

Alignment of the 4.3 cDNA sequence with that of mouse nuclear lamin B² cDNA (Hoger *et al.*, 1990) shows a striking similarity in the coding region (figure 3) and indicates that clone 4.3 is in effect a partial cDNA that lacks the 5' end, since it initiates at the position corresponding to 290 nt of the mouse lamin B₂ cDNA sequence.

The overall similarity with the mouse sequence is 78.5 % at the nucleotide sequence and 80 % at the amino acid level. The similarity would be much greater if it were not for a region of 147 nt (49 amino acids) that is completely divergent with respect to the mouse sequence (figure 3). Interestingly, when this region is compared in four different species (human, mouse, chicken, and *Xenopus laevis*) a striking genetic variability is observed (Hoger *et al.*, 1990; Vorburger *et al.*, 1989). This region, which in all cases contains a putative nuclear localization signal, could perhaps be regarded as a species-specific hypervariable domain. It should be noted that the human sequence also contains all of the short peptides that are regarded as diagnostic of lamin B² (Hoger *et al.*, 1990) (figure 3B).

The location of this gene at the genomic region highly transcribed and replicated early in S-phase, (Bludau *et al.*, 1986; Foisy and Bibor-Hardy, 1988), could provide a new opportunity to study this coupling (transcription and replication) at the level of the gene of an important nuclear protein.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author thanks all members of the department of Molecular Biology within Instituto di Genetica Biochimica ed Evoluzionistica

CNR Pavia, specially Drs. S. Riva, G. Biamonti and G. Perini for their kind technical assistance.

This work was supported by a fellowship of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO).

REFERENCES

- BURKE, B. and L. GERACE (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* **44**:639-652.
- BLUDAU, H.; M. KOPUN and D. WERNER (1986). Cell cycle-dependent expression of nuclear matrix proteins of Ehrlich ascites cells studied by *in vitro* translation. *Exp. Cell Res.* **165**:269-282.
- BU VOLI, M.; G. BIAMONTI; P. TSOULFAS; M.T. BASSI; A. GHETTI; S. RIVA and C. MORANDI (1988). cDNA cloning of human hnRNA protein A1 reveals the existence of multiple mRNA isoforms. *Nucleic Acids Res.* **16**:3751-3770.
- BIAMONTI, G.; M. GIACCA; G. PERINI; G. CONTREAS; L. ZENTILIN; F. WEIGHARDT; M. GUERRA; G. DELLA VALLE; S. SACCONI; S. RIVA and A. FALASCHI (1992). The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Molecular and Cellular Biology* **12**:3499-3506.
- FELDHERR, C. M.; E. KALLENBACH and N. SCHULTZ (1984). Movement of karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* **99**:2216-2222.
- FOISY, S. and V. BIBOR-HARDY (1988). Synthesis of nuclear lamins in BHK-21 cells synchronized with aphidicolin. *Biophys. Res. Commun.* **156**:205-210.
- GERACE, L.; A. BLUM and G. BLOBEL (1978). Immunocytochemical p73 localization of the major polypeptides of nuclear pore complex-lamin fraction. Interphase and mitotic distribution. *J. Cell Biol.* **79**:546-566.
- GERACE, L. and G. BLOBEL (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**:277-287.
- GERACE, L. (1986). Nuclear lamina and organization of nuclear architecture. *Trends Biochem. Sci.* **11**:443-446.
- HOGER, T. H.; K. ZATLOUKAL; I. WAIZENEGGER and G. KROHNE (1990). Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single - type lamin. *Chromosoma* **99**:379-390.
- KAUFMANN, H. (1988). Additional members of the rat liver lamin polypeptide family. Mammalian Somatic. *Cell Lamins* **18**:13946-13955.
- NEWPORT, J. (1987). Nuclear reconstitution *in vitro*: stages of assembly around protein-free DNA. *Cell* **48**:205-209.
- PERINI, G.; G. BIAMONTI; F. DEMARCHE; M. GUERRA; S. ROMAGNOLI; M. GIACCA; S. RIVA and A. FALASCHI (1990). Caratteristiche trascrizionali di una regione di DNA umano che si replica all'inizio della fase S. Abstracts of the XXVII Scientific Meeting of the Italian Society for Molecular Biology (SIBBM). Sardegna (Italy), August, 1990.
- VORBURGER, K.; C. F. LEHNER; G. T. KITTEN; H. M. EPPENBERGER and E. A. NIGG (1989). A second higher vertebrate B-type lamin; cDNA sequence determination and *in vitro* processing of chicken lamin B₂. *J. Mol. Biol.* **208**:405-415.

PRODUCCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL OKT3 A MEDIANA ESCALA, MEDIANTE EL ENCAPSULAMIENTO DEL HIBRIDOMA EN ALGINATO DE CALCIO

Nunciada Salma¹, G. Fiszman², E. González³, M.T. Rodríguez⁴, M.L. Zucheran⁴, M. Nakamura⁴ y A.M. Moro⁴

¹Laboratorio de Hibridomas, Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela, ²Centro Oncológico de Medicina Nuclear, Instituto Nacional de Oncología "Angel H. Roffo", Buenos Aires, Argentina, ³Academia Nacional de Ciencias, La Paz, Bolivia, ⁴Centro de Biotecnología, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Recibido en mayo de 1993. Aprobado en mayo de 1994

Key words: Monoclonal antibodies, OKT3, calcium alginate

SUMMARY

The entrapment of cells in calcium gel microbeads is a technique that is well adapted for use in biotechnology. One of the applications has been in the monoclonal antibody production field, in moderate or large scale. The encapsulation procedure takes advantage of the calcium-mediated gelation of sodium alginate.

In this study, we encapsulated the OKT3 hybridoma at a concentration of 1.5×10^6 cells/mL of alginate, cultivated in a spinner vessel of 500 mL. The hybridoma showed a high cell density (reached a maximum of 11.7×10^6 cells/g alginate) and viability. The monoclonal antibody production was elevated, maintaining around 70 mg/mL of supernatant during the culture. The harvested supernatant was concentrated and purified without pyrogens.

The results showed that the monoclonal antibody production was superior compared to conventional cultures. In this manner, the immobilization of hybridomas significantly promotes productivity.

RESUMEN

El encapsulamiento de células en esferas de alginato de calcio constituye una técnica ampliamente utilizada en biotecnología. Una de las aplicaciones ha sido en el campo de la producción de anticuerpos monoclonales, tanto a mediana como a gran escala. El proceso de encapsulamiento se basa en la gelación del alginato de sodio mediada por iones Ca^{2+} .

En este estudio se encapsuló el hibridoma OKT3 a una concentración de 1.5×10^6 células/mL de alginato, cultivándose en spinner de 500 mL de capacidad. El hibridoma mostró una alta densidad celular (hasta 11.7×10^6 células/g de alginato) y viabilidad. La producción del anticuerpo monoclonal fue considerable, manteniéndose alrededor de 70 mg/mL de sobrenadante durante el cultivo. Los sobrenadantes cosechados se concentraron y se purificaron libres de pirógenos.

Los resultados mostraron que la producción del anticuerpo monoclonal fue superior si se compara con cultivos convencionales. Así, la inmovilización de células hibridas promueve un medio para incrementar la productividad.

INTRODUCCION

Los anticuerpos monoclonales (AcM) son biomoléculas de gran utilidad, principalmente en terapia humana, imágenes de tumores, diagnóstico

e investigación básica (Houba, 1982; Arathoon y Birch, 1986). Cualquiera de estas aplicaciones basa su potencial en el requerimiento de grandes cantidades de AcM. El uso masivo de estas biomoléculas ha creado la necesidad de desarrollar métodos apropiados para su producción y purificación, en cantidades y calidad suficiente, para su uso específico (Arathoon y Birch, 1986; Ratafia, 1987).

Recientemente, el empleo de la técnica de inmovilización celular en *macrocarrier* ha sido adaptada para la producción de AcM además de otras biomoléculas, tanto a mediana como a gran escala (Mattiasson, 1983; Nilsson *et al.*, 1983; Nilsson, 1987; Duff, 1985; Brunt, 1986; Possilico, 1986; Shirai *et al.*, 1988; Smiley *et al.*, 1989).

Este método fue desarrollado primero por Lim y Sum (1980), seguido por Lim y Moss (1981), y posteriormente modificado por Nilsson *et al.* (1980, 1983), siendo de gran utilidad en la industria, la medicina y la agricultura (Familletti, 1987).

El polímero más utilizado para encapsular ha sido el alginato de sodio, por ser compatible con la mayoría de las células, llevándose el proceso de gelificación bajo condiciones fisiológicas (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990). Muy recientemente se han estado empleando polímeros sintéticos con muy buenos resultados (Bañó *et al.*, 1991).

El alginato de sodio es un polímero de carbohidrato no ramificado constituido por dos unidades: ácido glucurónico (G) y ácido manurónico (M), unidas por enlaces α y β 1-4. La composición y secuencia es ampliamente variable dependiendo del organismo y tejido del cual es aislado. Los monómeros se encuentran dispuestos en un patrón de bloques a lo largo de la cadena con regiones de homomonómeros, denominadas bloques M y G, interceptadas con regiones de estructura alternada (bloques MG)

(Smidsrød y Skjæk-Bræk, 1990). El alginato de sodio gélifica en presencia de iones Ca^{2+} , quedando así las células encapsuladas en un enrejado tridimensional, el cual ofrece un gran área de superficie para la colonización (Shirai *et al.*, 1987; Iijima *et al.*, 1988; Sinacore *et al.*, 1989).

