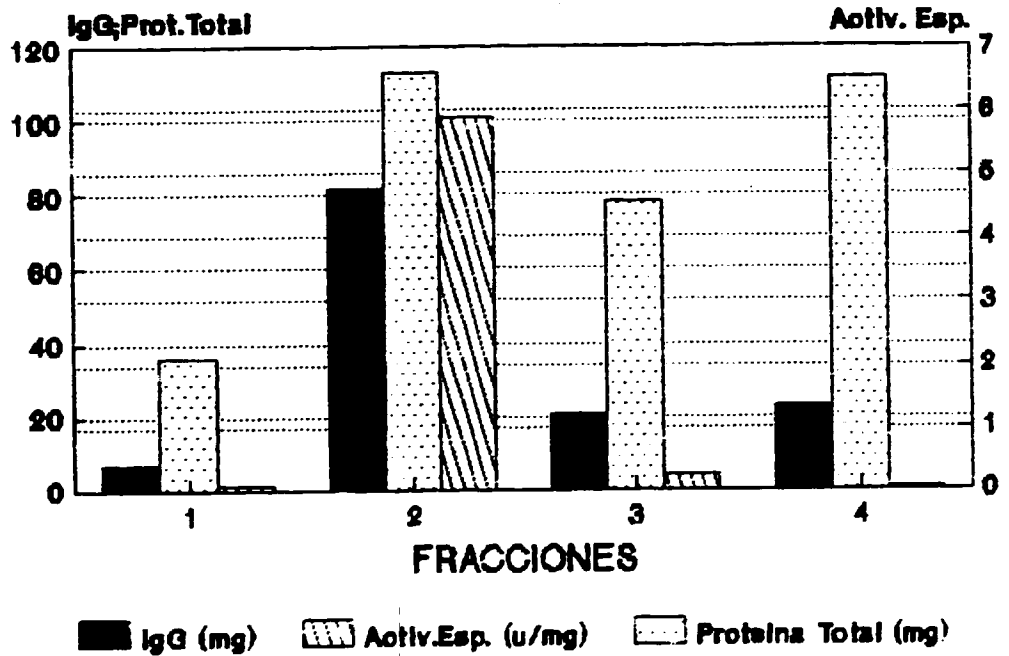
- volumen de muestra:14.9ml
- concentraci. n de la muestra:27.0 mg/ml
- flujo volumétrico:25.0 ml/h
- flujo lineal:5.1 cm/h
- velocidad de registro:0.2 mm/min
- capacidad de la columna:4.0 mg/ml

(B) SDS-PAGE al 10.5% en condiciones de reducci. n. d. las fracciones obtenidas en (A) y teñidas con Coomassie Blue R-250. Los carriles corresponden a:

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

figura 4

INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO I



HIBRIDOMA OB-HEP1

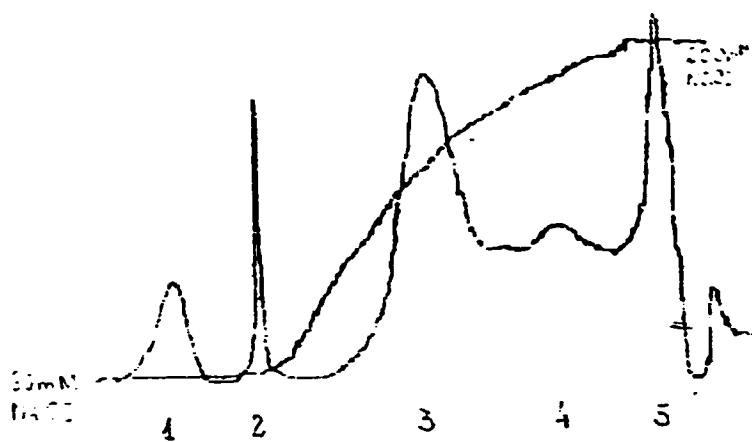


Figura 5 .(A) Columna cromatográfica de DEAE-Sephacel. Los líquidos ascíticos precipitados en sulfato de amonio y desaladas en Sephadex G-25 M fueron sembradas en una columna de DEAE-Sephacel 2.5x10 cm/cm y eluías con un gradiente continuo 00-200 mM de NaCl en las siguientes condiciones:

