



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

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

19043

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

**Contrato No. 89/64**

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

**1er. Año de Actividades**

**País: Argentina**

**Segundo Informe Técnico (Final)**

2/00

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

PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES: Un esfuerzo  
compartido en América Latina.

INFORME DE AVANCE #2

Dr. Alberto Leonardo Horenstein  
Centro Oncológico de Medicina Nuclear  
Comisión Nacional de Energía Atómica  
Instituto Nacional de Oncología A.H.Roffo  
Av. San Martín 5481 CP 1417  
Buenos Aires -Argentina

## INTRODUCCION

Este Informe de Avance #2 incluye:

- a) Informe científico sobre los aspectos de desarrollo propuestos en los términos de referencia del Contrato 89/64 bajo el ítem SERVICIOS REQUERIDOS DEL CONTRATISTA.
- b) Informe del adiestramiento en técnicas de producción masiva.
- c) Informe contable

## DESARROLLO

### A) Informe Científico

Se continuaron los trabajos de investigación y desarrollo tendientes a demostrar la utilidad potencial de anticuerpos monoclonales producidos en este laboratorio. En función de estos objetivos se realizaron los estudios siguientes:

#### 1. Estudios in vitro

La tecnología de immortalización de células híbridas permite obtener anticuerpos monoclonales de enorme utilidad como reactivos en bioquímica clínica, aunque ellos no sean el objetivo inicial del experimento. Como resultante de la fusión para producir anticuerpos monoclonales anti-antígeno carcinoembrionario (Informe #1) se generó un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales que aglutinan específicamente glóbulos rojos humanos portadores del antígeno A del sistema ABO de grupo sanguíneo. El anticuerpo monoclonal es del subtipo IgG1 y el hibridoma ha sido expandido bajo la forma de tumor ascítico en ratones Balb/c .

A partir del líquido ascítico el anticuerpo monoclonal fue purificado por cromatografía en Proteína A-sefaraosa y conservado a 4°C y -20°C ó liofilizado sin variación cuantitativa de su actividad biológica.

La determinación de su especificidad se realizó por radioinmunoensayo utilizando como antígenos glóbulos rojos (A,B; Rh<sup>+</sup> y Rh<sup>-</sup>) y linfocitos aislados con la técnica de Boyum. El anticuerpo monoclonal reactivo con el glóbulo rojo fue revelado con un segundo anticuerpo de conejo anti-ratón marcado con 125-I por el método del Iodogeno. Se obtuvieron 11.517 cpm como promedio con glóbulos rojo A, 1.300 cpm con B, 1.243 cpm con linfocitos y 1.066 en controles con solución salina.

Las pruebas de laboratorio aplicadas para la determinación de los antígenos de grupo sanguíneo A (A1 y A2), B, A1B, A2B, O, y otros fenotipos antigénicos: Rh-hr, K/k, Fy, Lu, Jk, MNS<sub>s</sub>, Le, P, Xg, Cotton y Dombrock, fueron: reacción en tubo, aglutinación en placa de microtitulación y reacción en placa de vidrio. Todas las muestras de dadores de los grupos A y AB detectados con el reactivo comercial aglutinaron con el anticuerpo monoclonal (n=86), no observándose reacción alguna con glóbulos rojos de los grupos B (n=23) y O (n=76). En el análisis cuantitativo el anticuerpo monoclonal dió un título de 1:4.096 vs 1:32 dado por el reactivo comercial. Las reacciones de aglutinación con el panel de eritrocitos portadores de los otros fenotipos antigénicos fueron negativas.

Estudios de adsorción y elución mostraron que los eluatos preparados a partir de células A y AB aglutinaron selectivamente hematíes de estos grupos. Asimismo la especificidad fue demostrada con glóbulos rojos recubiertos con IgG (anti-O), C3b y C3d. La determinación de la avidéz, tomada como el comienzo de la aglutinación fue de 3", 5" y 18" para células A1, A2 y A2B, respectivamente. La actividad del anticuerpo monoclonal disminuye en medios alcalinos (pH8) y ácidos (pH5). El empleo de medios enzimáticos como la bromelina potencia la reacción, observándose título de 1:128.000 con hematíes A1.

Se analizó también la inhibición de la hemoaglutinación con glicoproteína de saliva de secretores de sustancia A, B, ó H. La dinámica de unión del anticuerpo monoclonal marcado con 125-I en presencia del anticuerpo frío agregado en exceso mostró una cinética de disociación similar a la descrita en la literatura para anticuerpos monoclonales con alta afinidad.

