



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial

**Propuesta de un Proceso Productivo
para la Obtención de un Reactivo
Hemoclasificador anti-B**

Tesis presentada en opción al Título Académico de
Máster en Biotecnología
Mención Industrial

Autor: Ing. Lisset Casado Maceo

Tutora: Dra. C. Suyén Rodríguez Pérez, PT

2017

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.”

Louis Pasteur

Dedicatoria

Para mis padres,

Fernando y Ana Luisa,

Por su amor y comprensión.

Para mi abuelita Felicidad.

Agradecimientos

A mi tutora Suyén , por su dedicación, apoyo y conocimientos transmitidos y por motivarme a crecer profesionalmente.

A Téllez por soportarme y compartir los buenos y malos momentos.

A mis hermanos Enrique y Yanet, por darme confianza y seguridad.

A Ale, Henry, Osmany y Karina, los mejores compañeros...

A Pablo y Teresita, mis primeros maestros en esta industria.

A mi grupo PIF, que nunca dejan de sorprenderme y con los que he aprendido mucho en este año.

Al Dpto. de Logística y Comercial, por su preocupación y cariño.

Al Departamento de Calidad por su aporte al desarrollo de esta tesis.

A cada una de las personas de LABEX, que de una forma u otra han intervenido en el logro de este trabajo.

Al Claustro de profesores la Maestría de Biotecnología, así como a los trabajadores del CEBI. En especial a Serrat.

RESUMEN

El reactivo Hemoclasificador anti-B es de uso obligatorio para la clasificación de los grupos sanguíneos por el Sistema ABO; actividad frecuente en la red nacional de Hospitales y Bancos de Sangre. La elevación de los estándares regulatorios de los reactivos hemoclasificadores, conllevó a LABEX a adquirir un nuevo Hibridoma anti-B para desarrollar un diagnosticador que pueda ser comercializado. En el presente trabajo se caracterizó el crecimiento y producción del Hibridoma anti-B a escala de laboratorio en medio de cultivo RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino y medio PFHM, empleando frascos rotatorios y modo de operación por lote, donde se calcularon y compararon parámetros como: velocidad de crecimiento, concentración celular, tiempo de duplicación y potencia de aglutinación del sobrenadante de cultivo; obteniéndose los mejores resultados con medio RPMI. La adición de insulina y glutamina al medio PFHM, no mejoró la productividad de la línea celular. Se caracterizó el clon BMS-4 en procesos de fermentación *in vivo* (ratones *BALB/c*) e *in vitro* (frascos rotatorios y biorreactor de olas) y se elaboraron las propuestas de los procesos productivos para obtener un IFA con la calidad conforme a lo establecido regulatoriamente. En la evaluación económica de las variantes desarrolladas, la opción con frascos rotatorios y medio RPMI suplementado con suero fetal bovino resultó la más rentable, al representar un costo de producción de 290 422.99 UM/a y generar utilidades de 655 490.44 UM/a, con un tiempo de operación de 150 días al año que permitirá satisfacer la demanda nacional de 30 mil frascos anual.

ABSTRACT

The anti-B Hemoclassifier reagent is mandatory for the classification of blood groups by the ABO System. It is a frequent activity in the national network of Hospitals and Blood Banks. The elevation of the regulatory standards for hemoclassifiers reagents led to acquire by LABEX a new anti-B Hybridoma and to develop a new diagnostician that could be market. In the present work, the growth and production of the anti-B Hybridoma were characterize at laboratory scale in culture mediums: RPMI supplemented with Bovine Fetal Serum and PFHM medium, using both the rollers bottles and batch mode of operation. The parameters calculated and compared were growth rate, cell concentration, duplicate time and agglutination potency of the culture supernatant. The best result was obtain with RPMI medium. Insulin and glutamine added in the PFHM medium did not improve the productivity of the cell line. BMS-4 clone culture was characterized *in vivo* and *in vitro* fermentation processes, using *BALB/c* mice and rollers bottles or wave bioreactor, respectively. It was necessary to obtain a productive processes of API with the quality according to the established for Regulatory standard. Economical comparative analysis among these variants developed resulted that fermentation carried in rollers bottles, in RPMI medium supplemented with fetal bovine serum, was the most cost-effective option. It has a production cost of 290 422.99 UM/a, generating profits of 655 490.44 UM/a, with an operating time of 150 days a year, that will meet the national demand of 30 thousand vial per year.

ABREVIATURAS DE TÉRMINOS:

Ac: Anticuerpo

AcM: Anticuerpo monoclonal

SFB: Suero Fetal Bovino

cel: Células

Ig: Inmunoglobulinas

PNO: Procedimiento Normalizado de Operación

BM: Banco Maestro

Pot: Potencia

máx: Máxima

CECMED: Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos.

CENPALAB: Centro Nacional de Producciones de Animales de Laboratorios

LABEX: Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales

INS: Insulina

GLUT: Glutamina

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

LAM: Líquido Ascítico Murino

ESP: Especificación de Calidad

CV: Coeficiente de Variación

GE: General Electric

AA: Aminoácidos

HC: Cadena pesada

LC: Cadena ligera

VL: Región variable de la cadena ligera

CL: Región constante de la cadena ligera

CDR: Región Determinante de la Complementariedad

VH: Región variable de la cadena pesada

CH: Región constante de la cadena pesada

col.: Colaboradores

PBS: Buffer fosfato salino

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

SN: Sobrenadante

SSF: Solución salina fisiológica

SN conc.: Sobrenadante concentrado

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
	II.1 Anticuerpos. Generalidades.	4
	II.2 Sistema ABO.	6
	II.3 Anticuerpos Monoclonales.	7
	II.3.1 Producción de anticuerpos monoclonales.	8
	II.3.2. Biorreactores.	12
	II.3.3. Modos de operación de los biorreactores.....	14
	II.4 Cinética del crecimiento celular.....	16
	II.5 Medios de cultivo para la producción de Anticuerpos Monoclonales.....	17
	II.6 Ámbito Regulatorio para reactivos hemoclasificadores.	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
	III.1. Línea Celular.	21
	III.2. Medio de cultivo.	21
	III.3. Cultivo celular.	22
	III.3.1. Adaptación a medio de cultivo PFHM.	22
	III.3.2. Obtención del inóculo.....	23
	III.3.3. Caracterización cinética del Hibridoma anti-B.	23
	III.4. Producción <i>In Vivo</i>	23
	III.5. Producción <i>in vitro</i>	25
	III.6. Etapa de clarificación y concentración del sobrenadante de cultivo.	26
	III.7. Determinaciones Analíticas y cálculo de variables.	27
	III.8. Procesamiento de los datos. Diseño Experimental y Tratamiento estadístico de los resultados del estudio cinético.	30
	III.9. Diseño, desarrollo y producción de lotes a escala productiva.	30
	III.10. Análisis económico.....	31

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
IV.1 - Caracterización del Hibridoma anti-B a escala de laboratorio.	32
IV.1.1. Adaptación del Hibridoma anti-B a medio de cultivo PFHM-II.....	32
IV.1.2. Caracterización del Hibridoma anti-B en medio de cultivo RPMI y en PFHM.	35
IV.1.3. Caracterización del Hibridoma anti-B en variantes de formulación de medio de cultivo PFHM.	37
IV.2 - Propuesta de los procesos productivos para la obtención del AcM anti-B.....	40
IV.2.1. Producción de anti-B “in vivo”.	41
IV.2.2. Producción de anti-B <i>in vitro</i> en frascos rotatorios.	43
IV.2.3. Producción de anti-B <i>in vitro</i> en Biorreactor de Olas Applikon 50 l.....	46
IV.3 - Valoración económica de los procesos productivos propuestos para la obtención del AcM anti-B.	50
IV.4 - Valoraciones Generales de los Procesos Productivos.....	52
V. CONCLUSIONES y recomendaciones.	53
V.1 - Conclusiones	53
V.2 - Recomendaciones.....	55
VI. BIBLIOGRAFÍA	56
VII. ANEXOS.....	56

I. INTRODUCCIÓN

Karl Landsteiner en 1900 fue quien demostró el fenómeno de aglutinación entre eritrocitos y sueros humanos; de esta manera se dio origen al Sistema ABO, el más reconocido en el ser humano. (Cerdas-Quesada, 2015). El descubrimiento del Sistema ABO tuvo un gran impacto en la medicina clínica e indujo a muchos investigadores a trabajar y publicar en esta área. El estudio de los grupos sanguíneos ha contribuido fundamentalmente en el campo de la medicina transfusional y en el tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido, además de ser útil a otras ciencias tales como la medicina forense (León y col., 2004).

Hasta principios de los años ochenta, se utilizaron sueros policlonales humanos como fuente de reactivos para la determinación de los grupos del Sistema ABO. La producción de estos sueros estaba asociada a tareas laboriosas y prolongadas, además, a un conjunto de problemas vinculados al manejo y administración de material biológico en humanos y el riesgo de infecciones. A comienzos de esta misma década, se generalizó la producción de Anticuerpos Monoclonales (AcM) con características adecuadas para ser buenos reactivos de identificación eritrocitaria (Cerdas-Quesada, 2015).

El Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX) posee entre sus líneas productivas los reactivos hemoclasificadores del sistema ABO que son utilizados por la red de hospitales y bancos de sangre del país. En este grupo de reactivos se encuentra el Hemoclasificador Anti-B, que se sirve para la determinación del grupo sanguíneo B y otros grupos portadores del antígeno B, según el sistema de clasificación ABO. Este reactivo reviste gran importancia debido al alto impacto que tiene en la medicina transfusional, al permitir la detección de compatibilidad sanguínea entre un receptor y un donante. El ingrediente farmacéutico activo (IFA) lo constituye el AcM anti-B.

El AcM anti-B es producido a partir de una línea celular híbrida (Hibridoma anti-B), procedente de la fusión de un linfocito B productor del anticuerpo de interés, con una línea celular de mieloma. Su obtención puede ser por vía *in vivo* o *in vitro*. En el caso particular de LABEX, tradicionalmente se había empleado la vía *in vivo*, a partir de ratones, que son inmunizados con el propio hibridoma. De este procesamiento se obtiene el líquido ascítico murino (LAM), rico en AcM, el cual es extraído de los ratones para producir el reactivo hemoclasificador.

Para desarrollar un buen reactivo hemoclasificador, este debe ser específico para el antígeno que se desea detectar, suficientemente potente para dar una buena reacción macroscópica con variantes débiles de los grupos sanguíneos, además de mantenerse estable bajo las condiciones de uso cotidiano y un costo de producción razonable (Wittig y col., 2006). Estas características son reguladas en Cuba por el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) y se encuentran establecidas en la Regulación No.59-2011 *Requisitos de los Diagnosticadores Utilizados en Inmunohematología* (www.cecmec.cu). Esta propia institución en el año 2011 elevó los estándares regulatorios para la comercialización de estos reactivos, donde el proceso productivo de LAM existente hasta ese momento en LABEX no cumplía con los nuevos requisitos y por tanto, se comenzó a importar la materia prima para la producción del Hemoclasificador anti-B; lo que constituye un gasto de divisas y un riesgo a la estabilidad o soberanía del país para asegurar el sistema de Salud Pública, además de un riesgo ya que un fallo en el diagnóstico podría causar la muerte de una persona.

Para solucionar este problema se adquirió un nuevo Hibridoma anti-B, el cual debe ser evaluado con vista a obtener un nuevo reactivo que cumpla con los parámetros de calidad y además permita desarrollar un proceso productivo que cubra las demandas del Sistema Nacional de Salud, que aumenta progresivamente cada año. Lo antes expresado, da lugar al planteamiento del siguiente problema científico:

PROBLEMA CIENTIFICO:

La necesidad de desarrollar un proceso productivo *in vivo* o *in vitro* que permita obtener un ingrediente farmacéutico activo (IFA) con las características adecuadas para ser empleado en la producción de un reactivo Hemoclasificador anti-B.

A continuación, se plantea la hipótesis y los objetivos para dar solución al problema científico.

HIPÓTESIS:

Si se caracteriza el cultivo del Hibridoma anti-B (clon BMS-4) en cultivos *in vivo* e *in vitro*, se podrán diseñar procesos productivos para la obtención de IFA anti-B, con fines de diagnóstico.

OBJETIVO GENERAL:

Proponer un proceso productivo para la obtención del Hemoclasificador anti-B que cumpla con los parámetros de potencia, avidez e intensidad establecidos por regulación, para la producción del reactivo Hemoclasificador anti-B.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Caracterizar el crecimiento y la producción de AcM anti-B del clon BMS-4 empleando los medios de cultivo PFHM II y RPMI-1640.
2. Caracterizar el cultivo del Hibridoma anti-B a escala productiva *in vivo* e *in vitro*.
3. Proponer el o los procesos productivos para la obtención del reactivo Hemoclasificador anti-B.
4. Evaluar económicamente los procesos productivos propuestos.
5. Seleccionar un proceso productivo para la obtención de IFA anti-B que cumpla con los parámetros de calidad para su uso diagnóstico.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 ANTICUERPOS. GENERALIDADES.

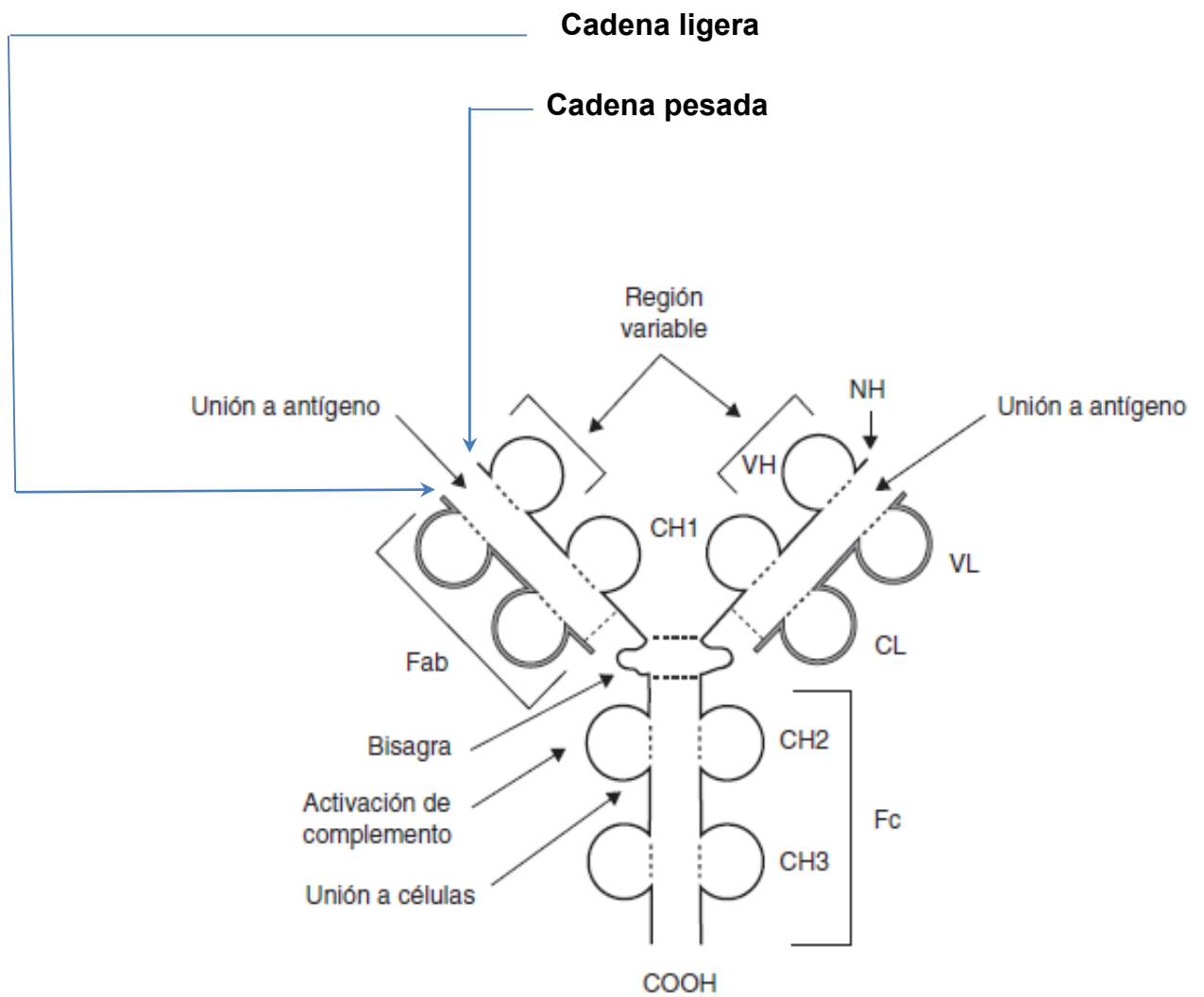
- Estructura y características básicas de los anticuerpos.

La función del sistema inmune es defender al organismo de sustancias foráneas invasoras, tales como virus y bacterias. El mismo está compuesto por un grupo de células y órganos, donde los linfocitos B y T junto a los macrófagos realizan las funciones principales de defensa y protección (Ohlin y Zouali, 2003). Las células B, son capaces de producir anticuerpos y en conjunto con las células T tienen como función la destrucción de los antígenos; que no son más que sustancias extrañas al organismo, capaces de generar una respuesta inmune activando las células B para la producción de anticuerpos (McDonnell, 2015).

Los anticuerpos son capaces de generar numerosas respuestas tras su unión a los antígenos. Esas respuestas efectoras dependen del extremo carboxiterminal de cada isotipo, que determina el tipo de unión a determinados receptores de membrana de las células y la capacidad de fijar el complemento.

Cada molécula de anticuerpo está formada por cuatro cadenas, dos ligeras y dos pesadas, cada una de ellas idénticas; unidas por puentes disulfuro que forman una estructura espacial similar a una Y. Estas tienen dos funciones fundamentales: el reconocimiento y la unión al antígeno, que llevan a cabo mediante los extremos amino terminales de las cadenas; y se incluye una tercera, la función efectora, realizada por el extremo carboxiterminal de las cadenas pesadas (**figura 1**) (García, 2011).