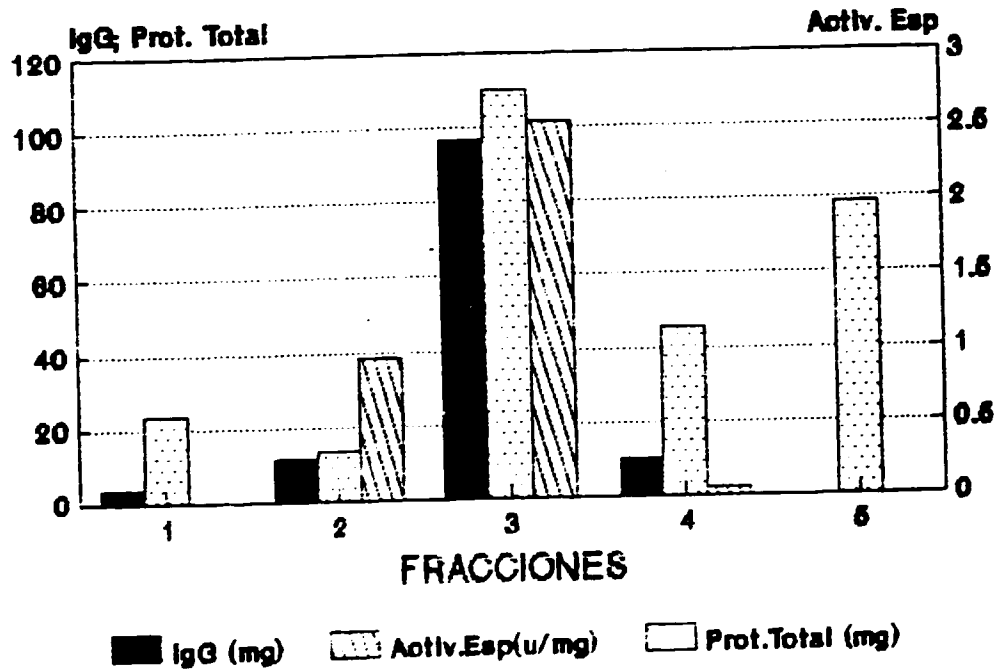
- volumen de muestra: 0.1-0.5 ml
- concentración de la muestra: 27.0 mg/ml
- flujo volumétrico: 25.0 ml/h
- flujo lineal: 5.1 cm/h
- velocidad de registro: 0.2 mm/min
- capacidad de la columna: 4.0 mg/ml

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

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

figura 6

INTERCAMBIO IONICO DEAE-SEPHACEL. EXPERIMENTO II



HIBRIDOMA OR-HEP1

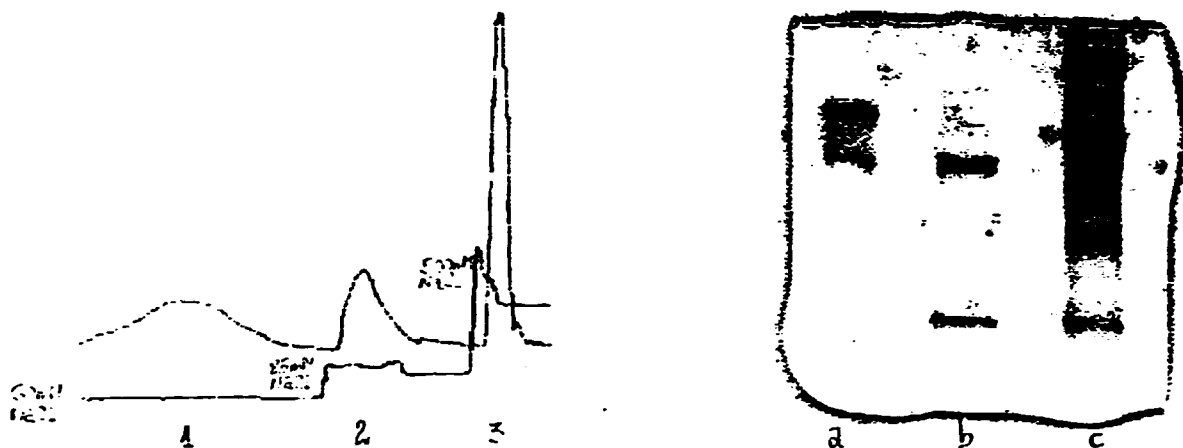


Figura 7 (A) Columna cromatográfica de DEAE-Sephacel. Los líquidos azoicos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sephadex G-25 M fueron sembrados en una columna de DEAE-Sephacel 2.5/20 cm/cm y eluían con un gradiente discontinuo 60, 65 y 800 mM de ClNa en las siguientes condiciones:

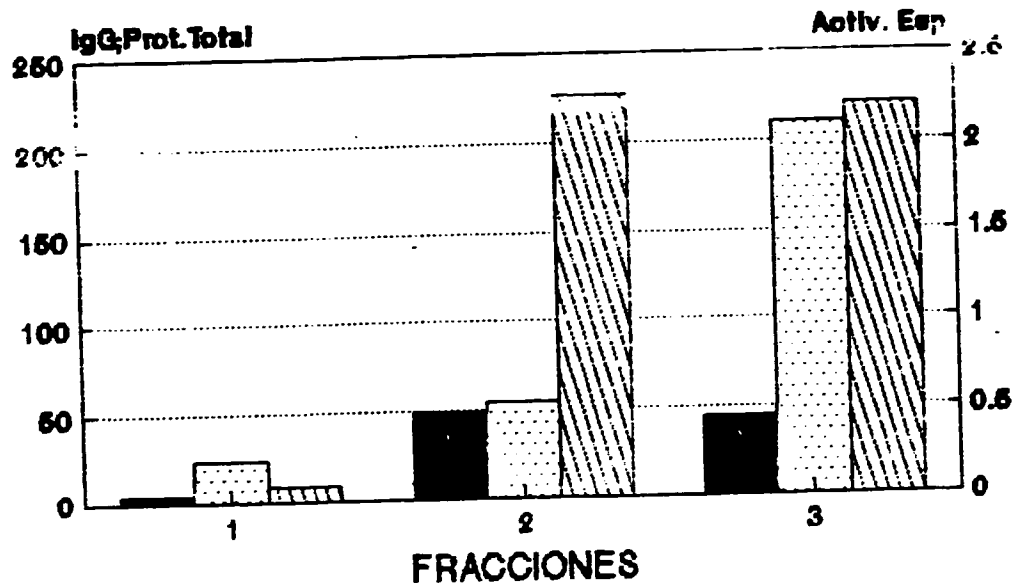
- volumen de muestra: 14.0 ml
- concentración de la muestra: 27.0 mg/ml
- flujó de elución: 25.0 ml/h
- flujó de muestra: 5.1 ml/h
- velocidad de registro: 0.2 mm/min
- capacidad de la columna: 4.0 mg/ml