El anticuerpo monoclonal presenta además capacidad de fijación de complemento revelada por medición de la actividad hemolítica de suero fresco de dadores A1 al enfrentar glóbulos rojos A1 sensibilizados con líquido ascítico portador del anticuerpo monoclonal.

Estos resultados indican que el anticuerpo monoclonal reúne las propiedades necesarias para su utilización en inmunología clínica satisfaciendo los requerimientos de seguridad diagnóstica, obviando el uso de sueros testigos de origen humano de título variable y patogenicidad potencial.

Se considera que el híbrido productor del anticuerpo monoclonal anti-grupo sanguíneo A posee las condiciones adecuadas de paso a la fase de producción masiva en los Centros de Referencia.

En función de estos resultados se han realizado fusiones con el objeto de obtener anticuerpos monoclonales con especificidad para el grupo sanguíneo B.

## 2. Estudios in vivo

La especificidad y selectividad de un anticuerpo monoclonal A4 dirigido contra el antígeno carcinoembrionario permitió analizar in vitro e in vivo a la línea tumoral M3 (Informe #1).

La capacidad de invadir y metastatizar es una de las propiedades de las células malignas. La mayoría de los fracasos terapéuticos en la clínica oncológica se debe a la diseminación incontrolada de la células neoplásica. De allí que la obtención de modelos experimentales murinos para estudiar dicha diseminación es importante.

El modelo descrito en el Informe #1 se amplió al estudio de una derivada experimental de la línea M3 con mayor capacidad de dar metastasis a nivel del pulmón y denominada MM3. Los estudios realizados coinciden con la hipótesis de que los hidratos de carbono presentes en la membrana celular afectarían la capacidad de diseminación de la célula tumoral. Los resultados obtenidos serán comunicados en el Congreso Latinoamericano de Biotecnología de la Habana (7-11/8/90), adjuntándose a la presente el resumen publicado.

### B) Adiestramiento en técnicas de producción masiva

A partir del 1/4/90 y hasta el 30/6/90 el Licenciado Gabriel Fiszman, becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina, realizó la pasantía en el Instituto Butantán de San Pablo(Brasil). Se adjunta a la presente el Informe correspondiente elaborado por el becario.

### C) Informe Contable

Dado que no se informó anteriormente se detalla en este Informe #2 que el Contrato 89/64 se firmó en Viena en Junio de 1989 y en Buenos Aires en Julio de 1989, con transferencia de los fondos del PNUD (Buenos Aires) al Centro Oncológico de Medicina Nuclear en Noviembre de 1989. Se analizaron a la recepción de los mismos las proformas actualizadas para la adquisición de equipo para electroforesis y para conservación de células en nitrógeno líquido.

Los valores recibidos se aplicaron en :

1. Compra de equipamiento para electroforesis marca Pharmacia	USD	5.920,00
2. Trámites aduaneros, retiro, peonaje y entrega	USD	165,00
3. Equipo para conservación de células en Nitrógeno líquido y accesorios	USD	2.966,52
4. Pasaje Buenos Aires-San pablo-Buenos Aires y tres (3) meses de beca	USD	2.100,00

---

**Total** USD 11.151,52

**II CONGRESO  
LATINOAMERICANO  
DE BIOTECNOLOGIA**

**7-11 de agosto de 1990  
La Habana, Cuba**

- Utilizamos este Sistema, también, para titulação "in vitro" do vírus da raiva, comparamos os resultados de dois métodos de titulação; primeiro observamos a presença de efeito citopático a través de diluição sucessiva da amostra ("end point"); o segundo método observamos o efeito utilizando uma suspensão de 0.5% de agarose em meio de Eagle, immobilizando o meio, obtuvimos os resultados mais rapidamente, em apenas 24 horas é possível se obter o título, através da diluição final.

Os títulos obtidos por meio desta duas metodologias foram comparados com classica inoculação incerebral, e os resultados form similares entre si.

## (221) DISEÑO Y EVALUACION DE UN MODELO PARA EL DIAGNOSTICO IN VIVO Y TERAPIA DEL CANCER.

A.L. Horenstein; A. Koss; H.M. Glait

Centro Oncológico de Medicina Nuclear (UBA/CNEA), Inst. Nal. Onc. A. H. Roffo.

