



**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)

19983

26 p.  
tablas  
graficos  
diagramas

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA AMERICA  
LATINA Y EL CARIBE DP/RLA/83/003**

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

**INFORME FINAL**

**CONTRATO No. 91/007  
Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social  
Guayaquil, Ecuador**

PROYECTO DP/LA/83/003

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

A: DR. RODOLFO QUINTERO - Director General PRB

De: DR. LUIS E. PLAZA - Coordinador ECUADOR

Antecedentes:

Este informe es posterior a nuestra reunión de la Habana en el mes de Agosto del 90, posterior también al informe de la primera pasantía de trabajo en el CIGB de Habana por parte de Monika Merino (Octubre-Diciembre 1990), se acordó en aquella reunión la de efectuar las dos pasantías en los laboratorios de CIGB en Cuba por parte de Monika Merino y de Rosa Barba en el Butantan de Brazil.

Con estos antecedentes el informe sustenta las dos pasantías mencionadas.

- 1.- Trabajo de Monika Merino en Cuba.
- 2.- Trabajo de Rosa Barba en Brazil.
- 3.- Informe de Gastos.
- 4.- Conclusiones.

1.- El trabajo de Monika Merino se inició desde el 15 de Enero y concluyó en los primeros días del mes de Abril. La información del Dr. Jorge Gavilondo es de que Monika terminó exitosamente su estancia en CIGB y que logró asimilar los detalles referentes a la producción de anticuerpos monoclonales. Estimo que esta apreciación es válida aparte del informe técnico anterior en que participó con Alberto Horenstein, Rodrigo Ramos y Nunciada Salma. Estos criterios se expresan por cuanto no puedo adjuntar el informe técnico pues hasta la fecha no nos ha llegado debido a que quedó en corrección final en Habana y aspiró que sea considerado como parte del mismo la copia que seguramente debe haber enviado la delegada de Uruguay o informe del CIGB con lo que se hace descargo de este informe y que se ha estado hasta la fecha esperando de tal documento.

2.- El trabajo de la Dra. Rosa Matilde Barba Torres se inició en el Centro de Biotecnología del Instituto Butantan de Brazil desde el primero de Febrero hasta el 30 de Marzo del presente año y participó con los delegados de Bolivia y Venezuela usandose en el trabajo práctico 2 tipos de hibridomas: el anti B y OKT3.

Se anexa el informe técnico del trabajo efectuado conjuntamente con Heriberto Cuevas y Salma Nunciada de Bolivia y Venezuela respectivamente.

- 3.- Adjunto copia de lo que se ha entregado para cada uno de los viajes y apoyo de sostén en los laboratorios tanto de Rosita Barba como de Monika Merino. En estos rubros puede apreciarse cambios de costos de pasajes con respecto a los programados por incremento de las tarifas internacionales.

3.1. Monika Merino

Dólares

1 pasaje Guayaquil-Habana .....	\$ 455,40
1 pasaje Habana-Guayaquil .....	" 420,12
CIGB .....	" 800,00

TOTAL \$ 1.675,52

Rosa Barba \*

1 pasaje Gquil-Sao Paolo-Gquil....	\$ 1.614,00
movilización y subsistencia .....	" 586,00

TOTAL \$ 2.200,00

\* No guardó el ticket y no se entregó documentación de la ayuda en el Instituto Butantan

Pasajes internos Gquil-Quito-Gquil	
a oficinas ONUDI .....	\$ 50,00
envío de informes .....	" 60,00
SUB-TOTALES .....	" 1.675,52
" .....	" 2.200,00

TOTAL \$ 3.985,52

4. - Conclusiones:

4.1. Se ha cumplido con las selecciones de los becarios para Brasil y Cuba y se solicita aceptar el informe técnico conjunto elaborado en CIGB por los otros asistentes y que justifica el retardo de este informe. Se adjunta informe técnico de Rosa Barba.

4.2. Se anexa información económica y documentos de descargo.

Atentamente,



DR. LUIS ENRIQUE PLAZA VELEZ  
Jefe Inmunología IESS  
Coordinador Proyecto AcM.  
Guayaquil - Ecuador



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

**INSTITUTO BUTANTAN**

**C E R T I F I C A D O**

Certifico que la Dra. ROSA KATILDE BARBA TORRES  
HA RECIBIDO adiestramiento y capacitación en la  
producción masiva de anticuerpos monoclonales en  
el CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DEL INSTITUTO BUTANTAN  
por el periodo del 1º de Febrero al 30 de Marzo de  
1991.

Es cuanto certifico para los fines consiguientes  
del interesado.

Dra. Anna Maria Moron F.

**JEFE DE LABORATORIO**

**PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

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

PRUD / UNESCO / ONUDI  
RLA / 33 / 003

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

PARTICIPANTES:

BARBA T. ROSA (ECUADOR)  
CUEVAS L. HERIBERTO (BOLIVIA)  
SALMA E. NUÑEZ (VENEZUELA)

FEBRERO - MARZO 1991

## INFORME TECNICO

Programa de capacitacion personalizada en produccion masiva de anticuerpos monoclonales

Actividades del programa de entrenamiento:

### I.6 SEMINARIOS

Se discutieron los siguientes temas:

- 1.- Métodos de cultivo celular y producción masiva de anticuerpos monoclonales
- 2.- Produccion en gran escala de anticuerpos monoclonales murinos, usando bioreactores de fibra hueca
- 3.- Métodos de purificación de anticuerpos monoclonales
- 4.- Anticuerpos monoclonales de segunda generación
- 5.- Control de calidad en la producción de anticuerpos monoclonales
- 6.- Vacunas anti-idiotípicas

### II.- TRABAJO PRACTICO

Durante el trabajo práctico usamos 2 tipos de hibridomas; el anti B. y el OKT3 .

Las etapas del trabajo práctico fueron las siguientes:

- 1.- Expansión de los hibridomas :-Se expandieron los correspondientes hibridomas ,tanto en FRASCOS DE cultivo como en spinner
- 2.- Estudio de los parametros metabólicos : El objetivo fue establecer las condiciones de cultivo del hibridoma anti-B, que permitan una mejor estabilidad de las células ,así como una óptima producción de anticuerpos monoclonales.

Metodología:

De las células expandidas en el punto 1, fueron inoculados 16 frascos de cultivo (T-25) con  $1 \times 10^5$  cel./ml, en un volumen final de 10 ml de medio RPMI-1640 , 10 % SFB mas gentamicina 40 ug/ml ,adicionalmente se incluyeron 2 frascos de cultivo con 10 ml de medio libre de células como control.

Los frascos fueron incubados en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. A partir de las 2 horas y diariamente se determinaron los siguientes parámetros : pH, concentración de glucosa, concentración de lactato ,densidad celular y viabilidad ,así como la presencia y actividad de anticuerpos monoclonales.

El pH se determinó en un potenciometro, la glucosa mediante el método de la glucosa oxidada (Kit Bioclin Glicose-god-clin) .La determinación de lactato fue mediante el test enzimático piruvato/lactato (Kit Sigma). El número de células fue determinado realizando contaje celular en camara de Neubauer, y la viabilidad celular por exclusion en azul de tripano.

La presencia de los anticuerpos monoclonales fue medida por el ensayo inmunienzimatico ELISA en placas de polivinilo sensibilizadas con anti mouse Ig G. La actividad del mismo fue realizada por hemoaglutinacion directa, usando eritrocitos del grupo B.

### Resultados:

En la tabla 1 y figura 1 se muestran los resultados obtenidos:

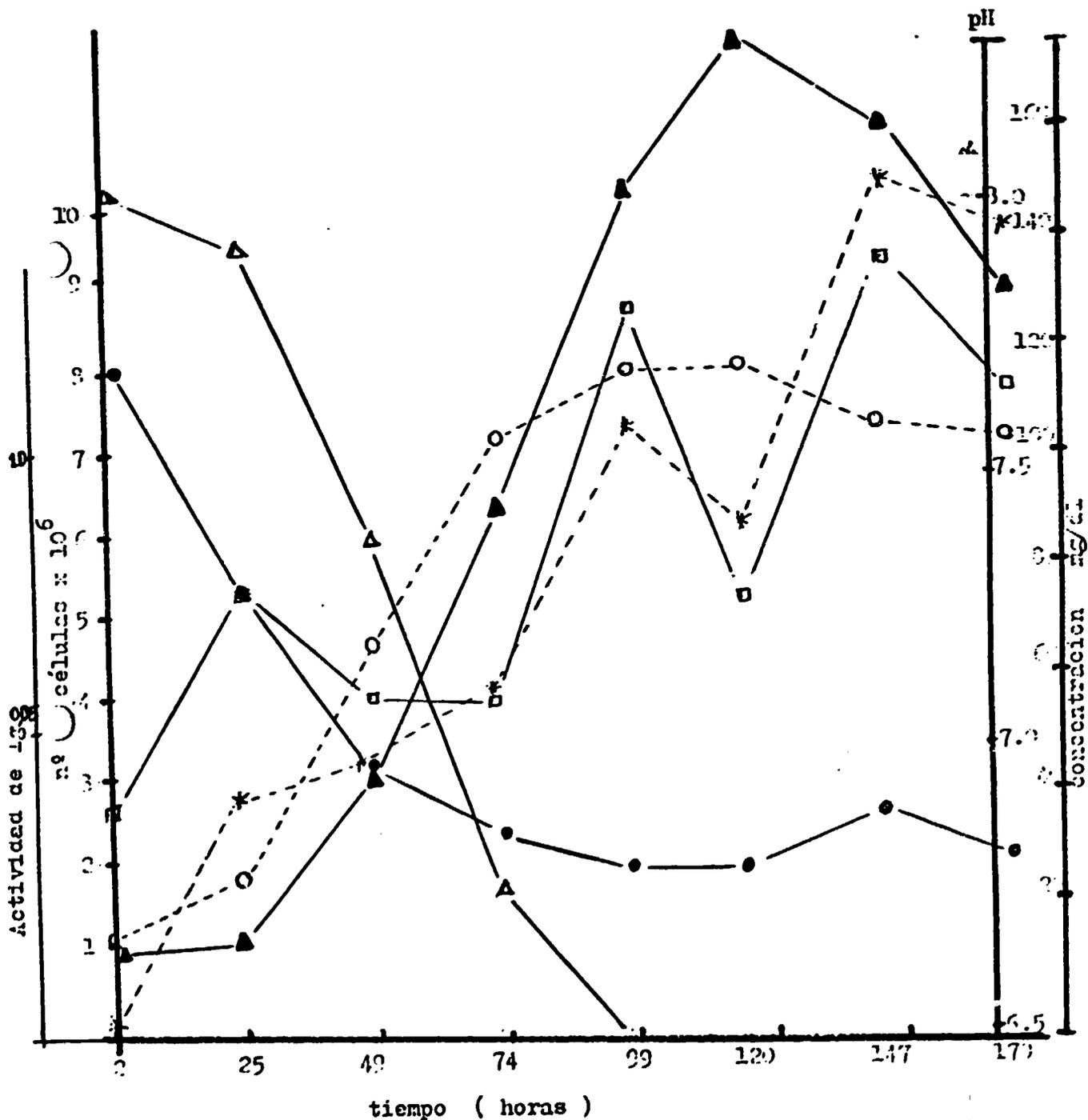
TABLA 1

Los datos presentados son el promedio de determinaciones por duplicado.

tiempo (hrs)	pH	nº de celulas (totales)	viabilidad %	Glucosa mg/dl	Lactato mg/dl	ELISA	Título Hemaglut.
2	7.71	9,75x10 <sup>5</sup>	100	152.15	13.43	0	0
25	7.31	1.13x10 <sup>6</sup>	100	143.90	30.47	0.05	32
49 <sup>1/2</sup>	6.95	3.19x10 <sup>6</sup>	100	89.89	71.80	0.05	32
74 <sup>1/2</sup>	6.86	6.3x10 <sup>6</sup>	100	26.55	108.53	0.059	4096
99	6.8	1.03x10 <sup>7</sup>	100	0.0	120.09	0.133	4096
120 <sup>1/2</sup>	6.8	1.28x10 <sup>7</sup>	88.7	0.0	119.20	0.07	2048
147	6.9	1.1x10 <sup>7</sup>	96.8	0:0	110,0	0.141	8192
170	6.82	8.9x10 <sup>6</sup>	85.6	0.0	107.60	0.117	1024

\*Los datos presentados corresponden a la presencia de Ig G en las respectivas muestras. Considerándose como indicador positivo unidades superiores a 0.05

### CURVA METABOLICA



▲ n° de células ; ● pH ; Δ glucosa ; ○---lactato  
 □ IgG puro ; \* IgG 1/25

Del análisis de los datos obtenidos podemos determinar:

- a) El tiempo de duplicación celular es de aproximadamente 24 horas, encontrándose la máxima densidad a las 120 horas de cultivo ( $1.28 \times 10^7$  células).
- b) Partiendo de una concentración de glucosa inicial de 153.5 mg/dl, el consumo máximo se encontró a las 74<sup>1</sup>/<sub>2</sub> horas (126,95 mg/dl) correspondiendo al momento de crecimiento celular en fase exponencial. A concentraciones de glucosa inferiores a 26.55 mg/dl las células entran en fase estacionaria.
- c) A medida que las células están en fase de crecimiento exponencial, observamos un aumento paralelo de las concentraciones de lactato en el medio, directamente relacionado con un descenso del pH y glucosa.
- d) La producción de anticuerpos monoclonales ocurre durante la fase de crecimiento exponencial y se mantiene durante la fase estacionaria y al inicio del declive.  
La presencia y actividad de anticuerpos se encontró entre las 90 y 147 horas.

3) Entrenamiento en la tecnología de cultivo masivo de híbrido mas "in vitro"

3.1 PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES POR CULTIVO EN FIBRA HUECA VITAFIBER (AMICON)

El sistema Amicon constituye un método alternativo de producción masiva de anticuerpos monoclonales. El mismo está constituido por: a) un cartucho formado por unidades de fibra, con 2 compartimientos: el espacio intracapilar o lumen de las fibras, y el espacio extracapilar, donde se presenta el crecimiento celular en alta densidad; b) un spinner con medio (reservorio); c) bomba de circulación; d) tubos de goma y filtros. e) y un agitador magnético: Todo este sistema coloca a 37°C.

Desarrollo

- a) Montaje del sistema: Se realizó en condiciones estériles.

bajo flujo laminar . Se permitió la circulación de un litro y medio de RPMI-1640 con gentamicina y 10 mM HEPES, libre de suero durante 72 horas con el objeto de eliminar compuestos tóxicos.

b) Preparación y siembra del inóculo : El hibridoma expandido como se indicó en la parte inicial de este informe, el anti B fue inoculado al espacio extracapilar de la fibra (ECS) a una concentración de  $4.37 \times 10^8$  células/ 5 ml de medio de cultivo.

c) Condiciones de la corrida

c.1) La velocidad del medio a través del sistema se inició con 60.12 ml/min , aumentándose desde las 144 horas hasta el final de la corrida a 105.38 ml/min. La dirección del flujo fue invertida inicialmente cada 24 horas ; cuando la densidad celular fue considerable, el mismo fue cambiado cada 12 horas.

Se reemplazaron los filtros cuando se observó marcada pulsación de los tubos de goma.

c.2) Al inicio de la corrida se utilizó medio RPMI con 10 % de suero fetal bovino , siendo reducido al 5% a partir de las 120 horas .De acuerdo a los parámetros metabólicos medidos en el espacio intracapilar (medio metabolizado ) se realizaron los cambios necesarios de medio fresco.

d) Parámetros medidos: El control de las condiciones de cultivo se realizó midiendo los siguientes parámetros :

d.1) Diariamente pH, concentraciones de glucosa y lactato.

d.2) Periódicamente se removió medio del ECS y se determinó la actividad del producto por hemaglutinación directa

### Resultados

Se presentan tabulados los parámetros medidos en el espacio intracapilar durante la corrida

Tabla 2:

tiempo(horas)	pH	glucosa mg/dl	lactato mg/dl
0	7.43	151.2	17.9
42	7.22	82.46	68.7
55.2	7.04	80.79	74.8
68	7.04	63.75	91.8
92	7.00	52.12	96.3
118.5	6.91	95.51	87.95
142.5	6.95	64.97	82.42
164	6.99	84.86	
184	6.89	73.07	
210	6.71	36.22	96.29
232	7.12	109.5	51.54
264		145.2	0.839?
288.3	6.97	75.54	76.23
307.17		89.55	62.03
331.35	7.06	99.08	60.11
354.15	6.96	81.51	73.21
376	6.99	110.5	60.57
400.05	6.97	96.29	76.03
425.04	6.97	93.92	102.9
449	6.98	82.11	79.81
471.1	7.01	95.66	70.18
504.45	6.91	74.73	85.97
519.5	6.85	92.34	78.82
543	6.87	80.44	76.96
567	6.98	82.38	73.85
574	6.91	40.44	82.90

Tabla 3

Se presenta tabulada la actividad del producto

tiempo (horas)	volumen extraido (ml)	titulo de hemaglutinacion
92	5	128
118.5	5	480
232	20	1920
307.17	15	7680
400.05	15	7680
449	15	3840
543	20	4194304
574	50	131072

De los parametros medidos podemos observar:

- a) Desde el inicio del proceso se observó un metabolismo alto, indicando que no se presentó de latencia .
- b) Las concentraciones de glucosa y lactata en el medio intracapilar, fueron mantenidas dentro de un rango promedio que permitió un crecimiento celular y acumulacion de Ac Mo.
- c) De acuerdo a los titulos de hemaGLUTINACION obtenidas para las diferentes cosechas del ECS, podemos deducir que la concentración de anticuerpos monoclonales fué en aumento progresivo.

### 3.2) ENCAPSULACION EN ALGINATO DE SODIO

Otro método alternativo para la producción masiva de AcMo es el encapsulamiento de la células en alginato de sodio .

El encapsulamiento permite obtener mayores concentraciones celulares, puesto que se aumenta el area de crecimiento .Esto hace posible aumentar la producción de los anticuerpos monoclonales.

#### Metodología

### Metodología

En este caso se utilizó el hibridoma OKT3, el cual fue expandido en spinner. Alcanzando la densidad celular esperada ( $60 \times 10^6$  cel), las células fueron centrifugadas a 800 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 30 ml de medio DMEM 10% HS. Esta suspensión celular fue mezclada con igual volumen de una solución de alginato de sodio al 2% y luego transferida a una jeringa con aguja 22<sup>1</sup>/<sub>2</sub> G. La mezcla fue goteada en forma uniforme sobre una solución de cloruro de calcio 125 mM (180 ml) colocada en un agitador magnético a velocidad mínima. Las perlas fueron lavadas sucesivamente con medio Mc Coy y finalmente resuspendidas en un medio DMEM 10% HS y cultivadas en un frasco spinner de 250 ml de capacidad.

Diariamente se realizaron las siguientes determinaciones: pH, concentraciones de glucosa, lactato y actividad de Acto. También se determinó el número de células / gramo de perlas y viabilidad celular, para lo cual las mismas fueron disueltas en un volumen adecuado de EDTA 50mM.

