



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

19041

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

Contrato No. 89/66

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

1er. Año de Actividades

País: Chile

Segudo Informe Técnico (Final)

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS Y PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PREVENTIVA ANIMAL.

Casilla 2. Correo 15.
Santiago - Chile.
FAX: 56-2-5585179.
56-2-2338336.

Santiago, Chile, 21 de Agosto de 1990.

Dr. Rodolfo Quintero R.
Coordinador Técnico ONUDI
Programa Regional de Biotecnología PNUD/UNESCO/ONU
para América Latina y el Caribe (RLA/83/003)
Presidente Masaryk 29. 10^o Piso
Col. Chapultepec Morales.
México 11570, D.F. MEXICO.
FAX 254-31-57.

Estimado Dr. Quintero:

Según lo acordado en la Reunión Técnica efectuada en La Habana entre el 4 y el 5 de Agosto del presente año, hago llegar a Ud. el Informe Final correspondiente al 1^{er} año de ejecución del Proyecto: "Producción Masiva de Anticuerpos Monoclonales: Un Esfuerzo Compartido en Latinoamérica"

1. Aspectos administrativos :

En Marzo de 1989, fui nominado por CONYCIT Coordinador en Chile de este Proyecto. Un año y medio antes, luego de una prolongada estadía (13 años) en la Universidad de Nueva York, regresé a mi país, recontratado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En Junio de 1989, por motivos ya conocidos por Ud., trasladé mi Laboratorio a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de esta misma Universidad. Si bien es cierto, este cambio no afectó mi participación desde un punto de vista administrativo, implicó la construcción e implementación de un nuevo Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales. Esto sólo fue posible gracias al financiamiento otorgado por PNUD/ONU y por otros Proyectos en los cuales soy el Investigador Responsable. Evidentemente, esta situación ocasionó un ligero retraso en nuestra actividad experimental.

2. Inicio:

1º de Enero de 1990, de acuerdo a recalendarización de actividades propuesta, y comunicada a nuestro país el 010990 (FAX a Dr. Jorge Garrido, CONICYT-Chile).

3. Fondos recibidos a la fecha: (Recepción, por parte de PNUD local; acusada en Noviembre de 1989).

Durante este primer año, ONUDI autorizó a su Representación Residente los pagos siguientes (mantenidos en la cuenta del PNUD local):

1. Noviembre de 1989	:	U.S.\$5.000.
2. Mayo de 1990 (Previa recepción y aprobación de primer Informe)	:	U.S.\$4.450.

Total	:	U.S.\$9.450.
-------	---	--------------

4. Gastos a la fecha:

1. Entrenamiento de 1 persona en el Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil:

Pasaje	:	U.S.\$ 738.
Estadía(3 meses)	:	U.S.\$1262.

2. Equipos: (Con otros recursos se ha construido un Laboratorio para la generación y expansión de hibridomas y se ha adquirido: Microscopio Invertido, Baño Termoregulado con agitación, Estufa con CO₂ para cultivo de tejidos, Refrigerador y Fungibles. Pronto se comprará Sistema Spinner para la producción semi-masiva de anticuerpos monoclonales por encapsulamiento en perlas de alginato):

Campana Flujo Laminar * : U.S.\$5.894.

Tambor Criogénico * : U.S.\$ 875.

* Ordenados a través de PNUD local.

Total de Gastos : U.S.\$8.769.

5. Saldo a la fecha:

Total dinero recibido : U.S.\$9.450.

Total de Gastos : U.S.\$8.769.

Saldo a la fecha : U.S.\$ 681.

6. Entrenamiento de Personal:

El Dr. Rodrigo Ramos M. fué seleccionado para concurrir al primer entrenamiento contemplado para nuestro país. El Dr. Ramos realizó una estadía de 3 meses (1º Abril al 31 de Junio), en el Centro de Biotecnología del Instituto Butantan, Sao Paulo, Brasil. Se adjunta copia de su Informe Técnico.