En el presente trabajo, se encapsuló el hibridoma murino OKT3 en alginato de calcio, con el fin de determinar su productividad a mediana escala. Adicionalmente se describe el procedimiento seguido para la obtención de AcM puro y sin pirógenos.

MATERIALES Y METODOS

Línea celular

Se empleó la línea del hibridoma murino OKT3 de la *American Type Culture Collection* (ATCC), productor del anticuerpo monoclonal del isotipo IgG2a. Las células del hibridoma se mantuvieron y expandieron en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DME, Sigma) suplementado con 7.5% de suero fetal bovino (SFB, Biosyst), 2 mM de glutamina y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina.

Encapsulación del hibridoma

El hibridoma expandido en frasco spinner (Belleco-glass, USA) y 95% de viabilidad, se encapsuló como se describe brevemente: La suspensión de células se centrifugó y el pellet se resuspendió en medio suplementado. Seguidamente se mezcló con una solución de alginato al 1.6% (Belleco Biotechnology, low viscosity sodium alginate). La suspensión células/alginato se goteó con jeringa y aguja número 22 1/4G sobre una solución de CaCl_2 125 mM, D-glucosa 2.5 mM y Hepes 25 mM, pH 7.2, a temperatura ambiente y bajo ligera agitación. De este modo quedaron encapsuladas las células a una concentración de 1.5×10^6 células/mL de alginato, cuya concentración final fue del 1%. Las perlas se lavaron con solución de Hanks (Sigma) y se transfirieron a un spinner de 500 mL de CO_2 con agitación continua de 15 rpm. Diariamente se tomaron muestras del medio metabolizado y de perlas. El sobrenadante se utilizó para determinaciones de pH, concentraciones de glucosa (Kit Quibasa, Brasil), lactato (Kit Sigma), y anticuerpos. Las perlas se pesaron y utilizaron para el conteo del número de células/g y la viabilidad, después de la disolución de las mismas con solución de EDTA 50 mM. Sobre la base de estos parámetros metabólicos, se realizó el cambio de medio metabolizado a fresco, que varió de 200-300 mL/día.

Cuantificación de anticuerpos por ELISA

Las placas de cloruro de polivinilo se sensibilizaron con IgG anti-ratón (Sigma) a una concentración de 6.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6 durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) conteniendo Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween). Para evitar unión no específica, las placas se bloquearon con PBS-leche descremada al 5% durante 1 h a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-Tween, se adicionaron diluciones seriadas de los medios de cultivo y del anticuerpo OKT3 estándar. Las placas se incubaron durante 1 h a 37°C, al final del cual se lavaron 3 veces y se añadió IgG anti-ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido 1:2000 en PBS-Tween. Luego de la incubación por 1 h a 37°C, las placas se lavaron y revelaron con solución sustrato 3,3'-5,5'-tetrametil benzidina como describen Madersbacher y Berger

(1991). La reacción enzimática se detuvo por adición de H_2SO_4 4.7 M y el cambio de color se monitoreó espectrofotométricamente a 450 nm en un lector microELISA (Titertek Multiskan).

La concentración de AcM en las muestras se determinó a partir de una curva de titulación, construida a partir de las concentraciones de anticuerpo OKT3 conocidas para las diferentes diluciones del patrón y los valores de absorbancia correspondientes.

Purificación de OKT3

Los sobrenadantes cosechados en el transcurso del cultivo se centrifugaron y concentraron por ultrafiltración tangencial, cuya membrana tenía un límite de exclusión de 30 kDa (Minitan-Millipore). A continuación se filtró a través de una membrana de 0.22 μm y se aplicó a una columna sin pirógenos XK-16 de 40 mL de proteína A Sepharose (Pharmacia), previamente equilibrada con el tampón Tris 0.05 M/NaCl 0.15 M/timerosal 0.02%, pH 8.6. La columna se eluyó consecutivamente con las siguientes soluciones tampón:

- Fosfato 0.05 M/NaCl 0.15 M pH 7,
- Glicina 0.05 M/NaCl 0.15 M pH 2.8,
- Glicina 0.05 M/NaCl 0.15 M pH 2.3,
- Tris 0.05 M/NaCl 1 M pH 8.6.

El AcM OKT3 se eluyó con el tampón b) y se neutralizó inmediatamente con tampón Tris 1M pH 10.5. Seguidamente se dializó contra PBS/timerosal 0.02% pH 7, durante 24 h.

