



**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)

19687

20/142

6p.

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

**INFORME DE EJECUCION 06 Y FINAL DEL PROYECTO.  
Mayo-Junio de 1991**

Este es el sexto y ultimo informe de ejecucion del Proyecto, por parte del Laboratorio de Referencia ubicado en la nueva Division de Inmunotecnología y Diagnóstico (antes Depto. de Hibridomas y Modelos Animales) del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana, Cuba. Incluye los resultados del trabajo de los representantes de Mexico, Chile y Guatemala en la etapa de producción comprendida entre el 5 de mayo y finales de julio de 1991, y una valoración general de toda la actividad desarrollada. Su composición es: Aspectos Financieros, Desarrollo de la Etapa de Producción, Conclusiones de la Etapa, Conclusiones del Proyecto, Recomendaciones y Anexo (informe técnico de los estudiantes).

**Aspectos Financieros**

Se terminó la recepción de materiales correspondientes a los pagos de 1990 y el primer pago correspondiente al contrato para 1991. UNIDO/UNESCO debe proceder a transferir el remanente de los fondos asignados a este laboratorio, que serán empleados para el viaje del jefe del Laboratorio de Referencia a la reunión final de conclusiones del Proyecto, y para cubrir gastos incurridos en comunicaciones y otros aspectos menores.

**Desarrollo de la Etapa de Producción**

No se presentaron dificultades en el comienzo del trabajo en la primera semana de mayo con los estudiantes: Flora Arana (Guatemala), Antonio Serrano (Mexico) y Angel A. Urate (Chile).

El estudiante de Chile no trajo consigo el hibridoma anti-Plasmodio que se había acordado crecer en esta etapa de producción (ver documentos de la reunión de agosto de 1990 en la Habana). En su lugar, trajo una carta del Dr. Arturo Ferreira mencionando que había obtenido el visto bueno del Dr. Nussenzweig en Nueva York para el traspaso del mencionado hibridoma al Laboratorio de Referencia, pero no sabía cómo ejecutar este traslado.

El Laboratorio de Referencia se considera sin responsabilidad alguna en este problema, pues el estudiante representante del país a cargo del hibridoma debía haber traído consigo la línea celular, tal como si sucedió en la etapa de producción en Colombia con Uruguay y Ecuador. No obstante, se hicieron algunas gestiones con científicos de este laboratorio que realizan estancias en Suecia para comunicarse con Ferreira, no obteniéndose una respuesta en tiempo al problema.

Por todo lo anterior, y en aras de circular el trabajo concluido, se empleó el hibridoma DR-IFHA2.4 (anti-Interferon alfa 2b)

3/13

de este Centro de Referencia, cuyo anticuerpo monoclonal se produce de manera rutinaria en bioreactores desde hace aproximadamente un año. Siendo este el caso, se obviaron las 3 primeras fases de la programación estructurada para la fase de producción del proyecto, a saber:

1. Recepción del hibridoma. Preparación de bancos de trabajo.
2. Inoculación de ratones para preservar el hibridoma, producir ascitis y fabricar un banco de trabajo.
3. Detección de micoplasma por fluorescencia. Decontaminación en caso necesario.

Y se pasó directamente a ejecutar los siguientes aspectos:

4. Determinación de condiciones óptimas para crecimiento y producción en bioreactor de fibra hueca, a partir de estudios metabólicos en cultivo estacionario. Incluye velocidad de crecimiento, consumo de glucosa, y producción de anticuerpos, en formulaciones de medio relevantes al cultivo masivo.
5. Preparación e inoculación del bioreactor de fibra hueca. Producción de sobrenadante rico en anticuerpos. Evaluación periódica de concentraciones de anticuerpos en las cosechas y de parámetros metabólicos de la corrida.
6. Cosechas de sobrenadantes. Purificación de sobrenadante por cromatografía de baja presión. Ensayos de recuperación de anticuerpos, pureza y actividad.

#### **Conclusiones de la Etapa**

1. Se cumplieron los objetivos estipulados en el proyecto. Los estudiantes realizaron una producción de ACM mediante cultivo en bioreactores Acusyst-R de fibra hueca, purificaron los anticuerpos, comprobaron su actividad y realizaron pruebas de control de su calidad.

Por emplear un hibridoma del laboratorio de Referencia, debidamente caracterizado y sin micoplasma, se pudieron obviar los tres primeros aspectos del programa y ello permitió que el grupo obtuviera muy buenos resultados en un período de tiempo relativamente corto, y pudieran asimilar de manera integral y profunda los controles del trabajo en bioreactores y en la purificación de los anticuerpos, incluyendo su control de calidad (ver anexo). Si se examina el nuestro informe anterior, este había sido un aspecto crítico para el primer grupo de estudiantes (enero-mayo de 1991).

