



**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)

19045

38p.  
grafías

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

**Contrato No. 89/70**

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

**1er. Año de Actividades**

**País: Colombia**

**Segundo Informe Técnico (Final)**



REPUBLICA DE COLOMBIA

MINISTERIO DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

MONOCLONALES  
COLOMBIA

Dependencia LABORATORIO DE INMUNOLOGIA

Oficio No. \_\_\_\_\_

Bogotá, D. E. Agosto 29 de 1.990

PROYECTO

"PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES"

Informe final del primer año.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA. Bogotá, Colombia.

Elaborado por: Oscar Orozco Díaz MD.  
Laboratorio de Inmunología  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA.

I). Aspectos Técnicos:

Continuando con lo reportado en el Informe de Avance de Actividades de Febrero 23 de 1.990, la labor principal se centró en la actividad D4, es decir en la caracterización y producción de ascitis del híbrido secretor de anticuerpos anti-fosfatasa alcalina. Al mismo tiempo se le confirió especial atención a la normalización de la metodología que permita aplicar el sistema fosfatasa-antifosfatasa (APAAP) estudiando especialmente la forma de inhibición de la fosfatasa endógena y la optimización para su uso de los diferentes sustratos y cromógenos.

Aunque relativamente extenso, creo pertinente enviar adjunta fotocopia de nuestros RESULTADOS pues este documento podrá ser útil tanto para demostrar el cumplimiento del compromiso suscrito en el Contrato como para motivar e ilustrar a los grupos en otros países interesados en este anticuerpo. Como informé en la reunión de coordinación de Agosto en Cuba, este anticuerpo está disponible para su escalamiento y/o uso por quien lo desee dentro de la Red Latinoamericana de Biotecnología.



REPUBLICA DE COLOMBIA

MINISTERIO DE SALUD

## INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

Dependencia LABORATORIO DE INMUNOLOGIA

Oficio No. \_\_\_\_\_

Bogotá, D. E. Agosto 29 de 1.990

Aparte de las CONCLUSIONES que se mencionan en el numeral 16 del anexo, quisiera resaltar que dentro de los híbridos seleccionados inicialmente, hemos continuado nuestro trabajo utilizando el F.A.8.14; el anticuerpo obtenido a partir de tumores ascíticos mantienen su buena reactividad con la enzima sin interferir con su sitio activo. Nuestros ensayos de optimización de la técnica APPAP nos ha permitido aplicarla para estudiar mejor los anticuerpos contra otros antígenos que ya hemos producido.

Además, de este proyecto hemos recibido otros beneficios, como el de adquirir la capacidad de obtener la fosfatasa alcalina de intestino de res y el estudio a fondo de varios sustratos y cromógenos para hacer más versátil nuestra capacidad técnica.

Este trabajo sobre fosfatasa alcalina fué la base para la presentación de Tesis de Grado del Señor Milton Crosby en el Departamento de Química - Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, siendo este otro beneficio indirecto en la realización de este proyecto.

El entrenamiento que realizó la Señorita Alba Lucía Cóbbita en Cuba en los meses de Mayo y Junio nos permitió comenzar a implementar la técnica de escalamiento intermedio de cultivo por escapolación con alginato de calcio, objetivo que representa para nosotros un buen avance en la capacidad de aplicación de la producción masiva de anticuerpos monoclonales; el informe sobre esta actividad fué enviado a la Coordinación por el Centro de Referencia de Cuba.

### II). Aspectos Administrativos y Financieros:

El primer desembolso programado de 7.650 dólares fué recibido a satisfacción y utilizado para comprar un lector de placas de ELISA, indispensable para la realización de este proyecto y que continuará prestando servicio en nuestra Institución. Su costo FOB fué de 5017.50 dólares y fué adquirido a través del PNUD en Colombia. El dinero sobrante se utilizó para pagar los gastos de viaje y mantenimiento de la Srta Alba Lucía Cóbbita para el entrenamiento programado y realizado en Cuba.



REPUBLICA DE COLOMBIA  
MINISTERIO DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

Dependencia LABORATORIO DE INMUNOLOGIA

Oficio No. \_\_\_\_\_

Bogotá, D. E. Agosto 29 de 1.990

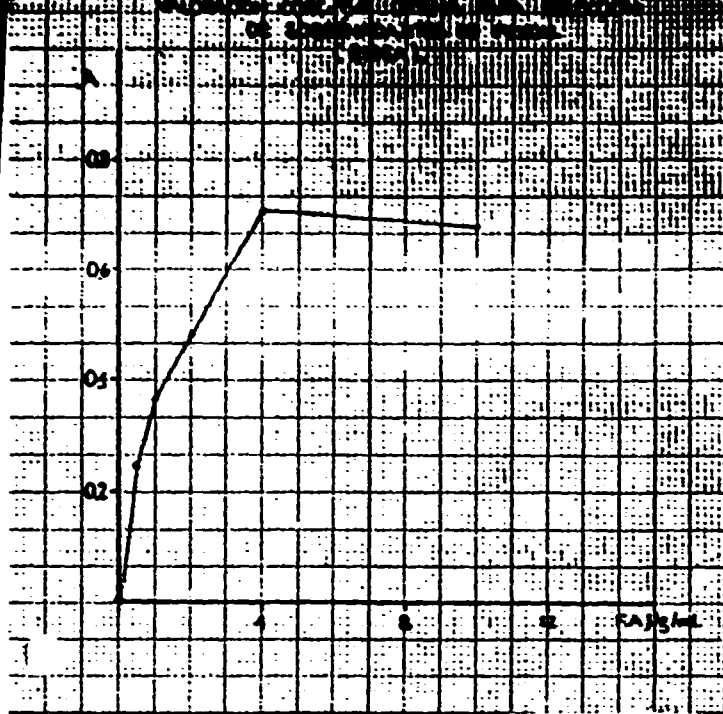
El segundo desembolso de 5.400 dólares fué recibido también a satisfacción luego del envío del Informe preliminar. De este dinero se separaron 2.200 dólares para financiar el viaje del segundo becario a Brasil, que de acuerdo a la reprogramación de actividades debe realizarse a partir del 10. de Octubre de 1.990. Los 3.200 dólares restantes cubren los gastos de comunicación (150 dólares). Información (500 dólares) y la compra de reactivos (1.550 dólares). Quedan pendientes por ejecutar 1.500 dólares cuyo desembolso está programado para ejecutarse luego de la aprobación del Informe Técnico final del primer año.

Cabe recalcar que debido a la recalendarización, hemos solicitado al Coordinador que se pueda ejecutar los 2.200 dólares dentro de una actividad que se realizará el segundo año (segundo entrenamiento en Brasil).

Estamos a la espera de definir si VECOL (Empresa Veterinaria Colombiana) suscribe los Términos de Referencia y firma el Contrato respectivo para el segundo año, en el cual se incluye como actividad principal, la participación en el escalamiento que se realizará en Brasil en Abril de 1.990

OSCAR OROZCO DIAZ MD.  
Laboratorio de Inmunología  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA.





A	FA μg/ml
0.675	10
0.690	4
0.482	2
0.376	1
0.256	0.5
0.000	0.01

PARA EL ANALISIS PRELIMINAR EN INMUNODOTT SE OBSERVO QUE LAS MAXIMAS INTENSIDADES LAS PRESENTAN LAS DILUCIONES DE 10 μg/ml, 4 μg/ml, 2 μg/ml SIENDO MAYORES Y CASI IGUALES LAS DILUCIONES DE 10 Y 4 μg/ml, LO CUAL CONCORDA CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA.

PARA EL TRABAJO DE SELECCION DE LOS GRUPOS CELULARES CON ACTIVIDAD ANTIFOSFATASA SE UTILIZARON LAS CONCENTRACIONES DE 10, 0, 4 ; SE ESCOGE RANGO INTERMEDIO DE 5 μg/ml.

LAS DISCREPANCIAS EN LOS VALORES MAXIMOS DE LA CURVA, PUEDEN DEBERSE A ERROR DE PIPETADO DE LA DILUCION IgG ANTIFOSFATASA, O DEL SUBSTRATO; YA QUE EL VOLUMEN ES TAN PEQUEÑO UNA DIFERENCIA EN POCOS μLIT. Y MAS AUN A LA SENSIBILIDAD DE LA DETECCION PUEDE CAUSAR ESTA DIFERENCIA.

#### 4. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE ANTI IgG DE RATON

SE EFECTUARON 4 PRUEBAS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION OPTIMA DE ANTI IgG DE RATON.

SE UTILIZO BUFFER DE AIDPLE Y PBS, ENCONTRANDOSE QUE EL CUOJO DE FONDO ES MUCHO MENOR AL UTILIZAR PBS.

SE UTILIZO SRI 1:200

ANTI RATON DE CONEJO: 1/100 - 1/500 - 1/1000 - 1/1500 - 1/2000 - 1/2500 - 1/3000 - 1/3500

LA CONCENTRACION DE PROTEINA FUE DETERMINADA POR LECTURA A 280 nm DE UNA DILUCION 1/100 DE LA MUESTRA

$a = 14.48$   
 $A = 0.153$   
 $D = 1 \text{ cm}$   
 $C = \text{mg/ml}$

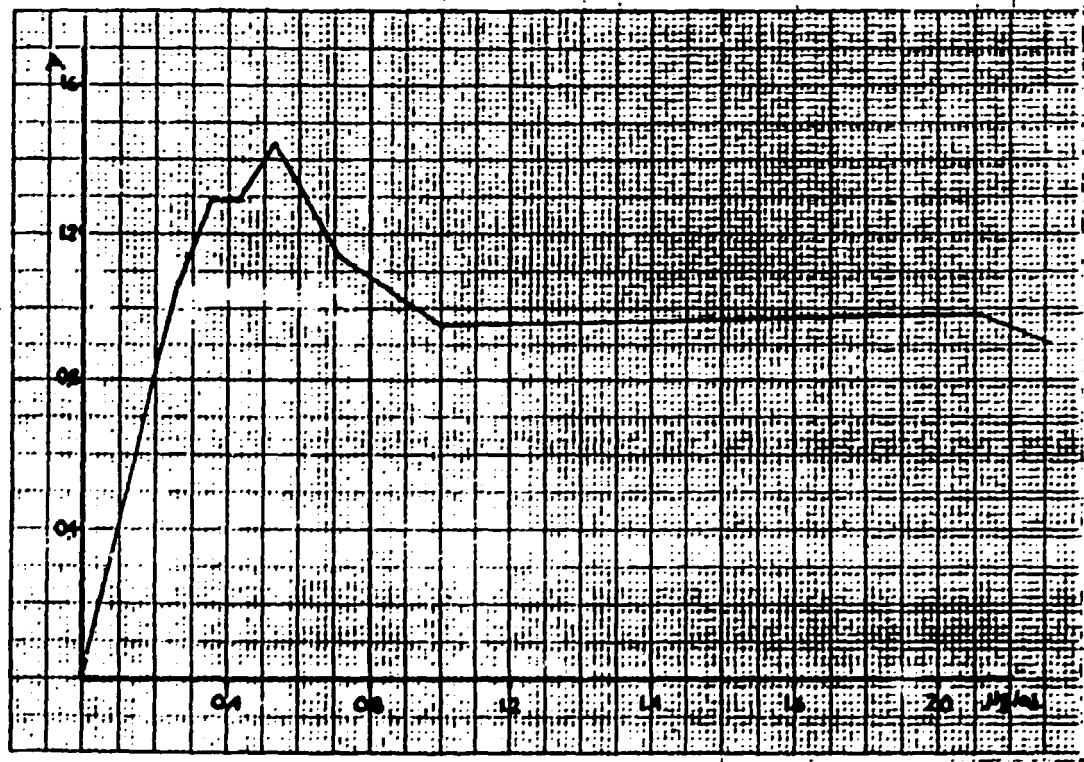
$C = 0.153 / 14.48 = 0.01057 \text{ mg/ml}$

C de IgG = 0.1057 mg/ml DE MUESTRA

C = 1057  $\mu\text{g/ml}$

SRI 1/200

			A	$\mu\text{g/ml}$
$\alpha$ Raton 1/100	/ SRI 1/200	/ $\alpha$ R+RECOP 1/500	0.605	10.57
1/500	/	/	0.986	2.114
1/1000	/	/	0.951	1.057
1/1500	/	/	1.143	0.7017
1/2000	/ SRI 1/200	/ $\alpha$ R+RECOP 1/500	1.442	0.5285
1/2500	/	/	1.281	0.4228
1/3000	/	/	1.294	0.3523
1/3500	/ SRI 1/200	/	1.182	0.3020
1/4000	/	/	1.071	0.2642
ASCITIS	/ PBS	/	0.146	-
1/100	/ PBS	/	0.047	-
PBS	/	/	0.053	-
PBS	/	/	0.048	-