La pureza de los diferentes eluatos se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, en presencia de SDS y en condiciones reductoras según Laemmli (1970). Las concentraciones de proteínas totales y de IgG se determinaron según Lowry *et al.* (1951) y ELISA respectivamente.

Todas las soluciones se prepararon con agua libre de pirógenos siendo esterilizadas por autooclave.

La cristalería se lavó con detergente especial, se enjuagó con agua libre de pirógenos, y se trató con 200°C durante 1 h.

El material plástico se trató con NaOH 0.5 N durante varias horas, y se enjuagó con agua libre de pirógenos.

RESULTADOS Y DISCUSION

El hibridoma OKT3 se expandió y encapsuló en perlas de alginato de calcio a razón de 1.5×10^6 células/mL de alginato al 1%. Un total de 130 mL de perlas se cultivaron durante 15 días en un spinner de 500 mL de capacidad.

Previo al encapsulamiento, se realizó el estudio metabólico del OKT3. El mismo nos permitió determinar, entre otros parámetros, las concentraciones de SFB óptimas para el crecimiento y productividad del hibridoma. Así se seleccionó como concentración para iniciar el cultivo el 7.5%.

Por otra parte, las experiencias previas del laboratorio apuntaron como concentración óptima de alginato el 1%. Con el uso de esta concentración y el empleo de aguja 22 1/4G para la formación de las perlas, se obtuvieron esferas cuyo diámetro