Las cadenas ligeras tienen una porción variable, de la que depende la especificidad, y una región constante que difiere según se trate de cadenas ligeras κ o λ . Las cadenas pesadas poseen, una región variable y una constante, la cual determinará las clases o isotipos principales de inmunoglobulina (Ig): γ , μ , α , δ y ϵ , que formarán, respectivamente, las IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Además, la IgA tiene 2 subclases, IgA1 e IgA2, y la IgG se divide en 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las propiedades de las Ig dependen de cada clase y subclase. Una vez secretadas, las Ig son monoméricas, con excepción de la IgA, que forma dímeros y de la IgM, que forma pentámeros.



(....) Puentes disulfuros

Figura 1. Esquema general de la estructura de una inmunoglobulina (García, 2011).

Dentro de la estructura de las cadenas de las Ig se denominan dominios a estructuras repetidas de 110 aminoácidos (AA) con un pliegue beta. Las cadenas ligeras tienen un dominio en la región variable (VL) y uno en la constante (CL). Las cadenas pesadas tienen, a su vez, un dominio en la región variable (VH) y tres o cuatro en la región constante (CH) según la clase de Ig. Entre los dominios CH1 y CH2 se encuentra un área denominada bisagra de la cadena constante que le da flexibilidad y permite un acoplamiento espacial adaptable.

En las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas hay 3 segmentos hipervariables de 10 AA yuxtapuestos que forman el sitio de unión al antígeno, que por ser complementarios a su secuencia se denominan CDR 1, 2 y 3, de los cuales el más variable es CDR3. Estas estructuras forman bucles en la superficie de los anticuerpos mediante los que interactúan con los antígenos.

- Inmunoglobulina M.

La inmunoglobulina M es una clase de anticuerpo conocida por ser la primera defensa contra varios antígenos. Las IgM son producidas por el sistema inmunitario y tienen un papel importante en las respuestas de inmunidad humoral primaria y adaptativa (Vollmers y Brändlein, 2009). Esta clase de anticuerpos tiende a ser menos específico, por lo que reconoce una gran variedad de antígenos patógenos, es altamente activo en las reacciones citotóxicas y citolíticas, debido a que provocan una activación superior del sistema del complemento (Mader y col., 2013).

En cuanto a los patógenos bacterianos o virales, las IgM son las primeras moléculas inmunes que se unen a los epítopos derivados de la membrana de estos organismos (Horn, y col., 2010). Además, la clase IgM puede ser útil como coadyuvante de vacuna, ya que actúa como receptores solubles a través de la formación de complejos con el antígeno (Ilag, 2011).

Al igual que otras moléculas de anticuerpos, la clase de IgM consiste en estructuras de subunidades de la cadena pesada (HC) y ligera (LC) que se ensamblan en polímeros superiores (**figura 2**). En el suero humano la forma predominante es el pentámero de peso molecular aproximado de 950 kDa, que está compuesto por cinco monómeros conectados con un polipéptido denominado cadena de unión. Alternativamente, se encuentran hexámeros de 1100 kDa, con frecuencia bastante baja *in vivo* (Brewer y col., 1994).

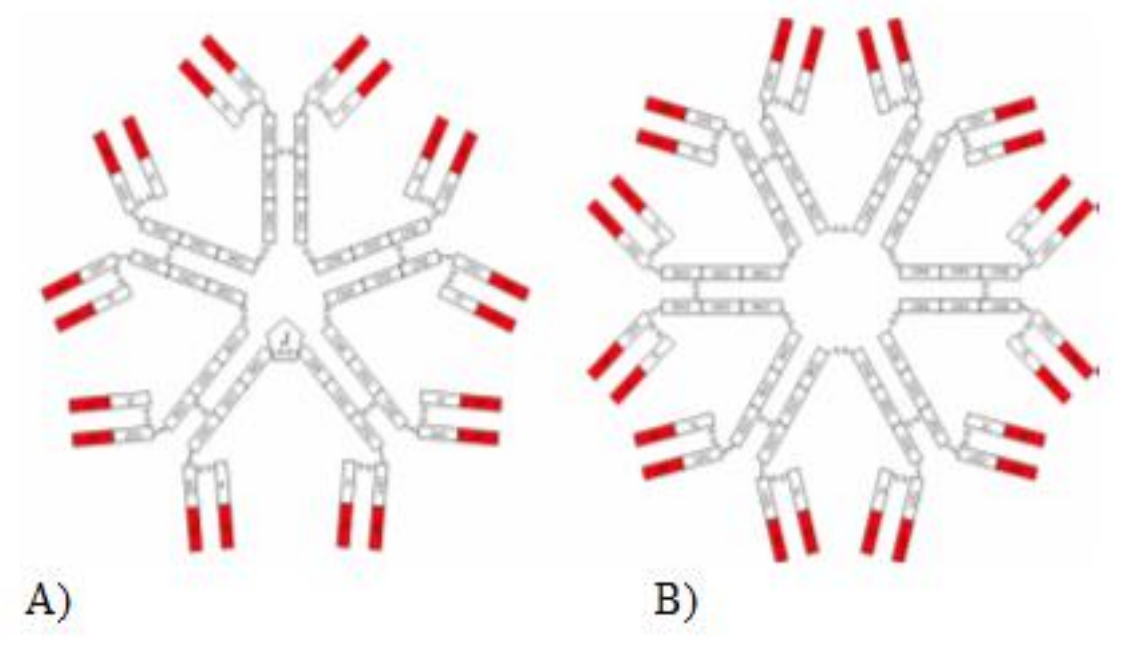


Figura 2. Estructura de la IgM: A) pentamérica y B) hexamérica (Tomado de Wolfram y col., 2016).

Los anticuerpos anti-ABO naturales se han considerado durante mucho tiempo como predominantemente del isotipo IgM, pero también se producen anticuerpos del isotipo IgG, especialmente durante la vida (Milland y Sandrin, 2006; Spalter y col., 1999).

II.2 SISTEMA ABO.

El sistema ABO fue el primer grupo sanguíneo descubierto por Landsteiner, su nombre proviene de los tres tipos de grupos que se identifican: los de antígeno A, B y O. Landsteiner demostró que los glóbulos rojos contenían por lo menos dos factores designados como aglutinógenos A y B, con los cuales se podía explicar los cuatro grupos que existían y así postuló que cada persona podía tener uno de ellos (A o B), ambos (AB) o ninguno (O) (Coppo y Baez, 2010).

En el caso de los grupos sanguíneos ABO, los individuos con grupo sanguíneo A, desarrollan una respuesta inmune a los antígenos tipo B de microorganismos y antígenos ambientales como las plantas que contienen estos epítomos (Marcus, 1969; Milland y Sandrin, 2006). Los individuos del grupo sanguíneo B, desarrollan anticuerpos anti-A, los individuos del grupo sanguíneo O producen tanto anticuerpos anti-A como anti-B, mientras que los sujetos del grupo sanguíneo AB no tienen anti-A ni anti-B porque expresan ambos antígenos en sus glóbulos rojos (Wolfram y col., 2016).

Los antígenos A y B son glicoproteínas, producidas por genes alélicos en un locus único, localizados del cromosoma 9. Los antígenos correspondientes se encuentran aparentemente adheridos a la membrana de los glóbulos rojos. La especificidad antigénica es conferida por el azúcar, terminal; ejemplo: azúcar N-acetilgalactosamina proporciona la especificidad antigénica A y el azúcar galactosa determina la actividad B (**figura 3**).

Los antígenos ABO están presentes en todos los tejidos, excepto el sistema nervioso central, de donde se deduce la importancia de dicho sistema en transfusión de eritrocitos, leucocitos, plaquetas y trasplantes de tejidos y también se encuentran presentes en las secreciones como polisacáridos solubles. (Grispan, 1983). Estos antígenos pueden provocar una respuesta de anticuerpo en individuos que carecen de los mismos y algunos anticuerpos pueden ocasionar reacción hemolítica ante una transfusión o enfermedad hemolítica del feto/no nacido (Sapatnekar, 2015).

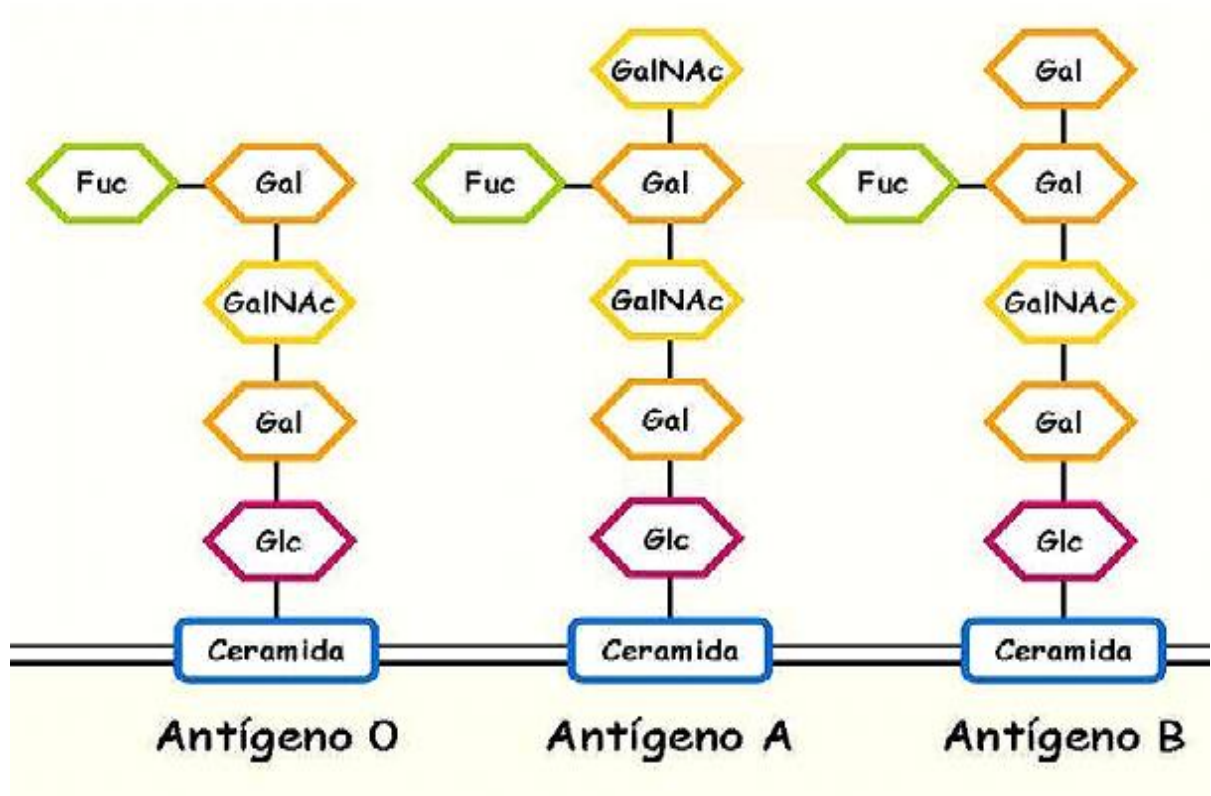


Figura 3. Estructura de las glicoproteínas que conforman los alelos O, A y B. (Tomado de Skirzewski, 2015).

Leyenda: GAL - Galactosamina; FUC-Fucosa; NAc: N-acetilgalactosamina

Las isoaglutininas, es decir, los anticuerpos contra epítomos de carbohidratos que forman los antígenos AB0 en glóbulos rojos, se consideran anticuerpos naturales prototípicos; y se ha demostrado que están comprometidos en pacientes con inmunodeficiencia (Patenaude y col., 2002; Fischer y col., 2015). Su aparición puede explicarse por una estimulación inaparente, particularmente de las bacterias intestinales, porque los antígenos reaccionan en forma cruzada con los polisacáridos del grupo sanguíneo y están ampliamente distribuidos en el medio ambiente (Milland y Sandrin, 2006; Yuki, 2005).

Los anticuerpos naturales se producen aún en ausencia de una estimulación antigénica externa y se manifiestan temprano en la vida de todos los individuos sanos con un sistema inmunológico funcional, presumiblemente como un producto del ensamblaje del segmento génico de la línea germinal (Milland y Sandrin, 2006; Palomino, 2016; Spalter y col., 1999). Por lo tanto, muestran baja afinidad a muchos patógenos microbianos y cierta reactividad cruzada, incluso a algunos auto-antígenos (Wolfram y col., 2016).

Los investigadores han identificado las bases moleculares de muchos antígenos de los grupos sanguíneos y mantienen activas al año, listas de bases de datos con más de 1.600 alelos de 44 genes (Patnaik y col., 2012). Estos conocimientos genéticos de los grupos sanguíneos mejoran las prácticas de la medicina transfusional actualmente (Sapatnekar, 2015).

Los grupos sanguíneos del sistema ABO fueron identificados al inicio con ayuda de anticuerpos obtenidos de suero humano de conocida especificidad (Pandey, 2010). El uso de personas para la obtención de antisueros policlonales era una tarea ardua y laboriosa, además presentaba varios problemas, que incluían aspectos éticos, médico-legales y epidemiológicos (Soria, 2010). A partir de la introducción de la tecnología de hibridomas desarrollada por Köhler y Milstein, el suero humano fue remplazado por anticuerpos monoclonales con especificidad para los antígenos ABO, despertándose un elevado interés internacional por la producción de reactivos hemoclasificadores de nuevo tipo basados en anticuerpos monoclonales (Rivero, 2010).

II.3 ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) se descubrieron en la primera mitad de la década de los setenta, del pasado siglo, por Milstein y Köhler en el laboratorio de biología molecular de Cambridge (Reino Unido). Estos autores investigaban los mecanismos moleculares de la generación de diversidad de los anticuerpos y necesitaban producir una

célula B inmortal con especificidad conocida, para así poder analizar en detalle las mutaciones de los genes de las Ig. Para ello fusionaron una línea de células de mieloma murino, sensible a ciertos fármacos, con células de bazo de un animal inmunizado (Milstein y Köhler, 1975). Mediante este procedimiento consiguieron seleccionar solamente las células híbridas y los clones con especificidad conocida. Su trabajo fue publicado en Nature en 1975 y 9 años más tarde recibieron el premio Nobel por este descubrimiento (García, 2011).

La utilidad de los AcM se debe a tres características: su especificidad de unión, su homogeneidad y su capacidad para producirse en cantidades ilimitadas. La producción de estas moléculas permitió la obtención de reactivos con una especificidad única y elegida, debido a que todos los anticuerpos producidos por descendientes de una célula de hibridoma son idénticos y pueden ser utilizados para probar la presencia de un epítipo deseado. Una ventaja única de esta tecnología es que pueden usarse antígenos impuros para producir anticuerpos específicos (Greenfield, 2014).

La tecnología de hibridoma tuvo gran éxito en la generación de AcM con especificidad de reconocimiento a los antígenos presentes en las membranas de los eritrocitos humanos, sustituyendo así al suero humano. Para la generación de estos hibridomas se han desarrollado protocolos que emplean ratones de laboratorio *BALB/c* y como material inmunogénico: eritrocitos grupo específicos, membranas celulares de amígdala humana, líneas celulares de cáncer de colon humano, fluido de quiste de ovario, saliva de individuos secretores, oligosacáridos sintéticos (Little y col., 2000; León y col., 2004; Wittig y col., 2006; Iyer y col., 2006; Abhyankar y col., 2012).

A finales de los años setenta y principio de los ochenta, del siglo XX, tanto en Inglaterra como en Canadá se produjeron anticuerpos de tipo IgM contra el sistema ABO, con características adecuadas para ser utilizados en la hemoclasificación eritrocitaria. Posteriormente estos reactivos fueron producidos a escala industrial con la consecuente disminución de los costos y con distribución universal (García, 2011).

II.3.1 Producción de anticuerpos monoclonales.

El rendimiento en cultivo de los hibridomas no es muy alto y por ello se ha desarrollado la técnica de producción *in vivo* de ascitis en ratones mediante la inyección intraperitoneal de los hibridomas, método no aceptado en todos los países por cuestiones éticas relacionadas con el tratamiento de animales como biomodelos experimentales (Maldonado, 2016).

Como alternativa se utilizan los procedimientos *in vitro* mediante la fermentación de cultivos de células de mamífero, utilizando biorreactores y sistemas de cultivo de perfusión continua (García, 2011).

- Producción de AcMs *in vivo*.

La tecnología *in vivo* se usa generalmente para la producción de pequeñas cantidades de AcM. Los productores de ascitis, pueden proporcionar cantidades de anticuerpos a diferentes escalas, desde unos pocos miligramos a kilogramos por año, para ellos se utilizan instalaciones que han sido diseñadas para cumplir con las Buenas Prácticas de Producción (Flickinger y Drew, 1999).

En la producción *in vivo* de AcM, los ratones son los animales de preferencia y sobre todo los de la especie *BALB/c*. En un estudio realizado por Xie, donde se realizó una revisión de las publicaciones entre el 2008 y el 2011, los resultados mostraron que el ratón es el animal de laboratorio preferido; las cepas de ratón y rata más utilizadas son los ratones *C57BL/6*, los ratones *BALB/c*, las ratas *Sprague-Dawley*, y las ratas *Wistar* (Xie, 2012).

La cavidad abdominal de los ratones ofrece condiciones de cultivo óptimas para las células, tales como una temperatura constante, un suministro óptimo de nutrientes y oxígeno, y una eliminación óptima de CO₂ y residuos metabólicos, es utilizada para incubar las células de hibridoma, las cuales son inyectadas y luego crecen y secretan anticuerpos que se concentran en el líquido ascítico, el que es colectado mediante extracciones repetidas (Flickinger y Drew, 1999).