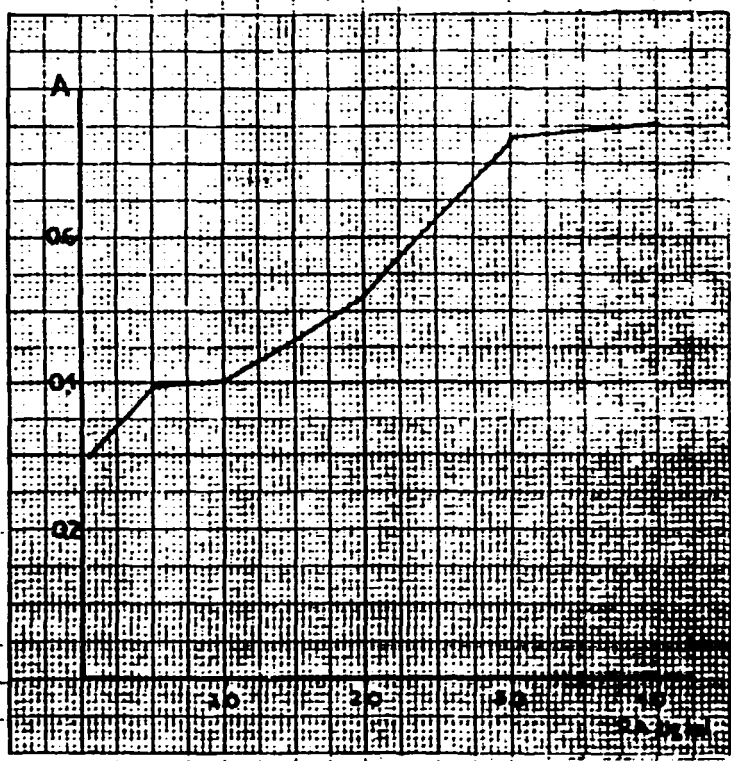
COMO SE PUEDE OBSERVAR EN EL PRIMER TRAMO DE LA CURVA A MENOR QUE AUMENTA LA CONCENTRACION DE ANTI IgG AUMENTA PROGRESIVAMENTE LA ADSORCION, HASTA ALCANZAR UN VALOR DE 1.442 (1/2000). LUEGO DE LA CUA PRESENTA UNA DISMINUCION PROGRESIVA HASTA UN VALOR MINIMO EN 0.605 (1/100)

ESTO SE PRESENTA POSIBLEMENTE AL TAMAÑO DE LAS MOLECULAS, QUE AL ENCONTRARSE EN ALTA CONCENTRACION PRODUCEN UNA DESVIACION A LA LEY DE LAMBERT-BEER; EN SU CUA LOS VALORES DEBEN ENCONTRARSE POR DEBAJO DEL LIMITE 0.15 - 0.25 DE ABSORCION, O TAL VEZ A IMPERFECCIONES POR IMPEDIMENTO ESTERICO AL HABER UNA ALTA CONCENTRACION DE PROTEINAS (IgG) QUE IMPIDE QUE SE ADIPE DEBIDAMENTE Y EN SU TOTALIDAD EL AREA DEL DIFUSION

SE TOMA LA DILUCION 1/500 PARA EFECTUAR PRUEBAS DE ELISA PARA FOSFATASA ALCALINA

DETERMINACION DE CONC. DE FOSFATASA ALCALINA QUE SE UNE AL ANTICUERPO ANTI-FOSFATASA ALCALINA.

- DILUION 1/500
- SRI 1/100
- SNR 1/100
- CONTROL POSITIVO FA - 4 U/ml
- NEGATIVO PBS
- SUBSTRATO PNP 1mg/ml EN
- BUFFER CARBONATO pH 10.4



LA CONCENTRACION OPTIMA DE FA QUE SE UNE AL ANTICUERPO ANTI-FOSFATASA ESTA ENTRE 3-4 U/ml, QUE CORRESPONDE A LOS PUNTOS DETERMINADOS CON ANTICUERPO EN DOT Y ELISA POR INMUNOFERECIDASA.

5. CARACTERIZACION DE SOBRENADANTES CON ACTIVIDAD ANTI-FOSFATASA ALCALINA

INMUNODOT SE SELECCIONAN LOS SOBRENADANTES.

- APLICAR 4 ULI. DE SOLN DE FOSFATASA ALC EN PBS DL 4 U/ml
- ELUCUAR E INCUBAR CON SOBRENADANTES 3 HORAS A 9°C AMBIENTE.
- INCUBAR CON AMPLICON MARCADO CON PEROXIDASA 1/300 1 HORA.
- REVELAR CON AEC 0.5ml / 95 ml Buffer ACETATO 0.05M pH 5 / 10 ULI H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- CONTROL POSITIVO SRI 1/100
- NEGATIVO PBS
- SUBSTRATO SNR

SE PROBARON 545 POCOS DE LOS CUALES SOLO 9 PRESENTARON ACTIVIDAD ANTI-FOSFATASA ALCALINA

5 H <sub>1</sub>	1 C <sub>3</sub>	7 G <sub>3</sub>
5 H <sub>5</sub>	1 D <sub>2</sub>	
7 G <sub>1</sub>	7 H <sub>1</sub>	
6 D <sub>3</sub>	2 B <sub>3</sub>	

ESTAS CELULAS FUERON PASADAS A CASAS DE 24 POCOS PARA MULTIPLICAR CELULAS

LOS POCOS (CELULAS O MEJOR EL ANTICUERPO) ANTI-FOSFATASA PRODUCIDO FUE CLASIFICADO DE ACUERDO A SU INTENSIDAD DE REACCION EN EL INMUNODOT.

IgG (CON AFINIDAD ALTA POR F.A)	5 H <sub>5</sub>	6 D <sub>3</sub>	7 H <sub>1</sub>
"	7 G <sub>1</sub>	1 C <sub>3</sub>	7 G <sub>3</sub>
"	3 B <sub>3</sub>	1 D <sub>2</sub>	5 E <sub>7</sub>

AUNQUE SI BIEN LA INTENSIDAD DE LA REACCION PUEDE DEBERSE TAMBIEN A UN TITULO ALTO DE IgG ANTI-FOSFATASA SE ADOPTO LA CLASIFICACION ANTERIOR.

PARA EFECTOS DEL ANALISIS SE UTILIZA LA SIGUIENTE NOMENCLATURA

S <sub>1</sub>	5 E <sub>7</sub>	S <sub>6</sub>	5 H <sub>5</sub>
S <sub>2</sub>	7 G <sub>1</sub>	S <sub>7</sub>	2 B <sub>3</sub>
S <sub>3</sub>	1 C <sub>3</sub>	S <sub>8</sub>	7 G <sub>3</sub>
S <sub>4</sub>	1 D <sub>2</sub>	S <sub>9</sub>	7 H <sub>1</sub>
S <sub>5</sub>	6 D <sub>3</sub>		

PARA EFECTOS DEL TRABAJO SE REQUIERE:

1. QUE EL ANTICUERPO POSEA BUENA AFINIDAD POR LA FOSFATASA ALCALINA Y PERMITA SU ACTIVIDAD
2. QUE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA DETECCION POSEAN BUENA AFINIDAD ENTRE SI Y NO SE SUELIEN NI DESPENDEN DEL ANTIGENO DURANTE LOS LAVADOS

PARA EFECTUAR ESTA PARTE DEL ANALISIS SE TOMA LA TECNICA ELISA POR SU RAPIDEZ Y SENSIBILIDAD ADEMAS DE AHORRAR REACTIVOS

A LOS 8 DIAS DE PASAR LAS CELULAS A POCOS EN CASAS DE 24 PARA MULTIPLICAR LAS CELULAS SE EFECTUO EL PRIMER ANALISIS PARA VALIDAR SU HABILIDAD EN LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFATAGA ALC.

OTIPATON 1/500  
SRI 1/100  
SNR 1/100  
SOBRENADANTES S<sub>1</sub>-S<sub>9</sub>  
MIELOMA P<sub>3</sub>V  
FA 1 U<sub>3</sub>/ml

ENCUENTRO QUE LA HABILIDAD DE LAS CELULAS PARA PRODUCIR ANTICUERPO ANTIFOSFATASA ALCALINA HA DISMINUIDO CON RESPECTO A LA INICIAL EN TODOS LOS GRUPOS CELULARES. POSIBLEMENTE DEBIDO CAMBIO DE UNA CUBA A OTRA Y FUERA DE ESTO A QUE TODOS LOS MEDIOS NO ESTABAN BIEN ESTABILIZADOS.

SE OBTIENEN LOS SIGUIENTES RESULTADOS

	D.O
FA (CONTROL POSITIVO)	2.901
S <sub>1</sub>	0.664
S <sub>2</sub>	0.369
SRI	0.566

ES SON LOS RESULTADOS MAS RELEVANTES EN ESTE ANALISIS. NO SE PUEDE AFIRMAR QUE NO EXISTA PRODUCCION DE IgG ANTI FOSFATASA ALC, PORQUE EXISTE LA PROBABILIDAD DE QUE LOS ANTICUERPOS PRODUCIDOS BLOQUEEN EL SITIO ACTIVO DE LA ENZIMA.

DIAS 9 DESPUES DE MULTIPLICAR LAS CELULAS DE LOS POZOS ORIGINALES SE PROBEAN DE NUEVO.

	A		A
PBS	0.093	S <sub>1</sub>	0.153
FA	2.811	S <sub>2</sub>	3.048 *
S <sub>1</sub>	0.518 *	S <sub>3</sub>	0.202
S <sub>2</sub>	1.165 *	SRI	0.769
S <sub>3</sub>	0.156	αP+FA	3.636
S <sub>4</sub>	0.131	SNR	0.134
S <sub>5</sub>	0.195	PBS	0.071
S <sub>6</sub>	0.125	PBS	0.003

LOS DATOS INDICAN QUE LOS SOBRENADANTES DE LOS GRUPOS CELULARES S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>6</sub> CONTIENEN UNA BUENA CANTIDAD DE ANTICUERPO ANTIFOSFATASA ALC, Y QUE POR EL CONTRARIO LOS DEMAS SOBRENADANTES NO POSEEN INMUNOGLOBULINA O SI LA POSEEN ESTOS SE UNEN POR EL SITIO ACTIVO DE LA ENZIMA IMPIDIENDO SU ACCION SOBRE EL SUBSTRATO.

OTRO FACTOR QUE PUEDE AFECTAR ESTOS RESULTADOS ES LA BAJA AFINIDAD QUE PRESENTAN ALGUNOS ANTICUERPOS Y SE UNIONES MUY DEBILES CON LA ENZIMA SEA PERO CON LOS LAVADOS DE PBS-T.

EL DIA 12 SE EFECTUA OTRO CONTROL DE LOS GRUPOS CELULARES PARA VERIFICAR SU CAPACIDAD DE PRODUCIR ANTICUERPOS ANTI FOSFATASA ENCONTRANDESE QUE LOS UNICOS QUE CONSERVAN SU CAPACIDAD PARA PRODUCIR ANTICUERPOS SON S<sub>2</sub> D.O 0.254 Y S<sub>6</sub> D.O 1.613.

ESTO PUEDE DEBERSE A QUE DENTRO DE LOS GRUPOS CELULARES POSIBLEMENTE SE ENCONTRABAN UNOS POCOS GRUPOS CELULARES CAPACES DE PRODUCIR EL ANTICUERPO DESEADO Y CON LA MANIPULACION ESTOS PUEDEN HABER SIDO MALDISTRIBUIDOS Y LESIONADOS MURIENDO LENTAMENTE Y CAUSANDO ESTE EFECTO DEGRADADO.

PARA VERIFICAR ESTOS RESULTADOS Y CERRAR QUE LOS GRUPOS CELULARES HAN PERDIDO ACTIVIDAD EN LA PRODUCCION DEL ANTICUERPO DESEADO, SE EFECTUO UN INMUNODOT.