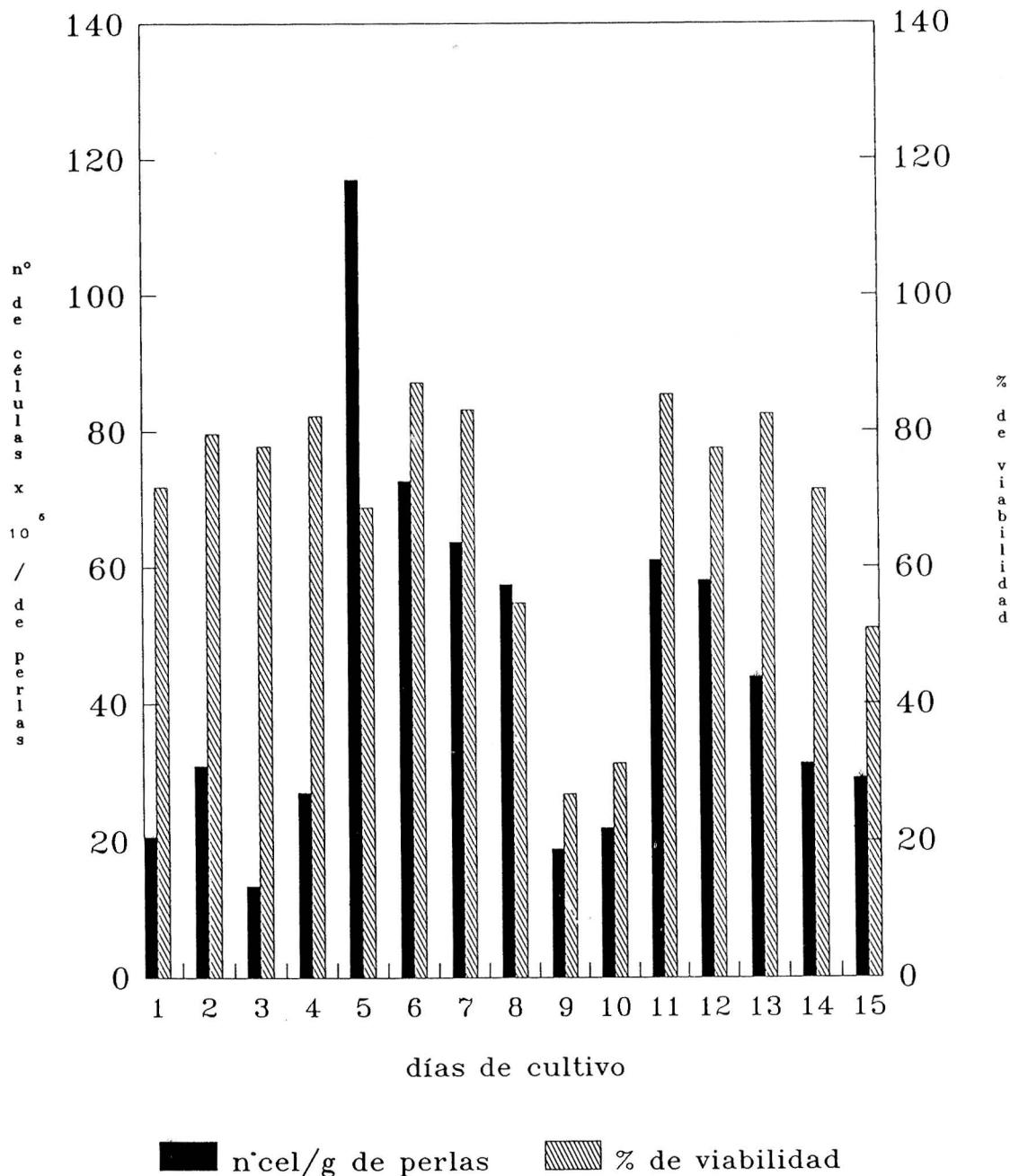


Fig. 1. Densidad celular y viabilidad del hibridoma OKT3 encapsulado en alginato de calcio al 1%.

aproximado fue de 1.8 a 2.2 mm y con una porosidad apropiada para mantener la integridad de las perlas durante el cultivo.

El crecimiento del hibridoma se monitoreó por conteo directo de las células después de la resolubilización de las perlas con solución de EDTA. La figura 1 muestra los datos de la densidad celular (número de células vivas/g de perlas) y el porcentaje

de viabilidad durante el cultivo. Se observó que el número de células vivas/g de perlas se mantuvo por encima de 2×10^6 , alcanzándose como máxima concentración 11.7×10^6 el quinto día.

En el transcurso del cultivo, se realizaron reducciones en la concentración de SFB con la finalidad de controlar el crecimiento de las células, lo que permitió una mayor duración del cultivo y, por

tanto, el mantenimiento de la productividad del AcM. Se inició el cultivo con 7.5% de SFB durante los primeros 8 días, a partir de entonces se disminuyó a 2.5% hasta el día 11. Entre los días 12 y 13 se aumentó al 5%, retornando los 2 últimos días del experimento al 2.5%. Como puede advertirse, el primer cambio de SFB (día 9) causó un descenso considerable del número de células y de la viabilidad. Sin embargo, el segundo cambio de la concentración del SFB al 2.5% (días 14 y 15) no incidió en las células adaptadas al 5%.

Al permitirse la adaptación a concentraciones inferiores al 7.5% se logró mantener la densidad celular entre 2-6 x 10⁶, con viabilidad entre 30-70, con lo que se consiguió que la productividad estuviese alrededor de 70 µg/mL de medio a partir del día 7. En la figura 2 se muestran los datos de la productividad volumétrica del AcM, comprobándose que el encapsulamiento no interfirió con la expresión

del anticuerpo, ni con su libre difusión hacia el medio de cultivo. La producción inicial fue de 27 µg/mL, aumentando progresivamente. A partir del día 7 las concentraciones de AcM estuvieron entre 54-79 µg/mL, con lo que se alcanzaron concentraciones de AcM 15 veces por encima del cultivo del hibridoma en suspensión (datos no mostrados).

El encapsulamiento tampoco interfirió con el metabolismo normal de las células (figura 2), como fueron el consumo de glucosa y la producción de lactato. El consumo de glucosa estuvo alrededor de 160.98 ± 41.9 mg/dL y la producción de lactato alrededor de 23.9 ± 7.5 mg/dL La perfusión diaria de medio fresco mantuvo las concentraciones de glucosa y lactato a niveles aceptables para este hibridoma.

La figura 3 muestra fotografías de las células atrapadas en las perlas. En la figura 3a se observa una perla inmediatamente después de encapsular, apreciándose las células dispersas y distribuidas uniformemente. A