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

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

figura 8

INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO III



■ IgG: mg ▨ Activ. Esp. (u/mg) ▤ Prot. Total: mg

HIBRIDOMA OB-HEP1

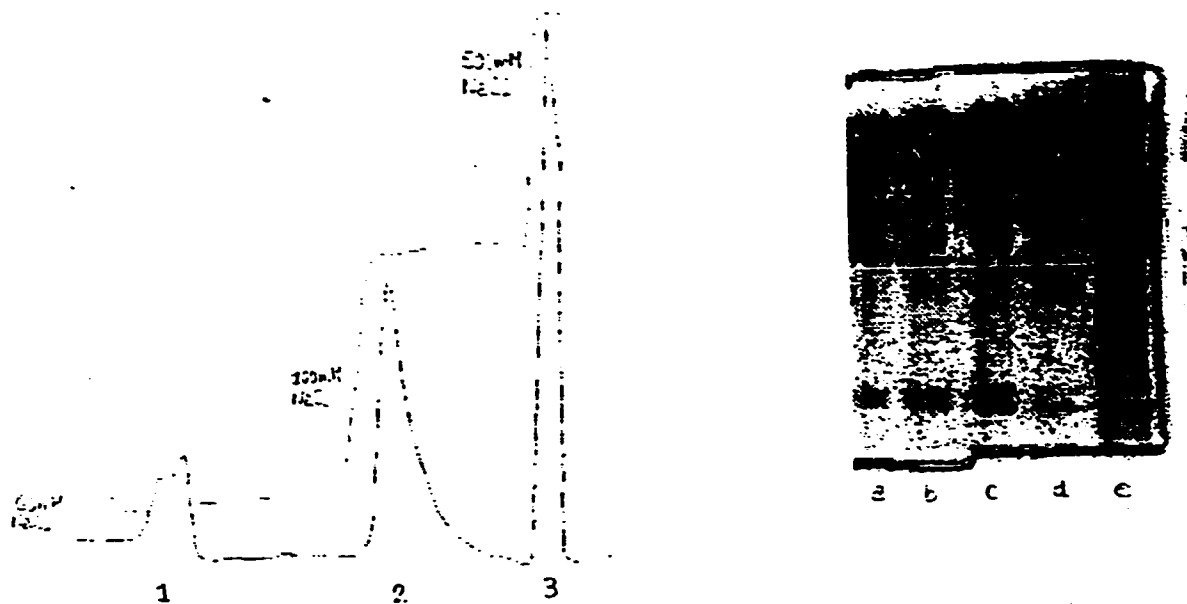


Figura 9 (A) Columna cromatografica de DEAE-Sephacel. Los líquidos asépticos precipitados en sulfato de amonio y desalados en Sephadex G-25 M fueron sembrados en una columna de DEAE-Sephacel al 5.0/100 cm/cm y eluados con un gradiente discontinuo de 50, 100 y 500 mM de NH_4Cl en las siguientes condiciones:

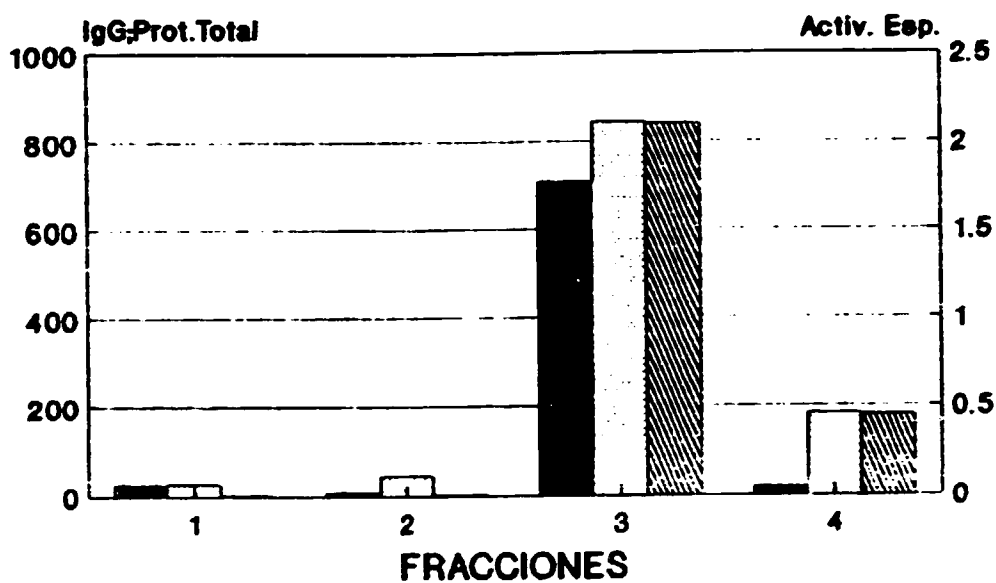
- volumen de elución: 140.0 ml
- cantidad de la muestra: 22.5 mg/ml
- flujo eluotrico: 100.0 ml/hr
- tiempo de línea: 10.4 cm/hr
- velocidad de registro: 1.2 mm/min
- capacidad de la columna: 4.0 mg/ml