### 3.3) CULTIVO DE HIBRIDOMAS EN SACO DE DIALISIS

Otra técnica desarrollada para el cultivo de células a altas densidades y concentración de un producto en forma pura y a un costo bajo, ha sido el cultivo en sacos de diálisis.

Metodología:

a) Inóculo: Se trabajo con dos hibridomas :el anti B y el OKT3, siendo el inóculo del hibridoma OKT3  $1.5 \times 10^6$  cel./ ml en un volumen final de 10 ml de medio RPMI 10 % HS y el del anti B  $0.4 \times 10^6$  cel / ml en volumen final de 10 ml de medio RPMI-1640 con 10 % de HS

b) Tratamiento de los sacos de diálisis: Se utilizaron sacos de 2.4 cm de diametro por 7 cm de longitud y un cut off de 14 Kd.

Con el objeto de eliminar sustancias tóxicas (glicerol sulfuros, metales pesados, etc ) se sometieron los sacos al siguiente proceso de lavado :

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

Los lavados fueron de una hora cada uno y en agitación. Dichos sacos de diálisis fueron almacenados en ácido acético al 10 % a 4°C.

c) Montaje: Los sacos de diálisis lavados fueron anudados en uno de sus extremos , mientras que en el otro se colocó una cánula de plástico con el fin de facilitar la manipulación. Luego se esterilizaron 2 horas en agua destilada a ebullición. Estos sacos fueron inoculados con las células en la concentración establecida y luego anudadas con hilo esteril, retirándose la cánula: Los sacos fueron introducidos en tubos de 21 cm de largo por 4 cm de diametro con 50 ml del medio de cultivo.

La incubación se realizó en agitación en sistema de rotación a velocidad mínima a 37°C

Resultados

En la tabla n° 4 se muestran los resultados obtenidos al medir consumo de glucosa para ambos sacos de dialisis

Tabla n° 4

Dias de cultivo	Consumo de Glucosa*	pH *	Consumo de Glucosa**	pH **
0	364.9	7.4	157.5	7.7
1	321.9	7.3	127.1	7.53
2	311.4	7.33	131.1	7.4
3	273.2	7.4	102.6	7.14
4	258.3	7.82	n.d.	7.02
5	188.3	7.22		
6	306.6	7.5		

\* OKT3 inóculo  $1.5 \times 10^6$  cel/ml

\*\* anti B inóculo  $0.4 \times 10^6$  cel /ml

Los datos sobre la concentración de glucosa en el medio fuera del saco de dialisis son de importancia en el seguimiento de los cultivos ,ya que es el único parámetro que puede ser determinado .

El número de células ,viabilidad y actividad de anticuerpo se determinaron finalizada la experiencia, en la tabla n° 5 se muestran dichos resultados:

Tabla n° 5

	OKT3	AB
N° C x 10 <sup>6</sup>	50	40
% Viabilidad	83.3	84.2
Hc	Elsa ID > a 78125	Hemagto D 43046721

#### 4) PURIFICACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL POR PROTEINA A-SEPHAROSA

Se realizaron 3 purificaciones del AcMo anti B a partir de los medios del espacio extracapilar de la fibra hueca (AMICON).

##### Metodologia

Las muestras de cada purificación previa filtración por  $\mu$  0.22 u fueron pasadas por una columna C10/10 (Pharmacia) conteniendo 10 ml de proteína A-Sepharosa. Una vez equilibrada con el buffer Tris 0.05 M / 0.15 M NaCl pH 8.6 hasta alcanzar la línea base, pasamos la muestra con un flujo volumétrico de 0.8 ml/min. Después de pasar la muestra, se lavó con el mismo buffer hasta recuperar la línea base. A esta fracción no unida de la columna se denominó Ft (flow through).

Debido a que no conocíamos el isotipo del AcMo a purificar se realizó la elución sucesiva con diversos buffers: a) buffer fosfato 0.05 M / 0.15 M NaCl pH 7.0 ; b) buffer citrato 0.05 M / 0.15 M NaCl pH 5.5; c) buffer acetata 0.05/0.15 M NaCl pH 4.3 y d) buffer glicina 0.05 M 0.15 M NaCl pH 2.3 . El anticuerpo eluido fue neutralizado con Tris base hasta pH 7.0 .

Posteriormente la columna fue lavada con buffer Tris 0.05M / 1M NaCl pH 8.6, buffer d y por último con buffer de equilibrio . Las fracciones obtenidas fueron dializadas en PBS pH 7.2 por 48 horas . Las fracciones obtenidas de cada purificación fueron ensayadas en su actividad biológica por hemaglutinación directa, y la pureza de los diferentes eluatos mediante electroforesis en geles de poliarilamida al 12.5 % en presencia de SDS en condiciones nativas y reducidas y en algunos casos en geles de gradientes de 8-25 % Phast-System (Pharmacia).

##### Resultados

1) Primera purificación: Fueron purificados 15 ml de una

mezcla de ECS (118 y 232 horas) en las siguientes condiciones

- velocidad de registro 0.15 cm/ min
- flujo volumétrico 0.8 ml/min

En la figura nº 2 se muestra el cromatograma de la primera purificación, en la figura 3 se muestra los SDS-PAGE al 12.5 % y en gradiente 8-25 % (Phast-System) en condiciones reducidas y teñidas con plata, mostrándose una baja concentración del anticuerpo purificado.

2) Segunda purificación: Fueron purificados 33 ml de una mezcla de ECS (331 h, 449 h y 543 h) en las siguientes condiciones :

velocidad del registro: 0.05 cm/min  
flujo volumétrico : 0.4 ml/min

Puesto que en la primera purificación no hubo elución de picos con buffer fosfato, este fue eliminado de los pasos de elución .

En la fig. 4 se observa el cromatograma de la segunda purificación, mostrándose la secuencia de elución con los distintos buffers. En la fig 5 se muestra el SDS-PAGE, 12.5 % en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue

3) Tercera purificación: Fueron purificados 40 ml de ECS de 574 h en las siguientes condiciones.

- velocidad de registro: 0.05 cm/min  
- flujo volumétrico: 0.4 ml/min

En esta purificación se utilizó elución del pico del anticuerpo buffer citrato con pH 3.5 el cual es menos drástico que el uso de glicina pH 2.3.

En la figura 6 se muestra el cromatograma de la tercera purificación, donde se observa la secuencia de elución con los distintos buffers.

En la fig. 7 se muestra el SDS-PAGE al 12.5 % en condiciones reducidas y teñidas con Coomassie Blue:

## Metodologia

En este caso se utilizó el hibridoma OKT3, el cual fué expandido en spinner. Alcanzando la densidad celular esperada ( $60 \times 10^6$  cel), las células fueron centrifugadas a 800 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 30 ml de medio DMEM 10% HS. Esta suspensión celular fué mezclada con igual volumen de una solución de alginato de sodio al 2% y luego transferida a una jeringa con aguja 22<sup>1</sup>/<sub>2</sub> G. La mezcla fué gotcada en forma uniforme sobre una solución de cloruro de calcio 125 mM (180 ml) colocada en un agitador magnético a velocidad mínima. Las perlas fueron lavadas sucesivamente con medio Mc Coy y finalmente resuspendidas en un medio DMEM 10% HS y cultivadas en un frasco spinner de 250 ml de capacidad.

Diariamente se realizaron las siguientes determinaciones:

pH, concentraciones de glucosa, lactato y actividad de AcMo. También se determinó el número de células / gramo de perlas y viabilidad celular, para lo cual las mismas fueron disueltas en un volumen adecuado de EDTA 50mM.

Resultados:

Se presentan en la tabla 4:

Tabla 4

días de cultivo	pH	Glucosa mg/dl	nº de cel/ grde alginato	viabilidad (%)	presencia de AcMo (título ELISA)
0	7.4	364,9	—	—	—
2(horas)	7.4	341,6	—	—	—
1	7.38	278,7	$1,4 \times 10^6$	79,6	25
2	7.13	160,1*	$8,97 \times 10^5$	63,6	125
3	7.32	304,9	$7,73 \times 10^5$	90	625
4	7.47	180,2*	$2,66 \times 10^6$	80,9	625
5	7.22	165,1*	$3,78 \times 10^6$	86,53	3125
6	7.03	150,1*	$1,07 \times 10^6$	54,7	15.125
7	6.95	102,6*	$2,17 \times 10^6$	72	>78.125
8	6.68	nd	$2,53 \times 10^6$	82,8	>78.125

nd no determinado

\* se realizó el cambio de 100 ml de medio fresco.

\*\* Se determinó la presencia de anticuerpos mediante la técnica de ELISA sensibilizando con anti-IgG de ratón.

Observación: a partir del 4º día, se observó la presencia de clusters en el interior de las perlas.

La determinación de lactato no fue determinada.

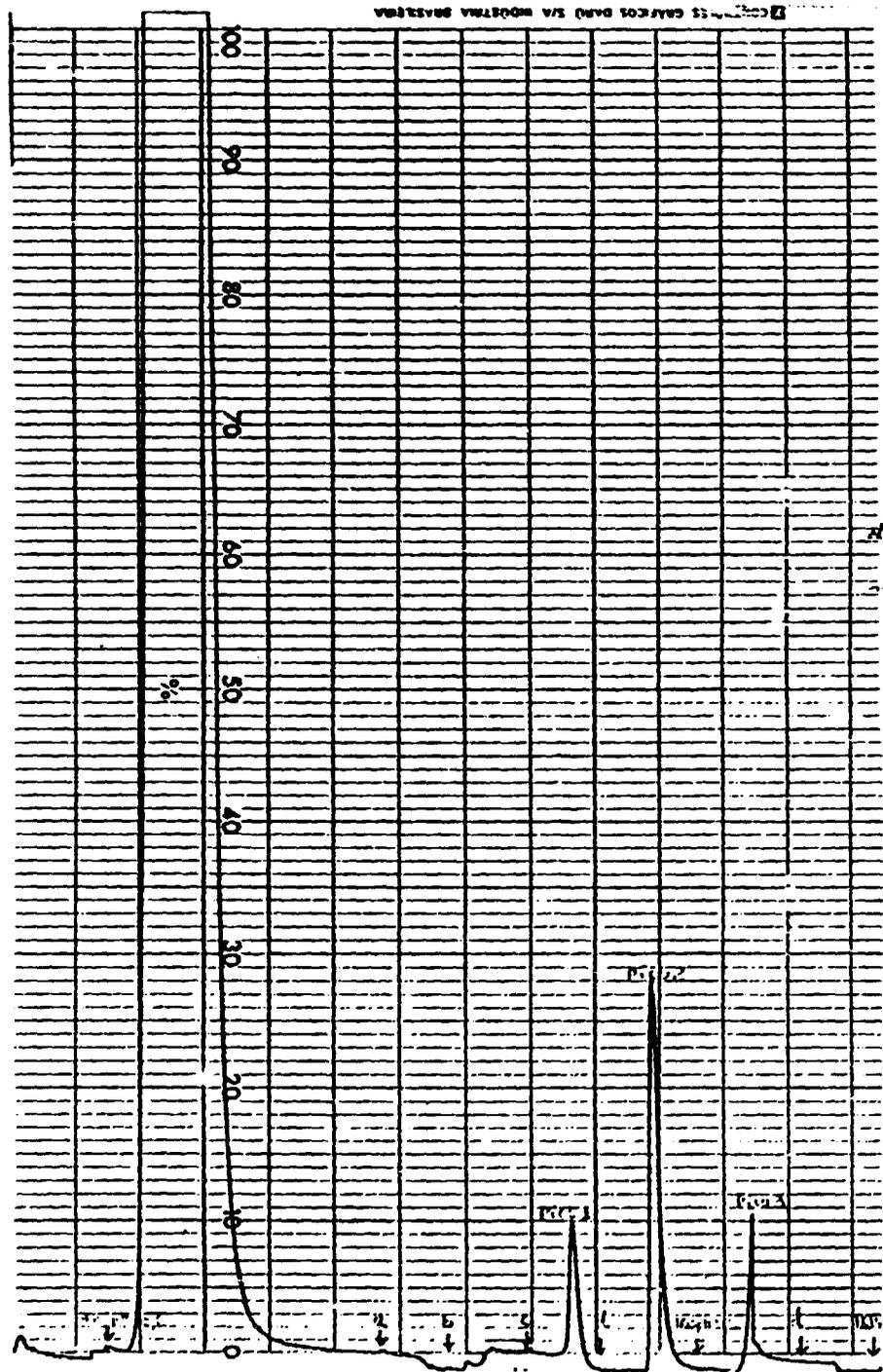


FIGURA nº 2. Cromatograma de la purificación nº 1.  
 volumen de la muestra 15 ml ; buffer de union: tris 0.05 M  
 pH 8.6 ; buffers de elución: 1º fosfato 0.05 M/0.15 M NaCl,  
 pH 7.0; 2º citrato 0.05M/0.15 M NaCl, pH 5.5; 3º acetato 0.05 M/  
 0.15 M NaCl, pH 4.3; 4º glicina 0.05 M/0.15 M NaCl, pH 2.3  
 buffer de regeneración: glicina pH 2.3  
 flujo volumetrico: 0.8 ml/ min  
 velocidad de registro : 0.15 cm/min  
 Actividad de AcHo en los picos por hemaglutinación = el pico con activi-  
 dad fue el n=2 con un título de 256.

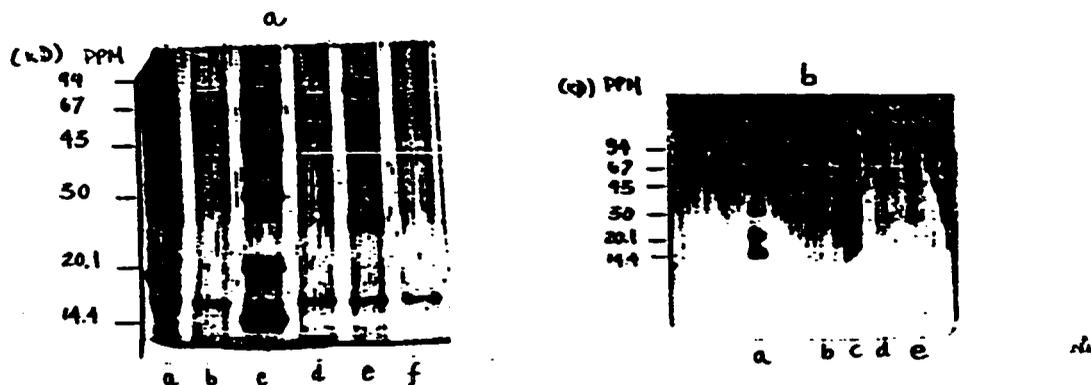


Fig 3 SDS-PAGE de las fracciones obtenidas:

a) al 12.5  $\mu$  en condiciones de reducción, teñidas con plata

Los carriles corresponden a:

- canal a: muestra precolumna - canal b : flow through
- canal c: patrón de peso molecular (M) - canal d: pico 1
- canal e: pico 2 - canal f: pico 3 .

b) en gradiente de 8 a 15  $\mu$ , bajo 4 condiciones diferentes:

- canal a: patrón de peso molecular (PPM).
- canal b: muestra del pico 2 diluida 4/5 en buffer con beta mercaptoetanol y hervida 5 minutos
- canal c: muestra del pico 2 diluida 4/5 en buffer con beta mercaptoetanol y hervida 10 minutos
- canal d: muestra del pico 2 diluida 3/5 en buffer con beta mercaptoetanol y hervida 5 min.
- canal e: muestra del pico 2 diluida 3/5 en buffer con beta mercaptoetanol y hervida por 10 minutos.

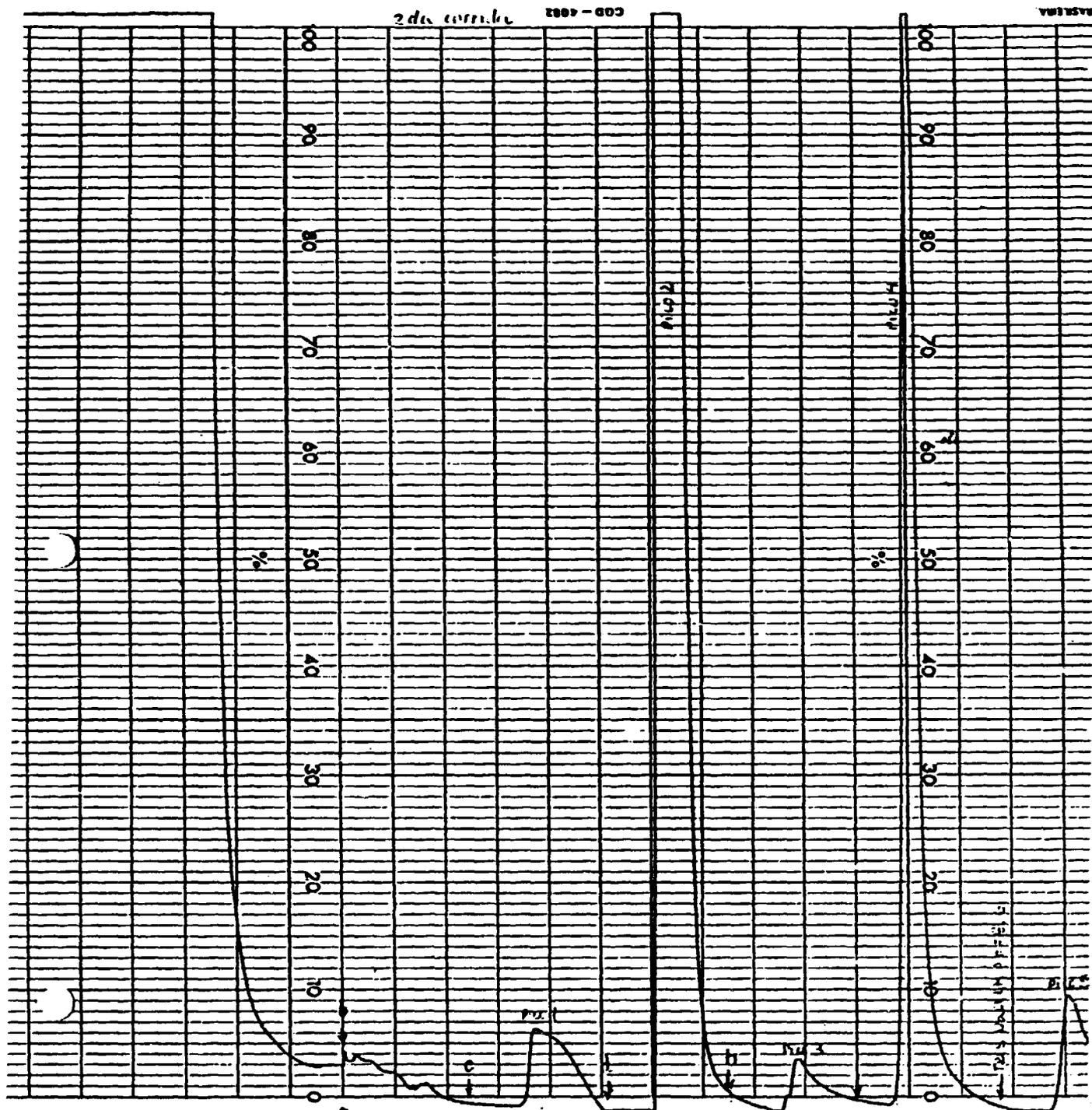


Fig 4 Cromatografía de la purificación nº 2

volumen de la muestra 33 ml

buffer de unión: tris 0.05 M pH 8.6

buffer de elución: 1º citrato 0.05/0.15 M NaCl, pH 5.5

2º acetato 0.05M/0.15M NaCl, pH 4.3

3º glicina 0.05M/0.15M NaCl, pH 2.3

buffer de regeneración: glicina, pH 2.3

flujo volumétrico : 0.4 ml/ min

velocidad de registro: 0.05 cm/ min.