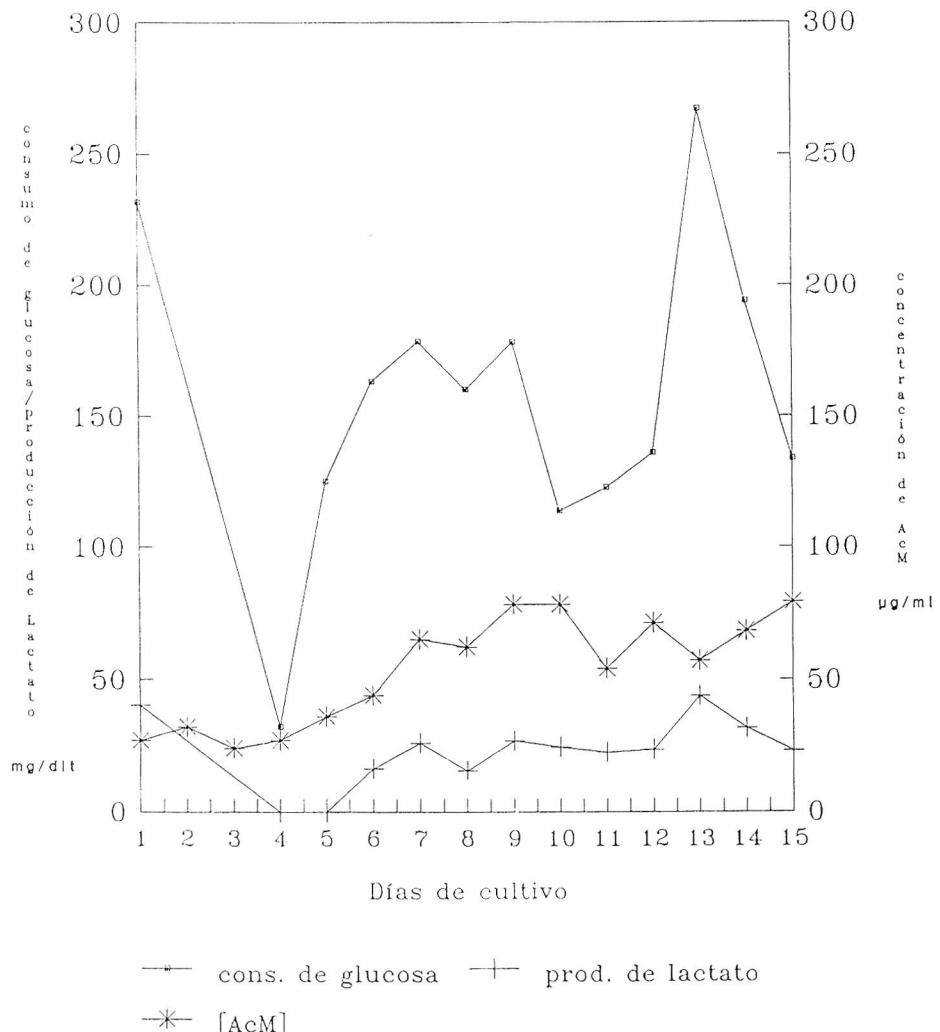


Fig. 2 Producción de OKT3, lactato y consumo de glucosa durante el cultivo celular.