FA 4  $\mu$ g/ml

S<sub>1</sub> a S<sub>4</sub>

CONTROL POSITIVO SRI

REVELADO CON PERIDINASA (AEC)

SE ENCONTRO QUE LOS SUPERVIVIENTES QUE SON PRODUCTORES ANTICUERPO ANTI FOSFATASA A

SRI S<sub>1</sub> +

S<sub>2</sub> +/-

S<sub>3</sub> +

S<sub>4</sub> +

SRI ++

S<sub>1</sub> - 5E7

S<sub>2</sub> - 7G7

S<sub>3</sub> - 6D<sub>3</sub>

S<sub>4</sub> - 7G<sub>3</sub>

ANTICUERPO DE BAJA AFINIDAD

AFINIDAD INTERMEDIA

ALTA

INTERMEDIA

ESTE RESULTADO ES CONFIRMADO POR ELISA ENCONTRANDOSE QUE S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> Y S<sub>4</sub> POSEEN AFINIDAD POR FA Y PERMITEN SU ACTIVIDAD

DO	
S <sub>1</sub>	0.102
S <sub>2</sub>	0.281
S <sub>4</sub>	3.130
FA	2.474
PBS	0.074

EL ANTICUERPO PRODUCIDO POR EL GRUPO S<sub>4</sub> RESPONDE DE LA FOSFATASA ALC LO CUAL NO CONCORDA CON LOS ANALISIS INICIALES, PUES ESTA CLASIFICADO COMO DE ALTA AFINIDAD POR LO CUAL PODEMOS ASUMIR QUE SE UNE A LA F. ALC POR SU SITIO ACTIVO

DE LOS CUATRO GRUPOS QUE PARECEN TENER Y CONSERVAR SU ACTIVIDAD PRODUCTORA DE ANTICUERPO ANTI FOSFATASA ALC SERAN CLONADOS POR DILUCION LIMITE

CLONACION POR DILUCION LIMITE

SE EFECTUARAN DILUCIONES DE LAS CELULAS QUE MOSTRABAN POSEER ACTIVIDAD EN LA PRODUCCION DE ANTICUERPO ANTI FOSFATASA, PARA QUE POR CADA 100  $\mu$ lit. DE SUSPENSION CELULAR HUBIERA 1 CELULA

LA SELECCION DE LOS CLONES POSITIVOS SE REALIZO POR EL SISTEMA ELISA UTILIZANDO COMO SUBSTRATO PNPP

CONTROL NEGATIVO FA 4  $\mu$ g/ml  
 NEGATIVO PBS  
 " MIELOMA

LOS CLONES DE LOS GRUPOS S<sub>1</sub> Y S<sub>2</sub> NO PRESENTAN UNA ACTIVIDAD DE FOSFATASA AL UTILIZAR EL SUBSTRATO. LOS CLONES DEL GRUPO S<sub>3</sub> PRESENTAN HABER PERDIDO SU HABILIDAD PARA PRODUCIR ANTICUERPO ANTI-FOSFATASA ALCALINA. O PODEMOS ASUMIR QUE EL ANTICUERPO SE UNE AL SITO ACTIVO DE LA FOSFATASA AL.

LOS CLONES DE LOS GRUPOS S<sub>2</sub> Y S<sub>8</sub> FUERON LOS QUE MOSTRAN POSEER UN BUEN NIVEL EN ACTIVIDAD ANTI-FOSFATASA Y ACTIVIDAD ENZIMATICA

LOS QUE MUESTAN ACTIVIDAD CAPTURANDO LA ENZIMA Y PERMITIENDO SU ACTIVIDAD FUERON 2.11 E 15 S<sub>2</sub> - P.C., AUNQUE TODOS LOS CLONES DEL GRUPO CELULAR S<sub>8</sub> POSEEN BUENA ACTIVIDAD CAPTURANDO F.A

DESPUES DE 20 DIAS TODOS LOS SOBRENADANTES DE LAS CELULAS MULTIPLICADAS, ALMACENADO A 4°C Y CON AZUDA DE SODIO AL 0.01% HAN CONSERVADO SU ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD

PARA PRODUCIR ASCITIS SE HA ESCOGIDO EL CLON 8.14

### 7. PRODUCCION DE ASCITIS.

SE INYECTAN DOS INYECCIONES B.16/C, DE PESO APROX 30g POR VIA I.P CON ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND. 0.5ml.

SE EFECTUA INOCULACION DE SUSPENSION CELULAR DE B.14 EN SOLUCION SALINA (APROX 7 MILLONES) POR VIA I.P., OBTENIENDOSE APROX 3ml DE ASCITIS

LA ASCITIS OBTENIDA FUE DEJADA TODA LA NOCHE A 4°C CON MDCI Y POSTERIORMENTE CENTRIFUGADA A 12000 rpm POR 20min A 4°C

AL EFECTUAR DILUCIONES SERIADAS NO SE OBTIENE EFECTO DE DILUCION Y EL TITULO DEL ANTICUERPO FUE MUY BAJA, LAS INTENSIDADES NO FUERON MAYORES DE 0.343

### 8. ENSAYO DE LA TECNICA APAAP SOBRE MUESTRA DE MEDULA OSEA N°1

SIGUIENDO LA TECNICA DESCRITA POR KUREL A. LUNGT YAM

- PUL DE ANTICUERPO TAN LIQUIDO: 25 ULIT
- ANTI CALI. DE CONEJO 1/50
- COMPLEJO APAAP SOBRENADANTE 8.14 + 30 ULIT DE FOSFATASA ALCALINA

#### SUBSTRATO

- CL NAFOL FOSFATO DE SODIO 2 mg
- 0.2 ml DE N,N DIMETILFORMAMIDA
- 9.8 ml DE TRIS BUFFER pH 8.2 0.1M
- 10 mg AZUL RAPIDO
- 20 ULIT DE LEVAMISOL 0.45 M
- REACCION POSITIVA LIBRE CON COLECCION AZUL

EL LIAMISOL ES EXTRAIDO DE TABLETAS DE TEMISOL, LA SOLUCION ACUOSA ES ADECUADA  
Y ALMACENADA A 4°C

→ EL RESULTADO OBTENIDO FUE NEGATIVO.

LA MUESTRA HABIA PERDIDO GRAN CANTIDAD DE CELULAS DEBIDO A LOS LAVADOS, PERO  
LAS CELULAS QUE PERMANECEN FODAS NO PRESENTAN NINGUNA COLORACION.

SE EFECIO UN CONTROL POR INMUNOFLUORECENCIA OBTENIENDOSE UN RESULTADO CON INTERES  
DE DETECCION ESOS; POR LO CUAL SE EFECTUA UN CONTROL SOBRE EL GRADO DE ANTICUEROS UTILIZANDO

LA REACCION SE LLEVA A CABO DE IGUAL MANERA Y EL CONTROL SE EFECTUA POR INMUNODOT

COMO ANTIGENO SE USÓ : ANTICUEROS PRIMARIO  
ANTI RAIDN : 1/100  
COMPLEJO APAAP :  
CONTROL POSITIVO F.A  
" NEGATIVO PBS

EL CONJUNTO DE ANTICUEROS ES ESTABLE Y SE UNEN ENTRE SI EN BUEN GRADO  
SI EXISTE ANTIGENO CELULAR DEBE SER DELECTADO POR SISTEMA APAAP

CONTROL POSITIVO APAAP

FOSFATASA ALCA 4 Ug/ml +++  
CONJUNTO APAAP ++

LOS POSIBLES PUNTOS CRITICOS EN EL ANALISIS INMUNODOTQUIMICO PUEDEN ENCONTRARSE EN LOS  
TIEMPOS DE INCUBACION LAVADOS CONCENTRACION DE SUBSTRATO, YA QUE EN INMUNODOT  
LOS PERIODOS DE INCUBACION SON MAYORES

## 9 EVALUACION INMUNODOTQUIMICA DE LA TECNICA APAAP N°2

MUESTRAS : MCF-7 + ESTRADIOL  
MCF-7  
HELLA

SE EVALUARA

SENSIBILIDAD DEL SUBSTRATO A FOSFATASA ALC.  
EFECTIVIDAD EN LA INHIBICION DE F. ALCALINA ENDOGENA  
EFECTIVIDAD DEL SISTEMA APAAP

ASCTIS OBC 133.1 1/60  
SRI RECEPTOR ESTROGENO 1/50  
SNR 1/50  
C/RACION DE CONJUNTO 1/20

LAS MUESTRAS SON FODAS CON ACEONA A -20°C POR 5 MIN.  
 LAVAR CON PBS 5 min.  
 INCUBAR CON ALBUMINA AL 4% EN PBS-T POR 20 MIN.  
 LAVAR CON PBS 3 x 5 min.  
 ANTICUERPO PRIMARIO 1 hora 37°C Amb.  
 LAVAR CON PBS 3 x 5 min.  
 ANTI RACION 1 hora 37°C Amb.  
 LAVAR CON PBS 3 x 5 min.  
 COMPLEJO APAAP 2 horas a 37°C Amb.  
 LAVAR CON PBS 3 x 5 min.  
 BLOQUEO CON LEVAMISOL 1 mM 5 min.  
 ADICION SUBSTRATO 20 min.  
 LAVAR CO.

POZO					POZO										
1	PBS	/	ORACION	/	APAAP	/	LEVAMISOL	7	PBS	/	ANTI RACION	/	APAAP	/	LEVAMISOL
2	SRI	/	"	/	"	/	"	8	SRI	/	"	/	"	/	"
3	1331	/	"	/	"	/	"	9	1331	/	"	/	"	/	"
4	ASCITIS	/	"	/	"	/	"	10	ASCITIS	/	"	/	"	/	"
5	SNR	/	"	/	"	/	"	11	SNR	/	"	/	"	/	"
6	PBS	/	"	/	"	/	"	12	PBS	/	"	/	"	/	"

PARA VALIDAR LA ACTIVIDAD DEL LEVAMISOL COMO BLOQUEADOR DE F.A. ENDOGENA, SE ADICIONA LEVAMISOL AL POZO 1 Y 7 ; AL POZO 6 Y 12 NO SE ADICIONA LEVAMISOL.

AL ADICIONAR EL SUBSTRATO EN NINGUNO DE ESTOS 4 POZOS SE NOTO CAMBIO DE COLOREACION EN LAS CELULAS, POR LO CUAL PODEMOS DECIR QUE LA ACTIVIDAD DE F.A. ENDOGENA SI EXISTE NO ALTERA EL SUBSTRATO.

EL POZO 10 PRESENTA ALTA REACTIVIDAD, PUES HA TOMADO UNA COLOREACION AZUL INTENSA SI LA ACTIVIDAD ES DEBIDA SOLO A LA F.A. DEL SISTEMA APAAP. LA ASCITIS POSEE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS DE CELULAS HELA.

EL SRI Y SNR PRESENTAN UNA REACTIVIDAD SIMILAR, UN POCO MAYOR EN EL SRI. EL COLOR QUE SE DA EN LAS CELULAS NO ES AZUL COMO SE ESPERABA, SINO OCASIONAL.

LAS CELULAS TRATADAS CON SRI PRESENTAN PUNTOS EN EL CITOPLASMA LO CUAL NO OCURRE CON EL SNR.

LOS RESULTADOS NO PUEDEN SER TOMADOS COMO POSITIVOS, YA QUE LA COLOREACION NO CORRESPONDE AL ESPERADO.

# 10. OBTENCIÓN DE FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL

SE TOMÓ EL MECONIO DE UNA PORCIÓN DE INTESTINO DELGADO Y SE AÑADIÓ APROX 400 ml DE SOLUCIÓN SALINA, LA SOLUCIÓN FUE HOMOGENIZADA Y GUARDADA A 4 GRADOS TODA LA NOCHE. LUEGO SE EFECTUÓ UNA GENTRIFUGACIÓN A 12000 RPM.

EL SOBRENADANTE FUE TOMADO Y CONGELADO A -20°C

SE DESCONGELÓ Y SE ENSAYÓ EL MÉTODO A SEGUIR PARA EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA: SE PUEDE PRECIPITAR CON  $(NH_4)_2SO_4$  O EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

DESPUES DE ENSAYAR VARIAS PRECIPITACIONES CON  $(NH_4)_2SO_4$  EN DIF. CONCENTRACION Y EXTRACCIÓN CON SOLVENTES SE ESCOGIÓ COMO MÉTODO PARA LA EXTRACCIÓN EL SEGUNDO, YA QUE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SE HABÍA PERDIDO EN PARTE CON LA PRECIPITACIÓN CON  $(NH_4)_2SO_4$

SE OBTUVIERON APROX 1500 mg DE PROTEÍNA EN PESO SECO

DEL EXTRACTO PUEDO OBTENIDO SE VALORA:

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

AFINIDAD DEL ANTICUERPO POR LA ENZIMA

ANTI-RATON 1/500

ANTICUERPO UTILIZADO 84

DILUCIONES DEL EXTRACTO 1/100 - 1/200 - 1/400 - 1/800 1/1600 - 1/3200 Y EXTRACTO PUCO

Abs. 1.762 1.753 1.761 1.978 1.801 1.738 1.742 PBS 0.123

AL EFECTUAR LAS DILUCIONES NO SE OBSERVA DISMINUCIÓN DE LA ABSORCIÓN LIGADA INDICANDO QUE LA CONCENTRACION DE ENZIMA ES ALTA

EL ANALISIS DEJA VER QUE EL ANTICUERPO RECONOCE LA ENZIMA Y QUE ESTA POSEE ACTIVIDAD

## VALORACION DE EXTRACTO ENZIMATICO

### CURVA PATRON

SOLUCION PNPP 1mg/ml

35  $\mu$ l DE FA = 30 mg Vol final 400  $\mu$ l = 75  $\mu$ g/ml

SOLUCION FRENADORA NaOH 2N

MUESTRA N°	PNP $\mu$ l	FA $\mu$ g/ml	(1) Abs. 6mn	(2) Abs. 12 mn
1	200	75	0.150	0.593
2	200	57.5	0.447	0.467
3	200	188	0.197	0.314
4	200	94	0.070	0.118
5	200	47		
6	200	24		
7	200	12	DL 1:2	DL 1:5
8	200	06		
9	200	03		
10	200	015		