(B) SDS-PAGE a: 10.5% en condiciones de reducción de las fracciones obtenidas en (A) y teñidas con Coomassie Blue R-250. Los carriles corresponden a:

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

figura 10

INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO IV



■ IgG: mg ▨ Activ. Esp.: u/mg □ Prot. Total: mg

HIBRIDOMA CB-HEP1

**"PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES. UN
ESFUERZO COMPARTIDO EN LATINO AMERICA".**

INFORME DE EJECUCION #3. Mayo-Julio de 1990

Este es el tercer informe de ejecución del Proyecto, por parte del Laboratorio de Referencia ubicado en la División de Hibridomas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana, Cuba. Incluye los resultados del adiestramiento de los representantes de dos países (Colombia y Guatemala) durante el período comprendido entre el 7 de mayo y principios de julio de 1990. Su composición es: Gestiones de Compra de Equipos y Materiales, Desarrollo del Entrenamiento, Comentarios, Conclusiones y Anexos (informes de las estudiantes).

Gestiones de Compra de Equipos y Materiales

En este momento la llegada de los equipos y suministros contratados se ha completado en el 100%. Tal como estipulado, se recibió el segundo pago correspondiente a USD 9100.00.

Desarrollo del Entrenamiento

Correspondía este período de entrenamiento a Colombia (reubicado de septiembre de 1989) y, según lo planificado en Sao Paulo, a Guatemala, Bolivia y Chile. En relación con este grupo se presentaron las siguientes dificultades iniciales:

- (a) La estudiante de Colombia llegó unos días después de lo previsto, por dificultades en su país para obtener la visa para México.
- (b) El PNUD de Guatemala hizo la solicitud de autorización de los fondos a Cuba en lugar de a México, lo cual motivó atrasos en la llegada de la estudiante.
- (c) En el caso de Bolivia, después de habersele situado la visa en la Paz a la estudiante propuesta, la coordinación general nos comunicó que por la no firma del contrato, este entrenamiento tenía que ser pospuesto.
- (d) Con respecto a Chile, a pesar de haber enviado telex y contactar por teléfono con el laboratorio, no se recibieron noticias hasta junio, en que por telex se nos propuso la estancia del estudiante para el período septiembre-diciembre.

La situación de Bolivia y Chile ha complicado el desarrollo del próximo entrenamiento, a desarrollarse entre septiembre y noviembre de 1990. Para este ha confirmado su asistencia Venezuela (reubicado de Septiembre de 1989), Argentina y Ecuador (según cronograma original), lo que unido a los dos países mencionados haría un total de cinco los posibles estudiantes. El laboratorio de referencia de la Habana, tal como fue ratificado en Sao Paulo, no considera adecuado, ni tiene condiciones para recibir a más de cuatro estudiantes por grupo, por lo que la situación debe ser examinada durante reunión de agosto.

A partir de mayo de 1990 comenzó el entrenamiento de los estudiantes: Alba Lucía Combita Rojas de Colombia y María Teresa Vázquez Ayala de Guatemala. El trabajo se desarrolló en lo esencial acorde con la programación reestructurada para ocho semanas, según la sugerencia del segundo grupo. Participaron siete u ocho investigadores y cinco técnicos de la División de Hibridomas, que desarrollaron los siguientes aspectos:

(a) Teoría.-

Las estudiantes recibieron las siguientes conferencias:

1. Aspectos generales sobre la tecnología anticuerpos monoclonales (AcM).
2. Proyectos de Trabajo de la Agrupación de Hibridomas y del CIGB.
3. Uso de ratones híbridos para aumentar la producción de AcM.
4. Uso de reactores de fibra hueca para producir AcM.
5. Sistemas de ensayo para AcM.
6. AcM por ingeniería genética.
7. AcM bifuncionales.

Las estudiantes impartieron los seminarios estipulados en el programa, a partir de un paquete de artículos fundamentales sobre generación y producción de AcM; estos fueron:

1. Aspectos generales sobre el cultivo masivo
2. Obtención de ascítis para la producción de AcM
3. Encapsulación de hibridomas en alginato
4. Métodos generales para la purificación de anticuerpos
5. Fusión celular para la producción de hibridomas murinos
6. AcM humanos
7. Dos artículos seleccionados por los estudiantes

También los estudiantes asistieron a los seminarios teóricos semanales de la División de Hibridomas sobre temas diversos que incluyen investigaciones sobre producción, purificación, aplicación y nuevas tecnologías en AcM. Efectuaron una visita de trabajo al Instituto de Oncología y Radiobiología de la Habana.

(b) Práctica (34 horas semanales):

Las estudiantes realizaron las siguientes actividades:

1. Aspectos generales sobre el cultivo de hibridomas:

Descongelación de hibridoma CB-Hep.1. Preparación de medios de cultivo. Valoración del crecimiento del hibridoma en ambos medios. Montaje de ELISA para el testaje de los sobrenadantes. Congelación de hibridomas para banco celular. Clonación de células de hibridoma. Fusiones demostrativas.