Actividad de hemo en los picos por hemaglutinación = se encontró actividad en los picos 2 (con un título de  $4.7 \times 10^{10}$  y pico 3 (con un título de 64).

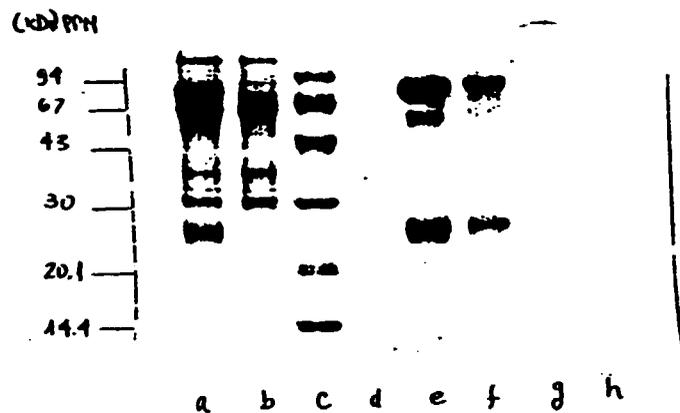


Fig. 5 SDS-PAGE al 12.5 % en condiciones de reducción de las fracciones obtenidas de la purificación 2 teñidas con Coomassie Blue

Los canales corresponden a:

- canal a: pre-columna.
- canal b: flow through (Ft).
- canal c: PPM.
- canal d: pico 1.
- canal e: pico 2.
- canal f: pico 3
- canal g: pico 4
- canal h: pico 5

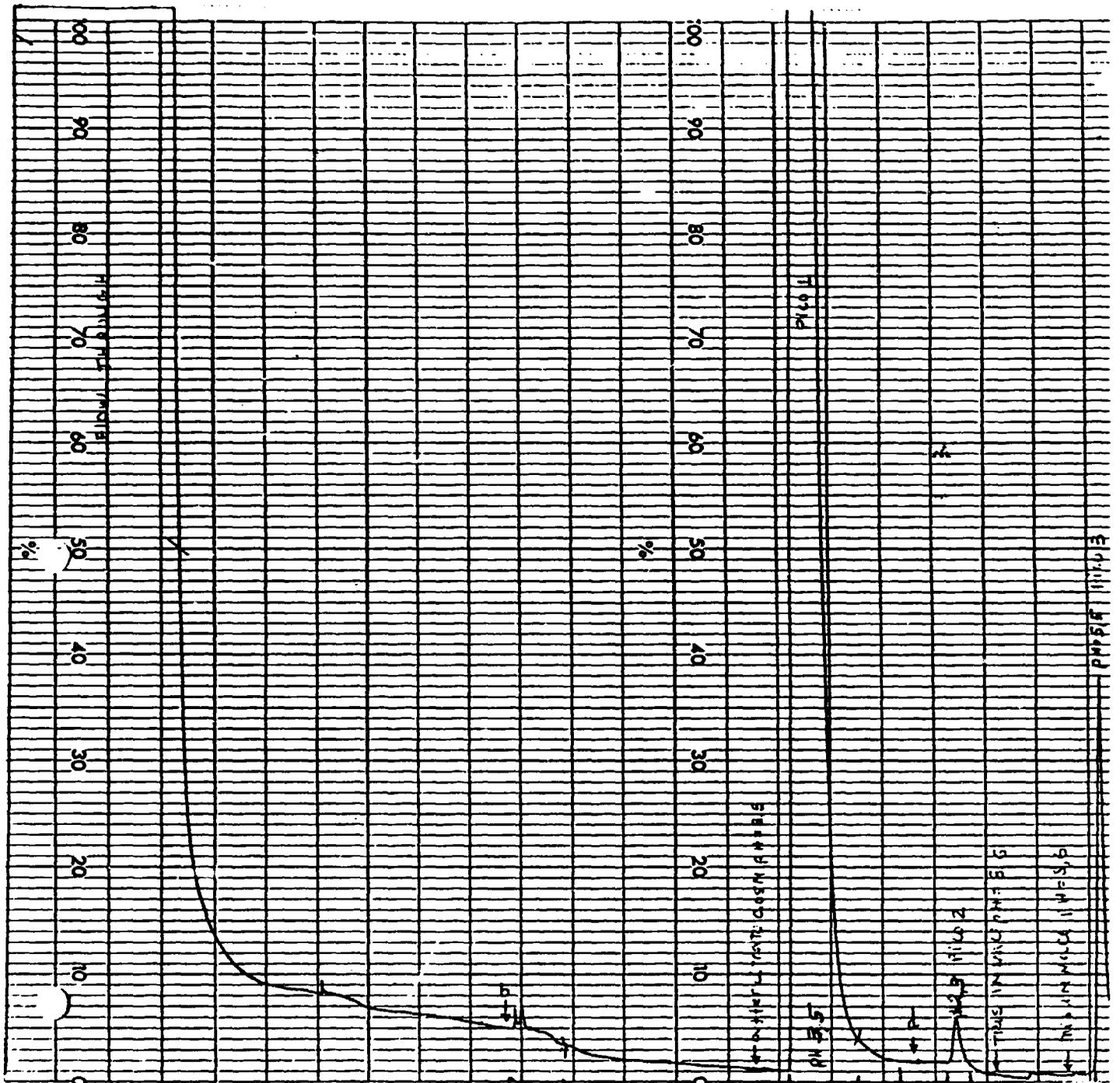


Fig 6. Cromatografía de la purificación nº 3.

volumen de la muestra 40 ml.

buffer de union=tris 0.05 M, pH 8.6

buffer de elución: 1º citrato 0.05M/NaCl, pH 5.5

2º citrato 0.05M/0.15M NaCl pH 3.5

3º glicina 0.05M/0.15M NaCl, pH 2.3

buffer de regeneración: tris 0.05 M, pH: 8.6, glicina 0.05M pH 2.3

flujo volumetrico: 0.8ml/min

velocidad de registro: 0.05 cm / min.

Actividad de AcNo en los picos por hemaglutinación = Se encontró actividad en los picos 1 (con título de 32768) y pico 2 (con título de 64).

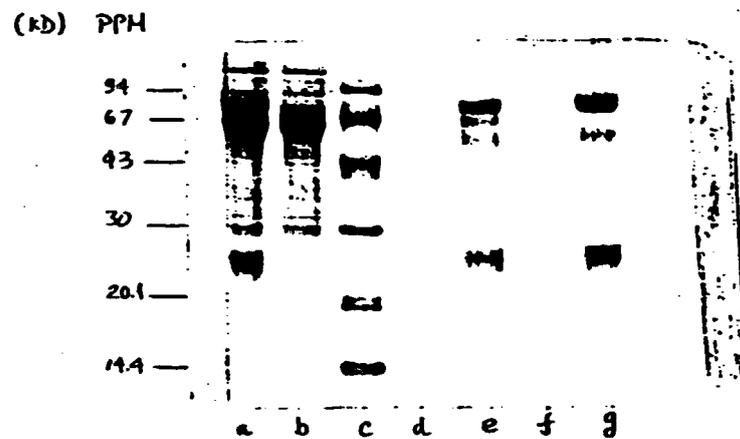


Fig.7 SDS-PAGE al 12,5% en condiciones de reducción de las fracciones obtenidas de la purificación 3, teñidas con Coomassie blue.

Los carriles corresponden a:

- canal a= Pre-columna.
- canal b= Flow Through
- canal c= PFI.
- canal d= Pre-pico 1:
- canal e= Pico 1:
- canal f= Pico 2.
- canal g= Pico 3.

## CONCLUSIONES

:Tanto las actividades teóricas como prácticas fueron culminadas.

Con respecto al trabajo experimental, se adquirió de la experiencia necesaria para la producción masiva de anticuerpos monoclonales. En lo referente al montaje de la fibra hueca (AMICON) hemos obtenido resultados muy positivos, concentrándose el AcMo anti-B con cierto grado de pureza y altos títulos de hemaglutinación. Los resultados obtenidos encapsulando células en alginato, estando aún en curso, han permitido la obtención de AcMo concentrado. También se realizó el montaje de una técnica alternativa, como es el cultivo en sacos de dialisis. Del mismo obtuvimos muy buenos resultados concentrándose bien los AcMo; OKT3 y  $\alpha$ B. partiendo de diferentes inóculos

Se purificaron los sobrenadantes del ECS de fibra hueca de Amicon por proteína A sepharosa. Se obtuvo un cierto grado de pureza puesto que en los SDS-PAGE aparece una banda entre 67-94 Kd, que posiblemente sean agregados del AcMo, esto no pudo ser confirmado.

### AGRADECIMIENTOS

Para concluir el presente informe, queremos manifestar nuestro sincero agradecimiento a la Dra. Ana Maria Moro Furlani por su orientación, enseñanza y amistad.

A Mariateresa Rodriguez, Miriam Nakamura y Mara Lucia Zucheran por su colaboración y amistad en nuestra permanencia en el laboratorio.

También agradecer a la Dra. Celia Dona Salete y a todo el personal de Biotecnología por brindarnos su amistad y lograr que nuestra estadía en el Brasil sea grata.

Muito Obrigado por todo

Nancy, Rosa y Heriberto .

HABOCC/CEL/EP  
ECUADOR

PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES  
UN ESFUERZO COMPARTIDO EN AMERICA LATINA

TERCER INFORME.

GUAYAQUIL, DIC 28 1990.

DE: DR LUIS ENRIQUE PLAZA V  
PARA: DR RODOLFO QUINTERO

Me permito anexar el informe tecnico del trabajo realizado en el periodo de entrenamiento de Monika Merino en el Centro de Ingenieria Genética y Biotecnología de la Habana Cuba bajo la dirección de Jorge Saviñondo, como se podrá notar se ha procedido a dar cumplimiento conforme se lo planificó y posterior a su entrenamiento pudo permanecer una semana más en entrenamiento y que nos ha servido de mayor apoyo. Deseo expresar formalmente nuestro agradecimiento y señalar que la misma candidata (Monika Merino) retornará al segundo serio de entrenamiento en Cuba a partir del 15 de Enero de 1991 mientras que se ha escogido para el entrenamiento en el centro Butantan de Brazil a la Dra Rosa Barba que forma parte de nuestro grupo de trabajo en el Hospital del IESS de Guayaquil y que está dentro del grupo de producción de monoclonales contando con experiencia previa. El nombre de la Dra. Barba lo haré conocer via telex al centro Butantan.

De acuerdo con lo convenido se ha pagado al CIGB de la Habana por uso de los laboratorios Ochocientos dólares en total (\$ 800,00) Pasajes Guquil Habana Guquil.

CIGB	\$ 800,00
PASAJES	\$ 1254,00
TOTAL	\$ 2054,00

Se adjuntan los documentos pertinentes.

Con los mejores augurios en salud y trabajo para el próximo año me suscribo con afecto y consideración.

Atentamente

  
Dr. Luis Enrique Plaza Véliz  
coordinador monoclonales Ecuador

Original fechado septiembre 25 de 1990

Factura No 20496



Departamento Marco L. 116A y 9 de Octubre Telfs. 310682-308598  
P. O. Box 371 Guayaquil - Ecuador 314131-307573  
305447-301256

Nombre: SRA. MONICA MERINO  
A cargo de:  
Dirección Comercial:  
Dirección Domiciliar:  
Lugar de Cobro:  
Tel.: 306796

SA/IA

REGISTRO UNICO 0990503397001  
REGISTRO OTURIS 3729

Guayaquil, septiembre 26 de 1990

REFERENCIA	CONCEPTO	TOTAL	
		US \$	SUCRES
VA 4201 052 504 VA 4400 755 012	SRA. MONICA MERINO SRA. MONICA MERINO	46,00	40.296,00
	GASTO DESCUAVILIM GR	1.093,85	958.212,60
SUN: UN MILLON NOVENTA Y OCHO MIL, TRESCIENTOS SESENTA Y TRES 84/100 SUCRES.-		1.139,85	998.508,60
Sub-Total		113,99	99.855,24
Sujeto al tipo de cambio oficial de la D.A.C. en esta fecha sucres 876,00			
Noche cobrada la detallada arriba cuyo valor pagará a la vista y sin protesto a la orden de AGENCIA DE VIAJES G-1 C. LTDA.			
TOTAL		1.253,84	1'098.363,84

ES FIEL COPIA  
DEL ORIGINAL

ACEPTANTE

AGENCIA DE VIAJES G-1 C. LTDA

*María Mercedes*  
GERENTE

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

**PNUD/UNESCO/ONUDI  
RLA 83 /003**

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

**PARTICIPANTES: MONIKA MERINO E.  
NUNCIADA SALMA E.  
RODRIGO RAMOS M.  
ALBERTO L. HORENSTEIN.**

**OCTUBRE - DICIEMBRE 1990.**

## INFORME TECNICO

### PROGRAMA DE CAPACITACION PERSONALIZADA EN PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

#### 1. ASPECTOS TEORICOS

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

##### 1. Conferencias:

- a. La tecnología de anticuerpos monoclonales (AcM). Aspectos generales. Proyectos de la División de Hibridomas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Aspectos generales del cultivo de hibridomas. Reactores de Fibra Hueca para producir AcM.
- b. Uso de líneas de ratones para la producción de AcM.
- c. Características de los AcM según su empleo. Uso de AcM en la purificación de moléculas diversas.
- d. Ensayos para AcM.
- e. AcM por Ingeniería Genética.
- f. AcM bifuncionales.
- g. Producción de AcM en bioreactor a burbujeo.

##### 2. Seminarios:

- a. Encapsulación de hibridomas en alginato. Cultivo de hibridomas en saco de diálisis.
- b. Métodos generales de purificación de AcM.
- c. Fusión celular para la obtención de AcM.
- d. AcM humanos.
- e. Estudio del efecto de nutrientes en el cultivo de hibridomas y producción de AcM. (Seleccionado por los participantes).
- f. Uso de vectores (shuttle vectors) en la generación de AcM biospecíficos. (Seleccionado por los participantes).

## II. ASPECTOS PRACTICOS

### 1. Aspectos generales en el cultivo de hibridomas.

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

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

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

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

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

## 2. Entrenamiento en tecnología de cultivo masivo

### 2.1 Producción "in vivo"

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

### 2.2 Producción "in vitro".

#### 2.2.1 Encapsulación en alginato de sodio

##### Introducción

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

##### Metodología

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

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

##### Encapsulación

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

pellet obtenido se resuspendió en medio de lavado (ML:DMEM/pen-estrep.) a razón de  $2 \times 10^6$  cels/ml. La mitad de esta suspensión celular fue centrifugada y resuspendida a la misma concentración celular en solución de ClNa 0,9%. Ambas fracciones fueron mezcladas por separado con igual volumen de una solución de alginato de sodio al 1,6%. Cada una de estas suspensiones fue transferida a una jeringa de 50 ml y goteada en forma uniforme utilizando aguja 20 1/2G, desde una distancia de 3cm, sobre 150 ml de solución 50 mM, 100 mM de Cl<sub>2</sub>Ca, a temperatura ambiente. Las perlas de alginato formadas se dejaron sedimentar 2-3 min, eliminándose el sobrenadante por vacío. Luego de lavarlas sucesivamente con ClNa 0,9% y ML, fueron resuspendidas en MS y cultivadas a 37 C en frasco spinner de 250 ml. A partir del día 2 se cambió el medio cada 24 horas. El medio metabolizado extraído se centrifugó a 1000 rpm por 10 min tomándose alícuotas para la determinación de Consumo de Glucosa (kit Sigma) y Concentración de Igs por ELISA. El pellet se resuspendió en un volumen adecuado para la determinación del número de células/ml de sobrenadante. Asimismo, cada 72 horas se determinó el número de células/gramo de perla, para lo cual las mismas fueron disueltas en 1 ml de citrato de sodio 50 mM. Se determinó la viabilidad celular por exclusión con azul de tripan. Por otro lado, con el fin de observar la formación de clusters en el interior de las perlas se extrajo algunas de las mismas observándolas en microscopio invertido.

### Resultados

De acuerdo al protocolo experimental descrito se cultivaron las células en los siguientes spinner:

TABLA # 1

Spinner	Cel. resuspendidas en		Solución de Cl <sub>2</sub> Ca	
	MS	NaCl	50 mM	100 mM
1	-	+	+	-
2	-	+	+	-
3	+	-	+	-
4	+	-	+	-
5	+	-	+	-
6	-	+	-	+

\* Cl<sub>2</sub>Ca a 4 C.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Introducción.

El Acusyst-R constituye una alternativa de escalado al

efecto de reemplazar la producción de AcM en ratones y roller. El sistema consiste en: reservorio de medio, sistema de gaseado para el control de pH, cartucho de fibra hueca y un dispositivo que permite el flujo reverso. El panel de control permite regular: temperatura, flujo de CO<sub>2</sub>, tiempo de ciclaje reverso y velocidad de las bombas (medio, circulación, cosecha y factores).

### Desarrollo

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

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

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

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

b. Ajuste de pH: se realizó 2 veces por día mediante el rotámetro de CO<sub>2</sub> ajustándolo con el objeto de alcanzar pH 7.3.

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

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

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

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

### 2:2.3 Cultivo de hibridoma en saco de diálisis

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

#### Metodología

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

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

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

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

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

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

## Resultados

En la tabla número 2 se muestran los resultados obtenidos al medir el consumo de glucosa para ambos SD.

TABLA # 2

Días en cultivo	Consumo de glucosa (mg/ml)	
	1*	2**
1	0.4	0.39
2	0.82	1.13
3	1.0	0.9
4	0.9	0.77
5	ND	-
6	1.08	-

\* CB-1FNA 2-4  $1.0 \times 10^6$  cels/ml.

\*\*CB-1FNA 2-4  $1.5 \times 10^6$  cels/ml.

ND: no determinado

Los valores de consumo de glucosa tienen vital importancia en el seguimiento de los cultivos, puesto que los otros parámetros estudiados sólo es posible determinarlos una vez finalizada la experiencia.

Con respecto a los resultados obtenidos al determinar el número de células, viabilidad y la concentración de Ig, estos se muestran en la tabla #3:

TABLA # 3

	1*	2*
# de cels x $10^6$	52.5	23.5
viabilidad %	80.3	48.5
[Ig] mg/ml	2.97	2.64

1\* CB-1FNA 2-4  $1.0 \times 10^6$  cels/ml.