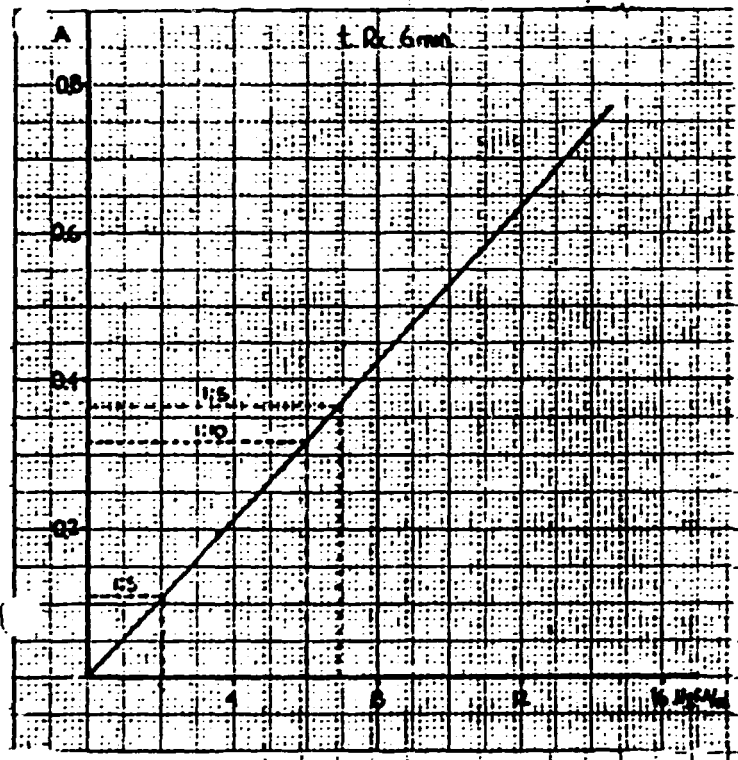
10 PARA EFECTUAR LECTURA DE LAS MUESTRAS SE USO AUN. NOMEN. DE 1 ml. 2325  
 25 ml

- VOL. DE REACCION ..... 900  $\mu$ l.
- VOL. DETRODO PARA LA LECTURA ..... 200  $\mu$ l. +
- VOL. DE SOLUCION FRENADORA ..... 100  $\mu$ l. +
- VOL. DE BUTIR CALORIMETRO ..... 700  $\mu$ l. +
- VOL. FINAL ..... 1000  $\mu$ l.

DEL DE LA LECTURA A 6mm 1:5

EXTRACTO DE FOSFATASA ALCALINA

1:5	→	1:10	→	0.318	A 6mm
1:10	→	1:5	→	0.364	"
1:20	→	1:5	→	0.110	"



DILUCION

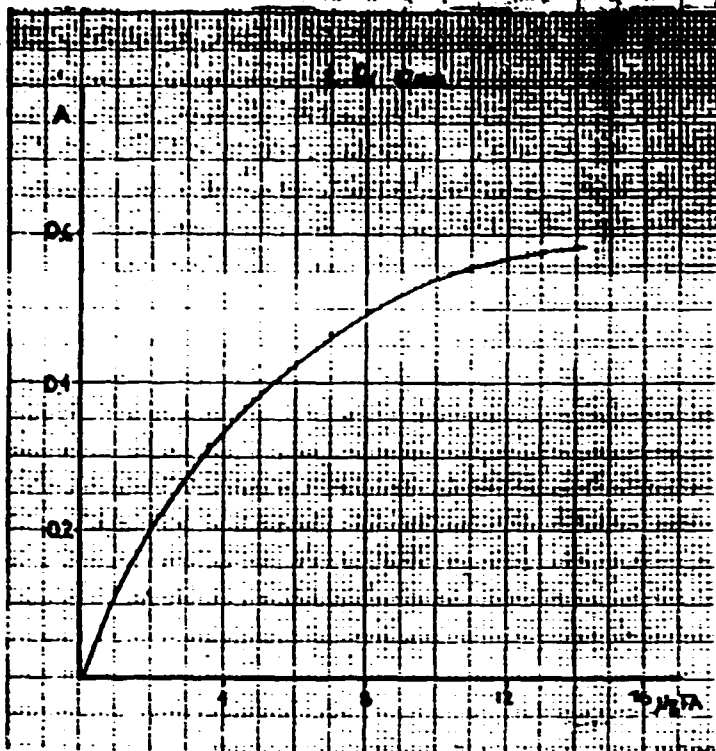
1:5  
 $mg FA = 6 \cdot 10 \cdot 5 \cdot \frac{5}{2} = 750 \mu g$

1:10  
 $mg FA = 6.45 \cdot 5 \cdot 10 \cdot \frac{5}{2} = 806 \mu g$

1:20  
 $mg FA = 2.2 \cdot 5 \cdot 20 \cdot \frac{5}{2} = 550 \mu g$

PROMEDIO 702  $\mu g$  / ml.

35.1 mg F.A. EN 50 ml DEL EXTRACTO



ELECTROFORESIS DE EXTRACTO DE F.A. INTESTINAL DE ORIGEN BOVINO EN GEL DE POLIACRILAMIDA

SE PREPARO UNA MUESTRA QUE CONTENIA 7.7 mg/ml DE PROTEINA DE LA CUAL SE TOMARON 40 μLIT PARA EFECTOS DEL ANALISIS.

PROTEINAS UTILIZADAS	P.M	R <sub>f</sub>
	94.000	11
	67.000	19
	43.000	31
	30.000	42

EL EXTRACTO ANALIZADO MOSTRO 4 BANDAS CON R<sub>f</sub> 11, 16, 28, 40.

LA F.A DEL EXTRACTO PRESENTA BUENA ACTIVIDAD SOBRE EL SUBSTRATO PAPP. ESTA ACTIVIDAD DEBE CUANDO SE UNE AL ANTICUERPO B.14

AL EFECTUAR DILUCIONES DE LA ASCITIS B.14 DE 1/100 A 1/25000 NO SE APRECIA EFECTO DE LA DILUCION TODOS LOS POCOS PRESENTAN LA MISMA ACTIVIDAD MEDIDA EN D.O. LO CUAL NO ES REPRESENTATIVO PUES PARECE SER MAS QUE TODO RUIDO DE FONDO.

POR OTRA PARTE LA FOSFATASA ALC. NO SE FDA A LA PLACA DE ELEA, POSIBLEMENTE DEBIDO A LA ALTA CONCENTRACION DE OTROS COMPONENTES DIFERENTES A F.A. LO CUAL PODRIA TAMBIEN INTERFERIR CON EL PROBLEMA ANTES MENCIONADO. ESTO EN LA BSA SENSIBILIDAD OBTENIDA EN LO QUE ALIQUO ANALISIS.

ASI MISMO LA CONDICIONES EN LAS QUE LA ENZIMA FUE EXTRAIDA NO SON LAS OPTIMAS Y LA BROMA QUE PUEDE UNA ESTRUCTURA ESPAZIA LA PUED HABERSE DETEGRADO POR EFECTO DE PH, FUERZA IONICA, TEMPERATURA, O IONES PESADOS MUY DIFERENTES A LOS QUE LE PROPORCIONAN SU ESTABILIDAD (Zn, Mg). DEBIDO A ENO SE EFECTUO UN ANALISIS PARA DETERMINAR SI EL ANTICUERPO RECONOCE EFECTIVAMENTE LA FOSFATASA ALC DEL EXTRACTO.

### INMUNO DOT

SE OBSERVA SI LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS EN LA FUSION RECONOCEN LA FOSFATASA ALCALINA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PA7	PA7	PA6	PA5	PA1	PA3	PA2H	PA2H	PA2	PA1	PA1	PA1
B	ASC. R14 1/100	7G1	SRI	PA8H	PA2	PA23	PA14	PA22	PA12	PA12	PA9	PA8
C	PA5	PP5	PB5	PB5	PP5	PP5	PB5	PB5	NSO 1/100	P3V	SNE	AL. RM 1/100

COMO SE OBSERVA EN LOS RESULTADOS EL SOBRENADANTE DE B.14 TIENE UN BASTO NIVEL DE ANTICUERPOS PUES NO APARECE EN LA SEÑAL DE COLORACION DADA POR EL AEC.

DESPUES DE CASI 3 MESES DE LA FUSION LOS SOBRENADANTES AUN CONSERVAN SU ESTABILIDAD EN CUANTO AL ANTICUERPO

LOS UNICOS SOBRENADANTES QUE RECONOCEN F.A DEL EXTRACTO SON PA1 PA14 PA12, LOS OTROS SOBRENADANTES O POSEEN UN TITULO BASTO DE ANTICUERPOS O SE HAN DEGRADADO. LO MISMO OCURRE CON LAS ASCITIS EN DILUCION 1/100.

ESTOS SOBRENADANTES SE SON PRUBADO EN ELISA PARA VERIFICAR SI LA FOSFATASA UNIDA A ELLOS POSEE ACTIVIDAD

# ELISA PARA EL ANTICUERPO PA.1 Y SUS COINES

- ANTI-BATON DE CONEJO 1/500
- SUPERADONES PA 1
- PA 12
- PA 14

FA DEL EXTRACTO DILUCION 1:2

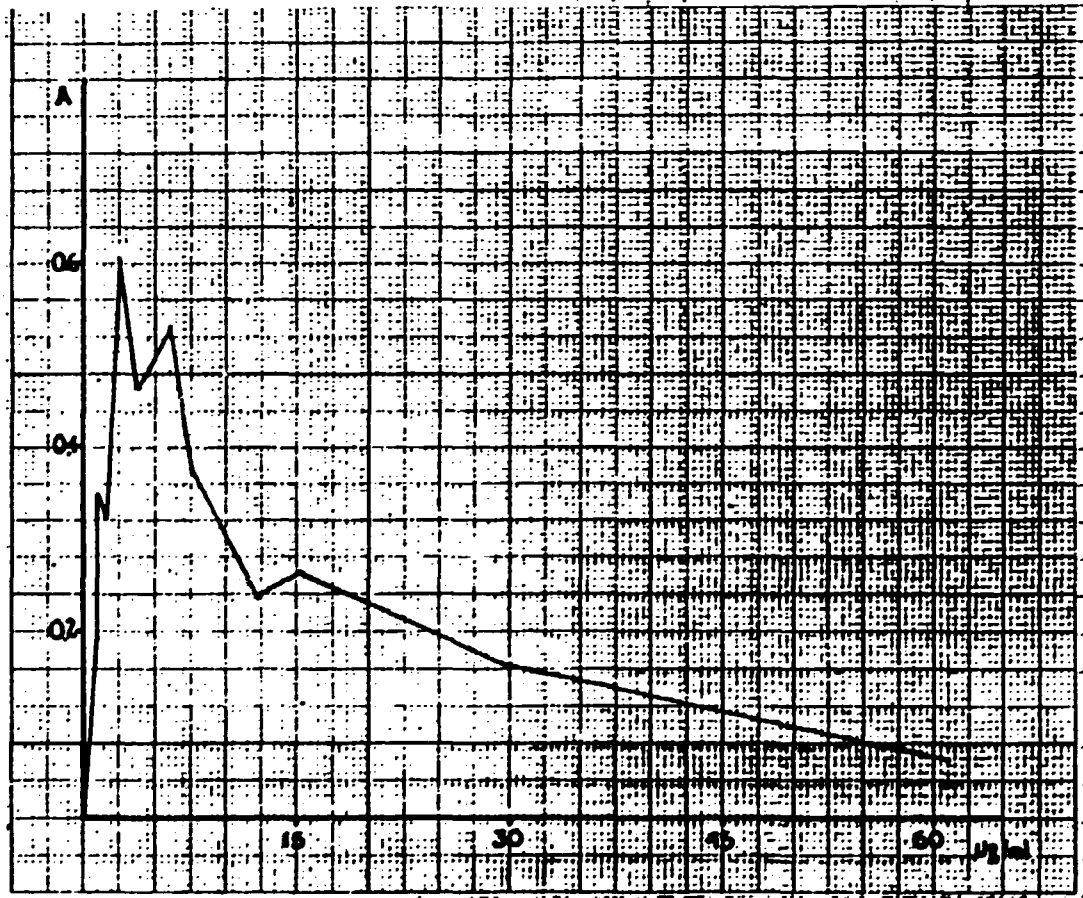
REACTIVO PNP EN BOTTLE LABORADO DSM pH 10.4