El AcMo B2C114 reconoce un carbohidrato del antígeno A de grupo sanguíneo humano. Dado que los glicóconjugados cambian durante la oncogenesis se investigó la expresión de los mismos en un adenocarcinoma mamario murino espontáneo M3 y su derivada experiemntal MM3 de mayor capacidad metastatizante.

La reactividad inmunológica del AcMo marcado con I-125, fue analizada sobre suspensiones celulares de M3 y MM3. La curvas de unión mostraron reactividad selectiva con M3. El análisis de Scatchard permitió determinar el número de epítopes antigénicos ( $10^6$ ) por célula y la constante de asociación ( $K_a$ ).

La biodistribución del AcMo B2C114-1125 en ratones Balb/c, portadores de M3 ó MM3, mostró que el AcMo discriminó con alta sensibilidad entre el tumos M3 y MM3. Esta especificidad fue luego confirmada por la obtención de imágenes positivas del tumor M3 en cámara gamma.

El reconocimiento diferencial por parte del AcMo B2C114 de la línea M3 sirvió como modelo para el estudio de la metástasis artificiales, observándose una disminución significativa de las mismas por pretratamiento de las células M3 con el AcMo.

El reconocimiento específico in vitro y la localización selectiva in vivo del tumor M3 permite obtener un modelo que facilitará la implementación de los AcMo en diagnóstico y terapia del cáncer.



## INFORME TECNICO

### PROGRAMA DE ADIESTRAMIENTO "PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES".

PARTICIPANTE: LIC. GABRIEL I. FISZMAN

PAIS: ARGENTINA

PERIODO DE ADIESTRAMIENTO: DEL -1/4/1990 AL 30/6/1990.

CENTRO DE REFERENCIA: CENTRO DE BIOTECNOLOGIA. INSTITUTO BUTANTAN.  
SÃO PAULO-BRASIL.

Durante el período de adiestramiento práctico, se asistió a una serie de seminarios teóricos, presentados por los participantes del programa e investigadores integrantes del Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales.

Los seminarios abarcaron los siguientes temas :

- Aspectos generales de la producción de anticuerpos monoclonales.
- Anticuerpos monoclonales biespecíficos y quimericos.
- Anticuerpos monoclonales humanos.
- Producción masiva de anticuerpos monoclonales.
- Control de calidad en la producción de anticuerpos monoclonales.
- Sistemas de purificación de anticuerpos monoclonales.

### TRABAJO PRACTICO

#### 1-MANTENIMIENTO DE HIBRIDOMAS EN CULTIVO ESTACIONARIO.

Se prepararon, a lo largo del curso de adiestramiento, medios de cultivo DME y RPMI-1640 (Sigma), esterilizados por filtración con presión negativa o positiva. Se utilizaron diferentes lotes de suero fetal bovino (SFB), (Cultilab, Brasil.) y suplementos convencionales, para el mantenimiento de los hibridomas OKT3 (obtenido de ATCC) dirigido contra el antígeno CD3 de linfocitos humanos y B2/C124 (producido en el Centro Oncológico de Medicina Nuclear del Instituto Roffo, Bs. As. Argentina), dirigido contra el antígeno A de grupo sanguíneo humano y el antígeno CEA.

Estos hibridomas fueron testados para verificar la ausencia de *Mycoplasma*, mediante el Kit Mycotect (BRL), obteniéndose los resultados negativos esperados para ambas líneas celulares. Con el objeto de evaluar las mejores condiciones de crecimiento en cultivo, del hibridoma OKT3, se diseñó un experimento consistente en el cultivo de células con diferentes concentraciones de sueros de distintos lotes y con o sin el suplemento ITS (Insulina, Transferrina, Selenato de Na; Sigma).

Para tal propósito, se utilizaron placas de cultivo de 96 fosas donde se sembraron los hibridomas a 10 cels./fosa.

Las células fueron mantenidas en cultivo durante 12 días en medio DME con 4 lotes diferentes de SFB en concentraciones de 2,5; 5; y 10% con y sin ITS. Al término de este período se midió la viabilidad celular mediante la coloración con MTT (3-(4,5 Dimetiltiliazol-2-yl)-bromuro de 2,5-difeniltetrazolio. Sigma) y se midió la intensidad de color en un lector de Elisa con filtro de 570 nm.