El segundo periodo de entrenamiento será de Octubre a Diciembre en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba. En este caso, los Representantes Técnicos, reunidos en La Habana, consideraron conveniente que nuevamente participara el Dr. Ramos, ya que el entrenamiento obtenido en su estadía en el Instituto Butantan no fué completo, debido fundamentalmente al retraso en la llegada de dineros y equipamiento a este Centro de Referencia.

El financiamiento de este segundo periodo de entrenamiento, implica la disponibilidad de dinero para los siguientes gastos:

Pasaje : U.S.\$1.600.

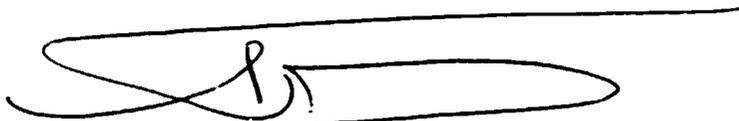
Estadía : U.S.\$1.200.

Total : U.S.\$2.800.

Considerando nuestro saldo en PNUD (U.S.\$681), tenemos un déficit de U.S.\$2.119.00. Por lo tanto, si este Informe es aprobado, rogamos a Ud. autorizar a la brevedad posible, el último pago programado para el primer año (U.S.\$2,700.00).

Debo hacer notar que, de acuerdo a los Términos de Referencia que hemos suscrito, y considerando la recalendarización, nuestro Laboratorio debería estar comenzando pronto la validación de hibridomas existentes en el país. Pensamos que nuestra infraestructura estará completa en las próximas semanas, lo que nos permitirá cumplir con este compromiso dentro de los plazos establecidos. Planeamos, además, generar nuevos hibridomas que por el momento tienen gran interés académico (anti-TNF alfa, anti-IFN gamma, anti-Pili K99 de E. coli, anti-Tc45 de T. cruzi). Creemos que, en el contexto de los objetivos de este Proyecto, es posible que alguno de estos hibridomas cumpla con las condiciones para ser expandido semi masivamente en nuestro país en el último año de ejecución de este Proyecto.

Sin otro particular saluda a Ud.



Arturo Ferreira, DVM, PhD.
Coordinador Técnico para Chile.

INFORME TECNICO

PROYECTO DE INVESTIGACION: PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONO-
CLONALES: UN ESFUERZO COMPARTIDO EN LATINOAMERICA.

PARTICIPANTE: Rodrigo Ramos M.

PERIODO DE ENTRENAMIENTO: 1/4/90 - 30/6/90.

CENTRO DE REFERENCIA: Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales
Centro de Biotecnología - Instituto Butantán-
Sao Paulo - Brasil.

ACTIVIDADES DESARROLLADAS:

I. TEORICAS :

Durante el transcurso de este entrenamiento, abordamos en sesiones de seminario, aspectos teóricos relacionados con la tecnología de hibridomas. Los temas, presentados por los integrantes del grupo de trabajo, fueron los siguientes:

1. Sistemas de producción masiva de anticuerpos monoclonales(AcMo).
2. Aspectos generales en la obtención de AcMo.
3. AcMo quiméricos y biespecíficos.
4. AcMo humanos.
5. Purificación de AcMo.
6. Control de calidad en la producción de AcMo.

II. PRACTICAS :

1. GENERALES:

- 1.1. Descongelamiento de línea celular OKT3; hibri-

1.2. Preparación y esterilización de medios de cultivo DME y RPMI-1640.

1.3. Mantención de OKT3 y B2/C114 (hibridoma que reconoce antígeno carcinoembrionario CEA y antígeno de grupo sanguíneo A humano) en cultivo estacionario, usando medio de cultivo DME enriquecido con 10% de suero fetal bovino(SFB).

1.4. Estudio metabólico de OKT3 en DME-10%SFB y en RPMI-1640-10%SFB; midiendo diariamente por 8 días densidad celular, consumo de glucosa, producción de lactato y pH. Establecimiento de las condiciones óptimas de crecimiento y producción de este hibridoma.