Para cada hibridoma es necesario determinar la dosis de células a inocular, de manera que se obtenga el mayor porcentaje de animales prendidos, pero que también permita una mayor sobrevivencia del ratón. Se reporta una relación inversamente proporcional entre el número total de células tumorales y la vida del animal y directamente proporcional con el prendimiento del tumor en el animal (Esparraguera, 2006). En trabajos previos realizados con hibridomas, generalmente se recomienda concentraciones entre 0.5 y 5·10⁶ células por ratón en no más de 1 ml de suspensión. Algunos reportes indican que al inocular un número de células mayor el promedio de vida de los ratones es de 8 días, mientras que con un número de 10⁶ este tiempo se alarga aproximadamente a 12 días. Un mayor inóculo conlleva a un tiempo de supervivencia menor e igualmente aumenta el dolor y la angustia inducida en el animal por la acumulación excesiva de líquido en el abdomen (González y col., 2015).

Para evitar la producción de tumores sólidos durante la producción de ascitis, se ha propuesto ajustar la concentración de células de hibridoma a inocular, para lograr un balance entre la no producción de grandes masas sólidas asociadas a la ascitis y el mayor rendimiento posible, teniendo en cuenta que cada hibridoma puede manifestar características específicas (Castillo y Gavilondo, 1989). La aparición de tumores sólidos en la cavidad peritoneal durante la producción de ascitis, tiene como desventaja la disminución del rendimiento del proceso, porque el Ac solo se encontrará en el suero del animal, trayendo como consecuencia que estos animales deberán ser desechados de la producción, provocando pérdidas económicas (Fuentes y col., 2003).

La producción de ascitis murina tiene como principales ventajas altas concentraciones de AcMs que a menudo no requieren de procedimientos adicionales de concentración que pueden desnaturalizar el anticuerpo y disminuir la efectividad. Requiere menor experticia del personal y servicios ingenieros de bajos requerimientos técnicos. Este método de producción requiere de condiciones ambientales controladas para los ratones inmunodeficientes, lo que puede resultar costoso, además demanda de grandes cantidades de animales que necesitan diariamente mantenimiento. Otra desventaja está dada porque la ascitis contiene varias proteínas de ratón y otros contaminantes, siendo frecuentemente necesarios varios procesos posteriores de purificación o uno de alta afinidad, con la relación de costes que estos presuponen. Por otra parte, se incurren en cuestionamientos bioéticos por el empleo de animales de laboratorio, a los cuales se les causa dolor durante los procedimientos (National Research Council, 1999; Miranda, 2011).

- Producción de AcMs *in vitro*.

A finales de la década 1970' comenzaron a realizarse cultivos celulares *in vitro* para la producción a gran escala de una amplia gama de productos dirigidos a la salud humana. Desde entonces se han estudiado las condiciones ambientales necesarias para una eficaz proliferación celular *in vitro*, lo cual ha motivado el desarrollo de medios de cultivos para proveer un ambiente químico-físico adecuado y favorecer el proceso de crecimiento y producción celular. Como consecuencia, varios tipos de equipos para controlar las condiciones ambientales del cultivo han sido diseñados, dando lugar al sistema de biorreactores utilizados actualmente en la industria biofarmacéutica (Chico y col., 2008).

Entre las principales características que debe cumplir un biorreactor se encuentran:

1. Control del equilibrio ácido-base (pH) del medio de cultivo.
2. Control de temperatura.
3. Proveer un adecuado intercambio de gases para suplir a las células de oxígeno y remover el exceso de dióxido de carbono.
4. Entradas para la adición de nutrientes a través de adecuadas formulaciones de medio de cultivo.
5. Superficie de adhesión para las células dependientes de anclaje.
6. Mantener condiciones de asepsia.

Al principio, para el cultivo celular se desarrollaron sistemas que no poseían controles, tales como frascos estacionarios (frascos-t), botellas rotatorias (*rollers*) y frascos agitados (*spinners*). Con el incremento de la escala productiva biorreactores de tanque agitados, sistemas basados en el uso de bolsas desechables (biorreactores de olas) y de agitación orbital (*Shake flasks, TubeSpin*) son comúnmente empleados para el crecimiento celular.

Los procesos *in vitro* de producción de anticuerpos monoclonales comprenden dos etapas fundamentales: cultivo celular (fermentación) y purificación. Para asegurar la consistencia y reproducibilidad, es importante utilizar siempre materias primas con propiedades idénticas, resultando necesario en cada lote de productivo, emplear la misma línea celular. Para garantizar la disponibilidad de células y el mantenimiento de sus características, una cantidad suficiente son preservadas en bancos celulares criopreservados en nitrógeno líquido a -196°C .

El proceso de fermentación comienza con la descongelación de un criovial del banco de trabajo, luego se realiza la expansión de la población celular a través de una serie de siembras en diferentes frascos de cultivo. Después las células se transfieren al biorreactor de producción, donde continúan creciendo y se acumula el producto expresado en el caldo de fermentación.

Las características del crudo cosechado del proceso de fermentación varían en función del medio de cultivo empleado, la productividad y características propias de la línea celular y de las condiciones de fermentación. El diseño de los procesos de purificación depende fundamentalmente de las características del crudo de fermentación y de la calidad requerida del producto final (Chico y col., 2008).

Entre las principales desventajas del cultivo celular están dadas por los complejos requerimientos técnicos de los biorreactores para asegurar un adecuado crecimiento celular, lo cual viene aparejado por un costo de inversión elevado. Además, las células

necesitan para su desarrollo el medio de cultivo y suplementos como suero, plasmas y fluidos tisulares entre otros, que provocan el incremento de los gastos productivos (Cárdenas, 2013).

El principal beneficio que ofrece la fermentación *in vitro* comparada con el proceso *in vivo*, es la facilidad de aumento de la escala productiva. En la década de 1980 las concentraciones de producto estaban típicamente en el intervalo de 1-100 $mg \cdot l^{-1}$ y luego de un desarrollo intenso en el trabajo con las líneas celulares, optimización del medio de cultivo y condiciones de operación, se han logrado obtener concentraciones de producto de 1-10 $g \cdot l^{-1}$ y productividades volumétricas de 500 $mg \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$, además de biorreactores de 2000 l de capacidad máxima (Huang y col., 2010).

II.3.2. Biorreactores.

Un biorreactor, es un recipiente comúnmente cilíndrico que puede variar en tamaño, desde unos milímetros hasta metros cúbicos, donde se pretende mantener ciertas condiciones ambientales, como el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno y otras, dentro de procesos químicos o biológicos (Frahm y col., 2002).

Comercialmente los biorreactores que se utilizan para cultivar células eucariotas son modificaciones de reactores utilizados para la fermentación de células procariontas, sin embargo, las células eucariotas son más frágiles a los esfuerzos cortantes que las procariontas, ya que están rodeadas por una membrana frágil que puede dañarse por colisiones con las paredes del biorreactor o por los esfuerzos cortantes que se generan en el fluido. En dependencia del tipo de célula eucariota -si esta es dependiente de anclaje- se requiere una superficie sólida en donde se pueda reproducir, también es necesario abastecer continuamente de oxígeno y nutrientes, además de eliminar los desechos para satisfacer los requerimientos bioquímicos de las células, razones que han conducido al diseño de nuevos biorreactores, con la finalidad de proporcionar un ambiente adecuado para el cultivo celular (Morgan y col., 1995).

Un factor clave para la elección del biorreactor *in vitro* apropiado es la capacidad de producción del sistema, que debe cumplir requisitos cuantitativos a un precio asequible. La concentración de los anticuerpos en el medio de cultivo es importante, permite reducir el volumen de líquido necesario en la producción, así como el tiempo necesario para un paso de purificación adicional, para la obtención de Ac con aplicaciones inmunológicas. También es importante considerar los requisitos para el espacio de laboratorio, el material

complementario y la experiencia técnica. Los sistemas que operan fuera de una incubadora ahorran un espacio valioso que puede ser asignado a actividades alternativas de cultivo celular (Dewar y col., 2005).

- **Frascos Rotatorios.**

Desde el inicio de la manufactura de productos de células animales, los frascos rotatorios han sido utilizados, brindando al cultivo celular altas velocidades de transferencia de oxígeno, pues solo se utiliza del 10 al 30% de su capacidad total, por lo que el resto del volumen del frasco está ocupado por aire y como resultado se obtiene una gran superficie de contacto entre la fase gaseosa y una fina película de medio líquido en la pared de la botella. Por otra parte, el mecanismo de homogenización (base exterior de agitación) controla la formación de espuma en el cultivo, lo cual ocasiona poco daño a la pared celular (Wurm, 2004; Berson y Friederichs, 2008; Coorning Incorporated, 2010). Este sistema resulta flexible, pues permite una rápida ampliación o reducción de la capacidad productiva, ya que pueden colocarse varias bases de agitación en una misma instalación, donde pueden acomodarse hasta miles de botellas para la producción (Anexo 1) (Simón, 2015; Fahey, 2002).

- **Biorreactores de olas.**

Los biorreactores desechables o de un solo uso, fueron introducidos a finales de la década del '90 del pasado siglo, constituyen un sistema de cultivo que satisface los requerimientos planteados anteriormente. Inicialmente, solo eran empleados a escala de laboratorio frascos, frascos rotatorios o biorreactores de fibra hueca, que eran ofertados para un solo uso y de material plástico. Como estos dispositivos no pueden ser esterilizados por calor o vapor, son sometidos a un tratamiento de pre esterilización por radiación o con óxido de etileno y desechados después de su uso (Shukla y Gottschalk, 2013).

El desarrollo de biorreactores desechables o de un solo uso, como alternativa a los sistemas comunes de cultivo, en su mayoría reutilizables, abrió un nuevo campo para esta técnica. La idea era abordar los problemas relacionados con el desarrollo temprano de los procesos, tales como la flexibilidad, rentabilidad, tiempo de comercialización, así como la calidad y las cuestiones reglamentarias (Portner, 2015). El primer biorreactor desechable introducido al mercado tenía un volumen de trabajo de 20 l, en la actualidad se pueden encontrar volúmenes disponibles de hasta 2000 l (Ecker y Ransohoff, 2014; Hernández, 2015).

Un diseño que ha tenido gran aceptación desde su surgimiento es el biorreactor de ola; consiste en una bolsa desechable que se encuentran en una plataforma de oscilación (Anexo 2). El movimiento de balanceo permite que los medios se mezclen y se proporcione una entrega mejorada de los componentes a las células. También proporciona una mejor transferencia de gases y evita que las células se asienten en el fondo de la bolsa, por lo que están realmente en un estado de suspensión. Tiene la flexibilidad adicional de poder funcionar como un cultivo tradicional o como un sistema de perfusión (Sargent, 2012).

El cultivo células de hibridoma para la producción de anticuerpos es una aplicación muy utilizada para el sistema de biorreactores de ola (Eibl y col., 2010). Las células son fáciles de cultivar y puede aumentarse el volumen fácilmente, inclusive a un factor de escala de 10, reduciendo los requerimientos de inóculo y la necesidad de pases. Por ejemplo, puede iniciarse una bolsa de 200 l con tan solo 10 l de cultivo y se puede añadir medio fresco coincidiendo con el crecimiento celular y llevar el volumen final del lote a 100 l. Debido a la variedad de patrones de crecimiento de las líneas celulares parentales de los hibridomas, es importante caracterizar antes de escalar (GE Company, 2008).

Por otro lado, los biorreactores desechables han incrementado su uso en el sector biotecnológico, debido a las facilidades de flexibilidad que brindan a los procesos de cultivo, acortando los tiempos de espera entre corridas productivas por la eliminación de los requerimientos de limpieza y esterilización, que son característicos de los procesos tradicionales con biorreactores de acero inoxidable (Anexo 3) (GE Healthcare, 2012). Otra ventaja es la disminución del capital de inversión y de los costos de operación, debido a que se reduce los consumos de agua purificada, gases y energía eléctrica, también requiere de un sistema automático menos complejo para su manipulación (Boedeker, 2014). Numerosas líneas de células animales tales como CHO, HEK, NSO y otras, han sido cultivadas satisfactoriamente en sistemas de biorreactores de ola, demostrándose la flexibilidad de este dispositivo (Hernández, 2015).

II.3.3. Modos de operación de los biorreactores.

Los biorreactores en fermentación son manipulados bajo diferentes formas o modos de operación, lo que les confiere flexibilidad en función de los objetivos y el contexto en que se desarrolla la producción. Estos modos de operación son: cultivo por lote, cultivo por lote alimentado, cultivo continuo y cultivo continuo con retención de biomasa o

perfusión. En el argot industrial se utiliza frecuentemente estos términos en idioma inglés, siendo los mismos *batch*, *fed-batch*, *continuo* y *perfusion* respectivamente (Puisseaux, 2016).

Al operar en modo de operación cultivo por lote o *batch* primeramente las células son inoculadas dentro del biorreactor. Estas se dividen hasta alcanzar la concentración deseada de biomasa y/o productos y luego se cosecha. Las células crecen a partir de una siembra inicial hasta alcanzar una concentración celular final de $1 - 3 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ en un tiempo aproximado de 4 a 7 días (Arathoon y Birch, 1985). En este tipo de cultivo no hay flujos de entrada ni de salida (Aiba y col., 1970), solo el oxígeno es suministrado de forma continua, por lo que es considerado un sistema cerrado.

La productividad del cultivo por lote generalmente está limitada por la baja concentración celular y por consiguiente, la concentración del producto es baja. Esto se relaciona al hecho de que las concentraciones iniciales de los sustratos deben ser relativamente bajas para evitar la muerte celular debido a los efectos osmóticos, así como al hecho de que las células son sometidas a condiciones medio ambientales que cambian durante el proceso entero (Morbach y Krämer, 2003).

La baja productividad puede mejorarse ligeramente llevando a cabo el proceso por los lotes repetidos o también conocido como semicontinuo, el mismo consiste en crecer las células de forma exponencial hasta el máximo valor permitido por el sistema y hacer cosechas continuas, dejando en el biorreactor suficiente células para continuar el cultivo (Vitón, 1998). El suministro de medio de cultivo fresco y la extracción del cultivo de forma intermitente, permite que las variaciones en las concentraciones de las diferentes sustancias presentes en el fermentador no sufran cambios importantes (Victores y col., 2008).

Otro modo muy empleado es el cultivo por lote incrementado, el que consiste en añadir escalonadamente los sustratos a medida que progresa la fermentación. Esto permite obtener altas densidades celulares; por lo que se necesita una concentración de sustrato inicial baja en el medio de cultivo e ir añadiendo el resto al medio lentamente para que no exista inhibición (Hernández, 2014). La principal ventaja es que impide la sobrealimentación de sustrato y de esta manera permite evitar la inhibición de la velocidad de crecimiento (μ). Además, con una tasa de alimentación adecuada, es posible regular μ en valores menores a la velocidad de crecimiento máxima (μ_{\max}). De este modo se alcanzan condiciones óptimas para la generación de un determinado producto, se evitan

los problemas asociados a la limitación por oxígeno, mejorar la reproducibilidad del proceso, maximizar el crecimiento celular, obtener altas concentraciones de biomasa al evitarse el efecto tóxico de los nutrientes. Por estas razones, este modo de cultivo es a menudo preferido por sobre los otros modos de operación (Erm y col., 2014).

En el modo de operación continuo se tiene tanto flujo de entrada como de salida. En este tipo de cultivo la velocidad de dilución puede variarse en un intervalo que va desde una velocidad mínima cero (lo que conllevaría a la realización de un cultivo por lote), hasta la μ_{max} . Si se intenta operar a diluciones mayores a un valor de dilución crítico se produce el lavado del biorreactor. Cuando parte de la biomasa que fluye fuera del biorreactor es reciclada, utilizando por ejemplo un tanque sedimentador, a este nuevo modo de operación se le nombra cultivo continuo con perfusión (Nuñez, 2014).

En cuanto a las concentraciones celulares alcanzadas y la extensión de las corridas de fermentación, se encuentran en extremos opuestos el modo “batch” y el modo perfusión. El cultivo por lote y el cultivo continuo son los utilizados con mayor periodicidad en los estudios de investigación y desarrollo de procesos. El primero es el más simple de aplicar y permite obtener resultados experimentales con gran actividad y eficiencia debido a su corta duración y bajo costo. El segundo resulta muy útil para la caracterización celular pues permite crear un ambiente constante en la mayor parte de los parámetros relevantes del proceso, que garantizan el establecimiento de estados fisiológicos definidos (Arathoon y Birch, 1985).

II.4 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO CELULAR.

Cuando se estudia el comportamiento cinético de un sistema es necesario entender como las concentraciones de los componentes representativos del mismo (substratos celulares, productos y subproductos) varían con el tiempo. La cinética se obtiene determinando experimentalmente la concentración de cada componente deseado en diferentes tiempos del proceso de fermentación (Nuñez, 2014). En un experimento cinético existen hasta cinco fases claramente identificables (**figura 4**): (1) fase de latencia (o adaptación), (2) fase exponencial, (3) fase de desaceleración, (4) fase estacionaria y (5) fase de decrecimiento (o de muerte).

La fase de latencia ocurre debido a la adaptación del microorganismo a las nuevas condiciones ambientales a las que se encuentra sometido. Esto incluye la síntesis de las enzimas necesarias para la actividad metabólica que deben realizar en el nuevo entorno.