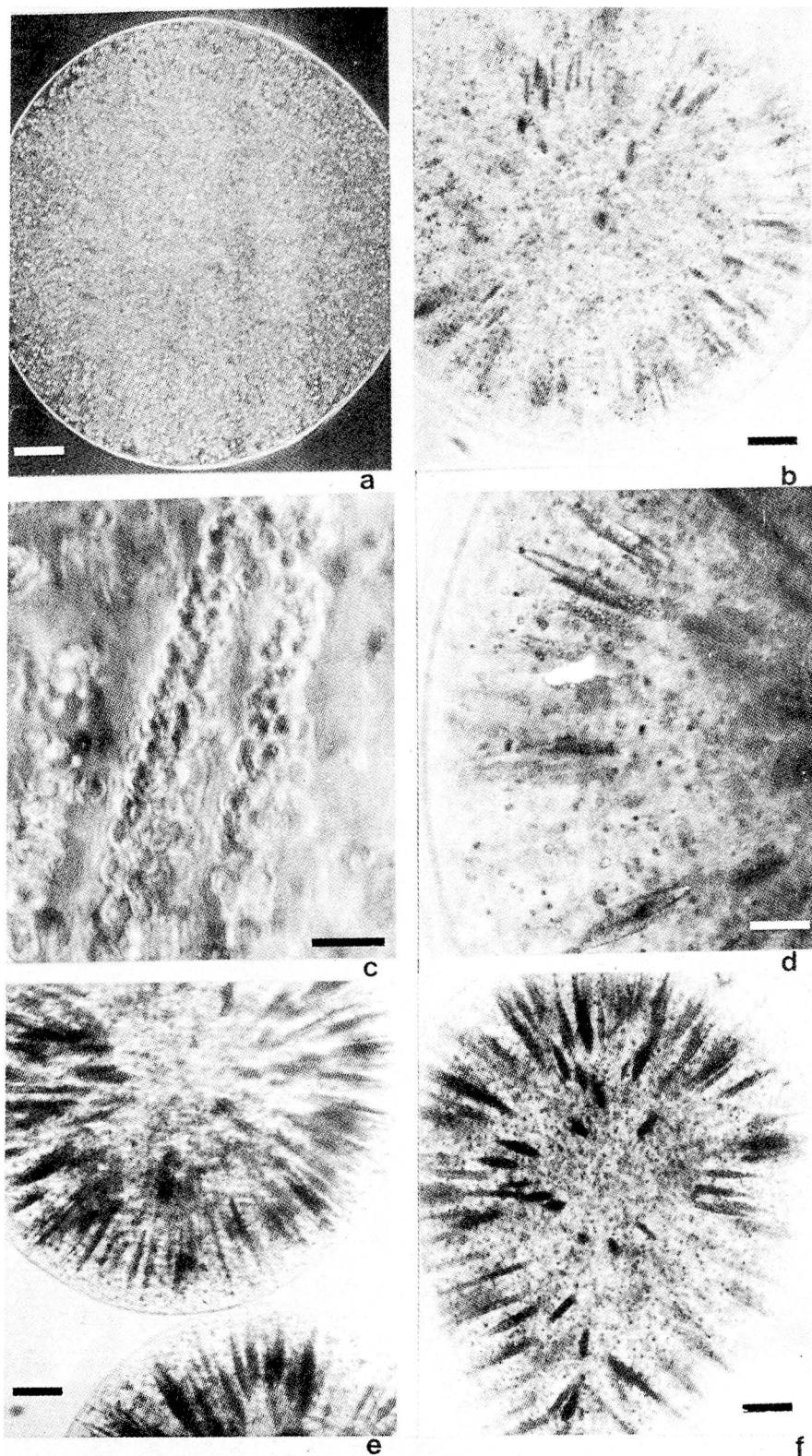


Fig. 3 Fotografías de las células del hibridoma OKT3 immobilizadas en perlas de alginato de calcio. Se removieron del cultivo aliquotas de perlas los días: 0 (a); 4 (b y c), 6 (d y e), y 7 (f). Barras de las figuras 3a, b, c y f= 100 μm ; de la figura 3e= 40 μm , y de la figura 3d= 40 μm .

los 4 días después de encapsulamiento, se distinguen grupos de células principalmente dispuestos en la parte más externa de la perla (figura 3b), a mayor aumento se observan dichas agrupaciones formando canales radiales (figura 3c). Los mismos fueron engrosando y aumentando su número al transcurrir los días. [figuras 3d y 3e (día 6) y 3f (día 7)]. Estos grupos celulares fueron visibles a simple vista.

El producto obtenido presentó una alta pureza, que se demostró por electroforesis en gel de poliacrilamida (datos no mostrados), una concentración protéica de 7 mg/mL y libre de pirógenos según la prueba Limulus Amebocyte Lysate (LAL) *in vitro*.

El proceso permitió obtener 78 mg de IgG monoclonal purificado, con un rendimiento del 79.8%.

Los datos presentados demostraron el crecimiento a alta densidad del hibridoma OKT3 en perlas de alginato de Ca al 1%, la que fue considerablemente superior en comparación con el cultivo del hibridoma en suspensión, donde la concentración máxima obtenida fue 1.69×10^6 células/mL (datos no mostrados).

Utilizando como concentración final de alginato el 1%, obtuvimos perlas cuya porosidad fue la apropiada para la transferencia de nutrientes, AcM, así como productos de desecho.

Las células crecieron agrupadas en el interior de la perla (figura 3) formando husos alargados o esféricos, que se encontraron distribuidos principalmente en la superficie de la perla. Estos canales radiales surgen como resultado de la gelificación siendo posteriormente poblados por las células (Sinacore *et al.*, 1989; Shirai *et al.*, 1988). En la bibliografía se ha reportado que la formación de las cavidades se produce, durante el proceso de gelificación, a temperaturas bajas. En nuestro caso obtuvimos estas cavidades en el interior de las perlas, a pesar de llevarse a cabo el proceso a temperatura ambiente.

El crecimiento de las células hacia la superficie de la perla minimiza la transferencia de oxígeno hacia el centro de la misma. Se ha reportado que las perlas con diámetros superiores a 1.5 mm no permiten un adecuado intercambio de oxígeno (Sinacore *et al.*, 1989). El diámetro de nuestras perlas fue superior a 1.5 mm y aunque permitió alcanzar concentraciones en el centro de las mismas.

El cambio de las concentraciones de SFB durante el cultivo (las cuales no interfirieron con la productividad), nos permitió mantener viables las células, bajando la tasa de división celular, y la obtención de concentraciones de AcM adecuadas lo cual se logró los últimos 7 días.

Durante el cultivo no ocurrió ruptura de las perlas, pero si la liberación de las células hacia el medio de cultivo a partir del día 7. Este hecho pudo haber estado contribuyendo a que las células en el centro de las perlas no recibieran una transferencia óptima de oxígeno.

La concentración de AcM en el medio se mantuvo constante hasta el final de la experiencia, aunque ocurrió un decrecimiento considerable de células y viabilidad los días 9 y 10. El mantenimiento de la concentración de AcM posiblemente se debió a la contribución de las células que fueron liberadas al medio de cultivo.

El inóculo inicial evitó que se tuviera una fase de latencia grande, ya que se observó a los pocos días del cultivo un aumento significativo del número de células/g de perlas, alcanzándose concentraciones superiores a 10^6 células/g.