2. Cultivo de hibridoma "in vivo":

Inoculación de hibridomas en ratones BALB/c. Evaluación del preñamiento. Obtención de líquido ascítico. Procesamiento y almacenaje del líquido ascítico para su posterior purificación. Ensayo de las condiciones óptimas de unión de anticuerpos a matrices cromatográficas. Evaluación de las condiciones óptimas de elución de anticuerpos. Purificación de ascítis.

Control de calidad.

3. Cultivo de hibridoma "in vitro":

Encapsulación de hibridomas en perlas de diferentes concentraciones de alginato de calcio. Seguimiento de parámetros tales como viabilidad y concentración celular, y producción de anticuerpos, en diferentes condiciones de cultivo. Montaje de un biorreactor de fibra hueca (Acusyst R) y cultivo de hibridomas inmovilizados. Purificación de AcM a partir de sobrenadante.

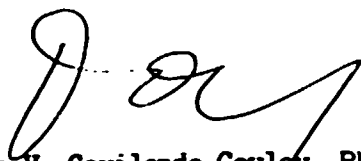
Comentarios

1. La estudiante de Guatemala llegó diez días después de iniciado el programa, lo que obligó a la repetición de conferencias teóricas por parte de personal del laboratorio. Esta estudiante se retrasó en el desarrollo de algunas prácticas de encapsulación por carecer totalmente de experiencia en el manejo de células en cultivo.
2. En los primeros ensayos de cultivo se presentaron algunas contaminaciones, por el énfasis que hace el programa en que los estudiantes desarrollaran habilidades en la manipulación directa. No obstante, se cumplimentaron los objetivos y los estudiantes adquirieron una adecuada independencia en el trabajo práctico.
3. Los estudiantes participaron en las tareas de montaje del bioreactor de fibra hueca, aunque no manipularon directamente el equipo para tratar de minimizar los riesgos de contaminación. El grado de manipulación de los bioreactores depende en gran medida de la experiencia y habilidades de los estudiantes.
4. Las dos estudiantes discreparon con el grupo anterior sobre la conveniencia de reducir el tiempo del entrenamiento a dos meses. El planteamiento fundamental es que con una extensión mayor se pudiera profundizar más en algunos aspectos prácticos. En la situación actual es imposible establecer un programa que satisfaga a todos por igual debido al desnivel de preparación existente. La parte cubana considera que el principio de vencer el curso en dos meses, con la posibilidad de un mes de reserva adicional, debe ser la opción; no obstante, el grado de avance individual de los estudiantes se sale por completo de las posibilidades de control de los organizadores. En consecuencia, los alumnos deben venir financieramente preparados para una extensión máxima de tres meses.
5. Una de los estudiantes (ver informe de Colombia) planteó coincidir con los informes anteriores en cuanto al servicio de limpieza del apartamento; nuestra opinión es que este ha mejorado con respecto al grupo anterior. No obstante se tomarán las medidas necesarias para evitar otros señalamientos de este tipo.

Conclusiones

Se cumplieron los objetivos estipulados en el proyecto. Las estudiantes adquirieron un basamento teórico y práctico que les permite comenzar de inmediato la producción de Ach mediante cultivo. El modelo explotado fue el de la encapsulación de los hibridomas en alginato de calcio, y su mantenimiento en frascos "spinner", tecnología asequible a laboratorios sin grandes recursos. Los alumnos se relacionaron además con bioreactores automatizados del tipo de fibra hueca, comprobando su funcionamiento, y recibieron un entrenamiento en los principios y métodos cromatográficos fundamentales para la purificación de Ach.

El programa incluyó opciones adicionales y los alumnos adquirieron además formación teórica y práctica que les permite abordar la propagación de los hibridomas "in vivo", en ratones BALB/c, y purificar los Ach a partir del ascitis tumoral producido en ellos. También vieron procedimientos de fusión para la generación de hibridomas de ratón.



Jorge V. Gavilondo Cowley, Ph.D.
Jefe, División de Hibridomas,
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Ave 31 entre 158 y 190, Apartado 6162, Cubanacán,
La Habana, CUBA. Telex: 512330 ING GEN CU, 511072 CUBA CIB
Tlef: 53-7-218854, 201409, 201308

La Habana, Cuba, julio 28, 1990

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE ADIESTRAMIENTO "PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES. UN ESFUERZO COMPARTIDO EN LATINO AMERICA".

ASPECTOS GENERALES.-

1. Los alumnos trabajarán de Lunes a Viernes, en los horarios de 9:30 am a 5:00 pm y de acuerdo con el reglamento interno de la institución.
2. El programa tendrá en contenido esencialmente práctico pero incluirá tres sesiones teóricas separadas: - conferencias y seminarios-, las primeras a ser impartidos por profesionales cubanos y los segundos por los alumnos. Las conferencias y seminarios serán los LUNES, de 9:00 a 10:30 am, y de 16:30 a 12:00h, en el orden en que aparezcan en el programa. Los MARTES entre 1:30 y 2:30 de la tarde los alumnos participarán en los seminarios internos de los Grupos de Hibridomas e Inmunoquímica. Los alumnos reciben a la llegada un folleto sobre tecnología de obtención y producción de anticuerpos monoclonales y los reprints básicos que emplearán para preparar sus seminarios.
3. La duración mínima prevista del entrenamiento es de unas 8 semanas de trabajo, pero podrá prolongarse hasta 12 semanas, si fuera necesario.
4. Existirá una sesión por semana con el Coordinador del Curso y los tutores de los experimentos para la discusión de resultados y detalles administrativos.