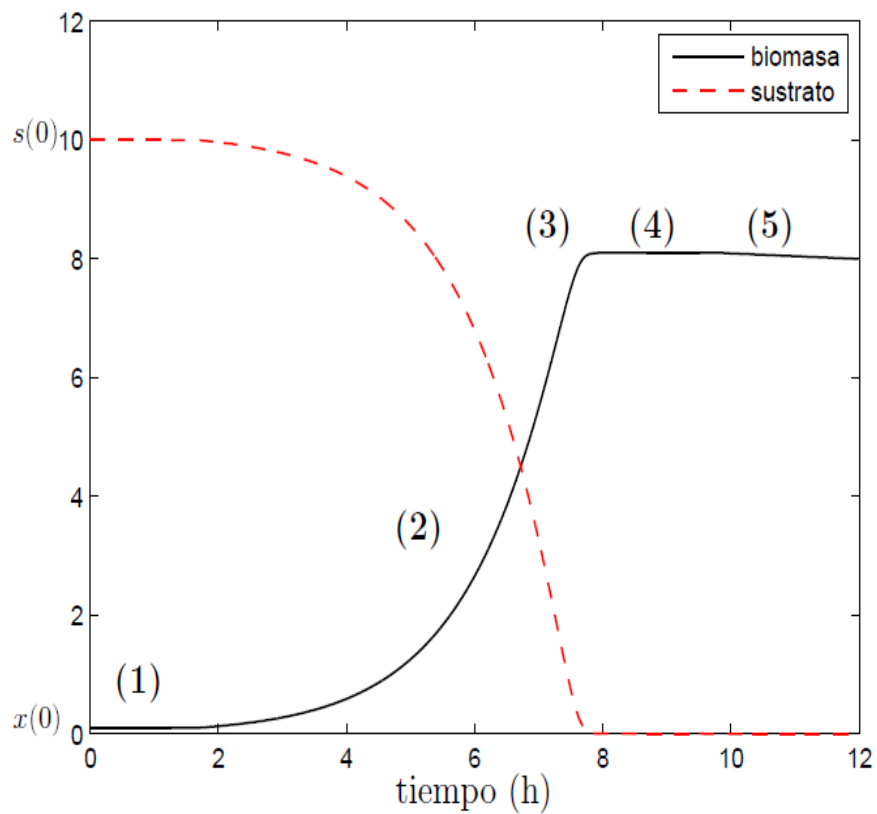


Figura 4. Curva característica del crecimiento celular (Tomado de Núñez, 2014).

Leyenda: 1) fase de latencia o adaptación, (2) fase exponencial, (3) fase de desaceleración, (4) fase estacionaria y (5) fase de muerte.

La duración de esta etapa, depende del microorganismo y de las condiciones del biorreactor, puede acortarse si la biomasa es transferida desde un medio de cultivo similar. Una vez adaptado a las nuevas condiciones, el microorganismo comienza a crecer.

En la etapa de crecimiento exponencial, el sustrato principal se encuentra en exceso. Si la tasa de crecimiento depende de un sustrato limitante y los factores ambientales son adecuados, entonces se alcanza la velocidad máxima de crecimiento. Luego, al reducirse las concentraciones de los sustratos, la tasa de crecimiento disminuye hasta que, eventualmente, la etapa de crecimiento culmina. Usualmente, el medio de cultivo se prepara de manera tal de que el sustrato limitante sea la fuente de carbono. No obstante, el crecimiento también puede detenerse debido a inhibición generada por sustancias acumuladas durante la fase de crecimiento exponencial.

En la fase estacionaria la tasa de crecimiento neta es nula. Finalmente, la concentración de biomasa puede reducirse debido a muerte de las células o al metabolismo endógeno; esto último se refiere a reacciones en las células que consumen sustancia de las células mismas.

II.5 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

El principio que rige el diseño de un medio de cultivo es determinar la composición de elementos que, mezclados, en una adecuada proporción, creen un ambiente físico-químico apropiado para favorecer el crecimiento de una determinada línea celular. Suele contener una mezcla compleja de componentes orgánicos, tales como aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos junto a sales inorgánicas tamponantes (Hesse y Wagner, 2000).

Algunos medios contienen suero sanguíneo o suero bovino (5 a 20%) para el aporte de factores de crecimiento, elementos trazas, proteínas inhibitoras de proteasas, y otros factores desconocidos. El suero fetal bovino tiene un alto contenido en proteínas, lo que puede ser problemático cuando se cultivan células de hibridoma para la producción de AcMs y, a menudo, se requieren etapas adicionales de procesamiento para la purificación de estos anticuerpos a partir de sobrenadantes que contienen suero (Even y col., 2006). Otras desventajas que tiene su empleo es que provoca variabilidad del contenido de nutrientes entre lotes, irregularidad de los suplementos, y posibilidades de contaminación

con partículas virales o priones, además de tener un precio elevado (Pandey, 2010; Doran y García, 1998).

Debido a estas desventajas se han desarrollado medios libres de proteínas, basados en el reemplazo de los suplementos de origen proteico por suplementos no proteicos. Estas formulaciones son diseñadas para líneas específicas y tienen como desventaja con respecto a los medios suplementados con sueros, la disminución de la protección ante los esfuerzos cortantes en los cultivos agitados, siendo necesario adicionar sustancias protectoras como el *Pluronic F68*, por otro lado, las acciones de las proteasas en el caldo de cultivo no se neutralizan (Zhang y Robinson, 2005; Tharmalingam y col., 2008). Sin embargo, habitualmente no se publican la composición de los medios los que son considerados “know how”, lo cual dificulta en algunos casos el desarrollo de los procesos posteriores de purificación, sobre todo porque en la composición de dichas formulaciones se incorporan hidrolizados de proteínas de plantas y oligopéptidos sintéticos (Franěk y col., 2000).

Existen también medios clasificados de químicamente definidos, siendo aquellos que se conocen con exactitud la composición desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. Sus limitantes están en no siempre proveer de todos los macro/micronutrientes requeridos o encarecer su formulación, para fines productivos. No obstante, la evolución de las formulaciones en los medios de cultivo, ha conducido al abaratamiento de los costos de producción, debido a la simplificación de los procesos de purificación al disminuir el perfil de impurezas presentes en el sobrenadante de cultivo; también se logra una mayor reproducibilidad entre lotes de producción y se reducen los riesgos de transmisión de agentes infecciosos, logrando estimular la proliferación celular con resultados comparables a los obtenidos en medios suplementados con suero (Invitrogen Corporations, 2001; LifeTechnologies, 2014).

II.5.1. Optimización de medios de cultivos.

Históricamente se han realizado numerosos esfuerzos para reducir o eliminar el suero del medio de cultivo, han surgido formulaciones basales enriquecidas con nutrientes proteicos de origen animal como la insulina, transferrina y otros péptidos o aminoácidos (Aj y col., 1990; Yee y col., 1989).

La insulina es un pequeño polipéptido de 5,7 *kDa* que es conocido por tener múltiples efectos en la fisiología celular, actúa como factor de crecimiento y mantenimiento en las

células, incluyendo el transporte por la membrana, metabolismo de la glucosa y biosíntesis de ácidos nucleicos y ácidos grasos. Se presenta normalmente en el suero animal y suele añadirse como suplemento a los medios libre de suero a concentraciones que oscilan alrededor de $5-10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Butler, 2015).

Los aminoácidos constituyen después de los carbohidratos, las fuentes de carbono disponibles más abundantes en los medios de cultivo para las células de mamíferos e hibridomas. Por regla general, la glutamina es el aminoácido de mayor concentración en los medios de cultivo. En estudios efectuados para diversas líneas celulares e hibridomas, ha sido correlacionada muy bien la velocidad específica de consumo de la glutamina con la de la glucosa y con la de producción de amonio, metabolito resultante de la degradación de este aminoácido (Galván, 2013).

El amonio, al igual que el lactato, se refiere como un inhibidor de la proliferación celular a partir de ciertas concentraciones, las cuales varían de una línea celular a otra. La degradación espontánea de la glutamina en el medio de cultivo hace que sólo el 75 % de esta sea aprovechada por la célula y que en ciertos casos se registren concentraciones de amonio diferentes de cero para el tiempo inicial de la fermentación. Este proceso es altamente dependiente de la temperatura por lo que las condiciones de almacenamientos de los medios de cultivo se consideran muy importantes en los procesos productivos (Galván, 2013).

La operación en modo de operación semicontinuo en los biorreactores de olas no permite que se alcancen altas concentraciones de lactato o amonio en el caldo de cultivo, disminuyendo este problema para el proceso productivo (Tang y col., 2007).

II.6 ÁMBITO REGULATORIO PARA REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES.

Los reactivos hemoclasificadores son diagnosticadores que tienen asociados un alto riesgo para la salud del paciente, un fallo en su funcionamiento puede provocar un daño importante e incluso la muerte en el paciente, por estas razones están clasificados en la “Categoría III” de máximo riesgo, por la entidad que regula su uso y comercialización en Cuba: el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED, 2011).

Para la determinación de los parámetros de calidad, son utilizadas técnicas de hemaglutinación, las cuales se basan en el enfrentamiento del anticuerpo con su antígeno específico en los eritrocitos, donde el azúcar terminal del antígeno se combina con el

anticuerpo (Grispan, 1983). Esta interacción es macroscópica, de ahí su utilidad en el laboratorio.

El CECMED establece en la Regulación No.59-2011 los requisitos que deben cumplir los hemoclasificadores del sistema ABO. Entre los parámetros de calidad se encuentran: potencia, avidez y especificidad.

-Potencia: Es el recíproco de la mayor dilución del reactivo donde se observa una reacción de aglutinación. La mínima potencia es de 512.

-Avidez: Es el tiempo que media entre la mezcla del reactivo con los eritrocitos y la aparición de la aglutinación. Debe ser menor o igual a 30 s.

-Especificidad: La capacidad del producto para identificar correctamente las muestras carentes del antígeno en cuestión. Se establece mayor o igual a 2+.

El sistema de calidad de LABEX tiene establecidas especificaciones para cumplir con los requisitos de la Regulación No.59-201. Para ello existen controles durante todo el proceso, para chequear el cumplimiento durante el desarrollo de todas las etapas productivas hasta la obtención del producto final.

La Organización Mundial de la Salud ha establecido estándares o patrones para regular el uso de los reactivos para la tipificación de los grupos sanguíneos que son internacionalmente comercializados. En un estudio publicado en el 2006, se propuso establecer como potencia de aglutinación mínima 256 para los hemoclasificadores anti-A y anti-B, a partir de los resultados de un ensayo ejecutado por 14 centros evaluadores de referencia mundial, con diferentes reactivos comerciales (Expert Committee on Biological Standardization, 2006).

No obstante, para cumplir la regulación existente en el país, el Hemoclasificador anti-B que se produce en LABEX deber ser liberado para uso con una potencia mínima de 512 y se ensaya con muestras de sangre B y AB (LABEX, 2009).

Para el desarrollo de un nuevo proceso productivo del Hemoclasificador anti-B podría evaluarse tecnologías *in vivo*, la que permite obtener productos concentrados pero brinda pequeños volúmenes de producto, o se podría utilizar tecnologías *in vitro* que permitiría aumentar los niveles de producción. Para ello se debe seleccionar un medio de cultivo que proporcione al hibridoma seleccionado o disponible, los nutrientes y características fisicoquímicas adecuadas para un buen crecimiento y productividad, monitoreando los indicadores de calidad aprobados por la regulación existente en el país o internacionalmente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III.1. LÍNEA CELULAR.

La línea celular utilizada es el Hibridoma anti-B, (clon BMS-4), secretor de una inmunoglobulina murina del tipo IgM (AcM anti-B), la cual reconoce específicamente al antígeno B sanguíneo en la superficie celular de los eritrocitos humanos. Las células se encuentran en el banco celular del LABEX, conservadas en crioviales con medio RPMI a -196°C y atmósfera de nitrógeno (LABEX, 2015).

III.2. MEDIO DE CULTIVO.

- RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)

El hibridoma fue cultivado en medio RPMI-1640 (SIGMA™) suplementado con Suero Fetal Bovino al 8 %. La formulación basal RPMI 1640 fue desarrollada por Moore y sus colaboradores del Roswell Park Memorial Institute para mantener células humanas en cultivo (www.laboratoriomicrovet.com). El medio se preparó del siguiente modo: RPMI 1640 en polvo ($10.34\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), Bicarbonato de Sodio ($2.00\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), Piruvato de Sodio ($0.11\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), L-Glutamina ($0.30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), 2-Mercaptoetanol ($0.01\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$), HEPES ($4.30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) y Suero Fetal Bovino ($80\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$).

- PFHM (*Protein-free Hybridoma Medium*).

Para el cultivo celular se preparó medio de cultivo PFHM-II, reactivo que es comercializado por la firma Gibco®, de Invitrogen Life Technologies™. Es un producto libre de suero animal y de proteínas, optimizado para el crecimiento de hibridomas y la producción de anticuerpos monoclonales (www.fishersci.com).

Fueron estudiadas tres formulaciones o variantes de medio de cultivo PFHM-II, para potenciar el crecimiento celular. Las cuales se describen a continuación:

A - Formulación del medio PFHM

- Medio en polvo PFHM-II: $15.01\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- L-Glutamina: $0.30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- Bicarbonato de sodio: $2.00\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- Pluronic F-68: $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

B - Formulación PFHM + Glutamina

A esta formulación de PFHM se le adicionaron $0.485\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de L-Glutamina para incrementar la concentración de glutamina del medio (A) de $4\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $8\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

C - PFHM + Insulina

En este caso se le adicionó al medio basal (formulación A), $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Insulina. Para la preparación se disolvieron todas las sales en agua purificada. Luego se ajustó el pH en el rango 6.9-7.1, mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado. Se realizó la filtración esterilizante por filtros de $0.2 \mu\text{m}$ (Sartorius®) y todos los medios fueron envasados en frascos estériles de 1l de vidrio (Duran®) o en bolsa de polietileno de 200 l (Sartorius®) en el caso del medio para la escala productiva. Los frascos fueron mantenidos durante 72 horas en cuarentena para la comprobación de la esterilidad.

III.3. CULTIVO CELULAR.

III.3.1. Adaptación a medio de cultivo PFHM.

La adaptación del Hibridoma anti-B a medio libre de proteínas se realizó mediante una modificación del método de adaptación secuencial descrita en protocolo de ThermoFisher Scientific™, que consistió en la sustitución del medio RPMI por el medio de cultivo PFHM (ThermoFisher Scientific, 2002).

Inicialmente se sembraron las células procedentes del medio RPMI + 8% SFB a medio PFHM suplementado con 8 % SFB. Una vez que las células alcanzaron alta confluencia y una típica morfología celular, se realizó la disminución del contenido de suero en un 50%, y así consecutivamente hasta lograr eliminar completamente este suplemento. Esta primera fase se ejecutó en frascos de cultivo estacionarios (Greiner Bio-One™) hasta que fue eliminado totalmente el SFB. La etapa final de la adaptación se desarrolló en cultivo agitado empleando frascos rotatorios (Greiner Bio-One™). Cuando las células estuvieron adaptadas al medio sin suero se realizó la congelación del cultivo.

Los parámetros del cultivo que se fijaron para determinar que el hibridoma estaba adaptado fueron:

- Viabilidad celular del cultivo superior al 85 %.
- Concentración celular superior a $1\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Durante las diferentes etapas fueron tomadas muestras del cultivo y se determinó la actividad biológica.

III.3.2. Obtención del inóculo.

Para iniciar los cultivos celulares, se realizó la descongelación de un criovial del banco celular de anti-B. Luego se realizó la expansión celular, donde se utilizaron frascos de cultivo estándar de 25, 75, 175 cm^2 (Greiner Bio-One™) secuencialmente, hasta alcanzar la cantidad de células necesarias para iniciar los estudios a escala de laboratorio en frascos rotatorios.

En la obtención del inóculo para la fermentación a escala productiva, el cultivo celular de los frascos de 175 cm^2 fue transferido a 6 frascos rotatorios de 850 cm^2 (Greiner Bio-One™) con un volumen de 500 ml de medio de cultivo PFHM. Fueron empleadas pipetas desechables de 5, 10, 25 y 50 ml (Greiner Bio-One™) para la extracción y adición de medio a los frascos.

El inóculo para el proceso de obtención de LAM anti-B se obtuvo en frascos agitados (Integra Biosciences™) con 500 ml de medio RPMI + 8% SFB.

III.3.3. Caracterización cinética del Hibridoma anti-B.

Los estudios cinéticos a escala de laboratorio se realizaron por triplicado con cada formulación de medio de cultivo PFHM y con el medio RPMI (descritas en el acápite III.2), en frascos rotatorios de 850 cm^2 (Greiner Bio-One™), a una temperatura de 37°C y a una velocidad de agitación de 3 rpm en una Base de agitación CELLROLL (CELLspin®). La concentración inicial fue de aproximadamente $0.25 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ en un volumen total de 500 ml .

Fueron tomadas muestras de 1 ml de cultivo con una frecuencia diaria para el conteo celular y para la determinación de los parámetros cinéticos. Para ello se centrifugó la muestra del cultivo a 1000 rpm durante 5 min , para eliminar las células y determinar posteriormente la actividad biológica al sobrenadante de cultivo.

III.4. PRODUCCIÓN *IN VIVO*

III.4.1. Biomodelo.

Se emplearon ratones *BALB/c* de aproximadamente 10 semanas de edad procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con calidad sanitaria y genética certificadas. Los animales se mantuvieron en locales protegidos con un ciclo de iluminación de 10 horas luz - 14 horas oscuridad, la temperatura osciló entre los 20 ± 2 °C y la humedad relativa se mantuvo entre los 60 -

65 %, con inyección y extracción de aire a pleno. Se utilizaron cajas T₂, como recinto primario con tapas metálicas de acero inoxidable y biberones plásticos. Como encamado se utilizó bagazo desecado y desmeollado estéril. Se suministró dieta peletizada (ALYco[®], CENPALAB). El agua administrada fue filtrada por membrana de acetato de celulosa de 0.2 μ m y acidulada a pH 2,4-2,8.

Se conformaron 3 grupos de 100 animales cada uno, para un total de 300 ratones. Los animales se preinocularon con 0,2 ml de petrolato ligero por vía intraperitoneal, como parte del proceso de preparación previa de la cavidad abdominal. Transcurridos los 7 días se inocularon con el Hibridoma anti B, a la concentración de $1 \cdot 10^6$ células/ratón.