1.5. Búsqueda de contaminación por micoplasma en OKT3 y B2/C114; ambos hibridomas en DME-10%SFB. Resultado negativo en ambos casos.

1.6. Evaluación de la influencia de distintos lotes de suero; y diluciones de los mismos en el crecimiento de células OKT3. Este experimento consistió básicamente en cultivar en placa de 96 pocillos 10 células por pocillo en DME mas distintas concentraciones de suero(0,2.5, 5, 10%) de los lotes a probar, además de presencia o ausencia de suplemento Insulina, Transferrina,Selenato de Sodio(ITS). Cuando se usó fué en dilución 1:100. Después de 12 días de mantener este cultivo detectamos viabilidad celular mediante coloración con (3-(4,5 dimetilfiazol-2-1)-bromuro de 2,5-difeniltetrazolio)(MTT) y posterior medición en lector de ELISA con filtro de 570nm. Concluimos que el mejor crecimiento de OKT3 se obtuvo con el lote de suero 1070 (Cutilab,Brasil) al 5% más ITS.

2. ESPECIFICAS:

2.1. INMUNOENSAYOS PARA EVALUAR LA PRODUCCION DE AcMo A PARTIR DE SOBRENADANTE DE OKT3 Y B2/C114.

A: OKT3 ANTES DE PURIFICAR

A.1. CITOTOXICIDAD: sembramos en placas de Terasaki distintas diluciones de sobrenadante de cultivo. Usamos muestras obtenidas de los cultivos utilizados para la confección de la curva metabólica de OKT3 (día 0 a día 8). Incubamos con linfocitos humanos y suero normal de conejo como fuente de complemento evaluando mediante coloración con azul de tripán.

B: OKT3 ANTES Y DESPUES DE PURIFICAR

B.1. ELISA: en un primer experimento sensibilizamos placas con IgG de conejo anti IgG de ratón, incubando luego con distintas diluciones de sobrenadante de OKT3 o fracciones eluidas de la purificación y revelando con IgG de conejo anti IgG de ratón purificado y acoplado a peroxidasa, seguido de ortofenilendiamina(OPD) como sustrato y posterior cuantificación en lector de ELISA. Esta experiencia nos permitió confirmar que había IgG de ratón en el sobrenadante de OKT3. Para estudiar la especificidad de este AcMo sensibilizamos placas con una línea celular portadora de CD3 siguiendo luego el mismo esquema de la experiencia anterior.

C: B2/C114 ANTES Y DESPUES DE PURIFICAR

C.1. DIRECTO EN PORTAOBJETOS: usando gota de sangre humana grupo sanguíneo A más gota de sobrenadante o fracción eluida de B2/C114.

C.2. TITULACION: en placa de 96 pocillos con eritrocitos humanos grupo A.

2.2. PURIFICACION DE AcMo A PARTIR DE SOBRENADANTE DE OKT3 Y B2/C114.

A. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD: realizada para ambos hibridomas. Usamos columna de proteína A-Sefarosa(500mg) acoplada a monitor U.V. e impresora. Como desconocíamos la concentración de AcMo pasamos 50 ml de sobrenadante con un flujo de 0.3 ml. por min. Para eluir utilizamos tampones que cubrieron un rango de pH de 8.6 a 2.3. Con OKT3 obtuvimos el cromatograma esperado con un pico de absorvancia a pH 4.3; donde esperabamos que eluyera el AcMo ya que sabíamos era IgG 2a. Solo esta fracción colectada, demostró actividad significativa en ELISA. En el caso de B2/C114 el cromatograma solo mostró el pico de absorvancia de proteína total(pH 8.6). Al probar todas las fracciones colectadas, por titulación en placa encontramos actividad significativa en todas ellas. Como usamos la misma columna que habíamos montado previamente para OKT3, no pudimos dejar incubando toda la noche el sobrenadante con la proteína A Sefarosa para una mejor interacción ; lo que sí aconteció con OKT3. Probablemente esto último influyó para que el AcMo producido por B2/C114 no se pegara adecuadamente a la columna y eluyera sin discriminación alguna de pH.