PROGRAMA.-

A la Llegada.- Acomodación en el apartamento, entrega del plan de trabajo, los materiales de seminarios y el reglamento de trabajo en el CIGB, visita al CIGB y la División de Hibridomas.

Semana 1.-

Coordinador de la semana: Dr. Karelia Cosse

Lunes:

9:00-10:30 am: Conferencia (Dr. J. Gavilondo o Dr. C. Duarte): La tecnología de Anticuerpos Monoclonales. Aspectos generales. Proyectos de trabajo de la División de Hibridomas del CIGB.

10:30-12:00 m: Seminario (tutores: Dr. J. Gavilondo, Dra. K. Cosse o Dra. María E. Pérez): Cultivo Masivo de Hibridomas y Encapsulación de Hibridomas.

Semana: Experimento #1 (tutor: Tcn. Marcos Giezi): Cultivo de Hibridomas (mantener línea de hibridomas, evaluar crecimiento y producción de AcH en medio de cultivo, clonar, expandir).

Experimento #2 (tutor: Tcn. Arturo Alfaro): Obtener Ascitis en Animales (inocular ratones con ascitis).

Experimento #3 (tutor: Dra. K. Cosse o Dra. María E. Pérez): Encapsular hibridomas en alginato (encapsular, establecer condiciones de llenado)

Semana 2.-

Coordinador de la semana: Tcn. Marcos González

Lunes:

9:00-10:30 am: Seminario (tutores: Dr. F. O. Castro, Dra. K. Cosse): Obtención de ascitis maso en AcH.

10:30-12:00 m: Conferencia (Dr. F. O. Castro): Uso de líneas híbridas de ratones para la producción de AcH.

Semana: Experimento #1 (tutor: Tcn. Marcos Giezi): Cultivo de Hibridomas (continuar clonaje, expandir para animales y alginato, congelar).

Experimento #2 (tutor: Tcn. Arturo Alfaro): Obtener Ascitis en Animales (inocular animales, observar animales).

Semana 3.-

Coordinador de la semana: Tcn. Manuel Aguilar

Lunes:

9:00-10:30 am: Seminario (tutores: Dr. C. Duarte, Dra. M. Freyre): Métodos generales de purificación de anticuerpos.

10:30-12:00 m: Conferencia (Dra. K. Cosse o Dra. María E. Pérez): Reactores de fibra hueca para producir AcH.

Semana: Experimento #2 (tutor: Tcn. Arturo Alfaro): Obtener Ascitis en Animales (extracciones y procesamiento de ascitis).

Experimento #3 (tutor: Tcn. N. Aguilar): Encapsular hibridomas en alginato (continuar evaluación del experimento).

Semana 4.-

Coordinador de la semana: Dr. Carlos Duarte

Lunes:

9:00-10:30 am: Seminario (tutores: Dra. S. Cruz, Dr. L. Sorell): Fusión celular para obtención de hibridomas murinos. 10:30-12:00 m: Conferencia (Dr. L. Sorell): Ensayos para AcM.

Semana: Experimento #3 (tutor: Tcn. N. Aguilar): Encapsular hibridomas en alginato (continuar evaluación experimento).

Experimento #4 (tutores: Dra. M. Freyre, Dr. C. Duarte, Tcn. L. Martínez): Purificación de AcM a partir de ascitis y sobrenadante de cultivo (procesamiento inicial de muestras para afinidad e intercambio iónico, controles de Igs, pureza y actividad)

Semana 5.-

Coordinador de la semana: Dr. Carlos Duarte

Lunes:

9:00-10:30 am: Conferencia (Dra. M. Ayala): Anticuerpos monoclonales por ingeniería genética.

Martes 1:30 pm: Seminario: Tarea referente al trabajo de cada alumno en su institución de origen.

Semana: Experimento #3 (tutor: Tcn. N. Aguilar): Encapsular hibridomas en alginato (continuar evaluación experimento).

Experimento #4 (tutores: Dra. M. Freyre, Dr. C. Duarte, Tcn. L. Martínez): Purificación de AcM a partir de ascitis y sobrenadante de cultivo (continuación del trabajo comenzado)

Semana 6.-

Coordinador de la semana: Dra. S. Cruz

Lunes:

9:00-10:30 am: Seminario (tutores: Dra. S. Cruz, o Dra. Maria E. Fernández.): AcM humanos.

10:30-12:00 m: Conferencia (Dra. S. Cruz): AcM bifuncionales.

Semana: Experimento #5 (tutores: Dr. J. Gaviñondo, Dra. K. Cosme o Dra. Maria E. Pérez, Tcn. N. Aguilar, Tcn. M. Glez.): Cultivo de hibridomas en bioreactor (acntaje de equipos).

Experimento #6 (tutor: Dra. S. Cruz): Fusión celular.