III.4.2. Inoculación y Recolección del LAM

El hibridoma fue inoculado utilizando como vehículo Tampón Fosfato Salino (PBS). A partir de los 10 días del proceso de inoculación comenzó la extracción del LAM por el método de punción en días alternos. Fueron realizadas seis extracciones en total. El líquido fue recolectado en tubos de centrifuga de 50 ml (Corning[®]) con EDTA disódico al 2 %.

Se realizó la clarificación de ascitis por centrifugación a 2500 rpm durante 20 min, en centrífuga refrigerada y se midió el volumen de líquido clarificado, que se almacenó a -20°C. Se conformó el lote mediante la unión de los volúmenes extraídos y luego se filtró mediante membrana de acetato de celulosa de 0.2 μ m.

Se evaluó en el proceso el rendimiento de ascitis por ratón y se calculó el porcentaje (%) de pérdidas de LAM, así como la potencia, avidéz e intensidad.

$$Rendimiento_{Ascitis/Ratón} = \frac{V_{Total\ LAM}}{Total_{Rat.Prend.}} \quad \dots \text{ (Ec.1)}$$

Donde:

$V_{Total\ LAM}$: Volumen total de Líquido Ascítico Murino (l).

$Total_{Rat.Prend.}$: Total de ratones prendidos

III.5. PRODUCCIÓN *IN VITRO*.

- Fermentación en Frascos rotatorios.

Para la producción de sobrenadante anti-B en frascos rotatorios de 850 cm^2 (Greiner Bio-One™) se empleó medio de cultivo RPMI + 8% SFB y las condiciones de operación descritas en el acápite III.3.3. El modo de operación que se utilizó fue el semicontinuo, donde luego de cada cosecha se adicionó medio de cultivo fresco para el ajuste de la concentración a $(0.30 \pm 0.05) 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$.

- Fermentación en Biorreactor de olas.

La fermentación a escala productiva se realizó en un Biorreactor de olas (Wave Bioreactor® de Applikon™), el cual tiene una capacidad de 50 l y un volumen de trabajo máximo de 25 l . Este sistema está formado por diferentes dispositivos interconectados y requiere de equipamientos y accesorios (Anexo 4). El conjunto completo que se empleó en los experimentos de este trabajo incluye:

- El controlador automático (*ez-Control*)
- El recipiente del reactor (bolsa plástica desechable).
- El dispositivo de agitación (*Rocker*).
- Las sondas de pH/O₂ y temperatura.
- Bomba para la toma de muestra, adición y extracción de medio de cultivo.
- Una cabina de seguridad biológica con flujo laminar de aire estéril, para la manipulación.
- Bolsa plástica de 200 l para el almacenamiento de las cosechas del cultivo.

El modo de operación empleado fue el semicontinuo, que consistió en la extracción periódica de suspensión celular (o caldo de cultivo) del biorreactor y la adición de medio de cultivo fresco, para el ajuste de la concentración celular a $(0.4 - 0.6) \cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Para mantener adecuadas condiciones medio ambientales durante el cultivo del Hibridoma anti-B en el biorreactor, se manejaron variables operativas del *ez-Control* y del *Rocker* (**tabla 1**). La agitación del biorreactor se controló a través del ángulo de oscilación y la velocidad de agitación en el *Rocker*. Para mantener los niveles de oxígeno disuelto en el cultivo, fue necesario administrar aire y oxígeno, estos flujos fueron controlados automáticamente por el *ez-Control* así como para el control del pH se adicionó CO₂ y aire. La temperatura se fijó a 37°C con un margen de variación de 0.5°C.

Tabla 1. Parámetros operativos del Biorreactor de Olas.

Parámetros de operación	Variables	
Agitación	Ángulo de inclinación de las oscilaciones del fermentador	13 ° para $V_{trab} < 15$ L 17° para $V_{trab} > 15$ L
	Oscilaciones por minuto	10 rpm
O₂ (20 - 40 %) pH (7,0 ± 0,1)	Flujo de Oxígeno	0,075 ± 0,01 L / min
	Flujo de Aire	1,000 ± 0,10 L / min
	Flujo de CO ₂	0,350 ± 0,05 L / min

A las muestras de la corrida se le realizó el conteo celular y se le determinó actividad biológica por técnicas de hemaglutinación. Las cosechas fueron acumuladas en una bolsa de 200 l hasta el término de la fermentación y se le midió a actividad biológica.

III.6. ETAPA DE CLARIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL SOBRENADANTE DE CULTIVO.

III.6.1. Clarificación de los sobrenadantes a escala productiva.

Para eliminar las células de las cosechas de la fermentación del Hibridoma anti-B fue empleado un sistema en cascada compuesto por tres filtros SARTOPURE PP2 (Sartorius®), con tamaño de poro de 8 a 0.2 μm y una Bomba peristáltica WM 520U (Watson Marlow®). La cosecha filtrada se almacenó en bolsas plásticas de 50 l y fueron tomadas muestras para la determinación de la actividad biológica.

El sobrenadante cosechado durante la producción en frascos rotatorios se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min para eliminar las células.

III.6.2. Concentración del sobrenadante filtrado.

El sobrenadante filtrado fue concentrado 5 veces empleando un cartucho de fibras huecas (Fresenius®) F4HPS de 0.8 m² de área de filtración con una porosidad de 30 kDa. Fueron utilizadas dos bombas peristálticas WM 520U, para fijar los flujos de circulación intra- y extra- capilar, los cuales fueron de 100 ml·min⁻¹ y 200 ml·min⁻¹.

A este concentrado se le determinó actividad biológica mediante la técnica de hemoaglutinación y se guardó en frascos de vidrio de 5 l (Duran®) a una temperatura de 4-8°C.

III.7. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y CÁLCULO DE VARIABLES.

III.7.1. Determinación de la concentración de células viables y totales.

La **concentración** y la **viabilidad celular** en procesos de cultivos, son usualmente determinados mediante técnicas de exclusión por colorante, las que tienen como principio básico que ciertos colorantes no son capaces de penetrar las membranas celulares intactas, pero sí aquellas que han aumentado su permeabilidad, efecto que se asocia con la muerte celular. Este principio fue el utilizado para las determinaciones de estos parámetros, mediante la aplicación del método de exclusión con el colorante Tripán azul al 0.4% (Griffiths, 1986).

Para ello se mezclaron 100 μ l de suspensión celular con 100 μ l de Tripán azul al 0.4% (para una dilución 1/2) y la mezcla se depositó en la cámara de Neubauer. La cámara montada se observó al microscopio óptico y se realizó el recuento de los cuatro cuadrantes de la cámara, del número de células viables (brillantes) y no viables (azules) en el microscopio óptico (Olympus®).

La concentración de células vivas muertas y totales se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$X_{v,d,t} = \frac{S_{v,d,t}}{n} \times Fd \times Fc \quad \dots \text{ (Ec.2)}$$

Donde:

$X_{v,d,t}$: concentración celular de las células vivas, muertas o totales según el caso a determinar ($cel \cdot ml^{-1}$).

$S_{v,d,t}$: suma de la cantidad de las células vivas, muertas o totales según el caso a determinar ($cel \cdot ml^{-1}$).

n : número de cuadrantes de la Cámara de Neubauer: 4 cuadrantes.

Fd : factor de dilución de la muestra en Tripán azul al 0,4 %. Es el inverso de la dilución, por tanto es 2.

Fc : factor constante de la cámara, derivado del volumen que encierra un cuadrante de la cámara: 10^4 .

La viabilidad del cultivo (Vb), representada por el porcentaje de las células vivas (Sv) con respecto a las células totales (St), en una suspensión celular se determinó por la siguiente ecuación:

$$Vb (\%) = \frac{Sv}{St} \times 100 \quad \dots \quad (\text{Ec. 3})$$

III.7.2. Determinación de velocidad específica de crecimiento máxima.

La velocidad específica de crecimiento se determinó en función de la variación de la concentración celular en el tiempo. El valor máximo de la velocidad específica de crecimiento se calculó a partir de un ajuste lineal de la curva de crecimiento en la fase exponencial utilizando la fórmula:

$$\mu_{max} = \frac{\ln X_{vf} - \ln X_{vi}}{t_f - t_i} \quad \dots \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

μ_{max} : velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1}).

X_{vf} : concentración celular (de células vivas o totales según el caso) en el último punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial ($cel \cdot ml^{-1}$).

X_{vi} : concentración celular (de células vivas o totales según el caso) en el primer punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial ($cel \cdot ml^{-1}$).

t_f : tiempo transcurrido en el último punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial (h).

t_i : tiempo transcurrido en el primer punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial (h).

III.7.3. Determinación del tiempo de duplicación.

El tiempo de duplicación se fundamenta en el tiempo en que la concentración de células se duplica, teniendo su menor valor cuando el cultivo se encuentra en la fase de crecimiento exponencial (Henry y col., 2008). Este parámetro se calculó por la siguiente fórmula:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad \dots \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

td : tiempo de duplicación de las células en cultivo en fase de crecimiento exponencial (h).

III.7.4. Determinación de la concentración final de células en el Biorreactor.

En el modo de operación semicontinuo se adiciona medio al fermentador después de haberse realizado la cosecha de fermentación, para suministrar los nutrientes necesarios a las células para su crecimiento, para la determinación de la concentración final de células se utilizó la siguiente ecuación:

$$X_{vf} = \frac{X_{vi} \times V_i - X_{vi} \times V_{cos}}{V_f} \quad \dots \quad (\text{Ec.6})$$

Donde:

V_i : volumen del fermentador inicial (l).

V_f : volumen del fermentador final (l).

V_{cos} : volumen extraído del fermentador (l).

III.7.5. Determinación de la Actividad Biológica.

- Potencia de aglutinación.

Para determinar la actividad biológica de los sobrenadantes y el LAM anti-B, se determinó la potencia, intensidad y avidez mediante las técnicas de hemaglutinación. Donde el procedimiento plantea los siguientes pasos para la realización de las mismas.

1. Tomar 3 muestras de hematíes de fenotipo B y AB.
2. Lavar tres veces con solución salina fisiológica (SSF) a 1500 rpm por 10 min y preparar una suspensión al 2 % de hematíes en SSF con albúmina al 2 %.
3. Realizar diluciones dobles progresivas del sobrenadante anti-B a analizar en SSF con albúmina al 2 %.
4. Mezclar 100 μ l de la suspensión al 2 % de hematíes en SSF con albúmina al 2 % con 100 μ l de las diluciones de las muestras a analizar.
5. Incubar 5 min a 37 °C.
6. Centrifugar 1 min a 1000 rpm.

Realizar la lectura de los aglutinados por inspección visual en la escala de 1+ a 4+. Los valores numéricos que se le asignan a la intensidad de aglutinación y la forma en que se expresan se encuentran en el Anexo 5.

- **Avidez e Intensidad.**

En láminas portaobjetos se mezclaron 50 μ l de sobrenadante de cultivo o LAM anti-B, con 50 μ L de una suspensión al 40 % de hematíes de fenotipo B y AB en Solución Salina Fisiológica. La avidéz se determinó midiendo el tiempo transcurrido desde el mezclado hasta la aparición de la aglutinación. La intensidad se determinó por la lectura directa según el grado de reacción de la aglutinación establecida (Anexo 5).

III.8. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO CINÉTICO.

Los datos procedentes de las mediciones de viabilidad celular, concentración celular, velocidad específica máxima de crecimiento y actividad biológica fueron registrados y procesados mediante el programa Microsoft Excel 2016 del paquete informático Microsoft Office 2016.

Se utilizó un diseño al azar para comparar los tratamientos con las formulaciones de Medio de Cultivo y las variables de respuesta fueron: concentración de células vivas, velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación. Previamente al análisis de las varianzas, se comprobó la Normalidad de la distribución de los datos de las “respuestas”, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación de las varianzas obtenidas en cada tratamiento se realizó mediante ANOVA tipo I y posteriormente las medias se compararon por el método de mínimas distancias (LS) con un nivel de aceptación de 95% ($\alpha= 0,05$). El programa estadístico que se utilizó fue el *Statgraphics Centurion V* para Windows 7.

III.9. DISEÑO, DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE LOTES A ESCALA PRODUCTIVA.

Para el diseño de los procesos productivos, a partir de las opciones seleccionadas en el estudio, se estableció un algoritmo lógico para determinar escalonadamente los volúmenes de producción necesarios para cubrir una demanda nacional predeterminada de 30 000 frascos de Hemoclasificador anti-B y a partir de estos volúmenes, proyectar el proceso productivo. Los pasos se muestran a continuación:

1. Determinación del Volumen de Formulado necesario para cubrir demanda:
(Cantidad de frascos x 5,5 ml)

2. Determinación del volumen de IFA sobrenadante necesario para cubrir volumen de Formulador.

$$(V_{\text{Formulado}} \div Fd)$$

***Fd** = recíproco de la dilución de trabajo para obtener una potencia de aglutinación de 512.*

3. Desarrollo de proceso para la obtención de lotes.

(Definición de tamaño y cantidad de lotes anuales a producir según sistema productivo seleccionado).

III.10. ANÁLISIS ECONÓMICO.

El análisis de económico se realizó a partir de la determinación del costo de producción del IFA. Para determinar el costo de producción se elaboraron fichas técnicas para cada etapa del proceso productivo en las cuales se estableció: salida de la etapa (producto intermedio), tamaño de lote, materias primas y materiales gastados en el proceso y la cantidad empleada según unidad de medida, recursos humanos con salarios y horas empleadas en cada etapa.

A partir de las fichas técnicas se conformaron las fichas de costos en las que se aplicaron precios e importes a los recursos empleados en cada etapa del proceso, así como costos indirectos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 - CARACTERIZACIÓN DEL HIBRIDOMA ANTI-B A ESCALA DE LABORATORIO.

Para implementar un proceso productivo de forma robusta es necesario conocer una serie de variables tales como, productividad de la línea celular, formulación del medio de cultivo, características del biorreactor y caracterización del comportamiento de la línea celular a diferentes escalas productivas (Li y col., 2010). En este trabajo, para cumplir con estas reglas se realizó la caracterización del Hibridoma anti-B (clon BMS-4), en diferentes medios de cultivo y sistemas de fermentación, lo cual permitió seleccionar la mejor variante productiva para la obtención del AcM anti-B en LABEX.

La concentración y la viabilidad celular son variables críticas para el desarrollo de procesos de cultivo, resultando muy útiles para la determinación de la fisiología del cultivo celular como respuesta a las condiciones de operación, para el cálculo de velocidades de crecimiento y la productividad (Li y col. 2010).

La potencia de aglutinación, la cual se entiende como el recíproco de la mayor dilución de la muestra en que se puede observar aglutinación de hematíes, será el criterio de calidad para la selección de mayor importancia, porque su valor mantiene una relación proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en el sobrenadante de cultivo y es una medida de la productividad del hibridoma en cada medio y sistema de fermentación estudiado.

Otro criterio a tener en cuenta es el Costo de Producción, el que permite visualizar la alternativa más atractiva desde el punto de vista económico, el que permite evaluar la eficiencia de procesos productivos.

IV.1.1. Adaptación del Hibridoma anti-B a medio de cultivo PFHM-II.

En LABEX el proceso *in vitro* para la producción de AcM hemoclasificadores está establecido con el medio de cultivo RPMI, suplementado con 8% de suero, debido a las altas productividades que se obtienen. (Arora, 2013). Con el mismo son producidos actualmente los anticuerpos anti-D y anti-D débil (D^u), en frascos rotatorios como sistema de fermentación, con muy buenos resultados y además se conserva la línea celular del Hibridoma anti-B (Abijana, 2011; Ávila, 2015).

A pesar de que el SFB contiene varios factores promotores del crecimiento celular, en estudios de diversos autores se ha reflejado que este componente presenta varias desventajas para el establecimiento de procesos productivos (Brunner y col., 2010; Jochems y col., 2002). Su uso resulta una fuente potencial de contaminantes, incluyendo priones, virus y micoplasmas. Un reporte realizado por Wessman y Levings indica que entre el 20 y 50% de los SFB comerciales resultan positivos a las pruebas de detección de virus (Even y col., 2006; Wessman y Levings, 1999; Butler, 2005). Otro factor relevante es el precio en el mercado, pues un litro del reactivo en el 2005 se cotizaba como promedio entre 115 y 135 USD y actualmente, alcanza valores superiores a los 400 USD; constituyendo cerca del 70% del costo total de la formulación del medio de cultivo (www.fishersci.es).

Por estas razones, la tendencia actual en la industria biotecnológica es a la eliminación de este componente a través de la adaptación de líneas celulares a medios de cultivos libres de suero, reduciéndose en un 80% los costos de los mismos (Hernández, 2015; Arora, 2013; Even, 2006).

Para eliminar las desventajas que introduce el uso del SFB en el desarrollo del proceso productivo de obtención del AcM anti-B, se realizó la adaptación del hibridoma a medio PFHM. Se escogió este medio de cultivo porque es una formulación libre de sueros y proteínas, diseñada específicamente para el cultivo de este tipo de células, además su precio resulta tres veces inferior con respecto a la formulación de RPMI + 8% SFB (Galván, 2013; Victores y col., 2008). Para la adaptación se empleó el protocolo descrito en el acápite III.3 de Materiales y Métodos, mostrándose en la **figura 5** el comportamiento de la línea celular durante cada etapa.

Como se puede apreciar en el esquema (**figura 5**), la primera fase de la adaptación consistió en el cultivo en medio PFHM suplementado con 8% de SFB. Durante esta etapa, en los primeros 10 pases del cultivo, hubo una disminución de la viabilidad celular por debajo de un 70%, el tiempo de duplicación fue de más de 40 h y se mantuvo baja la concentración celular. Según LeFloch y Hashmi, en esta etapa inicial ocurre la mayor transformación en la maquinaria metabólica intracelular, al modificarse la composición del medioambiente extracelular, lo que incluye las concentraciones de amonio, glucosa y otras sales, obteniéndose como resultado que la mayor parte de la población celular se encuentre en la fase de adaptación debido principalmente al cambio brusco de formulación del medio de crecimiento (LeFloch y col., 2006; Hashmi y col., 2014).