2\*\*CB-1fna 2-4  $1.5 \times 10^6$  cels/ml.

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

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

### 3. Purificación de Anticuerpos Monoclonales

#### 3.1 Purificación de anticuerpos monoclonales por Proteína-A Sepharosa

##### Introducción

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

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

##### Metodología

###### (A) Filtración:

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

(B) Precipitación con Sulfato de Amonio:

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

(C) Desalinización:

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

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

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

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

(D) Afinidad:

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

Los anticuerpos fueron eluidos con tampón citrato 0.1M

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

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

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

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

### 3.1 Purificación de anticuerpos monoclonales por intercambio iónico.

#### Introducción

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

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

#### Metodología

##### Anticuerpo Monoclonal

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

##### Tratamiento del líquido ascítico

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

##### Purificación del Anticuerpo Monoclonal

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

##### Ensayos Analíticos

La concentración protéica de las fracciones obtenidas

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

La presencia de AcM específico se determinó por ensayo inmunoenzimático (ELISA) en placas de policloruro de vinilo (Dynatech). Estas fueron sensibilizadas durante 20 min a 50 C con 5 ug/ml de pHBsAg en NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 9.6 y lavadas 3 veces con PBS-0.05% Tween20. Las placas, conteniendo 100 ul/pozo de cada una de las fracciones eluidas de la columna de DEAE-Sephacel, fueron incubadas 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Previo lavado de las mismas, en las condiciones ya descritas, se incubaron con inmunoglobulina de conejo anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa por 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos inmunes fueron revelados con 100 ul/pozo de solución sustrato (5 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 mg de o-fenilendiamina y 10 ml de solución tampón citrato 50 mM, pH 5.5). La reacción fue detenida con 50 ul/pozo de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 250 mM y la absorbancia medida a 492 nm (Titertek Multiskan).

### Resultados

A los efectos de obtener una mejor separación entre el AcM y las proteínas contaminantes se procedió a ajustar las condiciones de retención de las distintas proteínas en la columna de DEAE-Sephacel con un gradiente continuo de fuerza iónica creciente. Las figuras 3 y 4 muestran el perfil de elución obtenido mediante un gradiente lineal de 0-200 mM de ClNa y las SDS-PAGE de los picos cromatográficos. El análisis electroforético muestra que en el pico 2 de la cromatografía fue colectada, gran parte de la Ig presente en la muestra sembrada. Por densitometría se demostró que sólo el 62% de la Ig total colectada eluye en dicha fracción. En la figura 5 se observa que el 87% de la proteína presente en dicho pico corresponde a Ig, la cual posee el 72% de la actividad específica recuperada.

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

eluyen con una fuerza iónica mayor de 60 mM ClNa, se decidió optimizar este método de purificación incrementando la fuerza iónica inicial. La figura muestra el perfil de elución obtenido con un gradiente lineal de 60-200 mM ClNa. Se observa que, a diferencia de la experiencia anterior, en las condiciones de equilibrio eluyen dos fracciones protéicas. Mediante SDS-PAGE (figura 7) demostramos que la primera de ellas corresponde homogéneamente a transferrina (carril 1), y la segunda a Ig (carril 2). Al aumentar el gradiente salino eluye una tercera fracción, que demostró en la electroforesis corresponder a Ig (carril 3). Si bien en la figura 8 se observa que estas dos últimas fracciones poseen Ig, con actividad específica, la densitometría mostró que la fracción 3 concentra el 82% del total de la Ig eluida, con un 85% de pureza. Es interesante hacer notar que la Ig colectada en la fracción 4 carece de actividad específica.

A los efectos de extender estos resultados de laboratorio a un subsiguiente proceso de escalado se encaró la purificación del AcM mediante la aplicación de un gradiente discontinuo de ClNa en las columnas utilizadas en los experimentos anteriores. El perfil de elución obtenido se muestra en la figura 9. Las tres fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis observándose que la Ig eluye en las fracciones 2 y 3. Del análisis posterior por densitometría se demostró que estas contienen el 50% y el 46%, respectivamente, del total de Ig eluida. Aún cuando ambas fracciones presentaron actividad específica similar (figura 10), con la fracción 3 eluyen proteínas contaminantes.

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

## CONCLUSIONES

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

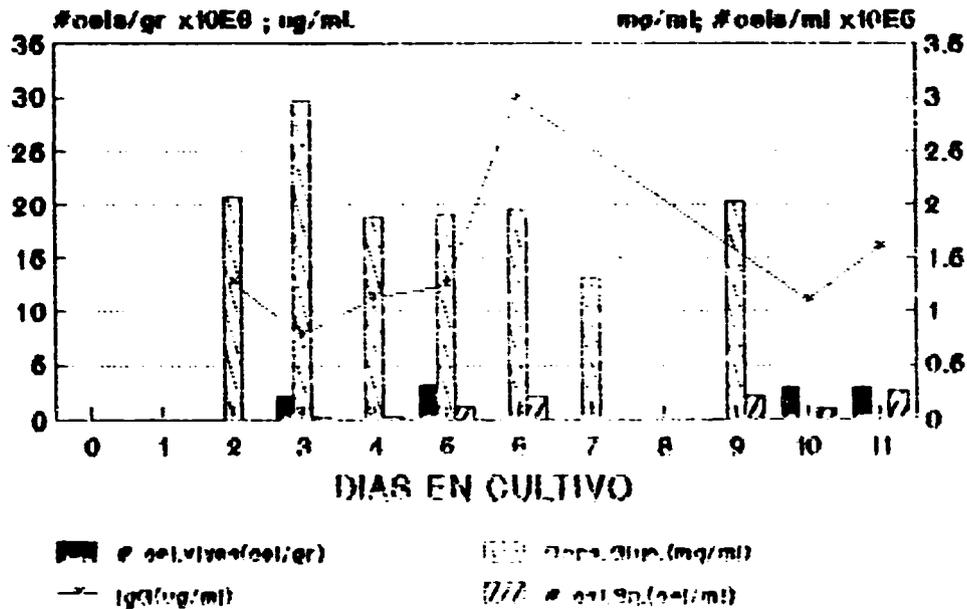
Con respecto al trabajo experimental, hemos adquirido la capacitación necesaria en la producción masiva de AcM, especialmente en lo que a cultivo de híbridomas en perlas de alginato de Calcio se refiere. También hemos realizado el montaje de una técnica alternativa como es el cultivo de híbridomas en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

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

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

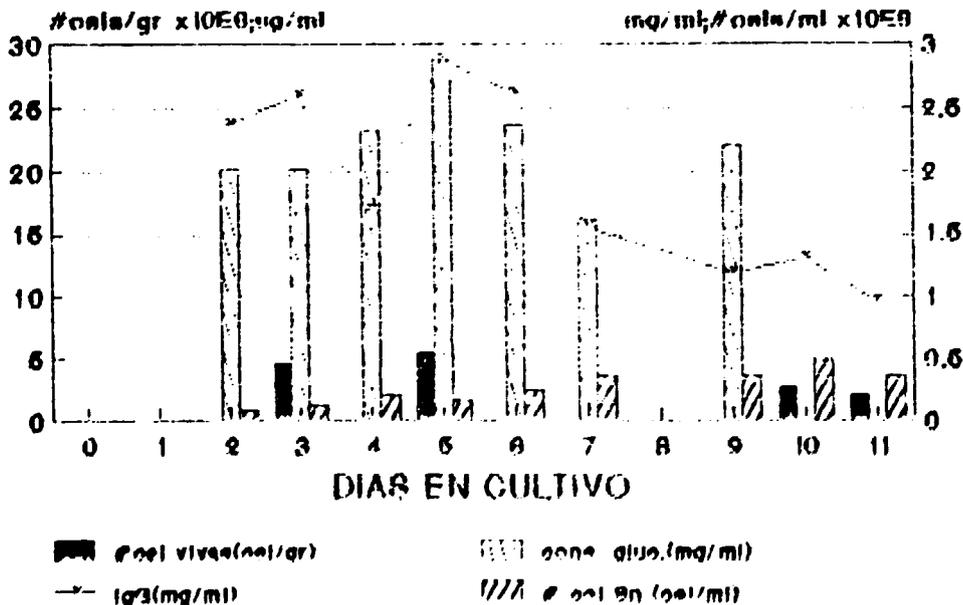
No podemos finalizar este informe sin dejar de expresar nuestro agradecimiento a todos los miembros de la Agrupación de Híbridomas y Modelos Animales.

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



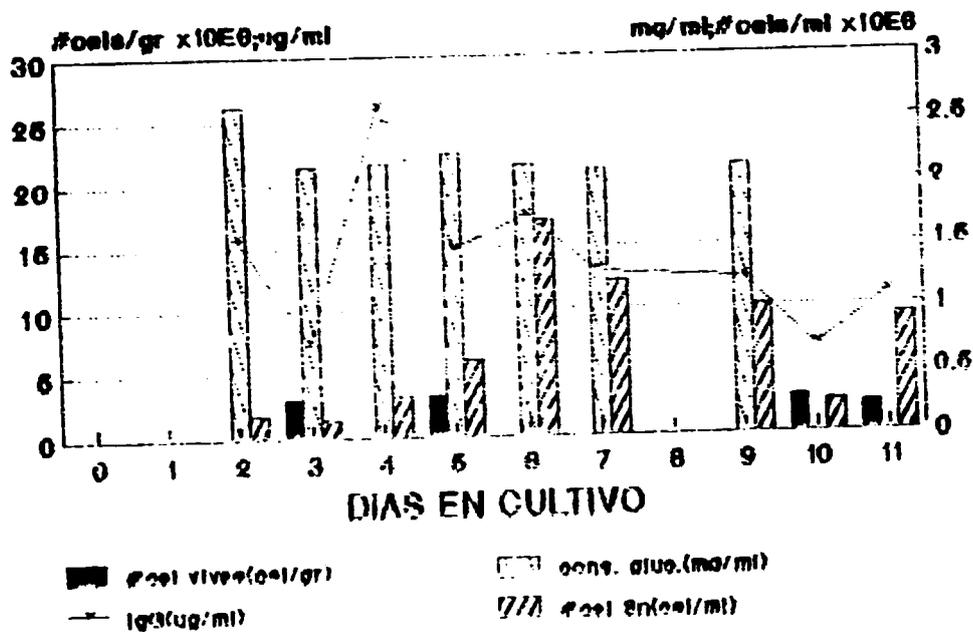
HIBRIDOMA OB-HEP1

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



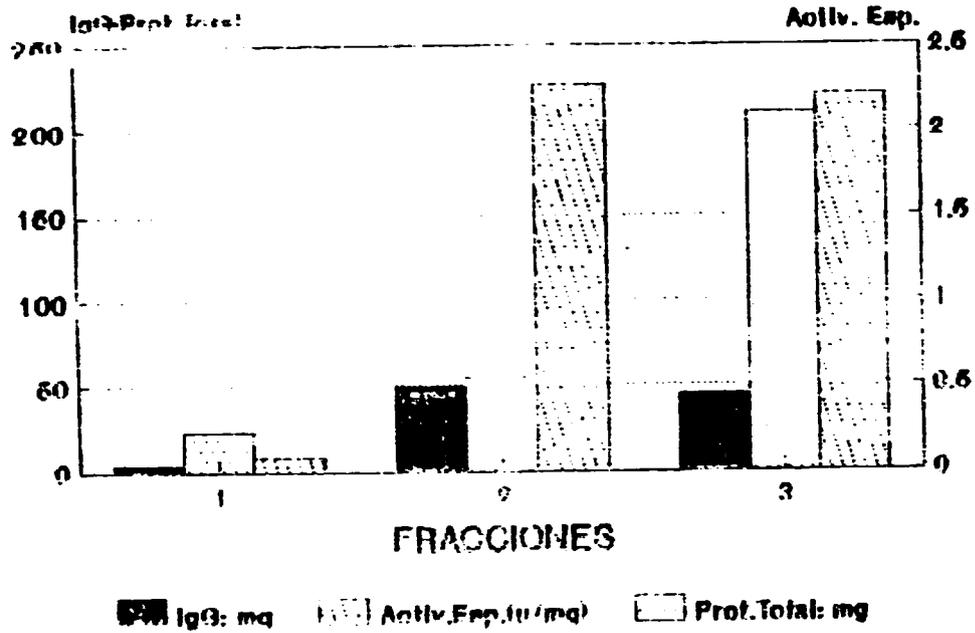
HIBRIDOMA OB-HEP1

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



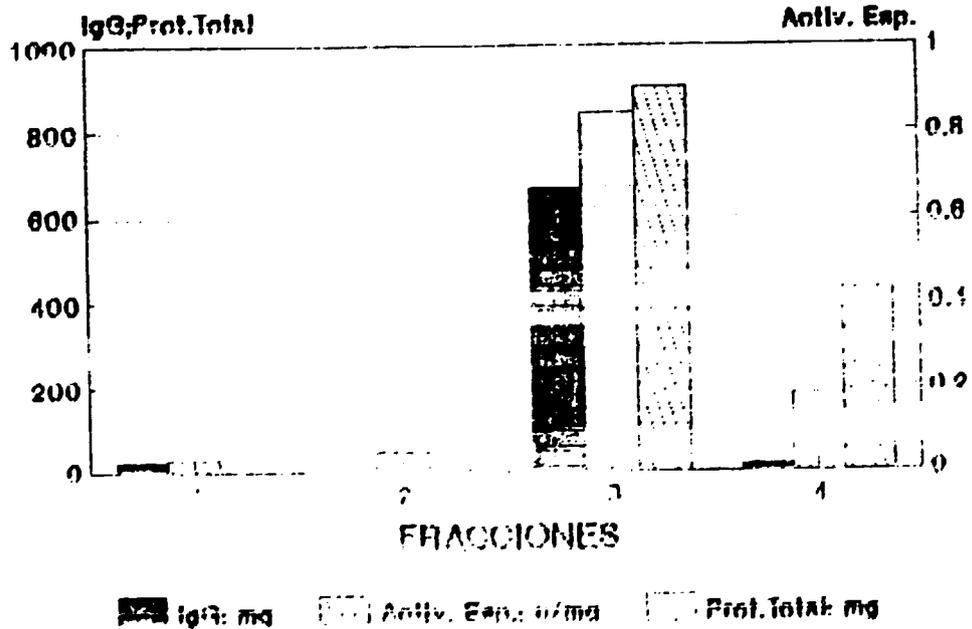
HIBRIDOMA OB-HEP1

## INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO III



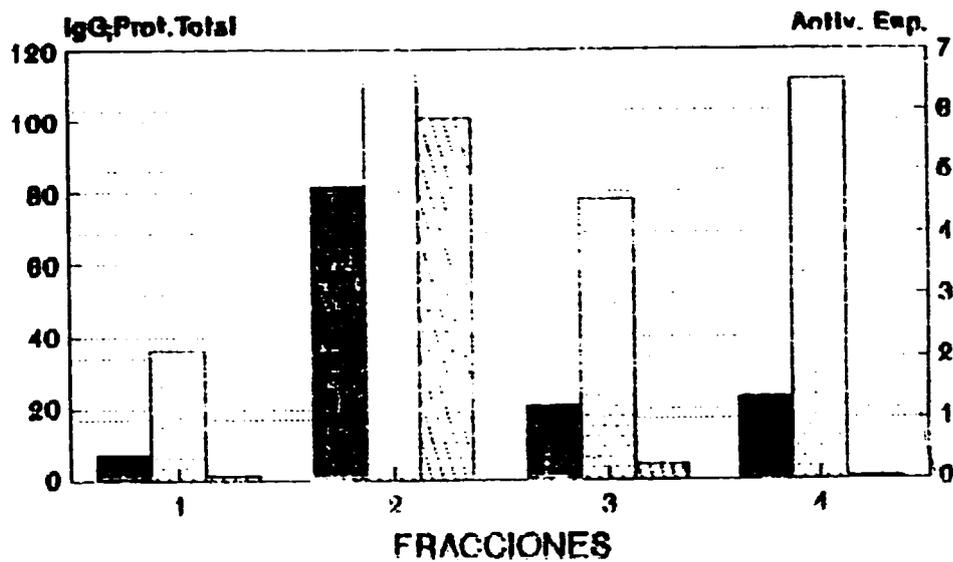
HIBRIDOMA OS-HEP1

## INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO IV



HIBRIDOMA OS-HEP1

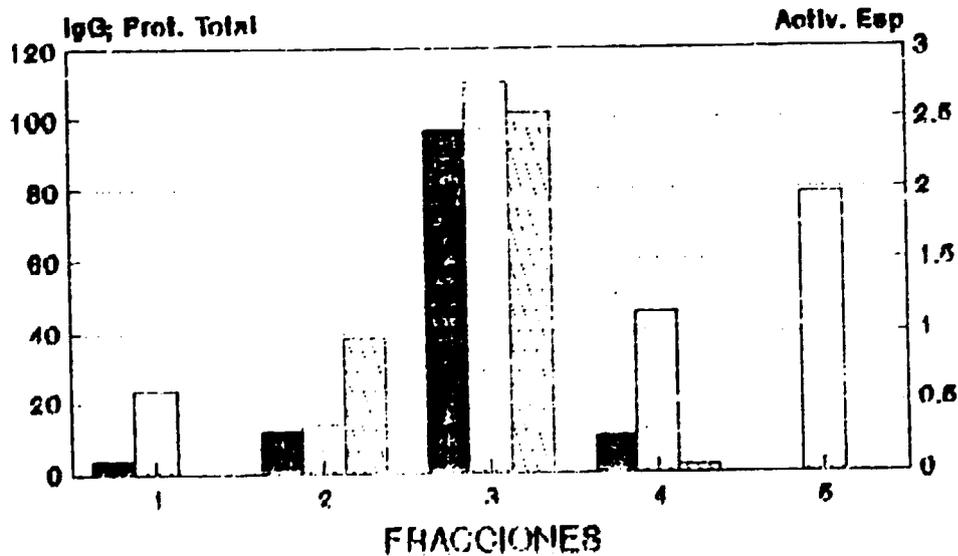
## INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHACEL EXPERIMENTO I



IgG (mg)   
  Activ. Esp. (u/mg)   
  Proteina Total (mg)

HIBRIDOMA OB-HEP1

## INTERCAMBIO IONICO DEAE-SEPHACEL. EXPERIMENTO II



IgG (mg)   
  Activ. Esp. (u/mg)   
  Prot. Total (mg)

HIBRIDOMA OB-HEP1

PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:

"UN ESFUERZO COMPARTIDO EN AMERICA LATINA"

INFORME TECNICO:

"PRODUCCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL OKT3"

Q.F. ADRIANA BAZ (Montevideo, URUGUAY)

Lic. MONIKA MERINO (Guayaquil, ECUADOR)

## INTRODUCCION

El hibridoma utilizado en este entrenamiento fue OKT3 (ATCC), siendo las actividades desarrolladas las siguientes:

- A) Cultivo del hibridoma (estacionario y en suspensión) (2,3)
- B) Estudio de parámetros metabólicos del hibridoma en cultivo estacionario (3)
- C) Producción del anticuerpo monoclonal OKT3 en biorreactor de fibra hueca (3,4)
- D) Purificación y Control del monoclonal obtenido (3,4)

Los números entre paréntesis indican el mes en el cual se llevó a cabo cada etapa. El plan de trabajo tuvo una duración de tres meses a partir del 31/1/91.