Semana 7.-

Coordinador de la semana: Tcn. N. Aguilar

Lunes:

9:00-10:30 am: Seminario (tutores: Dr. C. Duarte, Dr. J. Gaviñondo): Artículo seleccionado en biblioteca por alumnos. 10:30-12:00 m: Conferencias: Programa de AcM del Inst. de Oncología de la Habana. Programa de AcM del Inst. de Medicina Tropical de la Habana.

Semana: Experimento #5 (tutores: Dra. K. Cosme o Dra. Maria E. Pérez, Dr. J. Gaviñondo, Tcn. N. Aguilar, Tcn. M. Glez.): Cultivo de hibridomas en bioreactor (evaluación de crecimiento y prod. AcM).

Experimento #6 (tutor: Dra. S. Cruz): Fusión celular (atención a los cultivos).

Semana 8.-

Coordinador de la semana: Dra. S. Cruz

Semana: El tiempo de la semana debe ser dedicado por los alumnos a la confección de los informes técnicos de la estancia y la recuperación de información.

Partida de regreso.

**CENTRO
DE INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA**

Anexo.-

REPORTE DE LOS RESULTADOS ALCANZADOS EN LOS PROCESOS DE CULTIVO MASIVO DE HIBRIDOMAS DE RATON EN BIOREACTOR, PARA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se realizaron dos procesos de producción en el bioreactor Acusyst-R de la firma Endotronics; las condiciones de cada uno de estos procesos se describen a continuación:

Proceso I.-

Hibridoma: CB-Hep.1, secretor de anticuerpos monoclonales contra el antígeno S del virus de la Hepatitis B, preadaptado al crecimiento en DME (4 g glucosa/L) con 5% de suero bovino y 3% de HECS durante 7 días. Proveniente de banco de trabajo a partir del animal (directo).

Cantidad sembrada: 100 millones en el mismo medio

Tiempo pre-cosecha: 7 días

Control de consumo de glucosa: diario, y ajuste del consumo mediante aumento progresivo de la circulación del medio intracapilar y de su renovación (según manual Endotronics)

Control de pH: ajuste del rotámetro para CO₂ con vistas a alcanzar pH 7.3

Tiempo de ciclo: 720 min (15 días); 320 (2 días), 160 (18 días),

Tiempo de Proceso: 33 días (26 de marzo a 30 de abril); terminado por baja producción y contaminación de espacio intracapilar con levaduras

Cosechas y características del medio metabolizado: iniciada el 5 de abril; 3 ml/hora. La concentración de anticuerpos en el sobrenadante aumentó hasta llegar a valores de 100 µg/ml, nivel este donde se estabilizó durante el resto del proceso, a pesar del aumento en el número de células

Total de AcM producidos (sin Purif.): 240 ng

Total de medio consumido: 280 litros en intracapilar y 1.87 litros en extracapilar

Total de suero neonato consumido: 80 ml

Comentarios.-

Como parte de las pruebas realizadas para determinar las razones de la baja producción, se hizo la clonación de las células que habían crecido por 30 días en el espacio extracapilar, ya durante toda la etapa en que los niveles de producción no continuaron en aumento. Se demostró que más del 80% de estos clones eran provenientes de células productoras de anticuerpos, por lo que la

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

hipótesis de que la baja producción se pudiera derivar de la pérdida de capacidad de secreción y/o selección de variantes no productoras, no es válida.

Proceso II.-

Hibridoma: CB-IFNA2.4, secretor de anticuerpos monoclonales anti-IFN alfa 2b, preadaptado al crecimiento en RPMI1640 (3 g glucosa/L) con 5% de suero bovino durante 7 días. Determinada ausencia de micoplasma con sistema diagnóstico de Flow.

Proveniente de banco de trabajo a partir del animal (directo).

Cantidad sembrada: 150 millones en el mismo medio

Tiempo pre-cosecha: 7 días

Control de consumo de glucosa: diario y ajuste del consumo mediante aumento progresivo de la circulación del medio intracápsular y de su renovación (según manual Endotronics)

Consumo de glucosa: estabilizado alrededor de 600-700 mg/hora desde el día 22 del proceso.

Control de pH: ajuste del rotámetro para CO₂ con vistas a pH 7.3

Tiempo de ciclo: 720 min (5 días); 360 (5 días), 240 (5 días), 120 (5 días) y aumento hasta 720 de nuevo al detectarse escape de células en la cosecha (30 días de inoculado)

Tiempo de Proceso: 51 días (15 de junio a 4 de agosto); proceso en desarrollo

Cosechas y características del medio metabolizado: iniciadas el 22 de junio; 3 ml/hora; (ver gráfico 1)

Total de AcM producidos (sin Purif.): 5.79 gramos

Total de medio consumido: 400 litros en intracápsular y 2.88 litros en extracápsular

Total de suero neonato consumido: 144 ml

Comentarios.-

Las células detectadas en las cosechas de medio extracápsular se mantienen viables; se estima que, de esta forma, el sistema está manteniéndose actualmente en una especie de estado estable (reproducción y pérdidas equivalentes), muy determinado por el espacio de crecimiento accesible. El examen visual del cartucho del bioreactor demuestra que las células han cubierto uniformemente todo el espacio posible de crecimiento.