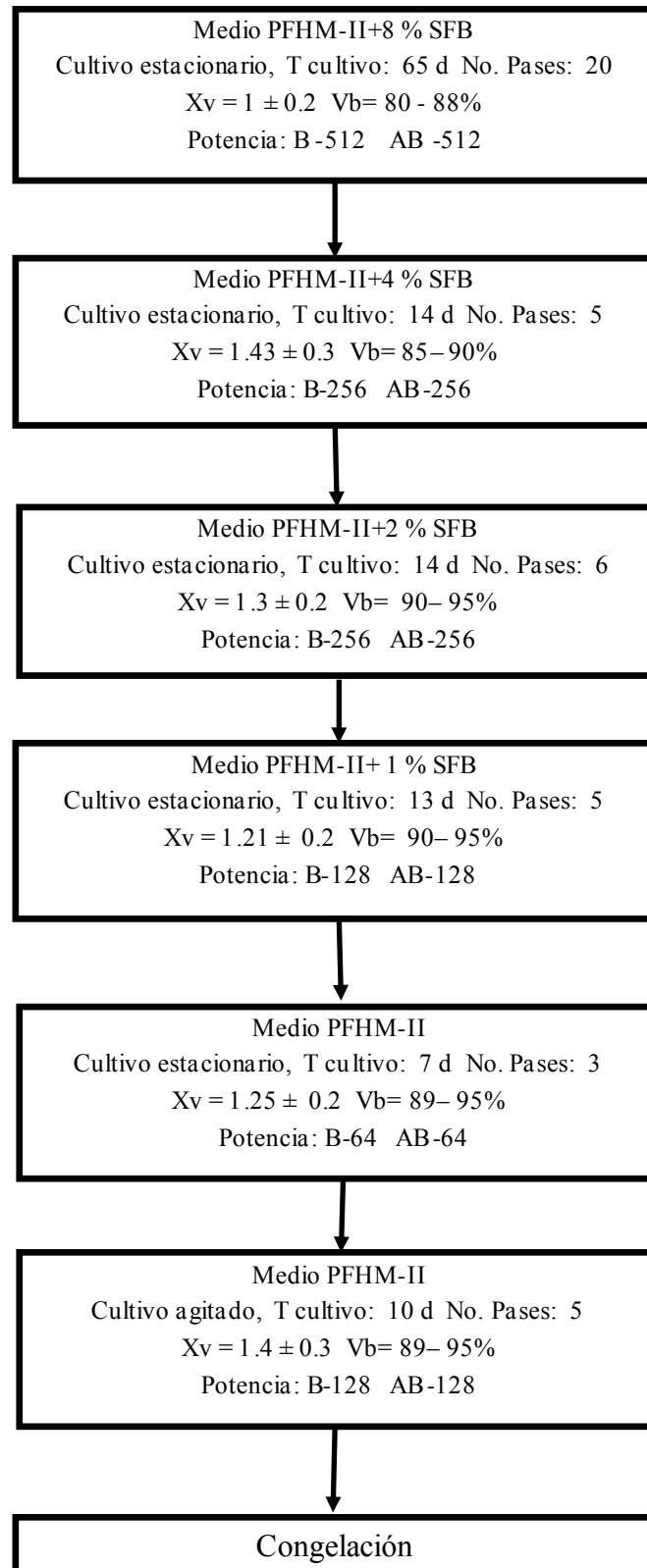


Figura 5. Resumen de la etapa de Adaptación del Hibridoma anti-B a medio de cultivo PFHM-II.

Una vez que el hibridoma estuvo adaptado al medio PFHM + 8% SFB, evidenciado en el aumento de la concentración de células vivas a $1 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ y la viabilidad celular a un 88%, se ejecutaron el resto de las etapas; comprobándose siempre la expresión del anticuerpo anti-B en el sobrenadante de cultivo, mediante la determinación de la potencia de aglutinación con fenotipos B y AB. El proceso completo de adaptación demoró aproximadamente cuatro meses.

Chang y colaboradores, fueron los primeros en reportar exitosamente la adaptación a medio libre de suero de cinco líneas diferentes de hibridomas, las cuales mantuvieron los niveles adecuados de expresión de anticuerpos durante tres meses en cultivo (Chang, 1980). En otro estudio, Kreutz logró la adaptación en solo tres pases del cultivo, de un hibridoma productor de un anticuerpo IgG (Kreutz, 1997). Estos autores lograron el proceso de adaptación en menor tiempo y número de pases que los realizados con el Hibridoma anti-B, en este trabajo.

La reducción paulatina del contenido de SFB provocó la disminución significativa de la productividad del Hibridoma anti-B, desde una potencia de 512 hasta 128 durante el cultivo en modo estacionario. Similares comportamientos obtuvieron los autores Faife y Ozturk en la adaptación de otras líneas de hibridomas y refirieron que la eliminación del SFB en el medio de cultivo influyó negativamente sobre la capacidad de producción de la línea celular, al eliminarse los factores que protegen a las células de la pérdida de productividad (Faife y col., 2008; Ozturk y Palsson, 1990a). Keen y Hashmi, obtuvieron un comportamiento diferente en la adaptación de líneas de hibridomas a medios químicamente definidos, pues el conocimiento de la composición del medio le permitió optimizar los componentes de los mismos y como consecuencia, mejoraron el crecimiento y productividad de las líneas celulares (Keen, 1995; Hashmi y col., 2014).

Por otra parte, en la adaptación realizada por Miranda en LABEX del Hibridoma t4 anti-CD4 a medio PFHM, a partir de medio RPMI+ 8% de SFB, se reportaron valores de productividad superiores 8,7 veces en el medio sin suero; sugiriendo que al retirar el SFB de la formulación del medio de cultivo, se eliminaron proteínas séricas que afectaban la producción celular o fueron incorporados nuevos elementos que aumentaron la formación de anticuerpos, para esta línea celular en particular, comportamiento que no coincide con los resultados de este trabajo (Miranda, 2011).

El Hibridoma anti-B, al expresar una molécula de tipo IgM, podría demandar mayor cantidad de energía para su metabolismo celular que el Hibridoma t4 anti-CD4

(productor de un anticuerpo IgG), diferenciándose en sus comportamientos e indicando que en el medio PFHM las concentraciones de nutrientes existentes son inferiores al medio suplementado con SFB. Leno y colaboradores, llegaron a la conclusión de que los hibridomas de rápido crecimiento celular, deben dirigir la energía celular a la síntesis de componentes intracelulares necesarios para su supervivencia y como consecuencia se reduce la secreción de anticuerpos monoclonales (Leno y col., 1992).

Lee y colaboradores presentaron la hipótesis sobre el mecanismo de producción de anticuerpos en el hibridoma pudiendo ser considerado como un parásito en las células de mieloma, compitiendo con la célula hospedera por el sustrato limitante (Lee y col., 1997). Por su parte, Arora refiere que cada hibridoma sufre cambios concretos durante el proceso de adaptación a determinado medio de cultivo, pues cada línea celular tiene requerimientos de crecimiento altamente específicos; por ende, el medio más adecuado debe ser determinado experimentalmente (Arora, 2013).

A partir del cultivo del Hibridoma anti-B adaptado a medio PFHM, fue realizada la congelación del banco celular maestro 47BM1402 según el procedimiento O1 PNO.005 “Congelación de células” (LABEX, 2012), con una concentración de 1 millón de células por ampolla y una viabilidad de 94%.

IV.1.2. Caracterización del Hibridoma anti-B en medio de cultivo RPMI y en PFHM.

La caracterización del crecimiento y productividad del Hibridoma anti-B se realizó en una fermentación en frascos rotatorios con los medios de cultivo RPMI+8 % de SFB y PFHM. El perfil de crecimiento se muestra en la **figura 6**, donde se observó un comportamiento típico de un sistema por lote, similar al reportado por Miranda en el estudio del Hibridoma t4 anti-CD4 con estos medios de cultivo (Miranda, 2011).

Durante las primeras 24 h se distingue la etapa que corresponde a la descripción de la clásica fase de adaptación, donde la velocidad de crecimiento es prácticamente nula (Hashmi y otros, 2014). Luego continuó la fase exponencial y después de las 72 h la fase estacionaria, donde se alcanzó la máxima concentración celular en ambos medios de cultivo. A partir de las 96 h el cultivo se adentró en la fase de muerte celular, la cual se caracterizó por la caída brusca de la viabilidad celular por debajo de un 70% y la disminución de la concentración de las células vivas.

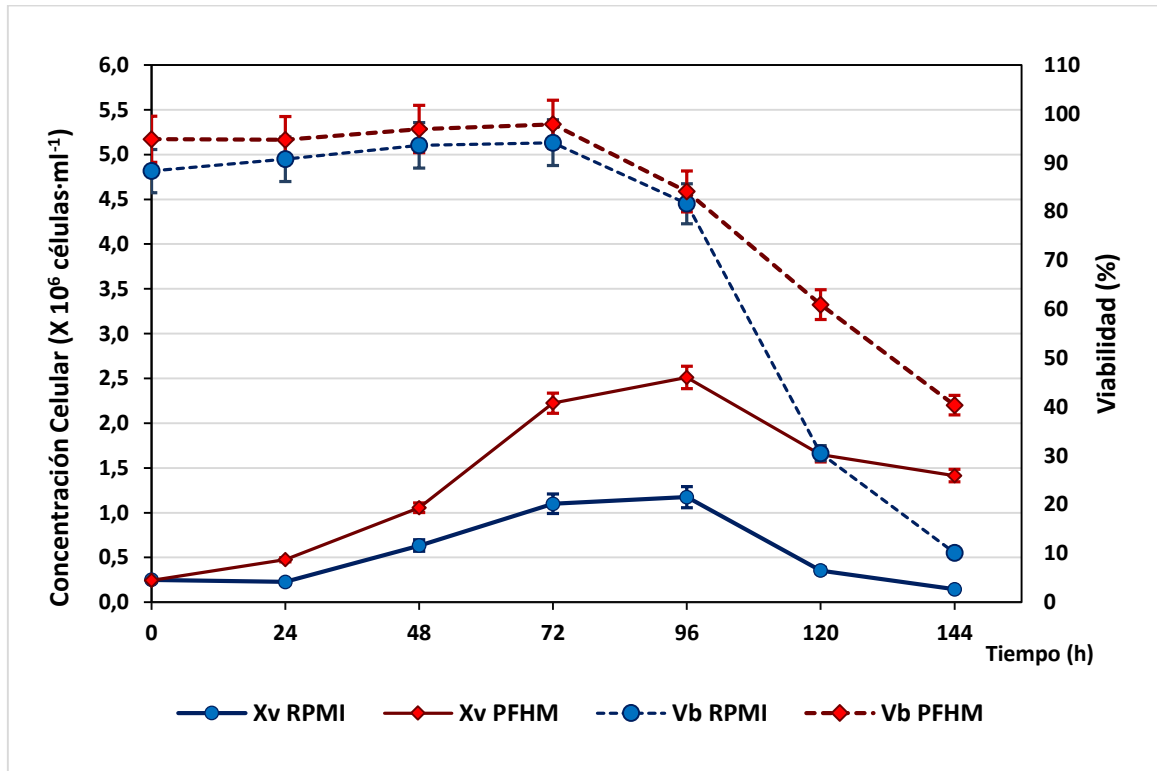


Figura 6. Curva de crecimiento celular del Hibridoma anti-B en los medios de cultivo PFHM y RPMI.

Tabla 2. Resumen de los parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B en medio RPMI y en medio PFHM, en modo de fermentación por lote en frascos rotatorios.

MEDIO DE CULTIVO	$X_{v\text{máx}}$ (10 ⁶ cel·ml ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	td (h)	Pot. máx Fenotipo	
				B	AB
				RPMI	1.18 ± 0.02
PFHM	2.51 ± 0.08*	0.031 ± 0.001	21.7 ± 0.4	256	128

* Resalta diferencias significativas en los valores para una misma columna.

Como se puede apreciar en la figura 5, durante todo el estudio estos parámetros cinéticos fueron superiores en el medio PFHM.

Un resumen de los parámetros cinéticos calculados para el Hibridoma anti-B en ambos cultivos, se presenta en la **tabla 2**. Los resultados muestran que existen diferencias significativas entre los valores de X_v , no así con μ máxima y el t_d , determinados o calculados del comportamiento cinético frente a cada medio (Anexo 6).

El comportamiento de X_v en el medio de cultivo PFHM fue superior al obtenido en el medio RPMI, infiriéndose que la adaptación del Hibridoma anti-B al medio libre de proteínas influyó en la mejora de la concentración máxima de células vivas, con un promedio de $2.51 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$, valor dos veces superior al obtenido en la cinética con suero de $1.18 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$. Se obtuvieron valores de velocidad de crecimiento máxima alrededor de 0.03 h^{-1} en ambos medios. La comparación de los valores del tiempo de duplicación, los cuales están relacionado directamente con μ según la ec.5, muestra que en ambos cultivos fueron muy similares cercanos a 21.4 h .

En el estudio realizado por Ávila para el hibridoma anti-D, empleando el mismo biorreactor e igual formulación de medio de cultivo RPMI, se obtuvo resultados superiores de concentración celular de $1.52 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$, aunque la velocidad de crecimiento fue inferior ($\mu_{\max} = 0.019 \text{ h}^{-1}$) (Ávila, 2015). Según Hayter, durante la fase exponencial, el metabolismo del hibridoma tiene una tendencia a aprovechar la mayor parte de la energía que obtienen de los nutrientes en la producción de anticuerpos teniendo como consecuencia la disminución de la velocidad de crecimiento (Hayter, Kirkby y Spier, 1992).

En la propia tabla 2 (ver Anexo 7), se observa el comportamiento de la productividad mediante la variación de la potencia de aglutinación del sobrenadante anti-B frente a los fenotipos B y AB. En el medio RPMI + 8% SFB se obtuvieron resultados de potencia superiores con respecto al medio PFHM, alcanzándose un máximo de 4096 y 2048, para el fenotipo B y AB respectivamente, al final del cultivo en lote, aun cuando la viabilidad había descendido a 31%.

Este comportamiento de aumento de la productividad en la fase de muerte celular, corresponde al modelo de producción asociado parcialmente al crecimiento celular, descrito por Dutton y Vicente para las líneas de hibridomas (Dutton y col., 1998; Vicente, 2015). Didier refiere que la acumulación de las diferentes enzimas y metabolitos celulares, así como la variación del pH por la presencia de apoptosis celular,

puede provocar la degradación de los anticuerpos en el cultivo, lo que se demuestra en la caída de potencia hasta 1024 en el punto final de la fermentación (Didier, 2008).

Por otro lado, en el medio PFHM los valores máximos de potencia fueron sólo de 256 para fenotipo B y 128 para fenotipo AB en la fase final de crecimiento. Estos resultados eran de esperarse, pues durante la adaptación del Hibridoma anti-B, la eliminación del SFB del medio de cultivo provocó efectos negativos sobre la productividad, como ya se había hecho referencia.

En el estudio cinético realizado por Justiz del clon C6G4 (perteneciente a los bancos celulares de LABEX), productor de una molécula anti-B de tipo IgG, a diferencias de este trabajo se obtuvieron productividades dos veces superiores en medio PFHM con respecto al medio RPMI + 8% SFB, con igual mejora de los parámetros cinéticos después de la adaptación. Sin embargo, la potencia de aglutinación máxima fue solo de 16 con ambos fenotipos (Anexo 8), sugiriendo que el clon BMS-4 es mayor productor que el clon C6G4 y que requiere una movilización de energías metabólicas para crecimiento celular, más que para la producción del AcM (Justiz, 2013).

También se debe tener en cuenta la diferencia que existe entre una molécula IgM y otra IgG, pues la primera presenta mayor cantidad de sitios de unión al antígeno, por tanto la capacidad de aglutinación frente a los eritrocitos B es superior (Coppo y Baez, 2010; Marks, 2014).

Los resultados obtenidos de actividad biológica y velocidad de crecimiento en la caracterización del Hibridoma anti-B en el medio RPMI suplementado con SFB y en el medio PFHM permitirán desarrollar y elegir las mejores condiciones operativas para establecer el proceso de obtención del anticuerpo anti-B, con el fin de cubrir la demanda nacional del reactivo hemoclasificador.

IV.1.3. Caracterización del Hibridoma anti-B en variantes de formulación de medio de cultivo PFHM.

La adaptación del Hibridoma anti-B a medio PFHM, a pesar de mejorar la concentración celular, disminuyó significativamente la productividad, factor negativo para el establecimiento del proceso productivo de obtención de sobrenadante anti-B con este medio. La baja potencia obtenida con los grupos sanguíneos B y AB, las cuales están por debajo del límite de 512 que establece el organismo regulador CECMED en la Regulación 59-2011 para este tipo de producto, conduce a la búsqueda de variantes de formulación de este medio de cultivo que puedan mejorar estos parámetros (CECMED,

2011). Igualmente, la eliminación del SFB de la formulación del medio de crecimiento, elimina el aspecto ético que implica el uso de este componente que a su vez eleva presenta un precio elevado en el mercado. Además, como se explicó anteriormente, el suero puede ser la causa contaminación en los cultivos celulares (Brunner y col., 2010; Wessman y Levings, 1999).

La mejora del medio de cultivo constituye una herramienta para reducir el decline en la viabilidad celular y mejorar la producción de anticuerpos monoclonales (Arora, 2013). Con este fin, la primera variante estudiada fue el medio PFHM suplementado con $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Insulina. La selección de este complemento se basó en la función de esta hormona como factor de promoción del crecimiento celular cuando es empleado en el medio de cultivo a concentraciones mayores que la fisiológica, de $2 - 10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Drapeau y col., 1994; Goswami y col., 1999).