Este ensayo permitió detectar el mejor crecimiento y condición de clonado, para los hibridomas OKT3, con el lote de SFB 1070 en una concentración de 5%, y el suplemento ITS diluido 1:100.

Con el fin de conocer los parámetros metabólicos del hibridoma OKT3 en las fases de crecimiento y producción en cultivo estático, que permitirán su seguimiento en cultivo masivo, se sembraron 36 frascos de cultivo T-25 con  $10^5$  cels./ml (18 con medio RPMI-1640+10% SFB y 18 con DME+10% SFB) y se midió diariamente por duplicado, durante 8 días: densidad celular, pH, consumo de glucosa, producción de lactato y producción de anticuerpos monoclonales (Acs. Mos.).

Con los valores obtenidos se confeccionó un gráfico que permitió conocer las características metabólicas de la línea celular OKT3.

## 2-INMUNOENSAYOS DESARROLLADOS CON SOBRENADANTES DE CULTIVO.

### 2.1-CITOTOXICIDAD.

Los ensayos de citotoxicidad fueron desarrollados para evaluar la producción de Acs. Mos. producidos por la línea celular OKT3 en la confección de las curvas metabólicas.

Para ello se sembraron, en placas de Terasaki, distintas diluciones de los sobrenadantes de cultivo junto a linfoci-

tos humanos y suero normal de conejo como fuente de complemento. Luego del período de incubación, el porcentaje de lisis celular fue evaluado mediante la coloración con azul de Tripán.

## 2.2-DETECCION DE INMUNOGLOBULINAS.

Este ensayo permitió la identificación y el conocimiento de la concentración aproximada de Igs. en los sobrenadantes de cultivo. Fue realizado mediante un Elisa, en donde se sensibilizó la placa con Ig. de conejo anti-Igs. de ratón, luego se incubó con diluciones de sobrenadantes de cultivo y diluciones de concentración conocida de Ig. patrón. Finalmente la reacción se reveló de forma convencional.

## 2.3-ELISA PARA SOBRENADANTE DE OKT3.

Fue desarrollado para verificar la inmunoespecificidad de los Acs. Mos. obtenidos de los sobrenadantes de cultivo de OKT3 en las distintas etapas de producción y purificación. Para ello las microplacas fueron sensibilizadas con una línea celular portadora del antígeno CD3 y enfrentadas con los sobrenadantes de cultivo en distintas diluciones, para establecer sus títulos.

## 2.4-HEMOAGLUTINACION.

Los ensayos de aglutinación fueron realizados con el objeto de determinar la actividad específica de los Acs. Mos. producidos por el hibridoma B2/C114, en los distintos eluidos de la purificación con Proteína A-sefarosa. Se realizaron ensayos de hemoaglutinación directa en portaobjetos y titulaciones en placas de 96 fosas, con eritrocitos humanos del grupo A.

## 3-PRODUCCION PASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

### 3.1-CULTIVO DE HIBRIDOMAS EN SISTEMAS DE FIBRA HUECA.

Se trabajó fundamentalmente con el sistema Vitafiber **II** de Amicon, compuesto por un cartucho de fibras huecas, un frasco spinner y una bomba peristáltica conectados por mangueras.

En una primera experiencia, se realizaron sucesivos lavados del sistema en general con solución de Hanks, medio de cul-

tivo DME sin SFB y finalmente con medio completo, ello permitió un mayor conocimiento del manejo y funcionamiento del sistema.

Para la inoculación celular, se cosecharon  $7 \cdot 10^7$  hibridomas OKT3 con una viabilidad del 80% y se inyectaron en el sistema. Se continuó con el seguimiento del cultivo, por medio de la medición de parámetros metabólicos. Al cabo de 6 días el experimento fue desechado, debido a que se encontró una viabilidad extremadamente baja y aire dentro del cartucho de fibra hueca. Con un análisis más detallado de las operaciones realizadas, pudo deducirse que el sistema no funcionó con flujo reverso, para el tipo de cartuchos utilizado.

El mismo sistema fue lavado nuevamente e inoculado con  $9 \cdot 10^7$  hibridomas OKT3, con flujo de medio de cultivo en dirección convencional. Durante una semana se sacaron alícuotas, para la medición de parámetros metabólicos y viabilidad celular, que revelaron un descenso de la viabilidad y escasa actividad metabólica sumado a un taponamiento del filtro que al ser reemplazado volvió a taponarse. Se cree que la gran cantidad de desechos celulares, producto de la alta mortalidad celular, causó el taponamiento del filtro. La baja viabilidad celular puede haberse debido a inconvenientes con el medio de cultivo o incluso a la línea de hibridomas utilizada.