OBSERVACIONES FINALES

- (1). Es necesaria la creación de toda una infraestructura alrededor de la producción en bioreactor, que implica:
a.- Personal con entrenamiento en cultivo, que haya vencido una

**CENTRO
DE INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA**

- etapa intermedia entre el trabajo de laboratorio y de producción
- b.- Instalaciones para el control del ambiente alrededor del bioreactor
 - c.- Instalaciones para la preparación de medios, filtraciones, esterilización, etc., particulares para la producción
 - d.- Un adecuado trabajo en la caracterización de las líneas a trabajar (micoplasma, producción, adaptación, bancos de trabajo, cultivos intermedios a otra escala, comportamiento en el animal, etc.)
 - e.- Instalaciones y conocimiento previo para la purificación de los volúmenes de producción, con una concepción nueva, a escala diferente de la de laboratorio.

(2). Se realizaron dos procesos de cultivo a gran escala, con dos hibridomas diferentes; en el primer proceso no obtuvimos las cantidades de anticuerpos previstas, no así en el segundo proceso donde los niveles de producción alcanzados fueron importantes.

(3). No existe suficiente evidencia para determinar con exactitud el porqué de las diferencias sustanciales entre los dos procesos. Por la complejidad de la tecnología, resulta difícil realizar experimentos de comparación; no obstante, existieron las siguientes diferencias (sin que ello signifique cuál es o son, las determinantes):

- a.- La línea CB-Hep.1 (primer proceso) produce menos anticuerpos que la CB-IFNA2.4 (segundo proceso) en las pruebas "in vivo" e "in vitro" (cultivo estacionario).
- b.- El medio empleado en el proceso I fue DME (fabricado por componentes) y en el segundo RPMI 1640 (comercial).
- c.- Los tiempos de ciclo (dirección del flujo de medio extracapilar) no fueron idénticos.
- d.- Para el proceso I, el medio de inoculación y de cosecha tenía HECS como aditivo en un inicio (las células estaban preadaptadas en este medio); este fue eliminado posteriormente. El proceso II no tuvo HECS pero el porcentaje de suero fue el mismo en ambos casos.
- e.- Los sistemas de determinación de concentración de anticuerpos estuvieron totalmente estandarizados para el proceso II, pero las purificaciones realizadas de las cosechas del proceso I demostraron la baja producción de anticuerpos.
- f.- El proceso I tuvo una contaminación del espacio intracapilar con levadura, a partir de los 33 días, pero ello no justifica los bajos valores de anticuerpos obtenidos con anterioridad.
- g.- El crecimiento experimentado por el hibridoma CB-Hep.1 fue inferior al del CB-IFNA2.4, en períodos de tiempo semejantes. Aún

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

así ello no justifica totalmente las diferencias en valores de producción debido a que con densidades parecidas, los valores eran muy diferentes.

h.- Adicionalmente, se introdujeron, de un proceso a otro, un conjunto de mejoras tecnológicas:

- Controles diarios de esterilidad al intracapilar (37°C) y en el extracapilar por medios de cultivo microbiológicos Oxoid, en cada cosecha.
- Aumento de los tiempos de esterilización de botellones (1.5 horas) e incremento de las medidas de control de los materiales de uso directo en el proceso.
- Montaje de sistema ELISA para Igs de ratón, y su estandarización.
- Estandarización de las pruebas para medición de consumo de glucosa.

(4). A priori, parecen importantes las diferencias en los niveles de producción originales de ambos hibridomas (aproximadamente de una orden de magnitud). Si bien ello pudiera explicar parcialmente las diferencias de producción en el bioreactor, no tenemos aún idea de las razones que llevan a que, en el animal, estas diferencias se reduzcan.

CONCLUSIONES

1.- El equipo Acusyst-R es adecuado para la producción de anticuerpos monoclonales en cultivo, pero su funcionamiento lleva implícito una infraestructura importante para mantener la calidad y continuidad del trabajo.

2.- La producción y eficiencia que se obtengan en un proceso de cultivo masivo en este bioreactor, parecen depender fuertemente de las características particulares del hibridoma a escalar; hemos encontrado que los niveles de anticuerpos secretados por el hibridoma en cultivo estacionario pueden ser uno de los posibles predictores de la productividad a alcanzar.

3.- De la experiencia obtenida con los dos procesos se deriva la importancia de la opción de producción a partir de ratones inoculados con el hibridoma. Es posible que para hibridomas de baja producción en cultivo estacionario, las bondades del ambiente "in vivo" no puedan ser reproducidas por los sistemas de bioreactores existentes.

4.- Tal como aparece en el informe central, es conveniente la

valoración de los sistemas de cultivo de hibridomas encapsulados en alginato de calcio, como opción complementaria en la producción, y como forma de adquirir experiencia en el paso de la escala de trabajo investigativo, a trabajo productivo.

5.- Debe tenerse en cuenta que todavía no podemos producir recomendaciones o experiencias de la parte de purificación de los anticuerpos, vertiente en la cual se ha laborado a escala de estandarización de métodos. Los primeros lotes de medio rico en anticuerpos, producidos en el Proceso II, recién serán purificados en agosto.

Endotronics-R, CB-IFNA2.4 (6-8/90)
Acumulado: 5.79 gramos (s/purif)

—+— Concentración de AcM —*— Total de AcM