NO SE TOMO NINGUNA LECTURA DE ESTE ELISA YA QUE NO SE OBSERVO NINGUNA REACTIVIDAD FUENTE AL SUBSTRATO

SI EL ANTICUERPO PA 1, PA 12, PA 14 ESTA RECONOCIENDO FOSFATASA ALCALINA, PARECE UNIRSE A ESTA POR SU SITIO ACTIVO, IMPIDIENDO ASI SU ACCION SOBRE EL SUBSTRATO

DEBIDO A LA PLEBIDA DE LA SENSIBILIDAD EN LA TECNICA APAAP SE VALIDARON TODOS LOS REACTIVOS EMPLEADOS PARA ESTA TECNICA

## II CURVA DE VALIDACION DE ANTI-BATON DE CONEJO



ANTI-DIFON

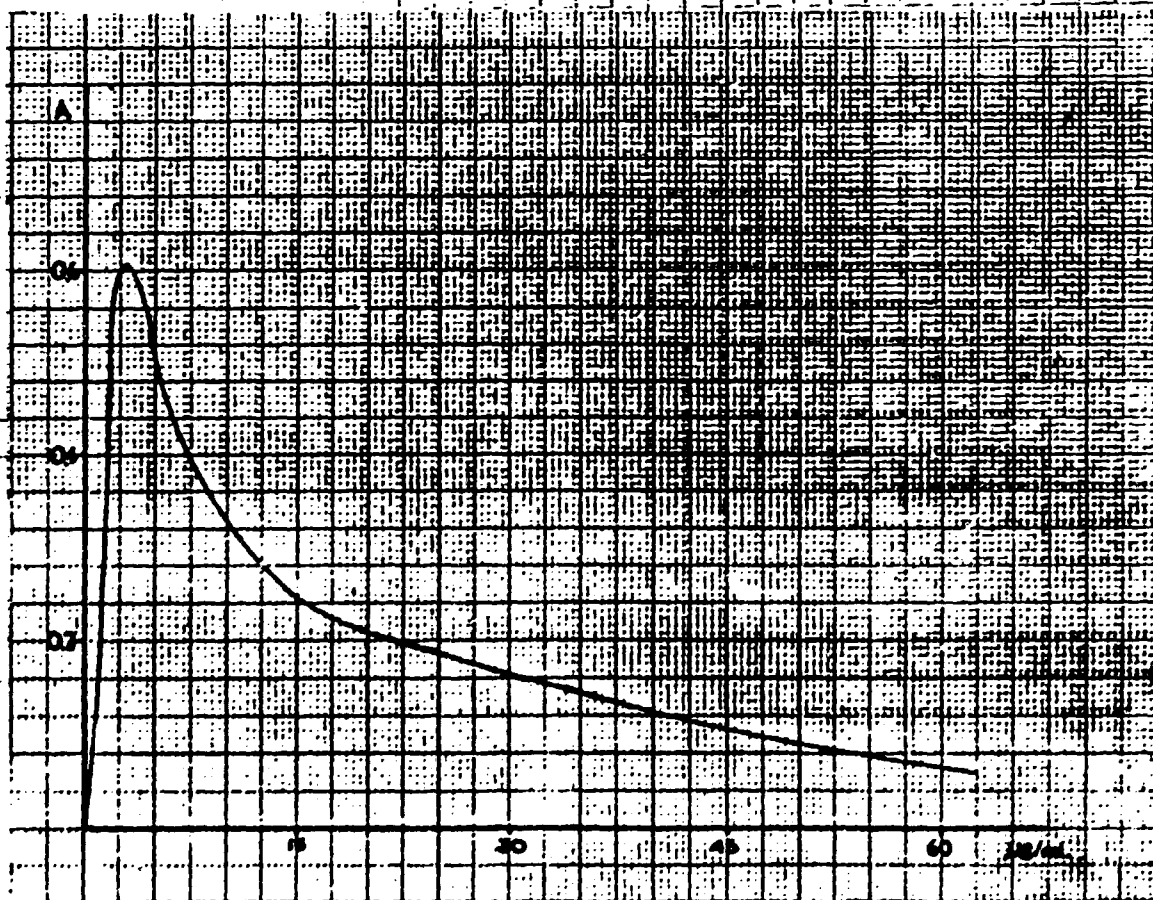
	Abs
1/100	0.418
1/200	0.525
1/400	0.619
1/800	0.856
1/1600	0.822
1/3200	0.682
1/6400	0.517

	Abs
1/500	0.593
1/1000	0.727
1/2000	1.003
1/4000	0.703
PBS	0.018
MIL	0.356
SNR	0.445

BLANC 0.080

LA CONCENTRACION EN

	µg/ml	A
1/100	61	0.062
1/200	30.5	0.169
1/400	15.3	0.263
1/500	12.2	0.237
1/800	7.63	0.371
1/1000	6.1	0.530
1/1600	3.81	0.466
1/2000	3.05	0.647
1/3200	1.9	0.326
1/4000	1.53	0.347
1/6400	0.963	0.191



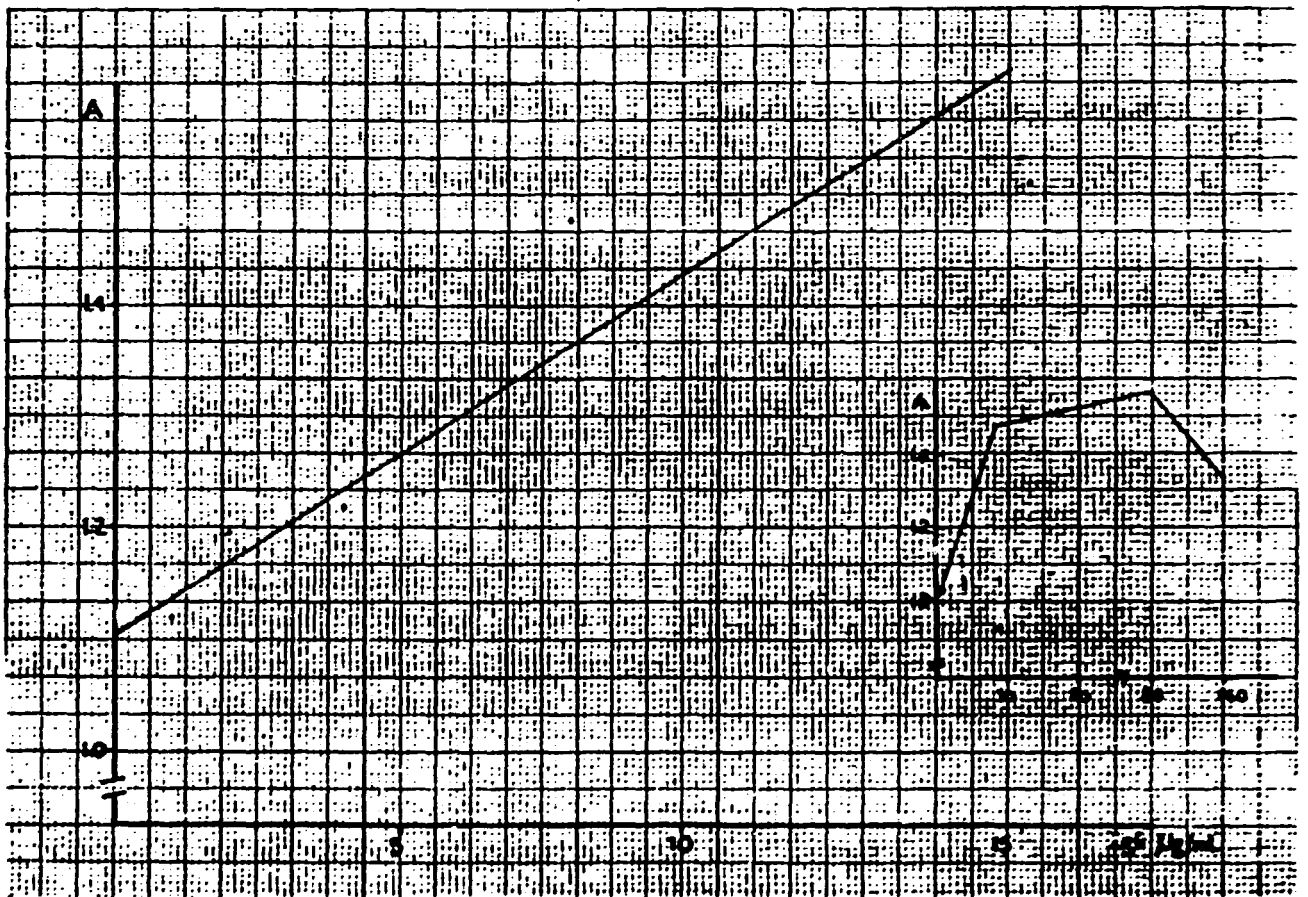
SI TOMAMOS LOS PUNTOS MAS REPRESENTATIVOS DE LA GRÁFICA INICIAL Y EXTRAPOLAMOS LOS ERRORES DE DILUCIÓN POR MEDICIÓN DE LOS VOLÚMENES OBTENEMOS LA GRÁFICA ANTERIOR

COMO SE PUEDE OBSERVAR A MENIDA QUE AUMENTA LA CONCENTRACION AUMENTA LA ABSORCIÓN; YA QUE SE USO LA MISMA CONCENTRACION DE IgG DE RATON, ESTO INDICA QUE LA CONCENTRACION OPTIMA DE ANTICORPO DE CONEJO ES  $1/2000$ , QUE CORRESPONDE A LA ABSORCIÓN MAXIMA (0.647)

PROBABLEMENTE A PARTIR DE ESTE PUNTO LA CONCENTRACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS PUEDE UN LIMITE EN EL CUAL SE ACUMULAN EN LA PLACA UNA MOLECULA CON OTRO INTERFERIENDO O OBSTACULIZANDO SU ACCION ANTICORPO, IMPIDIENDO QUE SE UNAN UNIFORMEMENTE AL ANTICORPO, POR LO CUAL A UNA CONCENTRACION MAXIMA DE  $1/1000$  (61.1  $\mu\text{g/ml}$ ) LA ABSORCIÓN ES MINIMA 0.062

SE TOMO COMO BLANCO DE CALIBRACION DE LA GRÁFICA, LA LECTURA DE MIELOMA, QUE ASIMISMO NO CONTIENE IgG; EL VALOR ES ALTO 0.356, LO CUAL INDICA QUE EN EL SOBRENADANTE PUEDEN EXISTIR SUSTANCIAS QUE PRODUCEN RUIDO DE FONDO, SEAN PROTEINAS, O SUSTANCIAS DE EXCRECIÓN DEL MIELOMA O DEL MEDIO DE CULTIVO.

## 12. CURVA DE VALORACION DE IgG DE RATON



Dil.	IgG $\mu\text{g/ml}$	A
1/5	160	1.330
1/10	80	1.569
1/50	16	1.511
1/100	8	1.479
1/200	4	1.218
1/400	2	1.194
1/800	1	1.142
1/1600	0.5	1.142

SE OBSERVA QUE LA LINEALIDAD QUE DEBE CONSERVAR A MEDIDA QUE SE AUMENTA LA CONCENTRACION DE IgG, SE PIERDE TOTALMENTE POR ENCIMA DE VALORES DE 30  $\mu\text{g/ml}$ . POR LO CUAL PARA EFECTOS DE UNA CURVA DE CALIBRACION TENDRIAMOS QUE OMBIAR ESTOS ULTIMOS PUNTOS.

ESTAS DESVIACIONES PUEDEN DEBERSE A UN AUMENTO EN EL RUIDO DE FONDO POR ALGUNA MOLECULA PRESENTE EN EL SUELO O EN SU DEFECTO A LA ALTA CONCENTRACION DE IgG QUE PUEDE LLEGAR A EXISTIR EN SOLA EN UN MOMENTO DADO LO CUAL PRODUCE ESTE TIPO DE VARIACIONES, ESTO SI DESCONTAMOS LOS ERRORES POR DILUCION Y POR PIPETADO.

### 13. COMPARACION ENTRE F.A COMERCIAL Y DE EXTRACTO.

DILUCION	A F.A com.	A F.A EXT.
1/50	1.021	0.885
1/100	0.807	0.774
1/200	0.619	0.785
1/400	0.613	0.730
1/800	0.558	0.723
1/1600	0.404	0.718
1/3200	0.302	0.859
1/6400	0.222	-

SE PUEDE OBSERVAR QUE LA ACTIVIDAD DE LA F.A DEL EXTRACTO ES UN POCO MENOR QUE LA DE LA F.A COMERCIAL. PERO EN ESTA SE OBSERVA EFECTO DE LA DILUCION, LO CUAL NO OCURRE CON LA F.A DEL EXTRACTO.