Finalmente, se utilizó un cartucho nuevo (que permite el flujo reverso) y se preparó nuevo medio de cultivo para la inoculación de hibridomas B2/C114. Al cabo de 5 días se encontró el sistema contaminado, cuyo origen se desconoce. Por otro lado, se estudiaron los componentes y el funcionamiento del bioreactor de fibra hueca Acusyst-Jr (Endotronics), se observó la inoculación celular, como así también el seguimiento de su comportamiento, mediante la medición de parámetros metabólicos.

### 3.2-MICROENCAPSULACION.

Se utilizó el sistema de cultivo inmobilizado en perlas de alginato de calcio.

La encapsulación de hibridomas OKT3, en medio DME+10% de SFB, se llevó a cabo mezclando  $10 \cdot 10^7$  hibridomas con soluciones de alginato al 1,6 y 0,8%. Esta solución fue goteada, con jeringa, sobre otra de 50mM Ca Cl<sub>2</sub>/100 mM Na Cl, con la inmediata formación del gel de alginato de calcio conteniendo

Los cultivos fueron mantenidos en frascos "spinners" o erlenmeyers con agitación, con medios DME+10% de SFR, en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. Su comportamiento fue seguido durante 10 días, mediante controles diarios de parámetros del metabolismo y cinética de crecimiento celular. La viabilidad fue observada por disolución de 1 ml de perlas de alginato, en una solución de EDTA 50 mM.

Los resultados de estas experiencias no fueron del todo satisfactorios, debido a una posible acción tóxica de las perlas de alginato. Para comprobar esta hipótesis, se sembraron hibridomas en suspensión homogénea, dentro de frascos spinners y botellas, para luego agregar perlas de alginato libres de células y observar su comportamiento. Esto tampoco pudo comprobarse, debido a la dificultad del hibridoma para crecer en estas condiciones.

#### 4-PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES .

##### 4.1-CROMATOGRAFIAS DE AFINIDAD.

Se llevaron a cabo a partir de sobrenadantes de cultivo de hibridomas OKT3 y B2/C114 crecidos en semi-confluencia. Resumidamente, 50 ml de sobrenadante de cultivo fueron preincubados con 500 mg de proteína A-sefarosa CL-4B (Sigma) a 4°C y luego sembrados en una columna. Las eluciones fueron seguidas por monitoreo con UV e impresora.

Los buffers utilizados para las sucesivas eluciones fueron: Tris pH: 8,6; Fosfato pH:7; Citrato pH:5,5; Acetato pH:4,3; y Glicina pH:2,3. Con respecto a la purificación de OKT3, esta experiencia permitió obtener un gráfico bastante razonable, ya que se observa un pico de absorvancia significativo, en el eluido a pH 4,3 donde eluyen las Igs. del isotipo IgG.2a, como era de esperarse. La fracción conteniendo el pico de absorvancia fue neutralizada con O1Na y dializada contra PBS. Con B2/C114 el resultado no fue el esperado. También, fue observada la purificación de Acs. Mos. en columnas de intercambio iónico con S-Sefarosa (Pharmacia).

##### 4.2-CRITERIOS DE PUREZA.

Las distintas fracciones eluidas de las columnas de proteína-A Sefarosa, fueron evaluadas para determinar su grado de actividad específica, por las técnicas de Elisa y hemoaglutinación.

Se trabajó con geles SDS-PAGE de diferentes concentraciones

y tamaños coloreados con azul de coomassie y plata.  
Se pudo concluir que los Acs. Mos. se encontraron en las fracciones esperadas con altos grados de pureza y actividad específica, para el hibridoma OKT3.

### CONCLUSIONES

Se han cumplido los objetivos propuestos en el Programa de trabajo. Si bien no se han obtenido resultados favorables en el mantenimiento de hibridomas en gran escala, considero que hemos adquirido la tecnología necesaria para su desarrollo en nuestros respectivos países.

Por otro lado este entrenamiento me ha permitido constatar que la interacción con profesionales de otros países, es fundamental para el desarrollo de la investigación en América Latina.



Lic. Gabriel Fiszman