## A) CULTIVO DEL HIBRIDOMA OKT3

## I- Estacionario

El hibridoma OKT3 fue cultivado en Cátedra de Inmunología (Facultad de Química, Montevideo, Uruguay) en IMDM (Sigma, USA) + 20 % suero fetal (Bioser, Argentina) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, en cultivo estacionario, a partir del cual 20 millones de células viables fueron transportadas a la División Hibridomas y Modelos Animales (CIGB, La Habana, Cuba).

Debido a que el medio seleccionado para la realización del trabajo fue DMEM (Gibco) se procedió a la adaptación del hibridoma al mismo. El proceso de adaptación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente esquema:

Se sembraron dos frascos de cultivo con una concentración de células de 200.000 células/ml (C/ml), manteniéndose la concentración en este valor durante 9 días. En el día 9 se determinó % de viabilidad en ambos frascos, por exclusión con trypan blue.

Frasco	Tiempo (días)				
	1	3	5	7	9
1	A 90%	A 80%	A 50%	A 30	--
	B 10%	B 20%	B 50%	B 70%	B 100%
2	A 90%	A 80%	A 50%	A 30 %	--
	C 10%	C 20%	C 50%	C 30%	C 100%

A: IMDM + 20 % Suero fetal (medio original)  
 B: DMEM + 20 % Suero de ternera (ST) (Cubavet)  
 C: DMEM + 20 % Suero de ternera + 3 % HECS (CIB)

El % de viabilidad en ambos frascos fue superior a 90 %, por lo que se consideró que la adaptación de la línea había sido satisfactoria y que podía prescindirse de la adición de HECS al medio de cultivo. Posteriormente se redujo en forma gradual el % de ST.

Las condiciones de cultivo para el desarrollo de todo el plan de trabajo descrito en Introducción (salvo que se especifiquen otras condiciones) fueron las siguientes:

DMEM + 10 % ST + penicilina (100 UI/ml) + estreptomycin (50 µg/ml) + glutamina (2 mM) + piruvato (1 mM), 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>.

A partir de células provenientes de cultivo estacionario se procedió a:

i- formación de un banco celular a - 70°C.

Con el fin de tener una reserva de la línea se congelaron células provenientes de cultivo estacionario y cuya viabilidad no fuera inferior a 85 %. Luego de centrifugar las células a 900 rpm, durante 10 minutos, el pellet se suspendió en DMEM + 20 % ST + 9 % DMSO (Fluka), a una concentración de 3-10 millones C/ml. Se congeló a - 70°C.

ii- inoculación en ratones Balb/c

Con el objetivo de eliminar una posible contaminación con Mycoplasma y determinar el rendimiento de producción de anticuerpo monoclonal en ascitis se inoculó el hibridoma en ratones Balb/c de acuerdo a los siguientes protocolos:

P I:

- Día 0- sensibilización intraperitoneal de 10 ratones Balb/c (♂) de 9-10 semanas de edad y 24 g de peso, con 0.5 ml de aceite mineral.
- Día 6- inoculación intraperitoneal con 3 millones de células/animal en DMEM + penicilina + estreptomycin (SL).
- Día 12- no se observó producción de ascitis en ningún animal.

P II:

- Día 0- sensibilización intraperitoneal, de 10 ratones Balb/c (♂) de 9-10 semanas de edad y 24 g de peso, con 0.5 ml de aceite mineral.
- Día 10- inoculación intraperitoneal de 5 animales con 4 millones de células/animal en SL y 5 animales con 5 millones de células/animal en SL.
- Día 15- no se observó producción de ascitis en ningún animal.

P III:

- Día 0- sensibilización intraperitoneal, de 10 ratones Balb/c (♂) de 9-10 semanas de edad y aproximadamente 24 g de peso con 0.5 ml de aceite mineral.
- Día 10- inoculación intraperitoneal con 10 millones de células/animal, en SL.
- Día 15- no se observó producción de ascitis en ningún animal.

iii- test de presencia de Mycoplasma

Para la detección de presencia de Mycoplasma se partió de células previamente cultivadas en medio sin antibiótico durante 3

días. El análisis fue realizado por personal del Centro de Salud Animal (CENSA) mediante proceso de hibridación con sondas (1) comprobándose ausencia de Mycoplasma en la línea celular OKT3.

## II- Cultivo en suspensión

Se estudió el comportamiento del híbrido en cultivo en suspensión y encapsulado en alginato como posibles sistemas para la preparación del inóculo para el biorreactor.

Primeramente se realizó un cultivo del híbrido en frasco spinner, sembrándose en una concentración inicial de 200.000 C/ml en un volumen de 300 ml de medio de cultivo. Cada 48 horas se determinó concentración de inmunoglobulinas (Igs) por ELISA, consumo de glucosa (Test Glucosa HK, Sigma), concentración de células y % de viabilidad, obteniéndose los siguientes resultados:

### -Cultivo en suspensión-

Tiempo (días)	Conc. celular (C/ml)(*)	Viabilidad %	Conc. Igs (µg/ml)	CG (mg/día)
0	0.20	98	--	--
2	0.25	51	25	1.6
4	1.20	53	19	0.7
6	1.10	48	23	0.6

(\*)- expresada en millones/ml.

Posteriormente se cultivó el híbrido encapsulado en alginato. La encapsulación se realizó con alginato 1.6 % (Bellico) a una concentración de 1 millón de C/ml de 1 millón de C/ml.

Las perlas así formadas se suspendieron en 170 ml de medio de cultivo, en spinner de 250 ml. Cada 48 horas se determinó concentración de inmunoglobulinas, consumo de glucosa, concentración de células y % de viabilidad. En este sistema se obtuvo:

### -Cultivo en perlas de alginato-

Tiempo (días)	Conc. celular (C/ml alg.)(*)	Viabilidad %	Conc. Igs (µg/ml)	CG (mg/día)
0	1.2	90	--	--
2	1.3	57	30	1.1
4	2.3	27	35	1.6
6	2.1	25	28	1.6

(\*) expresada en millones/ml

**-ELISA para determinación de concentración de Igs.**

Se sensibilizaron placas de microtitulación (Titertek) con anti-Ig de ratón obtenida en conejo, durante 3 horas a 37°C. Se bloqueó con PBS-leche 2 % por 1 hora a 37°C. Luego de lavar con PBS-Tween 0.05 % (PBS-T), se sembraron 100 µl/pocillo de diluciones de las muestras en PBS-Tween 0.05 %-leche 2 % (PBS-T-L), incubándose por 3 horas a 37°C. Posteriormente se lavó con PBS-T y se agregó 100 µl/pocillo de una dilución adecuada de anti-Ig ratón conjugadas a peroxidasa, en PBS-T-L. Luego de incubar con el conjugado por 1 hora a 37°C, se agregó 100 µl/pocillo de sustrato para peroxidasa (OPD) y se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Se leyó la densidad óptica a 492 nm en un lector de ELISA (Titertek Multiskan). La concentración de Igs en las muestras se expresaron referidas a una solución de IgG de ratón de concentración conocida tomada como estándar.

**B) ESTUDIO DE LOS PARAMETROS METABOLICOS DEL HIBRIDOMA EN CULTIVO ESTACIONARIO**

Debido a que las características metabólicas de la línea en las fases de crecimiento y producción deben determinarse para permitir un mejor control del proceso de producción en biorreactor (2), se siguió el esquema:

se sembraron 16 frascos de cultivo con una concentración inicial de 100000 C/ml incubándose a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub> durante 8 días. Los parámetros determinados, diariamente y por duplicado, fueron viabilidad, consumo de glucosa, pH y concentración de inmunoglobulinas. Los resultados se muestran en la Figura 1.

**C) PRODUCCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL OKT3 EN BIORREACTOR DE FIBRA HUECA**

**1) Descripción breve del equipo:**

Se utilizó un biorreactor Acusyst-R (Endotronics), el cual consta de un cartucho de fibras huecas que definen dos compartimentos, el espacio intracapilar (EIC) y el extracapilar (EEC). Las células crecen en EEC y en este queda retenido el anticuerpo monoclonal que secretan ya que las fibras tienen un cut-off de 10.000 D. Se produce de esta forma un libre pasaje de metabolitos y nutrientes entre un espacio y otro exceptuando aquellas moléculas de peso molecular mayor de 10.000. El equipo posee, además, un reservorio de medio conectado, por un lado a la

bomba de medio (BM) , la cual controla la entrada de medio fresco al EIC y salida de medio circulante (metabolitos), y por otro lado a la bomba de circulación (BC) que controla el suministro de oxígeno al cultivo. El cambio en el sentido de circulación de medio por el EIC es otro parámetro posible de ser controlado seleccionando el tiempo de ciclaje (CT) en el sistema. Al reservorio se inyecta aire mezclado con CO<sub>2</sub>, el % de este en la mezcla puede controlarse con el nivel del rotámetro del equipo. Este % es utilizado para mantener el pH del cultivo en el valor deseado.

El cartucho está conectado también a la bomba de factor (BF) que controla simultáneamente la entrada de medio al EEC así como la velocidad de salida de la cosecha.

En resumen, seleccionando las velocidades de circulación por las tres bombas se controla, suministro de nutrientes y oxígeno, salida de metabolitos y cosecha de anticuerpo secretado.

Existen salidas de donde pueden extraerse muestras del medio IC y EC. El muestreo de IC se utiliza para determinar los niveles de glucosa y el pH en el medio circulante (debe realizarse diariamente), mientras que las muestras del EC permiten estimar el estado de las células en el cartucho (viabilidad, células en división, etc).

NOTA: en este proceso con el fin de asegurar al máximo la esterilidad del sistema se intercalaron filtros de fibra hueca de 0.22  $\mu$  (Media-Kap), entre los frascos de alimentación de IC y EC y el biorreactor. Además todas las operaciones de cambio de medios y extracciones de muestras se realizaron en flujo laminar.

## II) Operaciones previa inoculación y durante el proceso de producción

- 1- Cultivo de las células en medio sin antibiótico 24 horas antes de su inoculación.
- 2- Lavado del espacio IC con la finalidad de eliminar el glicerol que cubre las fibras el cual es citotóxico.
- 3- Tratamiento del EC con medio suplementado con suero, este proceso prepara el sistema para la inoculación proporcionando a las células los factores de adhesión presentes en el suero.
- 4- Test de citotoxicidad: permite determinar si el medio circulante en el sistema tiene alguna acción citotóxica. Se extraieron 10 ml de medio del espacio IC en los cuales se sembraron 2 millones de células. Se realizó, en paralelo un control con medio del mismo lote. Los cultivos se observaron cada 24 horas para la detección de alguna actividad

citotóxica, durante 72 horas.

Test de esterilidad: este ensayo permite determinar si se ha contaminado el sistema en las operaciones previas a la inoculación. Se llevó a cabo simultáneamente al anterior. Se extrajeron 10 ml de medio del espacio IC y se incubaron a 37°C por 72 horas. Se realizó, en paralelo un control con medio del mismo lote. La presencia de contaminación se analizó por observación microscópica.

#### 5- "Set-up" del equipo.

Las condiciones iniciales del equipo fueron:

BM	20 ml/h
BC	100 ml/min
BF	3 ml/h
T	37 °C
Cirolaje	0 min

Con estos parámetros fijos se ajustó el rotámetro a un nivel tal que el pH inicial fuera estable y de 7.3. Luego de estabilizado y previo a la inoculación se fijó la BF en 0.

#### 6- Preparación del inóculo

Durante los días previos a la inoculación se siguió un estricto control del cultivo estacionario, determinándose diariamente concentración celular y viabilidad en cada frasco de cultivo. El valor de concentración celular se mantuvo mediante expansión del cultivo entre 200.000-300.000 C/ml, ya que en este rango las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial.

Un día antes de la inoculación las células se cultivaron en medio sin antibiótico, y por % viabilidad se seleccionaron 14 frascos de cultivo que contenían 30-40 millones de células/frasco y viabilidad de 85-99 %.

Antes de la inoculación y luego del setup del equipo las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. El pellet se resuspendió en 100 ml de medio EC determinándose número de células y viabilidad. Se volvió a centrifugar a 1000 rpm durante 10 min y el pellet se resuspendió en 35 ml de medio EC.

El inóculo obtenido consistió en 500 millones de células y 94 % de viabilidad.

#### 7- Inoculación

Con la BF en 0, se cerró la conexión entre el biorreactor y la línea de cosecha. La suspensión celular (35 ml) se transfirió a una jeringa de 50 ml y se inoculó al espacio EC, seguido de la inyección de 10 ml de medio EC. El proceso de inoculación se realizó en 15 min. El pH se controló 2 h post-inoculación siendo de 7.3.

- 5- Extracción diaria de muestras de IC, determinación del consumo de glucosa y medida de pH.
- 6- Extracción periódica de muestras de EC en función de los parámetros anteriores, crecimiento celular, concentración de inmunoglobulinas (Igs) en las cosechas, etc.
- 7- Cambio de frascos de alimentación y deshecho de medio IC y de alimentación de EC y cosecha, según indican las Tablas 2 y 3 respectivamente.
- 8- Tratamiento de las cosechas: Se centrifugaron a 3000 rpm, por 10 minutos, el pellet se resuspendió en medio de cultivo y observó microscópicamente para determinar viabilidad celular, presencia de células en división, contaminación, etc. Las cosechas se conservaron a - 20°C hasta su purificación, en todas se determinó concentración de inmunoglobulinas murinas (ELISA).

### III) Medios de cultivo utilizados:

Medio IC: DMEM + glutamina (2 mM)/piruvato (1 mM) + penicilina (100 UI/ml)/estreptomicina (50 µg/ml)

Medio EC: DMEM + 10 % ST + glutamina (2 mM)/piruvato (1 mM) + penicilina (100 UI/ml)/estreptomicina (50 µg/ml).

En la Tabla 3 se especifican otros componentes que se adicionaron a estos medios y en qué momento del proceso.

### IV) Esquema seguido para inoculación:

- Día - 2: ensamblado del biorreactor, esterilización e instalación. Lavado del espacio IC durante 24 horas.
- Día - 1: tratamiento del espacio EC con suero. Muestreo para test de citotoxicidad y esterilidad. Cultivo de las células en ausencia de antibiótico.
- Día, 0: inoculación, selección de nivel de rotámetro hasta estabilización del pH en 7.3.

TIEMPO (días)	PROCESO	PARAMETROS BIORREACTOR			
		BM (ml/h)	BC (ml/min)	BF (ml/h)	pH
- 2	ensamblado esterilización lavado IC	400	500	50	--
- 1	tratamiento EC test citotoxicidad esterilidad	20	100	50	7.3
- 0	inoculación				

#### V) CONTROL DEL PROCESO Y RESULTADOS

El proceso se controló mediante la extracción diaria de muestras del espacio intracápsular para determinación de consumo de glucosa y pH. Cada 48-72 horas se extrajeron muestras del espacio extracápsular.

Al día 5 post-inoculación se comenzó la circulación de factor por el espacio extracápsular y por lo tanto la cosecha.

En la Tabla 1 se muestra la estrategia de control y los parámetros determinados a lo largo de todo el proceso de producción en el biorreactor.

La Tabla 2 detalla el tiempo de recolección de las cosechas, el volumen y concentración de inmunoglobulinas de las mismas.

La Tabla 3 resume las operaciones y observaciones realizadas durante el proceso.

La observación periódica del cartucho y la toma de muestras del espacio extracápsular permitieron estimar, junto con los parámetros medidos la evolución del cultivo. Durante los primeros 5 días se pudo visualizar una considerable velocidad en el crecimiento del hibridoma. El día 3 post-inoculación se efectuó una extracción de muestra del espacio extracápsular, observándose gran número de células de aspecto viable así como también numerosas células en proceso de división.

A partir del día 7 se observó una detención en el crecimiento celular. La extracción EEC realizada en el día 9 no mostraba una cantidad significativa de células viables.

El día 12 se adicionó HECS al medio extracápsular, y se detectó una posible contaminación en el EEC, y por lo tanto se realizaron extracciones del espacio extracápsular cada 48-72 horas.

Se confirmó contaminación bacteriana el día 19 en el EC, aumentándose al doble la concentración de Pen-Estr. en el medio IC, y adicionándole Kanamicina (100 µg/ml). El tratamiento con Kanamicina se continuó por 72 horas.

La observación de las cosechas tratadas como se describe anteriormente demostró:

La cosecha 2 presentaba mayor cantidad de células muertas que la 1; en cambio en la cosecha 4 se volvió a encontrar un alto número de células de aspecto viable.

La cosecha No. 11 fue la primera con una turbidez considerable, el pellet obtenido luego de su tratamiento se resuspendió en medio de cultivo y se incubó a 37°C por 24 horas. Pudo comprobarse una contaminación por bacterias en esta cosecha.

Las cosechas siguientes presentaban todas una ligera turbidez. En el pellet obtenido a partir de la cosecha 15 se observó gran cantidad de células no viables y bacterias.

TABLA 1:

TIEMPO (días)	BM (ml/hr)	BF (ml/hr)	BC (ml/min)	TC (min)	pH	R	CG (mg/hr)
0	20	0	100	0	7.3	28	35
1	20	0	100	0	7.4	28	61
2	20	0	100	0	7.5	20	40
3	20	0	100	0	7.5	18	46
4	30	0	100	0	7.5	19	83
5	30	1	100	0	7.4	19	72
6	30	1	100	0	7.5	19	67
7	150	3	200	720	7.5	19	72
8	200	2	400	720	7.5	23	64
9	200	2	300	720	7.4	28	70
10	200	2	300	300	7.5	28	60
11	200	2	300	300	7.3	28	250
12	200	4	400	300	7.3	28	108
13	200	4	400	150	7.4	28	116
14	250	4	400	150	7.4	28	99
15	250	4	400	100	7.4	28	64
16	250	4	400	100	7.5	28	136
17	300	4	400	60	7.3	28	87
18	300	4	400	60	7.4	28	106
19	300	6	400	60	7.5	28	119
20	350	6	400	60	7.4	28	182
21	400	6	500	12	7.3	28	240
22	400	6	500	12	7.4	28	260
23	400	6	500	12	7.4	28	320
24	400	6	500	12	7.4	28	600
25	400	6	500	12	---	28	420
26	400	8	500	12	7.3	28	---
27	400	8	500	12	7.3	28	440
28	400	8	500	12	7.3	28	240
29	400	8	500	12	7.3	28	200
30	400	8	500	12	7.4	28	240
31	400	3	500	12	7.2	28	280
32	400	3	500	12	7.3	28	300
33	400	3	500	12	7.3	28	190
34	400	3	500	12	7.3	28	120
35	400	3	500	12	7.3	28	270
36	400	3	500	12	7.3	28	100
37	400	3	500	12	7.3	28	150
38	400	3	500	12	7.3	28	150
39	400	3	500	12	---	28	---
40							

Fin del Proceso

BM: bomba de medio  
 BC: bomba de circulación  
 BF: bomba de factor

CT: tiempo de ciclaje  
 R: nivel de rotámetro  
 CG: consumo de glucosa

TABLA 2T

Tiempo (días)	cosecha No	Volumen (ml)(*)	Concentración Igs (µg/ml)
8	1	100	235
10	2	200	60
12	3	200	100
14	4	200	52
16	5	200	42
19	6	250	73
20	7	100	41
22	8	400	63
24	9	400	120
26	10	400	33
27	11	200	38
28	12	200	--
29	13	200	41
30	14	180	57
33	15	180	100
35	16	200	74
37	17	200	98
39	18	500	45
40	19	150	40

(\*) En algunas cosechas el volumen excede al que debería haberse cosechado de acuerdo a la velocidad en la BF, esto se debió a que se mantuvo parcialmente la misma en valores mayores que los indicados en la Tabla 1 en general luego del cambio de filtros.