POSIBLEMENTE CONTIENE UNA ALTA CONCENTRACION DE F.A, LA CUAL SE HA ALCANZADO A DEGRADAR DURANTE EL PROCESO O LA MAYOR PARTE DE LA SENAL ES RUIDO DE FONDO DEBIDA A OTROS PROTEINAS Y ENZIMAS PRESENTES EN EL EXTRACTO QUE PUEDEN SER RECONOCIDAS POR EL ANTICUERPO.

AL COMPARARSE LOS DOS EXTRACTOS OBTENIDOS, UTILIZANDO COMO CONTROL F.A. TOMERUN CALORADO, A LA CAJA DE EUSA SE OBTUVIERON LOS SIGUIENTES RESULTADOS

DILUCION	A ETT <sub>1</sub>	A ETT <sub>2</sub>
1/50	0.970	0.890
1/100	0.851	0.890
1/200	0.736	0.832
1/400	0.607	0.842
1/800	0.472	0.717
1/1600	0.279	0.358
1/3200	0.114	0.003
FA	3.403	0

COMO PODEMOS OBSERVAR SE OBSERVA UN EFECTO DE DILUCION EN EL EXTRACTO N°1 AL CONTAR EL EXTRACTO N°2 NO PRESENTA ESTE EFECTO POR LO CUAL ES ACONSEJABLE EFECTUAR UNA PURIFICACION DE ESTOS EXTRACTOS YA QUE ESTO NO ES LOGICO SI SE EFECTUAN DILUCIONES

ESTOS RESULTADOS INDICAN POSIBLEMENTE UNA ACTIVIDAD NO DIRECTAMENTE A FOSFATASA ALCALINA SI NO UNA CATALISIS PRODUCIDA TAMBIEN POR EFECTO DE ALGUNO DE LOS COMPONENTES ACOMPAÑANTES DE LA FOSFATASA ALC EN EL EXTRACTO.

#### 14 OBTENCION DE ASCITIS A PARTIR DE F.A. 8.14

SE INOCULO UN RATON Balb/c APROX CON 6 MILLONES DE CELULAS I.P. DESPUES DE HABER SIDO INOCUADO CON AIF OBTENIENDOSE APROX 8 ml DE ASCITIS A LA CUAL SE LE EFECTUA LA SIGUIENTE TITULACION

DILUCION	A	DILUCION	A
CERO	1.431	1/51.200	0.962
1/100	1.306	MIELOMA	0.833
1/200	1.270	APAAP 814 con	0.922
1/400	1.221	APAAP 814 ET	0.810
1/800	1.113	FA	0.948
1/1600	1.041	PBS	—
1/3200	1.018		
1/6400	1.012		
1/12800	1.056		
1/25.600	0.935		

PODEMOS OBSERVAR UN EFECTO DE DILUCION, HASTA UNOS VALORES MAS O MENOS CONSTANTES SI TOMAMOS ENCUENTA LA REACCION PRESENTADA POR EL MIELOMA (0.833) Y LAS ULTIMAS DILUCIONES EN LAS QUE CASI NO HAY ANTICUERPO (0.962) 1/51.000 PARECE QUE SE PRESENTA UN AUTO CUIDO DE FONDO MAS QUE DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EN EL PIZO DONDE SE ADICIONA F.A. DIRECTAMENTE LA SEÑAL ES DE LAS MAS BAJAS 0.948 CON ADUELLAS EN DONDE SE ADICIONA UN COMPLEJO APAAP PREPARADO CON 8 DIAS DE ANTERIORIDAD 0.922 Y 0.810



15. L. INMUNOCITOQUIMICA - APAAP N:3

MCF-7 + SOBRENADANTES RE  
CONTROL + SRI α HELA  
• + SRI DNA  
• - SNR  
• - PBS

CELULAS DE CONTROL ⊖ OAT

POZO  
1 PBS  
2 RE  
3 RE  
4 RE  
5 RE  
6 RE

POZO  
7 RE 26 +/-  
8 MIBOMA -  
9 SNR +  
10 PBS -  
11 SRI α HELA +++  
12 SRI DNA +++

UTILIZANDO LOS REACTIVOS OBTENIDOS DE LAS REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS SE LLEVO A CABO UNA PRUEBA ACEJANDO LOS RESULTADOS ANTERIORES, EL SUBSTRATO UTILIZADO FUE:

NAFTOL AS-MX FOSFATO 2 mg  
0.2 ml N,N DIMETILFORMAMIDA  
9.8 ml DE TRIS BUFFER PH 8.2 OIM  
FAST RED TR 10 mg

EL BLOQUEO PARA FIA ENDOGENA SE LLEVO A CABO EN EL PASO FINAL 10 MIN ANTES DE ADICIONAR EL SUBSTRATO CON INCUBACION A 37°C x 10 min CON UNA SOLUCION DE LEVAMISOL 3 mM.

LOS CONTROLES POSITIVOS TOMAN UNA COLORACION INTENSA ROJA EN LAS CELULAS QUE HAN UNDO ANTICUERPOS Y POR CONSIGUIENTE EL COMPLEJO APAAP. LOS CONTROLES NEGATIVOS NO PRESENTAN NINGUN TIPO DE COLORACION.

LAS CELULAS FUERON FJADAS CON PBS, FORMALINA AL 10%, ACETONA -20°C 4 min y ETANOL -20°C 4 min.

COMO CONTRASTE SE UTILIZO VERDE DE METIL

## 16. CONCLUSIONES

EN LA DETERMINACION 4 Y 11 VALORACION DE ANTI-RATON DE CONED. SE OBTIENE EN LOS DOS CASOS UN MAXIMO DE ABSORCION A UNA DILUCION DE 1/2000 DE LA SOLUCION ORIGINAL DE ANTI-RATON. QUE CORRESPONDE EN LOS DOS CASOS APROX. A 0.55 Y 2.5  $\mu\text{g/ml}$ .

DUANTE TODO EL DESARROLLO DEL TRABAJO SE HA TRABAJADO CON UNA DILUCION DE 1/500 DEBIDO AL COSTEO : QUE LOS VALORES QUE SON REPRESENTATIVOS EN UNA DETERMINACION COLORIMETRICA SON AQUELLOS QUE ESTAN ENTRE 0.15 - 0.85 DE ABSORCION. ESTO PARA COMPLEJOS QUIMICOS SIMPLES, NO EN ESTE CASO COMO LOS ENSAYADOS (PROTEINAS). ESTO PUEDE INDICAR UN ERROR EN EL DESARROLLO DEL TRABAJO HASTA EL MOMENTO, YA QUE EN LA ULTIMA DETERMINACION SE UTILIZO EL ANTICUERPO B.14 PARA FOSFATASA ALCALINA.

LOS COMPLEJOS FOSFATASA ANTI-FOSFATASA PREPARADOS A PARTIR DE LOS SOBRENADANTES B.14 CONSERVAN SU ACTIVIDAD DESPUES DE DOS APLICACIONES EN INMUNODOTT. Y SON ESTABLES ALMACENANDOS CON AZIDA DE SODIO AL 0.01% A 4°C POR LO MENOS UN MES.

ES RECOMENDABLE PARA ASEGURARSE DE NO COMETER ERRORES EN LA REVELADA CON EL SISTEMA APAAP, QUE ESTE COMPLEJO SE INCUBE A 37°C CON AGITACION POR LO MENOS 30 MIN ANTES DE USAR. Y AL SER REUTILIZADO SE REEFERCE CON UNOS MILILITROS DE SOBRENADANTE Y F.A.

SEGUN SE REPORTA POR LA BIBLIOGRAFIA LA F.A ENDOGENA ES INHIBIDA POR  $1 \cdot 10^{-5}$  M DE LEVAMISOL, PERO ESTE PUEDE SER AUMENTADO HASTA LIMITES UN POCO POR DEBAJO DE  $2 \cdot 10^{-3}$  M QUE ES LA CONCENTRACION A LA CUAL SE INHIBE LA F.A INTESTINAL UNIDA AL COMPLEJO APAAP. EL BLOQUE CON SOLUCIONES  $10^{-3}$  M HAN DADO BUENOS RESULTADOS.

EL PROCESO DE EXTRACCION DE F.A INTESTINAL DE TERNERO ES UN PROCESO QUE PUEDE EFECTUARSE ENTRE 8-10 HORAS SIN MUCHAS COMPLICACIONES. LA PARTE DEL PROCESO QUE REQUERCE MAYOR TIEMPO ES LA CENTRIFUGACION; EL EXTRACTO DESPUES DE 2 MESES ALMACENADO EN TRIS BUFFER PH 7.2 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  CON AZIDA DE SODIO AL 0.02% ES ESTABLE ALMACENADO A 4°C.

LA FOSFATASA DEL EXTRACTO, PUEDE SER UTILIZADA EN TECNICA APAAP. PERO PARECE QUE PRESENTA BUNDO DE FONDO PROBABLEMENTE DEBIDO A LA ACCION CATALITICA DE OTRAS ENZIMAS PRESENTES EN EL EXTRACTO, YA QUE EL INTESTINO POSEE EN SU INTERIOR ENZIMAS DIF. A FOSFATASA ALC. POR LO CUAL SE RECOMIENDA SU PURIFICACION.

LA FALTA DE SENSIBILIDAD EN LOS ENSAYOS INMUNOCITOQUIMICOS UTILIZANDO LA TECNICA APAAP, SE RESOLVIO AL UTILIZAR LOS SUBSTRATOS INDICADOS POR LAS CITAS BIBLIOGRAFICAS; POSIBILMENTE LA POSICION  $\beta$  DEL NAFILU FOSFATO DE SODIO SEA MAS APTO PARA FORMAR EL COMUESTO DE PRECIPITACION QUE PRODUCE EL COLOR Y POR OTRA PARTE PUEDEN POSIBILMENTE OBTENERSE COMUESTOS DE MAYOR COLORACION.

LA TECNICA DE PREPARACION DEL SUBSTRATO SUFRIO ALGUNAS VARIACIONES; Y EL LEVAMISOL NO ES ADICIONADO A ESTE, YA QUE PRECIPITA POR ENCONTRARSE A PH ALCALINO, CON LO CUAL SE PERDERIA SU ACCION SOBRE F.A ENDOGENA, POR LO CUAL SE PREPARE LA SOLUCION DE LEVAMISOL APARTE DEL SUBSTRATO Y SE ADICIONA A LAS MUESTRAS A 37°C POR 10 MIN.

HOMOCLONALES  
COLOMBIA

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA  
AGRUPACION DE HIBRIDOS Y MODELOS ANIMALES

INFORME FINAL

PROGRAMA DE ADIESTRAMIENTO  
"PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES"

Elaborado por: Alba Lucía Cóbbita Rojas  
Bacterióloga  
Instituto Nacional de Cancerología  
Bogotá-Colombia

LA HABANA, CUBA, MAYO 7 - JULIO 7 DE 1990

## INTRODUCCION

Desde el desarrollo de los anticuerpos monoclonales a partir de la hibridación de un linfocito previamente estimulado con células de mieloma en 1975 por Koehler y Milstein, este método ha permitido un avance en los diferentes campos de la ciencia, ya que por sus ventajas sobre los anticuerpos policlonales, como son la alta especificidad, homogeneidad, crecimiento continuo, capacidad de inmortalizar la producción de reactivos monoespecíficos mediante el congelamiento de los híbridos a la vez que la producción contra casi cualquier determinante antigénico. Estos han cobrado mayor importancia y han permitido su uso como herramienta en muchas áreas.

Entre los campos ampliamente usados como es el caso de la biomedicina, estos tienen múltiples aplicaciones: básicamente en definición de subpoblaciones celulares, tipaje de antígenos en tejidos, determinación de grupos sanguíneos, hormonas y otros factores séricos, al igual que en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y parasitarias, etc. En la oncología a parte de usarse como instrumento de diagnóstico, también se ha usado en la búsqueda de una mayor especificidad para el tratamiento, al igual que se ha usado con fines terapéuticos pasivos de otras enfermedades. Otro de los campos útiles ha sido en el logro de un mayor entendimiento de los mecanismos básicos biológicos involucrados en la patogénesis de las enfermedades y análisis de productos génicos de la arquitectura y función celular.

Todo esto ha llevado a que se cree la necesidad del uso masivo de anticuerpos monoclonales, a la vez que se implementen nuevos sistemas que permitan una mayor producción y facilidad en la purificación de estos para su posterior uso.

Entre los diferentes sistemas utilizados para la producción masiva de anticuerpos encontramos: la producción "in vivo", en el cual el fluido ascítico derivado de ratones previamente sensibilizados con irritantes como: pristane o aceite mineral e inoculados posteriormente con el híbrido, ha sido la fuente de muchos laboratorios para la producción de éstos, sin embargo, debido a los grandes problemas que impiden una eficiente purificación de estos (proteínas contaminantes) han llevado a la creación de sistemas "in vitro", que aunque permiten una mayor facilidad para su purificación, no deja de ser un problema.