La segunda variante utilizó $8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de glutamina, porque las células emplean junto a la glucosa, este nutriente como fuente de energía para realizar su metabolismo y producir anticuerpos (Ozturk y Palsson, 1990b). Ljunggren y Haggstrom demostraron que el aumento de la concentración de glutamina en el medio provoca en las células de mieloma un uso más eficiente de la energía metabólica (Ljunggren y Haggstrom, 1994).

En la **figura 7** se observa la variación de la concentración de células vivas, así como la viabilidad durante la fermentación por lote de estas variantes de formulación, las cuales se compararon con la formulación de medio PFHM.

En el medio con insulina la fase de adaptación celular prácticamente no se aprecia, al aumentar durante las primeras 24 h la concentración celular a $0,6\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$, mientras que en el resto de las variantes el crecimiento fue mucho menor. Hasta las 96 h transcurre la fase exponencial en todos los medios, con un mayor crecimiento en el medio PFHM+INS donde se alcanzó una X_v de $3.31\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. En el estudio realizado por Chung y colaboradores, con el Hibridoma CRL-1606 la adición de insulina al medio libre de suero, también provocó un aumento de la concentración de células viables alargando la etapa de crecimiento exponencial (Chung y col., 1998).

Diferentes estudios han demostrado que las células de hibridomas suelen ser altamente dependientes de la glutamina como sustrato (Chung y col., 1998; Zielke y col., 1984; Christie y Butler, 1994). Sin embargo, las medias de los parámetros cinéticos evaluados en el estudio resultaron homogéneas en su tratamiento estadístico, para las variantes que

emplean sólo PFHM vs PFHM+GLUT (Anexo 9); por lo que se puede afirmar que la adición de glutamina al medio de cultivo no influyó sobre los parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B y que este compuesto no es el sustrato limitante del crecimiento celular.

Por otro lado, el análisis estadístico (Anexo 9) demostró que la adición de insulina al medio de cultivo tuvo influencia significativa, principalmente respecto al aumento de la concentración celular máxima, como consecuencia probablemente al incremento de la velocidad de crecimiento ($0.037 h^{-1}$) para un tiempo de duplicación de 18 h; valores superiores incluso a los obtenidos en el medio RPMI + 8% SFB. Según Vicente y Zhou, la adición de insulina al medio de cultivo tiene efectos positivos sobre el crecimiento celular, debido a que esta hormona posee efectos pleiotrópicos reguladores del estado proliferativo de las células (Vicente, 2015; Zhou y Hu, 1995).

En las figuras del Anexo 10 se observa la potencia alcanzada en la caracterización del sobrenadante de cultivo de todas las variantes de formulación de medio PFHM, la cual aumenta con el progreso de la fermentación. Sin embargo, es alrededor de las 24 h que se muestra una diferencia favorable al incremento de las potencias del medio PFHM con insulina, coincidiendo con el crecimiento exponencial y donde se calculan los parámetros cinéticos favorecidos en este medio de cultivo. Los máximos valores de actividad biológica se corresponden a 256 y 128 para fenotipo B y AB respectivamente, en todos los casos, sin mostrar diferencias significativas entre cada una de las variantes, a partir de las 48 horas (**tabla 3**). Por lo que se puede concluir que de manera general los nutrientes añadidos al medio no aumentaron la productividad de la línea celular.

Vicente reporta la obtención de clones del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal Racotumomab, donde la insulina por sí sola, no tuvo influencias significativas sobre la productividad del anticuerpo, comparada con otros suplementos como el suero y la glucosa que fueron adicionados a la mezcla de los medios PFHM+DMEM/F12 (Vicente, 2015). Por otro lado, en el trabajo realizado por Vitón y colaboradores, en la caracterización del Hibridoma L3 anti-CD45 en medio PFHM, la adición de insulina en concentraciones de 2, 5 y $10 mg \cdot l^{-1}$ aumentó considerablemente la producción del anticuerpo de interés, obteniéndose los mejores valores para $10 mg \cdot l^{-1}$ de insulina, donde al parecer el uso de la insulina favoreció el metabolismo de la glucosa, direccionando la energía disponible hacia la síntesis de proteínas (Vitón y col., 2015).

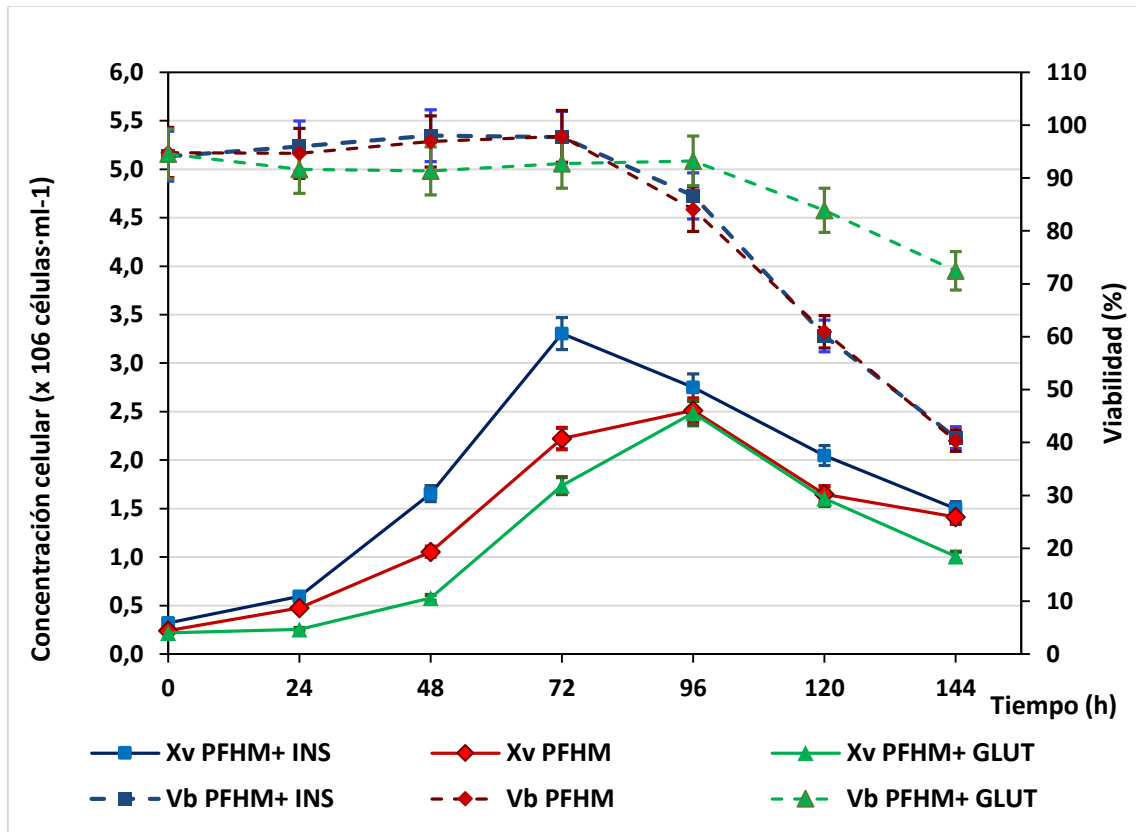


Figura 7. Curva de crecimiento celular del Hibridoma anti-B en las variantes de formulación de medio de cultivo PFHM.

Tabla 3. Resumen de los parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B en medio PFHM-II en modo de fermentación por lote, en frascos rotatorios.

Frasco	$X_{v\text{máx}}$ ($10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	td (h)	Pot. máx Fenotipo	
				B	AB
				PFHM	2.51 ± 0.08^b
PFHM+INS	3.38 ± 0.06^a	0.037 ± 0.001^a	18.6 ± 0.5^b	256	128
PFHM+GLUT	2.49 ± 0.06^b	0.032 ± 0.001^b	22.0 ± 0.4^a	256	128

Los resultados obtenidos durante la caracterización del Hibridoma anti-B en variantes de formulación de medio PFHM-II mostraron que el Hibridoma en este medio es bajo productor y que la adición de insulina, influyó principalmente sobre el crecimiento celular pero no aumentó el porcentaje de células productoras de anticuerpos; por tanto será necesario realizar un proceso de concentración del sobrenadante para mejorar los valores de potencia de aglutinación y poder establecer un futuro proceso productivo.

IV.2 - PROPUESTA DE LOS PROCESOS PRODUCTIVOS PARA LA OBTENCIÓN DEL ACM ANTI-B.

La etapa de caracterización del Hibridoma anti-B a escala de laboratorio permitió determinar las variables cinéticas de la línea celular con cada formulación de medio de cultivo. En el medio RPMI suplementado con SFB se obtuvieron valores de potencia de 4096 y 2048 frente a fenotipos B y AB respectivamente, mientras que en el medio de PFHM fueron inferiores, a pesar de que en este último los parámetros cinéticos de concentración celular y velocidad de crecimiento fueron superiores. A partir de estos resultados se decidió emplear los sistemas de fermentación existentes en LABEX para la obtención del AcM anti-B a escala productiva.

El reactivo Hemoclasificador anti-B se comercializa en frascos de 5 ml, puede contener como IFA sobrenadante o LAM anti-B, según el proceso de obtención realizado (*in vitro* o *in vivo*), a los cuales se le añaden sales y sustancias estabilizantes para la formulación y luego se realiza el proceso de filtración. Por cada frasco a envasar se formulan 5,5 ml.

Por otro lado, cada año en nuestro país se incrementa la demanda nacional de los reactivos hemoclasificadores, porque es obligatorio su empleo para la tipificación de los grupos sanguíneos cuando se realizan donaciones de sangre, trasplantes de órganos, operaciones quirúrgicas, etc. (LABEX, 2017). Las propuestas de los procesos productivos se hicieron en base a 30 mil frascos, demanda anual promedio actual, para los cuales se requerirán 165 l de formulado anti-B.

La primera experimentación estuvo dirigida a la evaluación del sistema de producción *in vivo*, obteniéndose Líquido Ascítico Murino a partir de la línea de ratones *BALB/c*. Esta tecnología tiene como característica la obtención de concentraciones de anticuerpos que pueden ser hasta mil veces superiores a las que se producen en sobrenadantes de cultivo, pero implica preocupaciones bioéticas y además puede tener un costo elevado (Castillo y Veloso, 1990).

También fueron evaluadas dos plataformas de fermentación *in vitro*: frascos rotatorios y biorreactor de olas, ambos pertenecientes a la tecnología desechable, la que resulta compatible con la infraestructura de las instalaciones productivas de LABEX existente. Las principales ventajas de los biorreactores desechables son su alta flexibilidad, fácil operación, baja probabilidad de contaminaciones cruzadas, ahorro de tiempo y reducción de los gastos (Behme, 2009; Mauter, 2009). Los problemas más críticos que actualmente restringen su uso surgen de la limitada experiencia en la industria e insuficiente resistencia del material plástico a las condiciones de operación, además la renovación del contenedor desechable en cada fermentación conduce a un aumento del consumo de materiales y de los residuales sólidos (Rao y Brorson, 2009; Eibl y Eibl, 2008).

IV.2.1. Producción de anti-B “in vivo”.

El método de producción en ascitis brinda como principal ventaja una alta concentración de AcMs y es ampliamente utilizado en la industria biotecnológica con fines investigativos y de diagnóstico, que por lo general requieren de pequeñas cantidades de anticuerpos (Flickinger y Drew, 1999). Por el contrario, la obtención de reactivos hemoclasificadores demanda de grandes cantidades (Marks, 2014).

Uno de los biomodelos más utilizados para estos propósitos son los ratones de la línea *BALB/c*, por su capacidad de generar plasmocitomas tras la inoculación de varias sustancias irritantes, como el adyuvante de Freud y el aceite mineral, lo que los hace particularmente importantes para la producción de AcMs. En este campo LABEX destaca por su amplia experiencia productiva (Esparraguera, 2006; Soria, 2010).

El primer paso para la producción *in vivo* del AcM anti-B consistió en la descongelación y expansión del clon BMS-4 del Hibridoma anti-B. Esta etapa es muy importante porque garantiza la calidad y cantidad de las células que serán trasplantadas en la cavidad abdominal del biomodelo, porque el número de células inoculadas es un factor vital que puede afectar el tiempo de vida de los animales (González y col., 2015). En el trabajo realizado por Soria, empleando el clon C₆G₄ del Hibridoma anti-B y ratones *BALB/c* se estudiaron tres concentraciones celulares para el inóculo, donde los mejores resultados de productividad fueron obtenidos a una concentración de 1 millón de células por ratón (Soria, 2010). Igual concentración celular fue empleada en este estudio para la conformación de tres inóculos celulares, a partir de los cuales se produjeron tres lotes de LAM anti-B, cuyas características son mostradas en las **tablas 4A y 4B**.

Tabla 4 A. Características de la producción de lotes de LAM anti-B en ratones BALB/c.

Lote LAM	Rendimiento ml Ascitis/Ratón	Vol. Total LAM	Vol. Final LAM	% Pérdidas
1	8.42	825.5	598.0	27.5
2	4.44	427.0	313.0	26.7
3	4.31	409.5	314.0	23.3
Promedio	5.72 ± 2.34	554 ± 235.3	408 ± 164.3	25.8 ± 2.2
CV (%)	40.82			

CV: Coeficiente de variación.

Tabla 4 B. Características de la Actividad Biológica de LAM anti-B producido en ratones BALB/c.

Lote LAM	Potencia		Aidez		Intensidad	
	Fenotipo					
	B	AB	B	AB	B	AB
1	2048	1024	4 s	5 s	4+	3+
2	8192	4096	4 s	5 s	4+	4+
3	8192	4096	4 s	5 s	4+	4+
Promedio	4096	2048	4 s	5 s	4+	4+

Una marcada diferencia se aprecia entre el lote 1 con respecto a los lotes 2 y 3, tanto en el volumen de producto como en el título frente al panel eritrocitario. Este resultado demuestra la alta variabilidad que puede existir entre lotes productivos en este tipo de proceso, tal y como se ha explicado anteriormente. Similar variabilidad se ha descrito para otros LAM en la obtención de anticuerpos (Jackson y col., 1999; Soria, 2010).

Según Marx la posibilidad de formación de un fluido ascítico es una respuesta al crecimiento tumoral, y después de 7 a 14 días del inóculo el volumen de ascitis puede fluctuar entre 2 y 10 ml por ratón, encontrándose los rendimientos obtenidos en rango con un promedio de 5.7 ml (tabla 3A) (Marx, 2000). El promedio de 25.8 % de pérdidas de volumen de LAM se debe fundamentalmente a la etapa posterior de clarificación, que se realiza para eliminar las células, hematíes y lípidos presentes en el LAM.

Las pruebas realizadas para determinar la calidad del LAM, una vez concluido el proceso productivo, fueron avidez e intensidad las cuales se determinaron mediante la técnica de hemaglutinación en láminas y la potencia de aglutinación. Para esta última se obtuvieron valores entre 2048 y 8192 frente al grupo sanguíneo B y 1024 hasta 4096 frente a A₂B (tabla 4B). En todos los casos la actividad biológica cumplió con la especificación ESP-47.5002 del sistema de calidad de LABEX que establece como límite 1024 (LABEX, 2016) .

Si se comparan estos resultados de potencia con los obtenidos por Soria, los cuales tuvieron una potencia de aglutinación entre 2048 y 64 para fenotipo B y 1024 y 32 para fenotipo AB, el Hibridoma BMS-4 de este estudio mostró una mayor inmunogenicidad en los animales al obtenerse un líquido ascítico de mayor calidad (Soria, 2010). Por otra parte, en el estudio reportado por León y colaboradores con el mismo clon (BMS-4) en igual línea animal, se reportaron resultados de potencia superiores en el LAM, con títulos de 16384 con eritrocitos B y de 4096 con eritrocitos AB (León y col., 2004).

La autora Esparraguera refirió que el rendimiento depende en gran medida de la línea genética de ratón utilizada y de las características individuales, ya que cada animal puede comportarse de manera diferente ante el mismo hibridoma y concentración celular, considerándose este comportamiento como normal e impredecible, por tal motivo se trata de mantener las mejores condiciones ambientales posibles para los biomodelos que se utilizan, y de esa manera favorecer las producciones (Esparraguera, 2006).

- **Propuesta del proceso productivo de LAM anti-B.**

Las instalaciones de producción de LABEX tienen una capacidad productiva de 3500 ratones. Teniendo en cuenta este dato se propuso el proceso de obtención de LAM anti-B a partir de ratones *BALB/c* para la alternativa *in vivo* y se representó en el esquema de la **figura 8**. Inicialmente deben comprarse los animales en el (CENPALAB) que se encuentra ubicado en La Habana y luego se trasladan en avión hacia LABEX.

Una vez en el centro son sometidos a una primera etapa de cuarentena, la cual puede demorar de 7 – 10 días para que los animales sean liberados, después se realiza la pre-inoculación y luego de un tiempo mínimo de espera de 7 días se inoculan los animales. La etapa de extracción comienza aproximadamente después de 15 días, realizándose en días alternos las extracciones de LAM y se puede extender hasta 15 días o hasta que dejen de producir los animales. Se ha establecido que para la obtención de un 1 l de LAM son necesarios 500 ratones, los cuales constituirán un lote productivo.

Para poder cubrir la demanda de 30 mil frascos del reactivo anti-B, es necesario producir 165 l del Hemoclasificador anti-B y tomando como referencia el resultado promedio de potencia de los lotes de LAM anti-B (tabla 4B) de este estudio, se planteó una dilución de trabajo de 1:4 en la formulación, para un volumen total de LAM de 41.2 l, pero se debe tomar en cuenta las pérdidas de LAM en el proceso de clarificación, las que fueron de un 27%. Por tanto, tomando como referencia los resultados de este estudio y la propuesta presentada, se deberán producir 52 l de LAM anti-B para lo que se necesitarán 9158 ratones *BALB/c*, para un total de 19 lotes de 500 ratones cada uno, los que se dividirán en 3 campañas productivas al año, debido a la capacidad del Bioterio de LABEX y un tiempo de trabajo de 150 días aproximadamente. Las características principales del proceso se resumen en la **tabla 5**.