COMUNIDAD LINGÜÍSTICA DE LOS PAÍSES DE LA AMÉRICA LATINA

TABLA 3

Tiempo (días)	Operaciones y Observaciones realizadas durante el proceso
6	Taponamiento de filtro de medio EEC.
7	Taponamiento de filtro de medio EIC
12	Adición 3 % HECS a medio EEC.
19	Adición Kanamicina y duplicación [pen-estr] al medio EIC.
20	Idem anterior.
21	Idem anterior.
23	Adición 3 % HECS a medio EEC.
26	Formación cristales en conexión de entrada al EEC del cartucho. Taponamiento de filtro de medio EEC.
30	Adición 3 % HECS a medio EEC.
35	Idem anterior.
38	Formación cristales idem día 26.
40	Desconexión del biorreactor.

## D) PURIFICACION Y CONTROL DEL ANTICUERPO MONOCLONAL OBTENIDO

### I) Técnicas usadas en el control del anticuerpo OKT3:

- \* Determinación de concentración de proteínas totales por Lowry (3).
- \* Determinación de concentración de Igs murinas por ELISA.
- \* Determinación del nivel de pureza por SDS-PAGE (4) y densitometría.
- \* Determinación de especificidad por IFI.
- \* Determinación de presencia de ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa (5).
- \* Determinación de concentración de Proteína A (ELISA).

#### \* IFI

Como células CD3+ se utilizaron ya sea linfocitos humanos periféricos separados de sangre fresca por gradiente de Ficoll (Pharmacia), ya sea líneas celulares T (Molt-4, Jurkat, provenientes del Centro de Investigaciones Biológicas).

La técnica se realizó en microplacas de 96 pocillos. Se incubó por 30 minutos a 4°C, 50 µl/pocillo de las muestras a ensayar con 500.000 células/pocillo. Luego de lavar 3 veces con PBS-BSA 0.1 % se incubó por 30 minutos a 4°C, con 50 µl/pocillo de una dilución adecuada de anti-Ig ratón conjugada a fluoresceína. Se determinó % de células fluorescentes en cada muestra. En cada ensayo se introdujo un control positivo, un control negativo y un blanco.

#### \* Determinación de concentración de Proteína A

Considerando que la Proteína A puede ser un contaminante importante en los eluatos obtenidos luego de la cromatografía se realizó una determinación de la misma por ELISA. Para ello se siguió el mismo esquema que para determinación de Igs murinas con algunas modificaciones. Se sensibilizó con anticuerpos anti-Proteína A obtenidos en carnero, y se reveló con los mismos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina. Se utilizó una solución de Proteína A de concentración conocida como estándar.

### II) Procedimiento

Los anticuerpos monoclonales OKT3 se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo estacionario y de cosechas de biorreactor. Los sobrenadantes se utilizaron para ensayar las

condiciones de purificación y control del monoclonal obtenido.

Para ello se partió de sobrenadante de un cultivo estacionario de 48 horas ( $V = 1000$  ml) el cual se precipitó con sulfato de amonio (50%). Luego de dejar estacionado por 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , el precipitado fue centrifugado a 6500 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Posteriormente se lavó 2 veces con sulfato de amonio 50% y se centrifugó en las mismas condiciones. El precipitado se disolvió en 200 ml de PBS, se centrifugó a 6500 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos y se realizó una gel filtración por Sephadex G-25 (Pharmacia), para eliminar el sulfato de amonio usando Tris 20 mM/ NaCl 150 mM pH 7.5 como tampón de corrida. El eluato se concentró por ultrafiltración hasta un volumen final de 50 ml. Posteriormente, a 20 ml de eluato concentrado se le realizó una cromatografía de afinidad en Proteína A-Sepharose (Pharmacia), adsorbiendo la muestra en tampón glicina 1.5 M/ NaCl 3 M pH 8.6, eluyendo consecutivamente con los siguientes tampones citrato a pH: 6; 5; 4 y 3. Se obtuvieron picos de elución a pH 6, 5 y 3. A cada uno de los eluatos se les determinó concentración Igs, pureza y especificidad.

Los resultados mostraron que la mayor cantidad de Igs se recuperaban en el eluato a pH 5, donde además se encontraba la actividad específica. No se observó bandas de contaminantes importantes en esta fracción.

Consecuentemente el método seleccionado para la purificación del anticuerpo monoclonal a partir de las cosechas de biorreactor siguió el esquema:

A) Cromatografía de Afinidad en Proteína-A(\*)

a- Filtración de cosechas por membrana  $0.22 \mu$ , dilución al medio con tampón glicina 1.5 M/NaCl 3 M, pH 8.6 (tampón 1), o PBS pH 7.4.

b- Lavado de la columna de Proteína-A Sepharose con tampón citrato pH 3.

c- Neutralización de la columna con tampón 1.

d- Aplicación de la muestra (90% de la capacidad de la columna).

e- Lavado de non-bound con tampón 1, o PBS.

f- Elución con tampón citrato pH 6.

g- Elución con tampón citrato pH 5.

h- Retomar en paso b.

(\*) Se utilizó Proteína A producida en Cuba.

Como método de disminuir la adsorción de IgG bovina del ST a la Proteína-A, se usó en las últimas purificaciones PBS pH 7.4 como tampón de acoplamiento (8).

Los eluatos a pH 5 y 6 fueron neutralizados con Tris. Se les controló pureza, [Igs], proteínas totales y especificidad.

## B) Gel Filtración por G-25

Este paso se realizó para cambio de solución tampón en los eluatos obtenidos a pH 5, usando Tris 20 mM/NaCl 150 mM, pH 7 como tampón de corrida.

## C) Concentración

Todos los eluatos obtenidos a pH 5 se concentraron por ultrafiltración y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se filtró por membrana de poro  $0.22\ \mu\text{m}$  y se liofilizó. Parte de este pool (OKT3 PE) se utilizó para las etapas que se describen a continuación.

## D) Intercambio iónico en DEAE-52

Se realizó este intercambio con el fin de eliminar algunas proteínas que se encontraban contaminando el producto final obtenido en C (OKT3 PE). Se siguió el esquema:

- tampón de acoplamiento: Tris 20 mM, pH 8.5
- aplicación de la muestra diluida en tampón de acoplamiento hasta presentar una conductividad similar al tampón de acoplamiento.
- elución con Tris 20 mM/ NaCl 60 mM.
- elución con Tris 20 mM/ NaCl 100 mM.
- elución con Tris 20 mM/ NaCl 500 mM.
- regeneración de la matriz con Tris 20 mM.

A los eluatos se les determinó concentración total de proteínas, [Igs], pureza, presencia de DNA.

## E) Intercambio iónico en DEAE-Sephacel

Se realizó este intercambio con el objetivo de eliminar los contaminantes que no pudieron ser eliminados en el paso anterior.

Se siguió el esquema:

- tampón de acoplamiento: Tris 20 mM, pH 8.5
- aplicación del eluato NaCl 60 mM del paso C, diluido en tampón de acoplamiento hasta presentar una conductividad similar al mismo.
- elución con Tris 20 mM/NaCl 60 mM.
- elución con Tris 20 mM/NaCl 100 mM.
- elución con Tris 20 mM/NaCl 500 mM.
- regeneración de la matriz con Tris 20 mM.

## F) Gel Filtración en Sephacryl-300 (Pharmacia)

Debido a que el % de pureza de la fracción 1 obtenida luego del intercambio iónico con DEAE-52 y del OKT3 PE eran similares se usó parte de este último sin liofilizar para ensayar otro paso de purificación que pudiera eliminar los contaminantes. Para ello se

realizó una gel filtración en Sephacryl-300 usando Tris 20 mM pH 8.5 como tampón de corrida.

### III) RESULTADOS

La Figura 2 muestra el esquema de purificación seguido y en la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en el primer paso (cromatografía de afinidad en proteína A). Como puede observarse algo de anticuerpos detectables por ELISA eran eluidos a pH 6.

Cabe señalar que para las cromatografías hechas con PBS pH 7.4 como tampón de acoplamiento se obtuvo un eluato a pH 6 mucho menor, que para aquellas en las que se usó tampón pH 8.6.

La Figura 5 muestra la densitometría obtenida luego de electroforesis SDS-PAGE para el OKT3 PE previo a su liofilización. Como puede observarse aun se encontraban bandas de contaminantes (albúmina, transferrina, proteína A) que según el densitograma constituían el 33 % de la muestra total. A esta misma muestra se le determinó contenido en Proteína A obteniéndose un valor de 25 ng/ml.

El ensayo de IFI mostró para todos los eluatos obtenidos a pH 5 (en todas las cromatografías realizadas), que en esta fracción se concentraba la mayor especificidad (más de 85 % de las células eran reconocidas por dicha fracción). El patrón de fluorescencia obtenido se caracterizó como puntos en los "bordes" de la célula, distribuidos no uniformemente en todo el perímetro. Este patrón fue similar al obtenido con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 10R-T3 (producido por el INDR).

Los resultados obtenidos luego del intercambio iónico en DEAE-52 se muestran en la Figura 4 y los densitogramas de cada eluato en las Figuras 6, 7, 8 y 9. Puede comprobarse que una cantidad importante de gamaglobulinas "no murinas" (no revelables por ELISA) fueron eluidas con NaCl 100 y 500 mM.

La determinación de presencia de ácido nucleico se realizó a los tres eluatos obtenidos del intercambio iónico, a la cosecha 17 y al OKT3 PE. Los resultados mostraron presencia de ácido nucleico en todas las muestras excepto el eluato de intercambio iónico obtenido con NaCl 60 mM.

El intercambio iónico en DEAE Sephacel no resultó adecuado para separar las proteínas contaminantes.

La gel filtración en Sephacryl-300 permitió eliminar las proteínas contaminantes, obteniendo una única fracción que por electroforesis y posterior densitometría presentó una pureza de

100 % (Figura 10 y 11).

A continuación se resumen los resultados de % pureza obtenidos en cada paso de purificación, para la fracción OKT3 PE, las fracciones obtenidas del intercambio iónico con DEAE-52 y la fracción obtenida en gel filtración con Sephacryl-S-300 high resolution.

Fracción	% (CP+CL)	% C	PT (mg/ml)
OKT3 PE	85	15	8.7
N B	24	76	0.1
F 1	81	19	0.4
F 2	51	49	0.1
F 3	63	37	0.1
Sephacryl	100	0	2.7

CP: Cadena Pesada  
CL: Cadena Liviana

C: Contaminantes  
PT: Proteínas Totales

De la tabla anterior se puede resumir lo siguiente:

- mg anticuerpo obtenido en las cosechas: 290 mg
- mg de anticuerpo OKT3 liofilizado: 297 mg/ pureza 85 %
- mg de anticuerpo luego de gel filtración: 32 mg/pureza 100 %.
- Rendimiento en purificación: aproximadamente 100 %.

## DISCUSION

## I- Partes A, B y C

Considerando el objetivo de esta etapa del Proyecto la inoculación del anticuerpo monoclonal en animales se realizó con el fin de analizar la producción en ascitis y compararla con la del biorreactor. Una vez que el primer protocolo de inoculación no dio resultados positivos se ensayaron consecutivamente los otros dos descritos en la parte experimental. El hecho de haber obtenido un 0% de prendimiento de ascitis, sin observar tampoco el desarrollo de tumor sólido en los animales podría explicarse por una pérdida en la clonalidad en la línea o por el uso de un protocolo de inoculación inadecuado. Ambas hipótesis deberían ser estudiadas, la primera realizando un clonado de la línea determinando si la población aun continúa siendo cerrada y la segunda utilizando otras condiciones en el protocolo de producción de ascitis (Ej: otros irritantes, usar animales suprimidos, etc.).

El cultivo del híbrido en suspensión se caracterizó por una muy baja viabilidad. Como primeramente se realizó un cultivo en frasco spinner y se obtuvo (48 h post-siembra) un descenso significativo en la viabilidad (resultado reproducido en dos experimentos independientes), se supuso que la agitación podría constituir un factor negativo para el cultivo. Por esta razón se procedió a realizar un encapsulamiento de las células en alginato, esperando que el microambiente de las perlas de alginato protegiera a las células de la agitación. Debido a que en este sistema también se produjo un descenso en la viabilidad y que éste podría deberse a alguna acción citotóxica del alginato, no puede asegurarse cuál (o cuáles) pudieron haber sido los factores responsables de la muerte celular. Mediante el agregado de perlas de alginato a un cultivo estático podría comprobarse si éste pudiera ser citotóxico. Los resultados de disminución en la producción de Igs y en el consumo de glucosa para el primer cultivo son concordantes con la progresiva muerte celular. Sin embargo, en el cultivo con alginato este descenso no es marcado, suponiéndose que tanto las Igs producidas como el consumo de glucosa eran mantenidos por las células que escapaban de las perlas que se encontraban diariamente libres en el medio.

Ambos sistemas fueron descartados como forma de preparar el inóculo para el biorreactor, ya que con ninguno de ellos fue posible la obtención del número de células necesarias y con la viabilidad requerida. Por ello se seleccionó el cultivo estacionario para la preparación del inóculo, para el cual se había determinado que las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial y con alta viabilidad, si se mantenían a una concentración entre 200.000-300.000 C/ml.

Los resultados de la curva metabólica muestran que cuando en el medio se alcanza una concentración de glucosa remanente de 1.5

mg/ml y un pH de 6.9, las células se encuentran en fase de producción. Estos valores de pH y glucosa debían ser manejados en el cultivo en biorreactor para seleccionar la fase de producción una vez superada la de crecimiento.

El proceso en biorreactor tuvo como aspecto no esperado el mantenimiento del pH sin necesidad de variar el nivel del rotámetro y un CG que se mantuvo en bajos niveles durante el mismo, aun cuando el sistema se encontraba contaminado.

La detención en el crecimiento observada alrededor del día 7 acompañada de la estabilización en CG, indicaban que una alta proporción de células habían muerto. Los factores que llevaron a esta muerte celular sin duda fueron la baja velocidad de la bomba de circulación (insuficiente suministro de oxígeno) y la baja velocidad de la bomba de medio, ya que, si bien los niveles de glucosa se encontraban por encima de los recomendados, la eliminación de metabolitos pudo no haber sido suficiente. A esto debe sumarse el hecho que los días 6 y 7 se produjo un taponamiento de los filtros de medio EC e IC, respectivamente, dejando al sistema sin circulación de medio por un lapso de varias horas.

No pudo lograrse la recuperación del cultivo en ningún momento a lo largo del proceso, aun cuando al agregar HECS al EC se pudo observar un leve aumento en el CG. Este hecho permitiría suponer que el agregado de HECS desde el comienzo del proceso podría ser beneficioso, aunque no se hallan observado diferencias en el crecimiento con y sin HECS en cultivo estático.

Durante el proceso (día 26 y 38) se observó la oclusión de la conexión de entrada de medio al EEC por la formación de cristales cuyo origen no pudo explicarse y cuya formación no estaba directamente asociada a la adición de HECS al medio EC.

Aunque la contaminación se mantuvo controlada hasta el fin del proceso, probablemente por la adición de Kanamicina y la duplicación de la concentración de penicilina/estreptomicina en el medio IC, pudo tener una acción retardadora en la recuperación de las células. El mantenimiento en el CG y la estabilidad del pH fueron un indicio del control de la contaminación. Estos parámetros también indicaron junto con la disminución en la [Igs] en las cosechas la imposibilidad de recuperación de las células.

Con los resultados obtenidos con este híbrido puede recomendarse que tanto la bomba de medio como la de circulación deben fijarse en valores más altos desde el comienzo del proceso, aun cuando se sobrepase el nivel de glucosa requerido. También sería conveniente realizar un control del nivel de metabolitos (ácido láctico) y del suministro de oxígeno. La circulación de factor antes del día 5 también podría ser beneficiosa para introducir el cultivo en fase de crecimiento.

## II- Parte D

La cromatografía de afinidad en Proteína-A permitió alcanzar un nivel de pureza de solamente 85 % (Figura 5), de todas formas, debe considerarse que aunque en este caso particular el anticuerpo a purificar no constituía la proteína mayoritaria en las cosechas el grado de purificación que se obtuvo fue significativo, por lo que se justificaría incluir este paso como el primero en el esquema de purificación. Este porcentaje podría, no obstante mejorarse con un lavado más prolongado de la columna entre la elución con pH 6 y pH 5. El uso de PBS pH 7.4 también evitaría la unión de la IgG del ST a la Proteína-A, por lo que sería aconsejable, en este caso particular en que el monoclonal de subclase IgG2a, utilizar como tampón de acoplamiento PBS pH 7.4.

El contenido en Proteína-A en la muestra OKT3 luego de la cromatografía será importante en función del uso del anticuerpo, se ha demostrado que la gel filtración permitiría su eliminación lo cual no descarta el posible uso de otros métodos más ventajosos.

Como se ha dicho anteriormente se intentó eliminar los contaminantes con intercambio iónico en DEAE-52. Los resultados que se ven en la Figura 4 muestran que gamaglobulinas no revelables en el ELISA utilizado ("no murinas") eran eliminadas del pool de anticuerpos a purificar, ya que eluían con NaCl 100 y 500 mM. De todas formas puede observarse que aun restaban proteínas contaminantes en el eluato NaCl 60 mM, según muestra el densitograma obtenido de esta fracción. La Figura 7 muestra que no hubo aumento de pureza luego del intercambio en esta matriz. Sin embargo sí puede decirse que ésta funcionaría adecuadamente para eliminar el ADN contaminante, ya que el mismo fue eluido a concentraciones de NaCl mayores de 60 mM.

El intercambio iónico en DEAE-Sephacel no debería incluirse ya que no mejora la pureza del producto final.

En cuanto a la gel filtración en Sephacryl-300, debe observarse que el nivel de pureza alcanzado es satisfactorio. Sin embargo debe tenerse en cuenta que se pierden en este paso aproximadamente 10 % de anticuerpos. La elección de este paso en la purificación dependerá del balance entre pureza que debe presentar el anticuerpo y rendimiento requerido para el proceso.