B. CRITERIO DE PUREZA: dado los resultados de la purificación, esta etapa fué cumplida solo para las fracciones colectadas en la purificación de sobrenadante de OKT3. Realizamos geles de

poliacrilamida a distintas concentraciones en condiciones nativas y denaturantes, tificando con plata y coomassie. Los resultados fueron los esperados de acuerdo al cromatograma obtenido en la purificación.

2.3. PRODUCCION MASIVA DE AcNo.

2.3.1. CULTIVO DE HIBRIDOMA OKT3 EN FIBRA HUECA: realizamos 3 experimentos con este sistema usando el Vitafiber II de Amicon compuesto por el cartucho de fibras huecas, frasco spinner conteniendo el medio de cultivo circulante DME-10% SFB, bomba peristáltica ; conectados estos elementos con mangueras de silicona.

A. EXPERIMENTO 1: inoculamos 7×10^7 células (80% viabilidad) e hicimos seguimiento del cultivo mediante la medición diaria de los parámetros metabólicos. Al cabo de 6 días tuvimos que desechar esta experiencia pues el espacio extracapilar apareció completamente ocupado con una burbuja de aire. Pensamos que esto se debió a que intentamos dar flujo de medio en ambos sentidos (convencional y reverso) a un cartucho que no viene diseñado para ello.

B. EXPERIMENTO 2: usamos el mismo sistema anterior previo riguroso lavado. Inoculamos 9×10^7 células (80% viabilidad) y la circulación de medio de cultivo fue solo en sentido convencional. Desafortunadamente después de 1 semana en que no hubo las variaciones esperadas en los parámetros metabólicos y tampoco una mantención de la viabilidad celular, desecharon este experimento porque además probablemente los mismos detritos celulares ejercieron una gran presión tapandose el filtro conectado en línea con la manguera a tra-

poliacrilamida a distintas concentraciones en condiciones nativas y denaturantes, tificando con plata y coomassie. Los resultados fueron los esperados de acuerdo al cromatograma obtenido en la purificación.

2.3. PRODUCCION MASIVA DE AcMo.

2.3.1. CULTIVO DE HIBRIDOMA OKT3 EN FIBRA HUECA: realizamos 3 experimentos con este sistema usando el Vitafiber II de Amicon compuesto por el cartucho de fibras huecas, frasco spinner conteniendo el medio de cultivo circulante DME-10% SFB, bomba peristáltica ; conectados estos elementos con mangueras de silicona.

A. EXPERIMENTO 1: inoculamos 7×10^7 células (80% viabilidad) e hicimos seguimiento del cultivo mediante la medición diaria de los parámetros metabólicos. Al cabo de 6 días tuvimos que desechar esta experiencia pues el espacio extracapilar apareció completamente ocupado con una burbuja de aire. Pensamos que esto se debió a que intentamos dar flujo de medio en ambos sentidos (convencional y reverso) a un cartucho que no viene diseñado para ello.

B. EXPERIMENTO 2: usamos el mismo sistema anterior previo riguroso lavado. Inoculamos 9×10^7 células (80% viabilidad) y la circulación de medio de cultivo fue solo en sentido convencional. Desafortunadamente después de 1 semana en que no hubo las variaciones esperadas en los parámetros metabólicos y tampoco una mantención de la viabilidad celular, desechamos este experimento porque además probablemente los mismos detritos celulares ejercieron una gran presión tapandose el filtro conectado en línea con la manguera a tra-

poliacrilamida a distintas concentraciones en condiciones nativas y denaturantes, tificando con plata y coomassie. Los resultados fueron los esperados de acuerdo al cromatograma obtenido en la purificación.

2.3. PRODUCCION MASIVA DE AcMo.

2.3.1. CULTIVO DE HIBRIDOMA OKT3 EN FIBRA HUECA: realizamos 3 experimentos con este sistema usando el Vitafiber II de Amicon compuesto por el cartucho de fibras huecas, frasco spinner conteniendo el medio de cultivo circulante DME-10% SFB, bomba peristáltica ; conectados estos elementos con mangueras de silicona.