Dentro de estos sistemas están: los sistemas homogéneos como: cultivos en agitación continua y sistemas heterogéneos como: inmovilización celular en microperlas, atrapamiento en matrices porosas, macroencapsulación en perlas de alginato y cultivo inmovilizado en fibra hueca, que permiten una producción alta de anticuerpos.

## OBJETIVOS

Con el incremento en el uso de AcM, tanto en el diagnóstico, tratamiento como en otras aplicaciones, se ha creado la necesidad de crear cantidades suficientes, por ésto, se han desarrollado nuevos sistemas que permiten una mayor producción, facilitando su purificación. Por tanto, uno de los objetivos de este curso, es conocer, para posteriormente poder aplicar en nuestros países, los diferentes sistemas básicos para el escalado de éstos, al igual que desarrollar sus metodologías, teniendo en cuenta las condiciones necesarias para lograr una mayor eficiencia.

Ya que el uso de estos AcM requiere un grado de pureza de acuerdo a su posterior uso, es importante establecer los parámetros óptimos de los diferentes métodos para su purificación. Por último, realizar otras técnicas de cultivo, que no son la base del curso, pero que complementan a éste, como lo son fusión celular, expansión y clonaje de híbridos.

## I. PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

### A. PRODUCCION IN VIVO

#### Objetivos:

Conocer las condiciones que deben ser tenidas en cuenta para lograr una mayor producción de AcM y realizar los diferentes métodos para la obtención de fluido ascítico.

#### Procedimiento:

Se tomaron ratones Bal/c los cuales se obtuvo el fluido ascítico por dos métodos: Primero: la vía clásica la cual se realizó por punción intra peritoneal, obteniéndose volúmenes que varían entre 2-5 ml./ratón, esta práctica es ventajosa, ya que permite la obtención del fluido repetidas veces (2-3), de acuerdo al estado del animal.

Segundo: por vía única, en la cual el ratón es sacrificado por dislocación vertebral, en el momento en que éste se encuentra en su mayor producción, es decir, cuando la cavidad abdominal está distendida a su máximo. Por este método, la cantidad que se logra varía entre 5-8ml./ratón. Este método es ventajoso, ya que permite una mayor facilidad de manejo cuando se trabaja con un número grande de ratones.

#### Conclusiones:

Las condiciones que deben tenerse en cuenta para lograr una mayor producción de anticuerpos, varían mucho, desde la cepa de ratones empleada, hasta el híbrido a ser usado, ya que éste es diferente para cada caso. En cuanto al ratón elegido, debe tenerse en cuenta, que en lo posible debe de usarse una misma cepa, el peso y tamaño son importantes, ya que se relacionan con la capacidad abdominal del ratón.

Las condiciones de preinóculo, es decir, el momento en que se logra una mayor sensibilización del peritoneo del ratón, ya sea variando la cantidad de irritante como el intervalo de tiempo que se deje para posteriormente inocular el híbrido, deben ser previamente estandarizados, al igual que el número de células a inocular.

### B. PRODUCCION IN VITRO

#### 1) ENCAPSULACION EN ALGINATO DE CALCIO

##### Objetivos

- estandarizar las condiciones óptimas del híbrido en i-strepto-kinasa 130.
- determinar si mediante concentraciones bajas de suero de ternero (5%), es posible lograr un crecimiento

celular y producción óptima de anticuerpo, en comparación a una alta concentración de suero de ternera (10%).

- determinar en base a la estandarización previa si es posible disminuir concentración de suero con o sin la compensación de factores de crecimiento (HECS) en la fase de cosecha.

#### Materiales y Métodos

- híbrido anti-sk/130
- medio de cultivo: DMEM
- suero de ternera (ST)
- alginato de sodio 1.6%
- citrato de sodio 50mM/EDTA 50mM pH 7.2
- cloruro de calcio 50mM/NaCl 100mM pH 7.2
- frascos spinner de 250ml.
- incubadora a 37 grad.
- agitador 20RPM
- factores de crecimiento (HECS:sobrenadante de células endoteliales humanas).

**Experimento # 1: Concentración de DMEM ST óptima**  
se tomaron los cultivos de híbridos (estacionarios), previamente adaptados en medio de cultivo con 5% y 10% de suero de ternera (ST), por 2 semana. Posteriormente, se procedió a encapsular según la técnica descrita por Martins Sinacore y col.(1989), teniendo en cuenta los siguientes parámetros: las células deben encontrarse en fase logarítmica, la concentración final de alginato, fué del 0.8% a razón de 40 millones de células/40ml de perla en 200 ml. de medio con ST al 5% y al 10%, obteniéndose una concentración final de 200,000 células/ml. de medio.

A partir del segundo día de cultivo, se realizaron diariamente cambios de medio evaluando: recuento celular de células viables y no viables dentro de las esferas y sobrenadante, consumo de glucosa, el cual fue valorado de acuerdo a la presencia de glucosa en el sobrenadante metabolizado, en base a la técnica estandarizada por Sigma. La concentración de anticuerpo producido por mililitro de medio se determinó por la técnica de ELISA previamente estandarizada, usando una concentración de 5um/ml. de strepto-kinasa para cubrir placas de 96 pozos (NUNC). Simultáneamente, se corrió una curva también estandarizada de ante mano.

**Experimento # 2: De acuerdo a la estandarización previa a partir del momento de cosecha "llenado de las perlas" se disminuyó la concentración de ST con y sin adición de HECS, evaluando los parámetros de crecimiento, viabilidad y consumo de glucosa.**

Resultados:

En el cultivo mantenido a una concentración de 10XST se observó que de acuerdo a la gráfica # 1 se obtuvo un mayor crecimiento al día 4, alcanzando 4.75 millones de células/ml de perlas, posteriormente, el crecimiento empezó a disminuir, manteniéndose hasta el día 10, el cual fue de 1.6 millones de células/ml de perlas.

En la producción de AcM, se observó una correlación con respecto al crecimiento celular, siendo así su mayor concentración en el día 4 de 50.6ug/ml. Posteriormente, su concentración fue disminuyendo a medida que el crecimiento celular disminuía. Se observó que el consumo de glucosa es alto, durante el momento en el que alcanzó su mayor crecimiento, posteriormente se vio que a medida que iba cayendo el crecimiento, el consumo fue menor.

En el cultivo mantenido al 5% de ST gráfica # 2, su mayor crecimiento se logró al día 3 obteniéndose 2 millones de células/ml de perlas, posteriormente este declinó lográndose mantener hasta el día 6. La mayor concentración de Igs, se observó al día 4 la cual fue de 19ug/ml, luego, esta declinó a la vez que el crecimiento celular. El consumo de glucosa no fue muy marcado correspondiendo el pico máximo a los días de mayor crecimiento celular.

De acuerdo a los resultados anteriores, en el cual se observó que la condición óptima de crecimiento para este híbrido en DMEM ST 10%, se partió para el segundo experimento. Se observó que a diferencia del experimento anterior, la cosecha se logró en el día noveno, alcanzándose un promedio de 3.62 millones de células/ml de perlas en ambos spinner, para lo cual el cambio de medio cada 24 horas, se realizó a partir de día 7 cada 48 horas con el fin de acelerar el llenado. Posterior a éste fueron cambiadas las condiciones de nutrientes: DMEM ST 5%/HECS 3% y DMEM ST 5% sin HECS, a partir de este momento se observó de acuerdo a la gráfica #3 que en el primer caso existe una leve disminución de crecimiento durante éste y posteriormente aumenta alcanzando su máximo al día 17 que fue de 3.85 millones de células/ml de perla, y luego comienza a declinar. La concentración de inmunoglobulina, a pesar del cambio de condiciones se obtuvo un incremento al día 13 que fue de 13.89ug/ml, que posteriormente no se continuo valorando por finalización del curso pero que de acuerdo a los otros parámetros este se encontraba en ascenso. El consumo de glucosa está correlacionado con el crecimiento, observándose un mayor consumo en el que éste era alto. Para el segundo caso se observó que posterior al cambio de las condiciones existe una leve disminución de crecimiento a la vez que la producción de AcM, pero este tiende a establecerse, logrando nuevamente un incremento tanto celular ( 3.12 millones de células /ml de perla como en la concentración de inmunoglobulina (17.35ug/ml al día 15 y luego comienza a declinar. El consumo de glucosa se ve correlacionado con el crecimiento celular y la producción de AcM, aunque se observa que este continúa a pesar de que el crecimiento



continúa. esto es probable ya que existe a la vez un mayor número de células escapadas al medio (93.12 millones de células/ ml de medio) que aumentan el consumo.

#### Conclusiones:

Se estableció que las mejores condiciones de este híbrido CB SK 130 para su crecimiento se logran en DMEM ST al 10%, ya que su un crecimiento fue el doble al observado en DMEM ST 5%, debido que existe un mayor aporte de nutrientes y a la vez de una mayor viscosidad que protege a las células de las fuerzas cortantes causadas por el movimiento, facilitando de esta manera un mayor crecimiento.

Aunque el crecimiento obtenido al cuatro día en DMEM ST 10% fue mayor al obtenido en DMEM-ST 5%, al vez que la concentración de inmunoglobulina, de la misma forma que las experiencias logradas por el laboratorio, estos fueron menores a lo esperado, semejando más a un crecimiento estacionario. Esto puede explicarse por el hecho de que al lograr un número suficiente de células para la encapsulación, no se tuvo en cuenta que estas se encontrarán realmente en una fase logarítmica para el momento de la encapsulación lo que hace que el crecimiento se afecte, a la vez que estas células durante el acondicionamiento en cultivo estacionario permanecieron en algunas ocasiones por tiempo prolongado sin cambio de medio el cual afectó también el crecimiento.

Se vio que en el primer experimento el tiempo de cosecha establecido al cuarto día, varía mucho con el segundo experimento, en el que se logra sólo hasta el día 9, esto puede explicarse en parte a lo anterior, es decir, las condiciones de las células no fueron las óptimas para el momento de la encapsulación, o que como lo descrito en publicaciones (Sinacor y Col 1989) éste puede lograrse al noveno día. Por otro lado, hay que tener en cuenta las características de cada híbrido ya que éstos pueden comportarse diferente, por lo tanto sería aconsejable estandarizar las características propias de cada híbrido previo a la encapsulación.

Posterior al tiempo de cosecha, el cambio de las condiciones del medio afecta el crecimiento celular en ambos casos, aunque para el cultivo en que se mantuvo sin HECS existe una disminución tanto del crecimiento como de la producción de anticuerpo, mientras que el cultivo que se mantuvo con HECS existe una disminución en el crecimiento, manteniéndose la producción de anticuerpo, esto permitiría concluir que en el HECS existen algunos factores de crecimiento que de algún modo favorezcan a la producción de anticuerpo.

## 2) CULTIVO INMOVILIZADO EN FIBRA HUECA

### Objetivos

- conocer el fundamento y mecanismos de manejo del Endotronics a la vez que las condiciones óptimas que se deben tener en cuenta para lograr así una mayor producción de anticuerpos.

### Materiales y Métodos

- AcM CB INF 2.4
- Biorreactor de Fibra Hueca "Endotronics Acusyst-Rtm"

Se procedió a montaje del sistema de acuerdo al manual de operación, posterior a su esterilización, se dejó circular medio con fines de lavado y eliminación de glicina, de 24-48 hrs. Pasado este tiempo, se pasaron los factores de crecimiento durante 24-48 hrs. Posteriormente se inoculó 150 millones de células/ml y se mantuvo en flujo el medio intracapsular (RPMI 3gr. de glucosa/ml), mientras que el extracapsular (RPMI 3gr. glucosa + 5%ST) se abrió al cabo de 7 días. A partir de ese momento, se evaluarán: consumo de glucosa, producción de lactato, y producción de AcM cada 48 hrs.

### Conclusiones

La producción de AcM en biorreactores de fibra hueca, solo se logró observar algunas de las partes de manejo de este, ya que por motivo de seguridad, no se nos permitió el manejo, por otro lado, la falta de tiempo no nos permitió valorar los parámetros óptimos que son requeridos y que pueden influir en una mayor o menor producción de AcM.

## II. PURIFICACION DE AcM

### Objetivos

- conocer las diferentes técnicas que se realizan para la purificación de AcM, teniendo en cuenta las diferentes condiciones necesarias que se deben seguir para lograr una mayor purificación.

#### A. Cromatografía de Intercambio Iónico

### Objetivos

- estandarizar las condiciones en las cuales se logra un mayor acople de anticuerpo a la resina variando las condiciones de pH del buffer usado.
- determinar en qué condiciones de gradiente continuo de fuerza iónica se logra la mayor purificación de AcM.
- determinar si al disminuir las condiciones de gradiente se logra una igual purificación de las Igs variando además el volumen final de éste.