2. El grupo manifestó una adecuada dedicación al trabajo y al estudio, seriedad en el trabajo rutinario y en la investigación, aunque las relaciones entre sus integrantes no fueron muy armónicas, debido a las diferencias en niveles de preparación. Las relaciones personales establecidas con el colectivo de la División fueron muy buenas.

Como ya adelantamos, de nuevo se presentó el problema (ocurrió en

un caso del grupo anterior) que ninguno de los alumnos había asistido a la fase de entrenamiento del Proyecto, por lo que se requirió un mayor esfuerzo por parte de ellos, y del personal del Laboratorio de Referencia. Felizmente, la calidad desplegada en el trabajo fue un factor decisivo para compensar la falta de entrenamiento previo; también influyó el que no se perdiera tiempo en la caracterización de la línea celular, aspecto este del cual ya hablamos en el inciso anterior.

3. Se pudo preparar un documento muy detallado referente a la operación de los bioreactores, sus controles, y el proceso de purificación (ver anexo).

### **Conclusiones Generales sobre el Desarrollo del Proyecto**

1. Este Laboratorio de Referencia cumplió totalmente y en tiempo con las diferentes fases del Proyecto, tal como acordadas en las reuniones de Sao Paulo, en 1989 y La Habana, en 1990. Se entrenaron en el periodo enero-diciembre de 1990 un total de 9 estudiantes procedentes de Uruguay, Costa Rica, México, Guatemala, Colombia, Venezuela, Argentina, Ecuador y Chile. Pasaron la etapa de producción, entre enero y julio de 1991, 5 estudiantes de Ecuador, Uruguay, Chile, México y Guatemala.

2. Gracias a un buen trabajo de contratación, los insumos financiados por el Proyecto estuvieron a la disposición de los estudiantes desde un principio, incluyendo equipamiento, reactivos y materiales.

3. Para la fase de entrenamiento (enero-diciembre de 1990) se elaboró un programa teórico-práctico muy detallado y ambicioso, que incluía varios objetivos adicionales a los acordados inicialmente para el Proyecto. Ello fue posible gracias a la existencia de una importante masa crítica de científicos y técnicos en este Laboratorio de Referencia. Entre estos objetivos adicionales cabe destacar los siguientes:

- (a) teoría y práctica de la producción de anticuerpos monoclonales en animales
- (b) teoría y práctica de la obtención de hibridomas murinos
- (c) teoría y práctica de la obtención de anticuerpos monoclonales humanos
- (d) teoría e intercambio sobre aspectos de la aplicación de la ingeniería genética para la modificación de anticuerpos

4. Resultó muy adecuada la integración de los estudiantes a la vida científica del Laboratorio de Referencia y del CIGR, la asistencia a los seminarios semanales de la División y del Centro, y a presentaciones de científicos extranjeros invitados, complementaron la enseñanza y permitieron a los estudiantes participar directamente con su experiencia en los debates científicos y técnicos.

5. Tanto en la fase de entrenamiento como en la de producción, los estudiantes pudieron establecer contactos con otras instituciones del país que laboran en la temática de anticuerpos monoclonales. Así, se desarrollaron nexos fructíferos con el Instituto de Oncología y Radiobiología de la Habana, el Instituto de Medicina Tropical de la Habana y el Centro de Investigaciones Biológicas.

6. Desde el punto de vista técnico, el Proyecto demostró que los bioreactores de fibra hueca constituyen un magnífico sistema para la producción de anticuerpos monoclonales, en sustitución o complementación de los animales, y otros sistemas de cultivo (estacionario, "roller", "spinner", encapsulación en alginato, y tanques agitados), para laboratorios pequeños.

En los procesos productivos hechos por este Laboratorio de Referencia, tanto en ocasión de los entrenamientos, como de su trabajo rutinario con el hibridoma CB-IFNA2.4 (anti-interferon), los rendimientos alcanzados en el modelo Acusyst-R de la firma Endotronics fueron los siguientes:

- (a) Número total de procesos: 7
- (b) Procesos exitosos: 6 (uno se perdió al inicio por contaminación bacteriana en el inóculo celular)
- (c) Duración promedio de los procesos: 20 días (40-74). Finales de procesos en su mayoría motivados por rotura de conexiones de goma sometidas a desgaste en las bombas peristálticas, que provocan contaminación
- (d) Concentración de anticuerpo monoclonal en el sobrenadante de cultivos: entre 0.5 y 2 mg/ml de anticuerpo, de acuerdo a la etapa de crecimiento en el bioreactor en que se hacía la cosecha
- (e) Total de anticuerpo producido: entre 4 y 13 gramos, según la duración del proceso
- (f) Gasto de medio de cultivo y suero bovino: 10 litros de medio sin suero por día, a partir de los primeros 7-10 días (un promedio de 5 litros/día antes); 5-7 ml de suero por día, a partir de los primeros 7-10 días
- (g) Recuperación habitual en la purificación: 80% o más de los anticuerpos luego de la purificación por Proteína-A-Sefarosa

Los procesos realizados con otros dos hibridomas (uno en cada caso) dieron rendimientos menores de anticuerpo (300-1000 mg totales en 30-40 días). El problema de la diferencia de comportamiento entre diferentes hibridomas no es nuevo, y se presenta para cualquier sistema de producción que se emplee, sea "in vitro" o "in vivo". En nuestra experiencia, los niveles de anticuerpos a alcanzar se han correspondido con la productividad innata del hibridoma, y los "bajos productores" "in vitro" (50 microgramos/ml en cultivo estacionario) habitualmente no alcanzan en este equipo niveles de anticuerpos parecidos a los logrados en

ratones. No obstante, es posible que con trabajos de optimización de medio de cultivo y condiciones de corrida, los valores alcanzados en el bioreactor pudieran incrementarse.

El equipo Acusyst-R es de fácil manejo y control, con un mínimo de requerimientos técnicos de apoyo y conveniente para un laboratorio pequeño que tenga necesidades entre 0.5 y 5 gramos por mes. El costo mayor, aparte de la inversión inicial, está en los bioreactores (cartuchos) donde crecen las células, y que se desechan luego de cada proceso.

En nuestra experiencia, la dificultad mayor en el funcionamiento de este modelo está en la presencia de desperfectos en los sistemas electrónicos de control del movimiento de algunas bombas peristálticas, de fácil solución.

### **Recomendaciones**

1. Este Laboratorio de Referencia recomienda el empleo de bioreactores de fibra hueca, del tipo Acusyst-R, como una alternativa viable a los ratones, para la producción de anticuerpos monoclonales en laboratorios con necesidades no superiores a los 5 gramos mensuales (en dependencia siempre del hibridoma particular). La
2. Es conveniente que ONUDI/UNESCO divulgue la existencia de los materiales técnicos originados en el marco del proyecto (programas teórico-prácticos desarrollados y anexos con reportes de trabajo), y los circule entre los laboratorios interesados.
3. Sería muy útil establecer el status de Laboratorio de Referencia Permanente ONUDI/UNESCO para la producción de anticuerpos monoclonales, en el caso de este laboratorio y que se divulgara entre países interesados las posibilidades potenciales de ejecución de proyectos conjuntos y entrenamientos en este laboratorio de Referencia.

Como información adicional, a partir de junio de 1991 las actividades científicas y técnicas del hasta ahora Departamento de Hibridomas y Modelos Animales del CIQB, donde se han llevado a cabo las labores del Proyecto, se incrementaron sustancialmente al integrarse a otro grupo de laboratorios y formar la nueva División de Inmunotecnología y Diagnóstico, a cargo de:

- (a) todo el trabajo de obtención y producción de anticuerpos monoclonales murinos, humanos y recombinantes para el diagnóstico, la investigación científica y el tratamiento del humano
- (b) el clonaje y expresión de antígenos recombinantes con propósitos diagnósticos
- (c) el desarrollo y producción de sistemas diagnósticos avanzados que empleen proteínas recombinantes, antígenos naturales, anticuerpos mono y policlonales, y diferentes sistemas de detección

4. Una vez vencida esta fase de entrenamiento, intercambio de información y promoción de relaciones entre laboratorios de la región, y atendiendo a la muy exitosa culminación de los trabajos, se estima como muy pertinente comenzar de inmediato la discusión de un nuevo Proyecto con características más avanzadas.

En ocasión de la próxima reunión de conclusiones del presente trabajo, puede someterse a consideración de UNUD/UNESCO el establecimiento de un nuevo Proyecto con tareas de ajuste bilateral entre los Laboratorios de Referencia y laboratorios específicos, para la obtención o la producción de anticuerpos monoclonales. La definición de las tareas dependería de las necesidades y particularidades de cada país.

**Jorge V. Saviolando Canley, Ph.D.**  
**Jefe, División de Inmunotecnología y Diagnóstico**  
**Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología**  
**Apartado 6162, Cubanacán, La Habana-6, CUBA**

La Habana, Cuba, julio 22, 1991