A. EXPERIMENTO 1: inoculamos 7×10^7 células (80% viabilidad) e hicimos seguimiento del cultivo mediante la medición diaria de los parametros metabólicos. Al cabo de 6 días tuvimos que desechar esta experiencia pues el espacio extracapilar apareció completamente ocupado con una burbuja de aire. Pensamos que esto se debió a que intentamos dar flujo de medio en ambos sentidos (convencional y reverso) a un cartucho que no viene diseñado para ello.

B. EXPERIMENTO 2: usamos el mismo sistema anterior previo riguroso lavado. Inoculamos 9×10^7 células (80% viabilidad) y la circulación de medio de cultivo fué solo en sentido convencional. Desafortunadamente después de 1 semana en que no hubo las variaciones esperadas en los parámetro metabólicos y tampoco una mantención de la viabilidad celular, desechamos este experimento porque además probablemente los mismos ditritos celulares ejercieron una gran presión tapandose el filtro conectado en línea con la manguera a tra-

C. EXPERIMENTO 3: en este caso usamos un cartucho diseñado para flujo en ambos sentidos. Como en los dos anteriores habíamos inoculado OKT3 sin los resultados esperados, decidimos intentar ahora con R2/C114. Desgraciadamente esto no fue posible ya que después de 3 días en que solo habíamos hecho circular medio de cultivo el sistema apareció contaminado.

2.3.2. CULTIVO DE OKT3 INMOVILIZADO EN PERLAS DE ALGINATO DE CALCIO:

A. EXPERIMENTO 1: 9.9×10^7 células OKT3 en DMF-10% SFB fueron encapsuladas con solución de alginato 1.6%. La formación de perlas conteniendo las células en su interior se produce al dejar caer la solución de alginato más las células en una solución 50mM CaCl_2 /100mM NaCl. Durante 10 días seguimos este cultivo midiendo la actividad metabólica observando además viabilidad celular (inicialmente 75%) y conteo celular por disolución de perlas en solución de EDTA 50mM. Las variaciones metabólicas fueron mucho más lentas de lo esperado; aún así, por ELISA detectamos producción de anticuerpo.

B. EXPERIMENTO 2: en esta experiencia intentamos mejorar las condiciones de cultivo disminuyendo la concentración de alginato a 0.8%. Aún así el comportamiento del sistema fue similar al anterior.

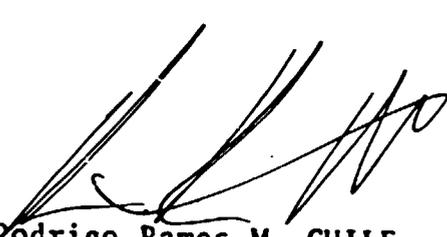
2.3.3. CULTIVO DE HIBRIDOMA PRODUCTOR DE AcMo ANTI DIGOXINA EN FIBRA HUECA ACUSYST-JR DE ENDOTRONICS: (DEMOSTRATIVO).

Observamos la inoculación de este hibridoma e hicimos seguimiento midiendo actividad metabólica.

CONCLUSIONES

Creo que mi estadía en este Centro de Referencia fué altamente provechosa ya que el plan de trabajo trazado de acuerdo a los objetivos propuestos en el proyecto fué cumplido. Si bien es cierto, los resultados experimentales no fueron los esperados, se logró lo fundamental; esto es, adquirir aprendizaje en la tecnología involucrada en la producción masiva de AcMo, de tal modo de poder ser implementada en mi país.

Es indudable también, que la interacción con investigadores de otros países ha sido muy productiva, ya que ha permitido conocer nuestras respectivas realidades en investigación científica y buscar caminos a seguir para una futura colaboración mutua.



Rodrigo Ramos M. CHILE.

Junio, 30, 1990.