#### Materiales y Métodos

- AcM CB IFN 2.4 a partir de fluido ascítico
- matriz: DEAE-SEPHACEL
- Buffer Tris/HCl 20mM pH: 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0
- Buffer Tris/HCL 20mM pH 7.6 NaCl: 0.2, 0.3, 0.5M.

1. Acoplamiento del AcM: El experimento se realizó de acuerdo a la técnica establecida por el laboratorio, variando para éste las condiciones de pH Buffer Tris/HCl 20mM, de la siguiente forma:

- a) pH 7.4
- b) pH 7.6
- c) pH 7.8
- d) pH 8.0

Para valorar las condiciones a las cuales se obtiene el mayor acople a la resina se realizó un ELISA, previamente estandarizado, usando Interferón alfa 2 recombinante en una concentración de 10ug/ml.

2. Evaluación de la concentración del gradiente de elución: Para la cromatografía se realizó la técnica establecida por el laboratorio teniendo en cuenta las siguientes condiciones: flujo: 120ml/hr, colección 2 ml/min., vel. de papel: 0.1mm/min, vol. de muestra aplicada 5ml y sensibilidad 0.5 A.

Para valorar la concentración de gradiente, en la cual se logra la mayor resolución del pico de purificación, se realizaron valoraciones de la siguiente forma:

1. Elución con Tris 20mM/NaCl 0.5M pH 7.6 vol. final 200ml.
2. Elución con Tris 20mM/NaCl 0.3M pH 7.6 vol. final 200 ml.
3. Elución con Tris 20mM/NaCl 0.3M pH 7.6 vol. final 500ml.
4. Elución con Tris 20mM/NaCl 0.2M pH 7.6 vol. final 200ml
5. Elución con Tris 20mM/NaCl 0.2M pH 7.6 vol. final 500ml

La valoración de la pureza del pico se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

#### Resultados

El mayor acople del CB IFN 2.4 se logró a pH 7.6 por lo tanto los siguientes experimentos se trabajaron con este.

Nota: Este dato fue obtenido de los trabajos previamente estandarizados, ya que por fallas en el sistema de testaje no se logró comprobar.

Se observó que el mayor pico de resolución se obtiene usando un gradiente de elución que varía de 0 a 0.3M de NaCl a un volumen final de 500ml (fig.3), donde existe una ligera contaminación con otras proteínas: Albumina y transferrina al inicio y final del pico. Usando una concentración mayor del gradiente de elución (0.5M) o al disminuir el volumen, la eficiencia que se logra en la resolución es menor, observándose una mayor contaminación con otras proteínas. Al disminuirse la concentración del gradiente de elución (0.2M) se logra una resolución del pico de las inmunoglobulinas proporcional a observado en 0.3M, aunque los otros picos no presentan una

resolución igual, pero estos no son de nuestro interés

#### Conclusiones

Se estableció que las mejores condiciones para lograr una purificación de anticuerpo se logra usando un gradiente de elución que varía de 0 a 0.3M de NaCl en un volumen final de 500ml. Observándose que la elución del pico de las Inmunoglobulinas se inicia al rededor de 40 a 60mM de NaCl, por tanto es posible disminuir la concentración del gradiente de elución, sin embargo, es importante tener en cuenta el volumen final de este, ya que a mayor volumen mayor resolución y al aumentar gradualmente el gradiente permite una mayor resolución. Por tanto esto es aplicable para economizar tanto reactivo como tiempo en la purificación.

#### B. Cromatografía de Afinidad

##### Materiales y métodos.

AcM: CB HEPATITIS

- Inmunoespecificidad: Matriz: Sepharosa 4B activada con CNBr  
Buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2  
Buffer acople: PBS pH 7.2  
Buffer elución: Glicina 0.2M pH 2.5

- Proteína A: Matriz: Proteína A Sepharosa.  
Buffer acople: Glicina 1.5M / 3M NaCl pH 8.9.  
Buffer elución: Ac. Cítrico 100mM pH 4.0

La cromatografía se realizó de acuerdo a la técnica estandarizada por Pharmacia. Para verificar su pureza se realizó por PAGE.

##### Resultados

Se observó un pico de elución de alta pureza para cada caso. el cual por electroforesis no presentó bandas correspondientes a otras proteínas, se vieron bandas correspondientes a la cadena pesada y ligera de la IgG. Aunque este AcM es bi-clonal, la IgM no se observó, ya que la muestra de elución no fue concentrada.

##### Conclusiones

Se vio que la cromatografía de intercambio iónico permite una purificación de AcM alta: 70-90% que para lograrla es necesario la combinación con otros sistemas como purificación con sulfato de amonio o filtración en gel, a diferencia de la cromatografía por afinidad, la cual facilita la purificación en un solo paso, elevando la especificidad y rendimiento a la vez que permite el manejo de grandes volúmenes, obteniéndose una pureza alrededor del 95%. Por tanto esta última es más ventajosa,

en cuanto a tiempo y reactivos, sin embargo, hay que tener en cuenta su costo para en momento en que se desee seleccionar.

### III. FUSION CELULAR: Producción de AcM anti- LPa.

#### Objetivos

Realizar y conocer la metodología para la obtención de AcM.

#### Materiales y Métodos:

- Células de mieloma : P3/653
- Células de bazo previamente estimuladas contra LPa (3 dosis de 50ug/ml c/15 días, la primera con ACF subcutáneamente y segunda y tercera intraperitonealmente).

Nota: Debido a que es una fusión a manera de conocimiento de la técnica no se realizó booster, ya que las condiciones de estado del ratón no lo permitió.

- Medio HAT
- Medio de lavado RPMI
- Placas de cultivo de 96 pozos

La técnica se realizó a la descrita por Koelher y Milstain. La selección de los clones positivos se realizó por la técnica de ELISA previamente estandarizada, usando como antígeno APO B (LPa-) 10ug/ml y LPa 5ug/ml.

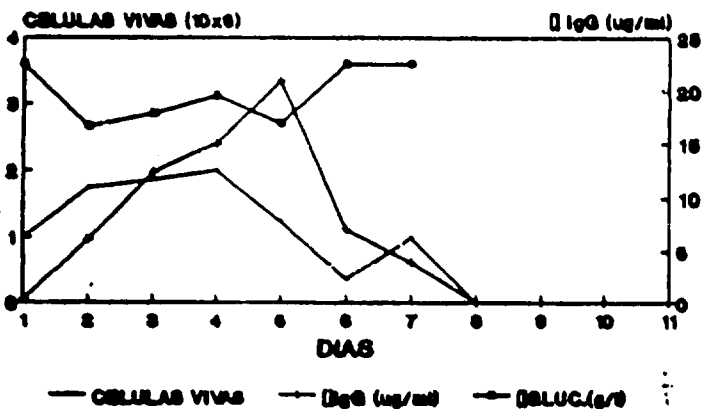
#### Resultados

Se probaron aproximadamente 524 pozos de un total de 672, de los cuales se obtuvieron 25 AcM que reconocen APO B del que se clonó uno y 2 AcM que reconocen LPa que se clonaron. Estos dos últimos AcM siguen en estudio para comprobar su estabilidad y especificidad para LPa.

#### Conclusiones

El rendimiento de la fusión celular fue bueno, a pesar de que no se halla realizado el booster, el porcentaje de eficiencia logrado fue alto, aproximadamente el 80%, a lo esperado, del cual se logró por el momento seleccionar 2 AcM que reconocen al antígeno específicamente.

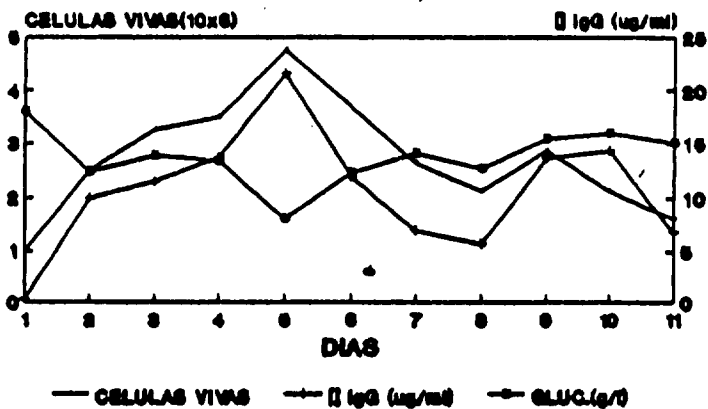
**CB-SK.130**  
5% ST + 3% HECS



MACROENCAPSULACION EN ALMISO DE Ca.

Gráf No 2

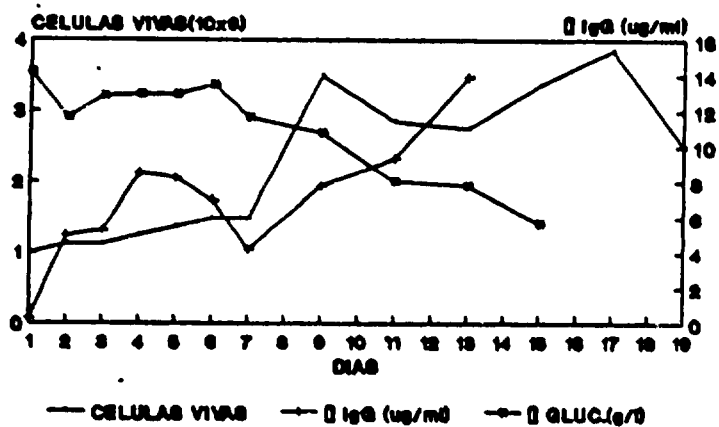
**CB-SK.130**  
10% ST + 3% HECS



MACROENCAPSULACION EN ALMISO DE Ca.

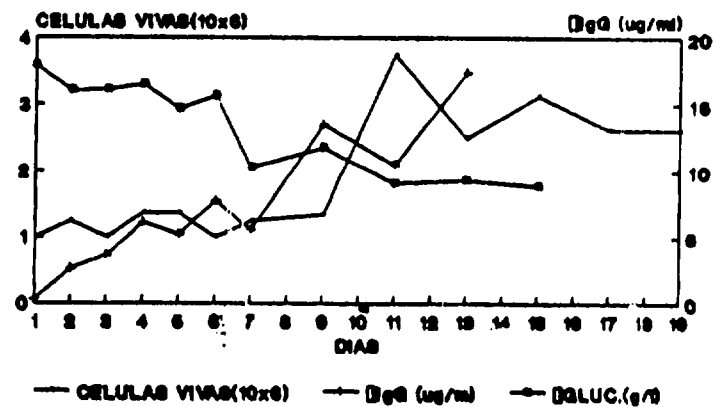
Gráf No 1

**CB-SK.130**  
**10% ST/3%HECS-5%ST/3%HECS**



MACROENCAPSULACION EN ALGINATO DE CALCIO

**CB-SK.130**  
**10%ST/HECS 3% - 5%ST/HECS 0%**



MACROENCAPSULACION EN ALGINATO DE CALCIO  
AL 0.2%

Gráfico # 3

## VALORACION DEL CURSO

### PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

En relación al programa los objetivos se lograron cumplir en su totalidad, dentro de las técnicas desarrolladas durante el curso se hizo énfasis en aquellas que nos permiten la posibilidad de lograrla realizar en nuestros países, por ser estas se un menor costo y fácil accesibilidad de metodología.

Por otro lado las personas que dirigen el programa cuentan con gran capacidad y experiencia la cual es transmitida junto a los conocimientos técnicos.

Los laboratorios cuentan con toda la capacidad y tecnología que facilitan un desarrollo y seguimiento del curso.

Existe un gran énfasis en la práctica manual de las técnicas, lo que es muy ventajoso para nosotros, ya que nos permite un mayor desenvolvimiento para su aplicación en nuestro países.

Debemos señalar que existieron algunos experimentos que por falta de tiempo no se completaron, como por ejemplo el cultivo en bioreactor, debido a que el curso fue reducido dada las sugerencias del grupo anterior, sin tomarse en cuenta previamente la experiencia práctica de los participantes, además que fue realizado casi terminandose el curso, por tal motivo sugiero que halle una reestructuración del programa para que experimentos como este sean en lo posible realizados al inicio del programa con el fin de mayores logros.

Por otro lado la falta de un programa más detallado imposibilita la agilidad del curso, ya que por estar solicitando explicaciones adicionales del programa, hace que se pierda mucho tiempo, pues la mayoría de las personas a cargo tienen sus propios trabajos.

Por otro lado pienso que no existe correlación entre el costo y el hospedaje, ya que los servicios prestados en el apartamento, fueron deficientes en materia de limpieza y acomodamiento de la cocina.

Respecto a la disponibilidad de material de escritorio y acceso de fotocopias esta fue poca. Pienso que debería ser tomado en cuenta porque ayudaría al mejor aprovechamiento del curso.

Quisiera que estos puntos de vista fueran tomados en cuenta para que en cursos posteriores se logren mejores resultados.

AIDA LUCIA LOMBITA ROJAS