La purificación del AcM utilizando proteína A Sepharosa nos permitió la obtención de AcM puro con un rendimiento alto. Al final del proceso el consumo de medio fue de 4.27 L y 226 mL de SFB, con la producción de 78 mg de AcM puro sin pirógenos.

Las condiciones utilizadas en el presente trabajo son de gran utilidad para la producción a mediana escala de OKT3, siendo en principio apropiadas de ser llevadas a gran escala.

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. María Correnti, Marian Ulrich, por sus valiosos comentarios. A la Dra. María Eugenia Cavazza por su colaboración en la realización de los gráficos y al Dr. Félix Tapia por sus sugerencias en las fotografías.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Biotecnología del Instituto Butantan, São Paulo, Brasil y financiado por PNUD/UNESCO/ONUDI, Proyecto No. 83/003.

REFERENCIAS

- ARATHOON, W.P. y J.R. BIRCH (1986). Large-scale cell culture in Biotechnology. *Science* **232**:1390-1395.
- BAÑO, M.C.; S. COHEN; K.B. VISSCHER; H.R. ALLCOCK Y R. LANGER (1991). A novel synthetic method for hybridoma cell encapsulation. *BioTechnology* **9**:468-471.
- BRUNT, J. VAN (1986). Immobilized mammalian cell: the gentle way to productivity. *BioTechnology* **4**:505-510.
- DUFF, R.G. (1985). Microencapsulation technology: a novel method for monoclonal antibody production. *Trends Biotechnol.* **3**:167-170.
- FAMILLETTI, P.C. (1987). Gel-immobilized cell culture for antibody production. *Biopharm.* Technical note.
- HOUBA, V. (1982). Properties of the monoclonal antibodies produced by hybridoma technology and their application to the study of diseases. In: *Proceedings of a symposium*

- held at the National University of Singapore. Eds V. Houba, WHO, Geneva and S.H. Cha, WHO Immunology Research & Training Center, UNDP/WORLD BANK/WHO Pub. Geneva, Switzerland.
- IIJIMA, S.; T. MANO; M. TANIGUCHI and T. KOBAYASHI (1988). Immobilization of hybridoma cells with alginate and methane polymer and improved monoclonal antibody production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**:572-576.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly by bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- LIM, F. and A.M. SUM (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* **210**:908-910.
- LIM, F. and R.D. MOSS (1981). Microencapsulation of living cells and tissues. *J.Pharmaceutical Sci.* **70**:351-354.
- LOWRY, O.H.; N. ROSEMBROUGH; A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:263-275.
- MADERSBACHER, S. and P. BERGER (1991). Double wavelength measurement of 3,3'-5,5' Tetriramethylbenzidine (TMB) provides a three-fold enhancement of the ELISA measuring range. *J. Immunol. Methods* **138**:121-124.
- MATTIASSEN, B. (1983). Immobilization methods. In: *Immobilized cells and organelles*. Ed. Mattiasson, B. CRC Press Inc. Boca, Raton, Florida, 1:4-19.
- NILSSON, K. and K. MOSBACH (1980). Preparation of immobilized animal cells. *FEBS Lett.* **118**:145-150.
- NILSSON, K.; W. SCHEIRER; O.W. MERTEN; L. OSTERBERG; E. LIEHL; D. KATINGER and K. MOSBACH (1983). Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules. *Nature* **302**:629-630.
- NILSSON, K. (1987). Methods for immobilizing animal cells. *Tibtech.* **5**:73-78.
- POSSILICO, E.G. (1986). Microencapsulation technology for large scale antibody production. *BioTechnology* **4**:114-1117
- RATAFIA, M. (1987). Issues in mammalian cell culture production. *Pharm Tech.*, Nov:48-56.
- SHIRAI, Y.; K. HASHIMOTO; H. YAMAJI and M. TOKASHIKI (1987). Continuous production of monoclonal antibody with immobilized hybridoma cells in an expanded bed fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**:495-499.
- SHIRAI, Y.; R. SASAKI; K. HASHIMOTO; H. KAWAHARA; K. HITAMI and H. CHIBA (1988). Continuous production of erythropoietin with immobilized animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:544-549.
- SINACORE, M.S.; B.B. CRESWICK and R. BUEHLER (1989). Entrapment and growth of murine hybridoma cells. in calcium alginate gel microbeads. *BioTechnol.* **7**:1275-1279.
- SMIDSROD, O. and G. SKJÄK-BRÆK (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech.* **8**:71-78.
- SMILEY, A.; W-S. HU and D. WANG (1989). Production of human immune interferon by recombinant mammalian cells cultivated on microcarriers. *Biotechnol. Bioeng.* **33**:1182-1190.