Es importante hacer notar que si bien la gel filtración podría constituir un método ideal para alcanzar una pureza suficientemente alta, presentaría serios inconvenientes a la hora del escalado en la producción. Dichos problemas no se presentaron

en esta purificación ya que se trabajó con cantidades totales de proteínas del orden de mgs. Cabe notar que la gel filtración realizada a 40 mg de proteínas consumió aproximadamente 18 horas, a este tiempo debe sumarse el tiempo utilizado en la concentración del eluato (factor de dilución de 60) 5 horas. De todas formas y de acuerdo con los resultados la gel filtración debe tenerse como una herramienta posible para alcanzar un elevado grado de pureza al final del proceso de purificación cuando otros métodos no serían útiles.

Debe considerarse que en el cálculo de rendimiento de purificación se comparó cantidad total de proteínas en las cosechas determinadas por ELISA con cantidad total de proteínas en el producto final determinadas por Lowry (corrigiendo por el % de pureza), siendo que ambos métodos de determinación de proteínas no son enteramente comparables, el rendimiento calculado representa solamente un valor aproximado.

De acuerdo a estos resultados el esquema de purificación que puede plantearse para este anticuerpo monoclonal sería:

- a- Cromatografía de Afinidad en Proteína-A  
 Controles: Proteínas totales  
                   Actividad  
                   Igs totales  
                   Pureza  
                   Acidos nucleicos
- b- Intercambio iónico en DEAE-52  
 Controles: idem a
- c- Gel filtración en Sephacryl-300  
 Controles: idem a

Un esquema como este implicaría una pérdida de anticuerpos del 10 %, la mayoría en el paso de gel filtración, por lo que se obtendría un 90 % de rendimiento con 100 % de pureza.

No debe obviarse que estos pasos deberían ser optimizados para este monoclonal con el fin de analizar la posibilidad de eliminar alguno de ellos sin afectar rendimiento y pureza obtenidos.

### CONCLUSIONES

No obstante la imposibilidad de obtener una producción de anticuerpo monoclonal acorde a la escala que permite el cultivo en biorreactor de fibra hueca, este no debe descartarse para tal fin. Debe considerarse que el rápido crecimiento observado durante la primera semana y el aspecto de las células que se extrajeron del EEC, así como la [Igs] de la primera cosecha, estarían sugiriendo que el cultivo en biorreactor constituye un sistema adecuado para la producción masiva del anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma OKT3. Deben, sin embargo, determinarse las condiciones de cultivo para este hibridoma que permitan controlar adecuadamente el proceso y alcanzar la fase de crecimiento para mantener a las células posteriormente en fase de producción.

En cuanto a la purificación pudo establecerse un esquema tentativo de purificación que rendiría un anticuerpo de alta pureza (100 %) y con buen rendimiento (90 %). Debería, sin embargo, realizarse un control más estricto al producto final en función del uso del OKT3, así como también incluir un sistema de cuantificación del mismo (ELISA celular).

Considero particularmente que este entrenamiento ha cumplido los objetivos propuestos permitiéndome la asimilación de los aspectos básicos concernientes a la producción masiva y purificación de anticuerpos monoclonales, contando con el excelente equipamiento y personal capacitado que ofrece el CIGB.

### AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer a todos y cada uno de los compañeros de la División Hibridomas y Modelos Animales ya que han sabido transferirme su experiencia en la producción y purificación de anticuerpos monoclonales y me han brindado constantemente una valiosa crítica objetiva al trabajo desempeñado. Corresponde además que reciban mi más profundo agradecimiento por el excelente ambiente laboral y el apoyo humano que he recibido de cada uno durante este período en el CIGB.

Agradezco también la colaboración del Dr. Araña (CIB), de la Dra. Ma. Elena Faxas (INOR) y del personal del CENSA.

(A): Comparación entre glucosa remanente en el medio: (GR) y producción de inmunoglobulinas (Igs).

(B): Comparación entre pH y producción de Igs.

(C): Comparación entre pH y % de viabilidad (% V).

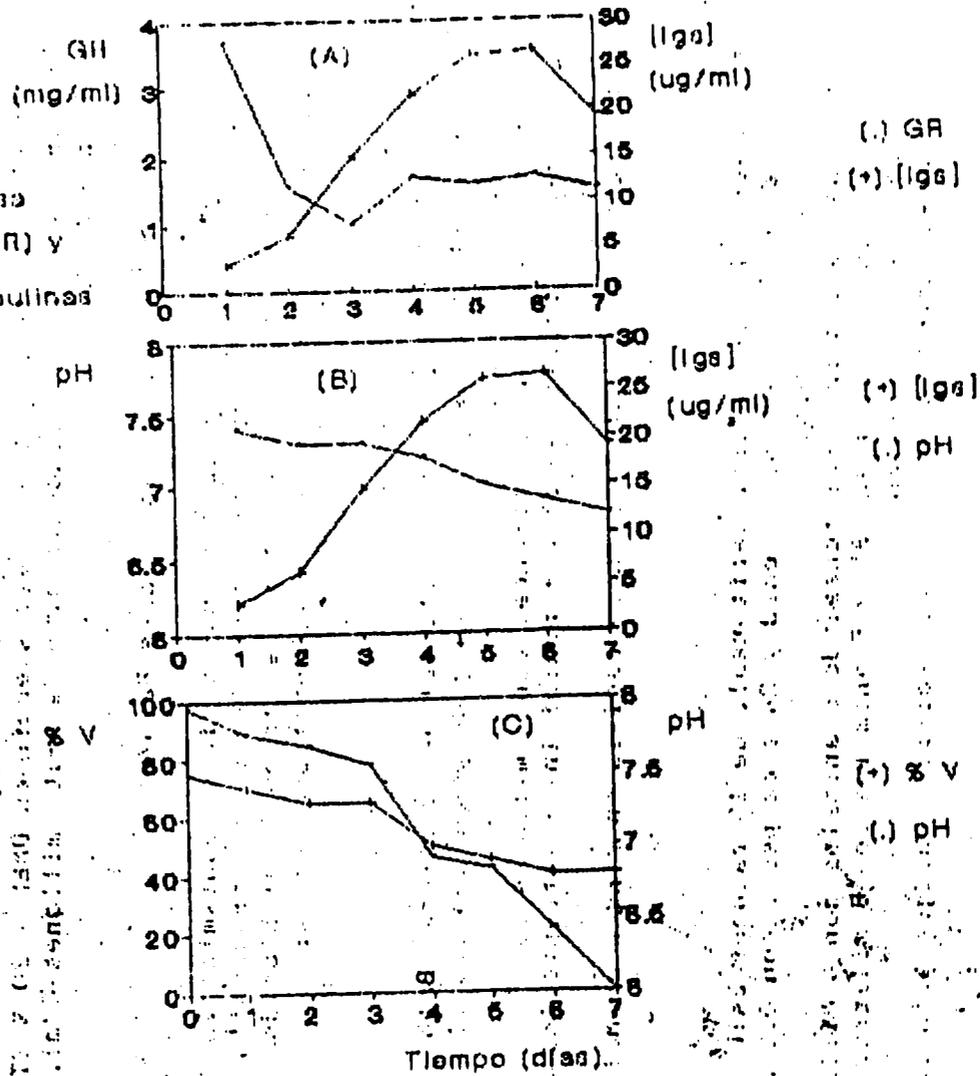


FIGURA 2

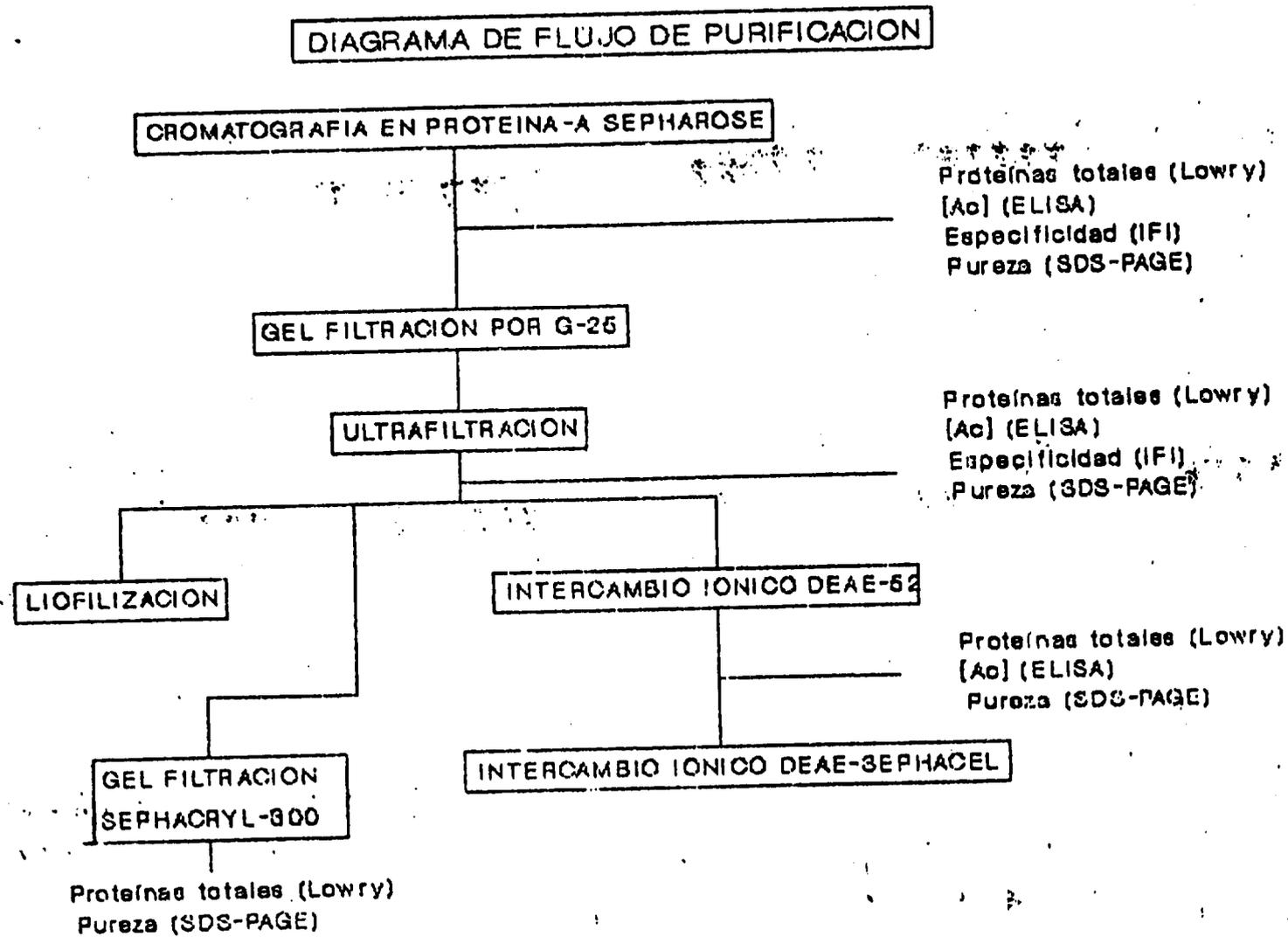
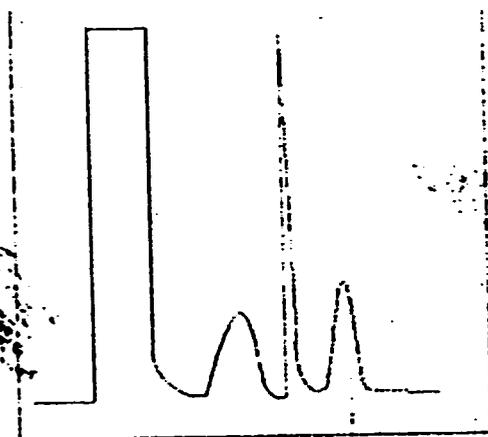


FIGURA 2



F N°	[PT]	[Ac]	Act.
N B	7.2	ND	-
F 1	1.0	150	+++
F 2	1.8	30	+-
F 3	---	---	-

ND- no detectable

FIGURA 3

Cromatografía en Proteína-A Sepharose. La tabla muestra concentración de proteínas totales (PT) en mg/ml, concentración de Igs ([Ac]) en µg/ml y actividad específica, para el non-bound (NB), y las fracciones 1 (F 1), 2 (F 2) y 3 (F 3).



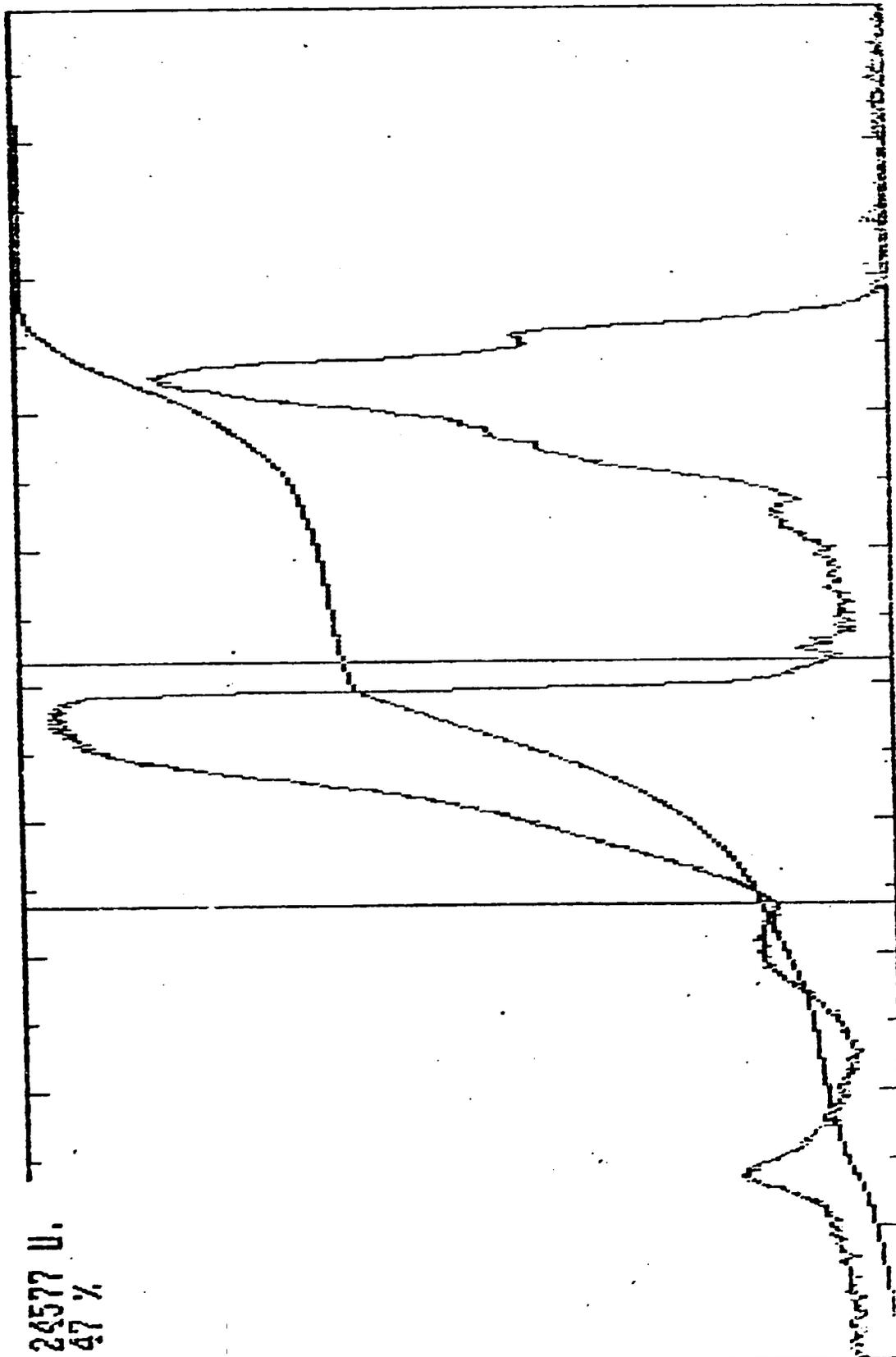
F N°	PT	[Ac]
N B	0.1	ND
F 1	0.4	38
F 2	0.1	ND
F 3	0.1	ND

ND- no detectable

FIGURA 4

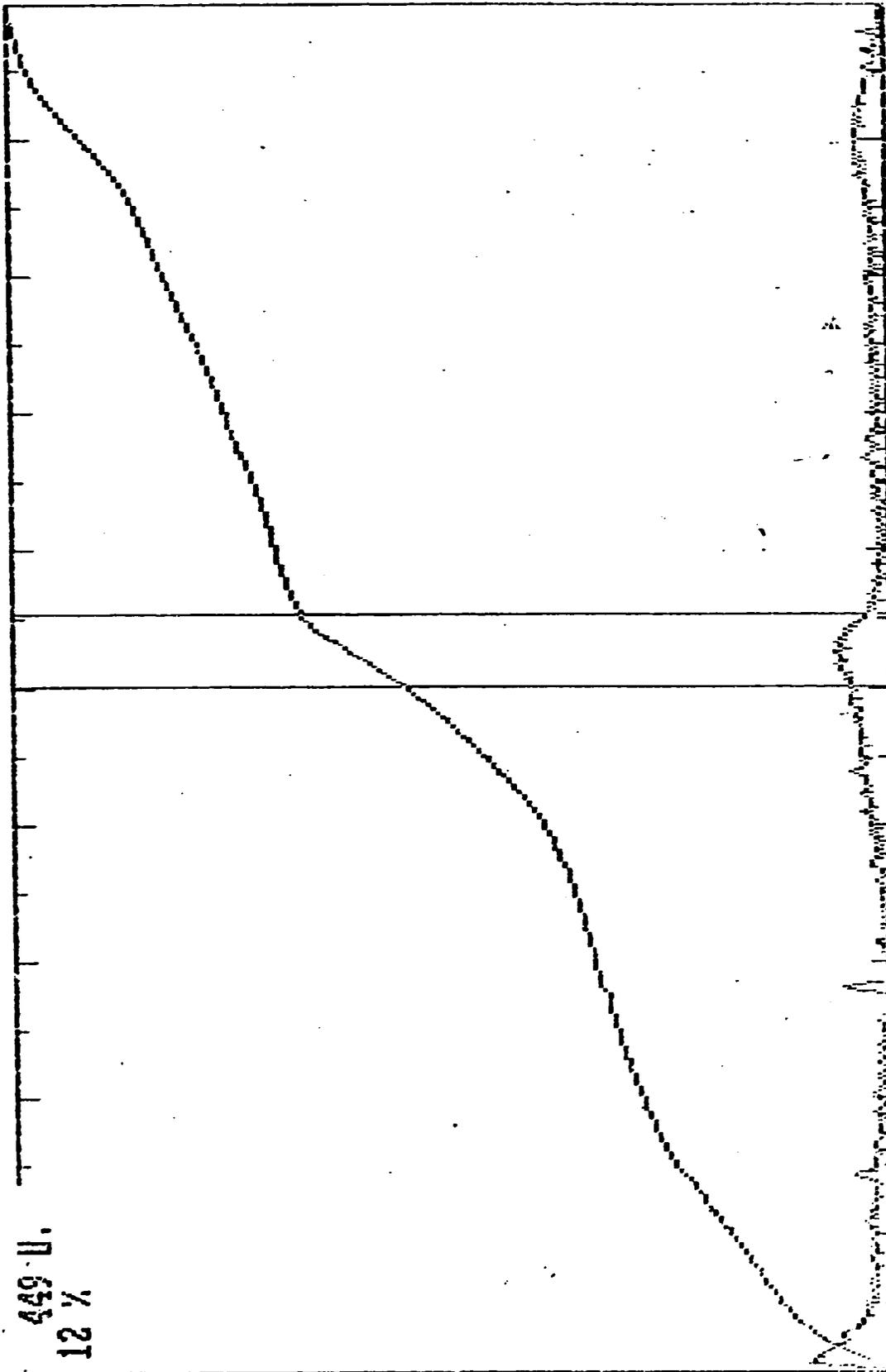
Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-52. Se representa esquemáticamente las fracciones eluidas y el gradiente discontinuo de NaCl realizado 80 , 100 y 500 mM (línea escalonada). La tabla muestra los valores de concentración total de proteínas (PT) en mg/ml y concentración de Igs murinas ([Ac]) en µg/ml, para el non-bound, y las fracciones 1 (F 1), 2 (F 2) y 3 (F 3).

20577 U.  
47 %



NOTES:  
F18: QUIT  
F19: DO  
F18: DIRB  
F7: SQU  
F6: ZUN  
F5: RE  
F4: NW  
F3: IIRIX

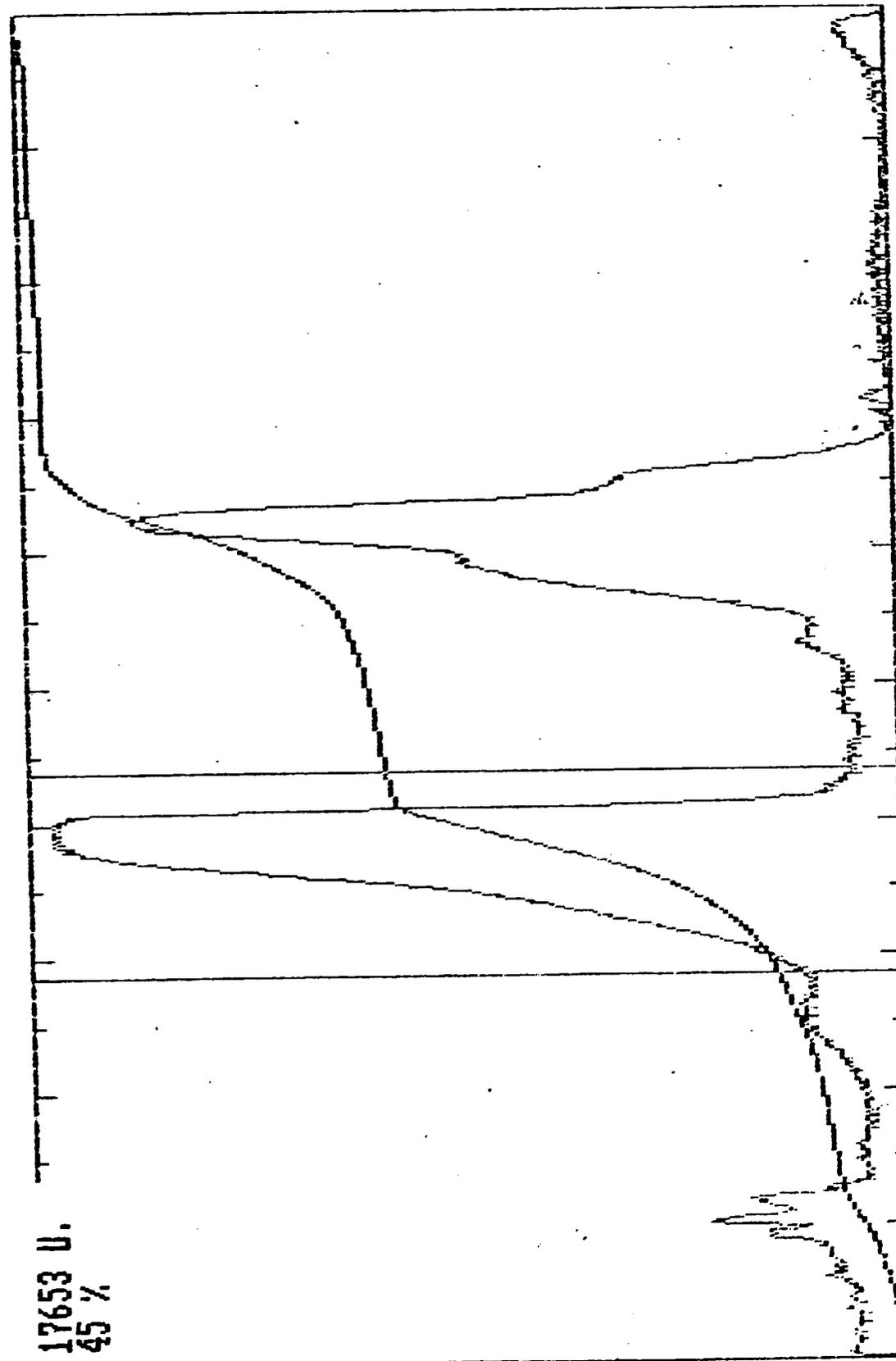
FIGURA 5



NOTE: THIS IS A COPY OF THE ORIGINAL RECORD. THE ORIGINAL RECORD IS IN THE FILE OF THE SUBJECT.

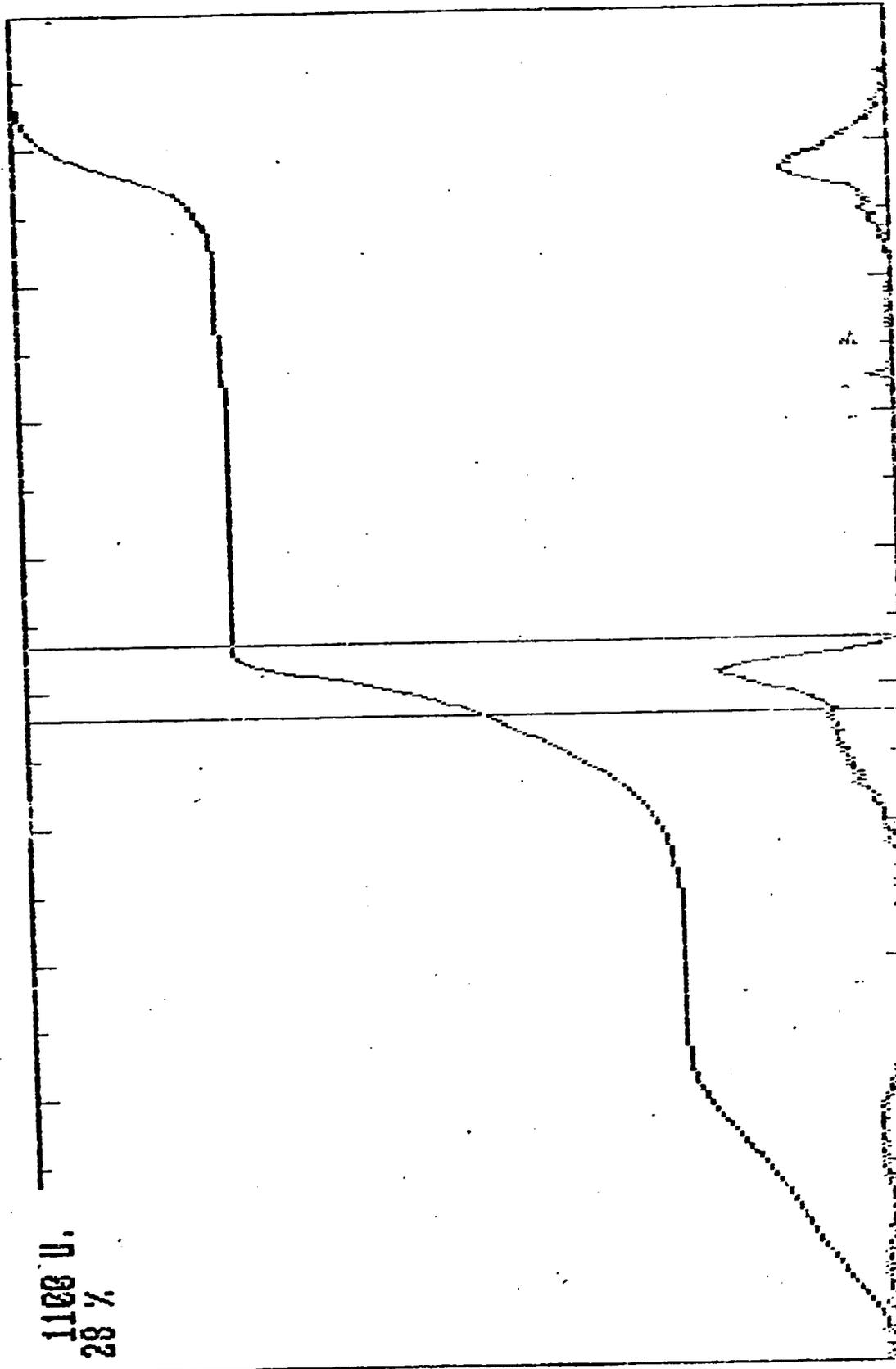
FIGURA 6

17653 U.  
45 %



FILE: 00111001 NOTES:  
INSTR: 12110000 F3:INTX F4:MW F5:RF F6:ZUM F7:SAV F8:DIR F9:DO F10:QUIT

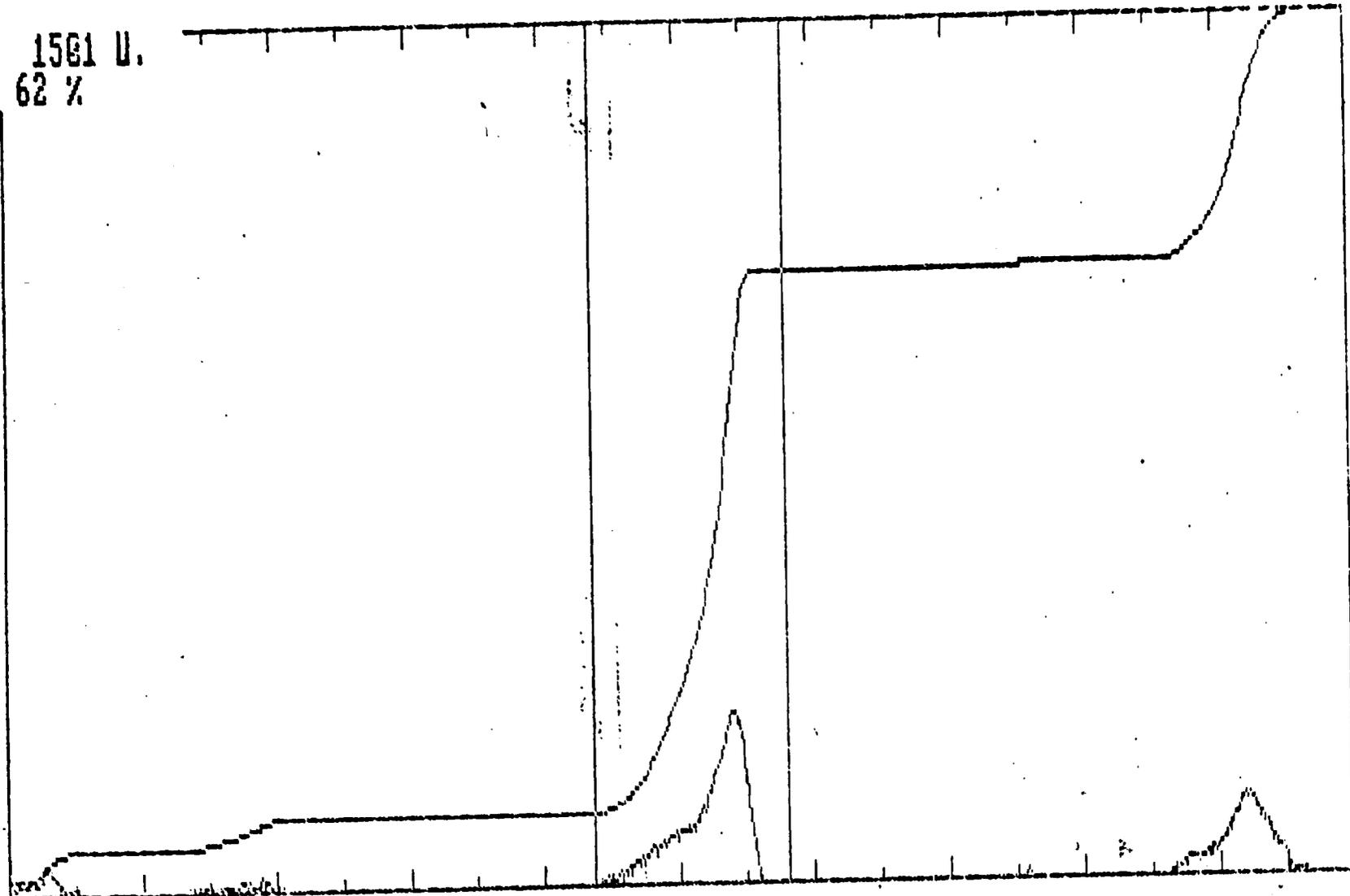
1100 U.  
28 %



NOTE: F3:INTX F4:MW F5:RF F6:ZUM F7:SAV F8:DIRE F9:DO F12:QUIT  
F1:REV F2:REV\*

FIGURA 8

1501 U.  
62 %



ESN= F2ii.ADJ, NOTES:  
F1:NEW F2:REV\* F3:INT\* F4:MW F5:RF F6:ZUK F7:SAU F8:DIRB F9:DO F10:QUIT

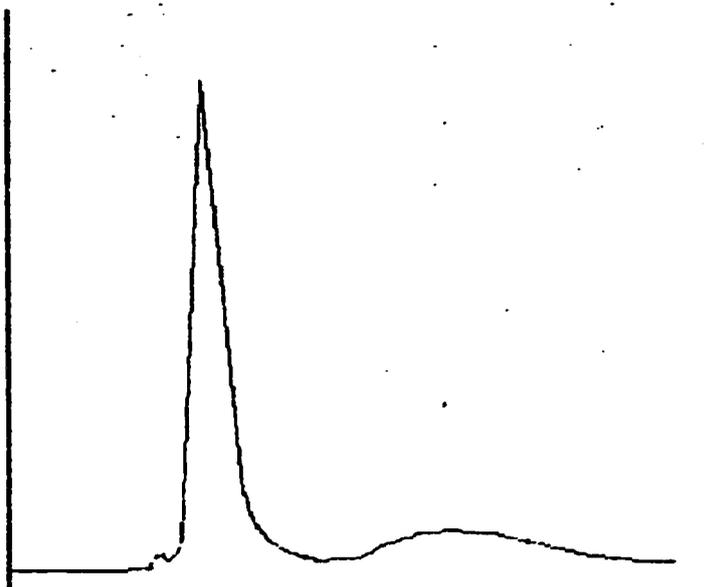
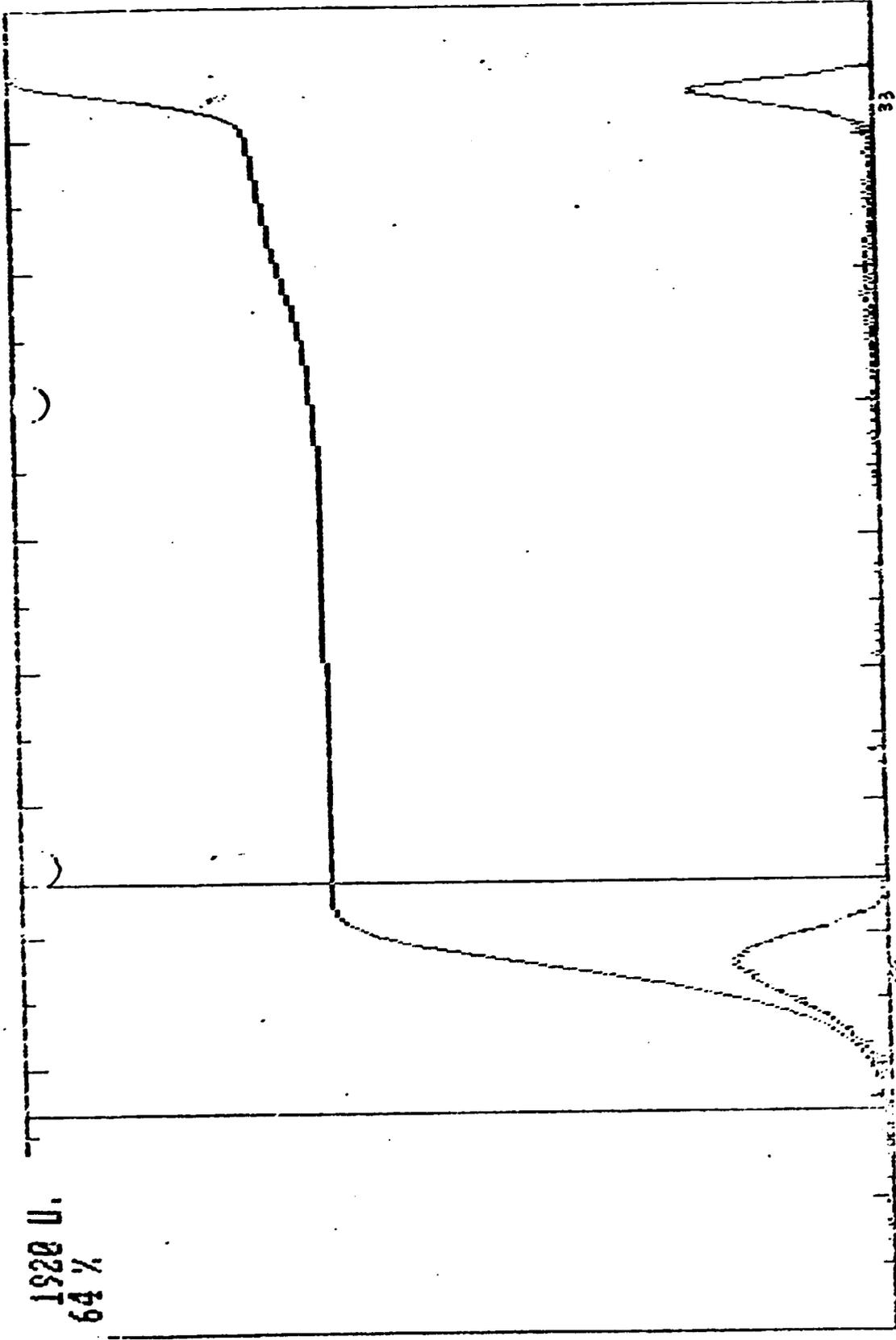


FIGURA 10

Gel filtración en Sephacryl-300.



ESM SEFACTYL. RDD. NOTES:  
 F1:NER F2:REV\* F3:INT\* F4:MR F5:RF F6:ZUM F7:SAU F8:DIRE F9:DO F10:QUIT