IV.2.2. Producción de anti-B *in vitro* en frascos rotatorios.

La tecnología de fermentación *in vitro* ofrece la ventaja de una producción a gran escala en poco tiempo y de forma rentable. Entre las técnicas de cultivo celular se encuentran el cultivo de células adherentes y en suspensión. En esta última, el crecimiento es independiente de la superficie del biorreactor, presentando como desventajas bajas densidades celulares y concentración de producto (Rodríguez y col., 2010). Los frascos rotatorios son utilizados para ambos tipos de cultivo, indistintamente.

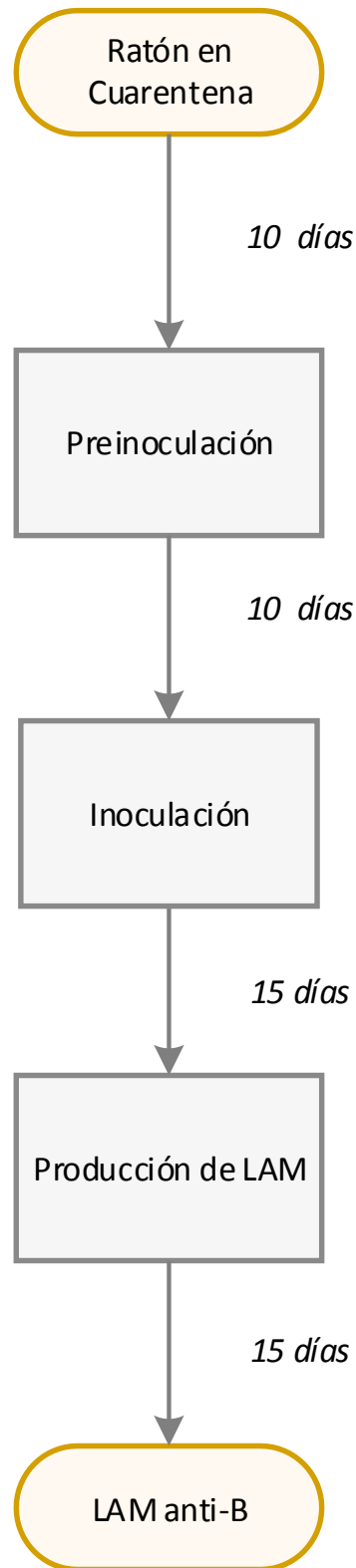


Figura 8. Esquema del Proceso de Producción de LAM anti-B en ratones BALB/c.

Tabla 5. *Propuesta del Proceso productivo en ratones BALB/c para obtener 30 000 frascos de Hemoclasificador anti-B.*

Volumen de formulado (l) - IFA	165
Dilución en la formulación	1:4
Volumen de LAM anti-B para formulación (l)	41
Volumen de LAM anti-B a producir (l) *	52
Cantidad de ratones	9158
Rendimiento Ascitis/Ratón (l)	0.0057
Cantidad de ratones x lote	500
Volumen de LAM/lote (l)	2.85
Lotes x año	19
Corridas x año	3
Tiempo x corrida (d)	50
Tiempo x año (d)	150

* Se determina a partir de un 26% de pérdidas en el proceso de clarificación.

En el LABEX, el proceso de fermentación para producción del Hemoclasificador anti-D, se estableció en frascos rotatorios y emplea el modo de operación semicontinuo con medio de cultivo RPMI suplementado con SFB. Se realizan cosechas repetidas de sobrenadante de cultivo cada 96 h a partir de la siembra, lo cual permite la producción de lotes de sobrenadante de forma continua, sin tener que repetir las etapas previas (descongelación y expansión celular). Este proceso se caracteriza por la baja complejidad mecánica y por ser consistente, además tiene un costo unitario de solo 3.18 UM por frasco de hemoclasificador (Ávila, 2015). Presenta como desventaja que las operaciones resultan intensas y laboriosas, además de la ausencia de controles de pH y Oxígeno tan importantes para el manejo del proceso productivo.

Para la evaluación de este sistema de fermentación con el Hibridoma anti-B se realizó la producción de tres lotes de sobrenadante utilizando medio de cultivo RPMI + 8% SFB y el modo de operación semicontinuo. Inicialmente fueron sembrados tres frascos rotatorios a una concentración inicial de $0.3 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ con un volumen efectivo de 500 ml. Las cosechas de sobrenadante anti-B fueron realizadas cada 72 h, para garantizar una potencia por encima de 512 y una viabilidad celular superior a un 85%, según el estudio cinético (ver epígrafe IV.1.2). Para la conformación de cada lote de sobrenadante anti-B fueron realizadas 4 sublotes consecutivos, resultante de la extracción del reactor de 800 ml de sobrenadante para cada uno, ajustando siempre la concentración del cultivo a $0.3 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ mediante la adición de medio fresco. En el Anexo 11 se encuentran los datos del cultivo durante la producción de los tres lotes. Los parámetros cinéticos se mantuvieron prácticamente constante entre cada sublote.

En la **tabla 6A**, se observa un resumen de los principales parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B durante la producción de los 3 lotes de sobrenadante de cultivo. Entre los diferentes lotes hubo poca variación con respecto a las variables de crecimiento calculadas ($CV < 2\%$); a diferencia del cultivo *in vivo*, que la variabilidad por ejemplo del rendimiento del líquido ascítico fue de 40.82 % (tabla 4B).

La concentración celular promedio fue de $1.55 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$, para una velocidad de crecimiento de 0.034 h^{-1} y un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 h. Estos valores fueron ligeramente superiores a los obtenidos durante el estudio cinético, lo que era de esperar por cuanto en la producción se partió de un inóculo con células adaptadas a las condiciones del cultivo y en el sobrenadante estaban presentes metabolitos y factores de crecimiento que favorecieron el crecimiento celular.

Como se puede apreciar en la **tabla 6 B**, la potencia, avidéz e la intensidad de los lotes de sobrenadante anti-B, que se obtuvieron a partir de la mezcla de los sublotos (Anexo 12), fueron similares, cumpliendo con los límites establecidos por la especificación de calidad ESP.5060 Sobrenadante anti-B (LABEX, 2016). La unión de los diferentes sublotos provocó la disminución de la concentración de anticuerpos, efecto dilución, lo que trajo como negativo la caída de los valores de potencia hasta 512, para ambos fenotipos.

No obstante, estos resultados fueron superiores a los obtenidos por Justiz con el clon de C6G4 en medio RPMI; donde a pesar de utilizar un cultivo de alta densidad celular con el desarrollo de biorreactor CELLine, el sobrenadante que se obtuvo solo alcanzó títulos de 64 frente a eritrocitos B y de 16 con eritrocitos AB, demostrándose nuevamente que el clon BMS-4 de este estudio, es mejor productor (Justiz, 2013).

En el trabajo realizado por Witting y colaboradores, se cultivó el clon BB2-3, productor del anticuerpo anti-B de tipo IgM en cultivo de alta densidad con el biorreactor MiniPerm y con medio suplementado con suero. El sobrenadante aglutinó frente a eritrocitos B, hasta una dilución de 1/15000, muy superior al sobrenadante obtenido con el clon BMS-4 en frascos rotatorios. En este estudio el sistema de fermentación tuvo una influencia significativa sobre la calidad del sobrenadante (Wittig y col., 2006).

Los resultados que se muestran en el Anexo 11, utilizando % frascos rotatorios a los que se extraen “cosechas” de sobrenadantes, reflejan que cada sublote de sobrenadante tuvo una potencia de aglutinación superior al lote final. Se propone en el diseño del proceso productivo que cada lote se conforme por una sola cosecha de sobrenadante anti-B. Para ello será necesario utilizar toda la capacidad de cultivo existente en la base de agitación (16 posiciones giratorias) para eliminar la probabilidad de requerir una etapa posterior de concentración, y poder así realizar un empleo eficiente del medio de cultivo, el cual tiene un componente de costo elevado por la adición de SFB como se explicó anteriormente.

Con este proceso de cada frasco rotatorio se obtendría 400 ml de sobrenadante (sublote), el cual solo necesitaría un proceso de clarificación por centrifugación para eliminar las células, obteniéndose por cada lote 6,4 l. De este modo, en el proceso de separación las pérdidas por volumen resultarían poco significativas (1 %) a diferencia de la producción *in vivo*.

Tabla 6. Resumen de la Producción en frascos rotatorios de los lotes de Sobrenadante anti-B en medio de cultivo RPMI+8% SFB.

A. Parámetros cinéticos.

lote	V (ml)	Xv (10⁶ cel·ml⁻¹)	μ (h⁻¹)	td (h)
1	3400	1.58	0.035	19.90
2	3400	1.51	0.034	20.62
3	3400	1.55	0.034	20.27
Promedio	3400	1.55 ± 0.03	0.034 ± 0.001	20.26 ± 0.36
CV (%)	-	0,98	1,68	0,58

CV: Coeficiente de variación.

B. Actividad Biológica.

Lotes de SN anti-B	Potencia		Avidez		Intensidad	
	Fenotipo					
	B	AB	B	AB	B	AB
1	512	512	2s	2s	4+	4+
2	512	512	2s	3s	4+	4+
3	512	512	2s	3s	4+	4+

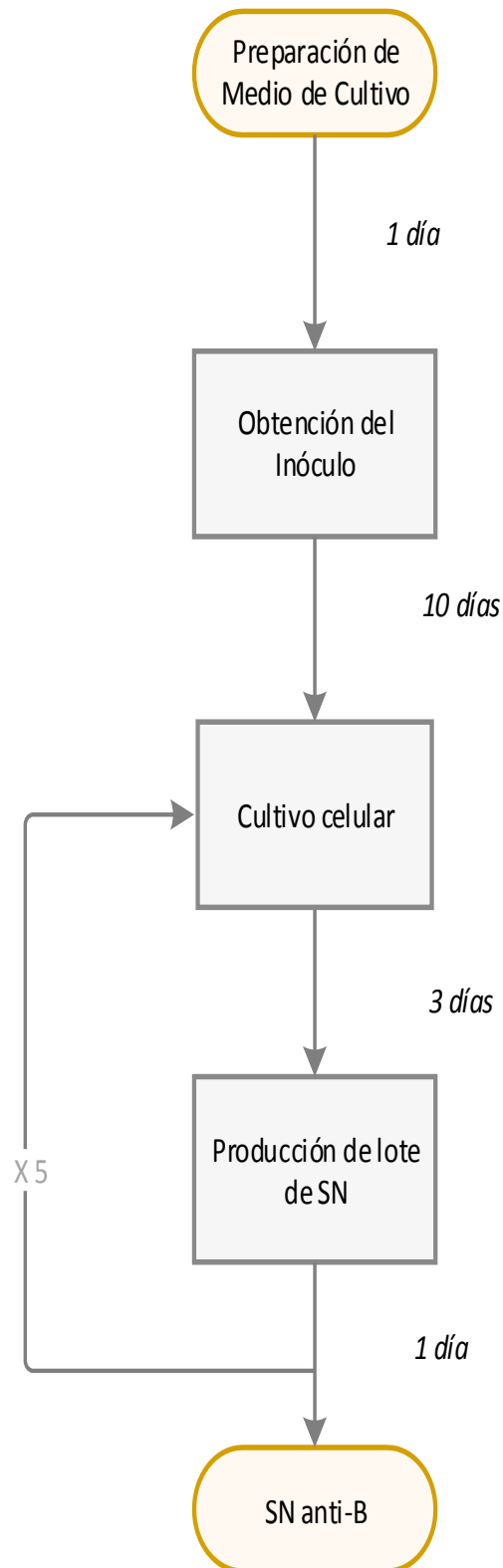


Figura 9. Esquema del Proceso de Obtención de Sobrenadante anti-B en medio de cultivo RPMI, utilizando Frascos Rotatorios.

Tabla 7. *Propuesta del proceso productivo de obtención de Sobrenadante anti-B con medio de cultivo RPMI empleando Frascos Rotatorios para producir 30 000 frascos de Hemoclasificador anti-B.*

Volumen de SN anti-B (l) - IFA	165
Dilución en la formulación	1:1
Volumen de SN para formulación (l)	165
Volumen de LAM anti-B a producir (l) *	165
Cantidad de Frascos rotatorios (Biorreactor)	80
Rendimiento SN/Frascos (Biorreactor) (l)	2.1
Volumen de SN x lote (l)	2.4
Lotes x año	25
Corridas x año	5
Tiempo x corrida (d)	30
Tiempo x año (d)	150

* Pérdidas no significativas para las mediciones de volumen que se realizan.

- **Propuesta del proceso productivo en frascos rotatorios.**

Tomando en cuenta que se requiere cubrir una demanda estimada de 30 mil frascos del reactivo anti-B y que se deben obtener 165 l de sobrenadante anti-B porque se utilizará para la formulación sin diluir, se realizó la propuesta del proceso productivo, la cual se refleja en la **figura 9**. Las características principales del proceso se resumen en la **tabla 7**.

Se propone realizar a partir de un mismo inóculo, empleando el modo de fermentación semicontinuo, 4 lotes de sobrenadante de 6,4 l y un lote de 8 l al finalizar el cultivo (al cosechar los 16 frascos), para un volumen final de 33 l por campaña productiva, empleando las 16 posiciones que brinda la base rotatoria. De esta forma serán necesarias 5 campañas productivas al año, con un tiempo total de trabajo de 150 días.

IV.2.3. Producción de anti-B *in vitro* en Biorreactor de Olas Applikon 50 l.

El clon BMS-4 de anti-B adaptado a medio PFHM mostró una productividad inferior a la obtenida con el medio RPMI, en el estudio cinético en frascos rotatorios, con valores de potencia de aglutinación del sobrenadante inferiores al límite de calidad de 512. Sin embargo, este medio de cultivo tiene la ventaja de un bajo costo de producción con respecto al RPMI suplementado con suero, aspecto significativo cuando se requiere incrementar volúmenes productivos para satisfacción de demandas crecientes. Por lo que se recurre a otra estrategia de sistema de fermentación, soportada en evidencias de altos rendimientos de producto y adecuadas condiciones para el desarrollo del hibridoma, durante largos tiempos de cultivo celular (Téllez, 2017; Hernández, 2014).

Se decidió estudiar la variante productiva empleando Biorreactores de ola Applikon de 50 l con una etapa posterior de concentración por cartuchos de fibra huecas. Este sistema de fermentación permitirá obtener mayores volúmenes de sobrenadante que los frascos rotatorios, al contar con un volumen efectivo de 25 l. Además, está provisto de una torre de control automático Applikon *ez-Control* que maneja las variables de operación tales como pH, Oxígeno Disuelto, Temperatura y Mezclado, proporcionándole un ambiente adecuado a las células (Applikon Biotechnology, 2014).

A partir de experiencias previas de fermentaciones realizadas en LABEX, empleando el modo de operación semicontinuo y medio de cultivo PFHM en este tipo de biorreactor, se desarrolló el proceso para la obtención de sobrenadante anti-B (Téllez, 2017; Hernández, 2014). Debido a que la adición de insulina influyó favorablemente sobre

los parámetros cinéticos del cultivo, pero no así sobre la actividad biológica del sobrenadante anti-B, se empleó sólo la formulación de medio PFHM en esta escala productiva, con el interés de ahorrar recursos.

Durante el proceso de escalado se tiene como objetivo alcanzar en el biorreactor de escala industrial un ambiente fisiológico e hidrodinámico tan similar como sea posible al establecido en los equipos de escala de banco o piloto. Las soluciones de ingeniería para ese problema incluyen mantener la semejanza geométrica y además mantener constante un criterio dado, tales como la potencia por unidad de volumen, el coeficiente volumétrico de transferencia de masa y de oxígeno, entre otros (González, 2000). En el caso del Biorreactor de olas, el oxígeno de la corriente gaseosa es transferido a través de la superficie líquido-gas, lo cual hace menos eficiente el proceso de transferencia en comparación con los fermentadores convencionales de tanques agitados y aireación sumergida por lo que se debe controlar el volumen de trabajo y la agitación (GE Company, 2008).

Hernández realizó el escalado para el Hibridoma anti-CD45 a Biorreactor de olas, a partir del criterio de velocidad periférica de impelente para satisfacer los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) (Hernández, 2014). Tuvo en cuenta que el K_{La} depende del área de transferencia, del nivel de agitación del cultivo, la temperatura, la geometría del sistema y la concentración de oxígeno. A partir de ese estudio fueron seleccionados los parámetros operativos para la realización de este trabajo mostrados en la tabla 3.1, de Materiales y métodos (ver acápite III.5.).

Para la evaluación del Hibridoma anti-B en el fermentador fue realizada una corrida productiva empleando el modo de operación semicontinuo (**figura 10**). Se prepararon 200 l de medio de cultivo PFHM II y fueron filtrados a una bolsa plástica, lo que garantizó un tiempo productivo de 40 días. El inóculo se conformó con 4 800 millones de células, para un volumen inicial en el fermentador de 20 l y una concentración de $0,24 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$. La estrategia seguida a partir del sexto día de trabajo, una vez que se adaptaron las células al sistema de cultivo, consistió en el crecimiento del cultivo celular hasta la fase exponencial y extracciones de sobrenadante cada 72 h, ajustando la concentración aproximadamente a $0,5 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$, mediante la extracción de 15 l de suspensión celular y la adición de esta misma cantidad de medio de cultivo PFHM. De esta forma se garantizó la acumulación del producto en el biorreactor y una buena viabilidad del cultivo celular, superior al 90%.

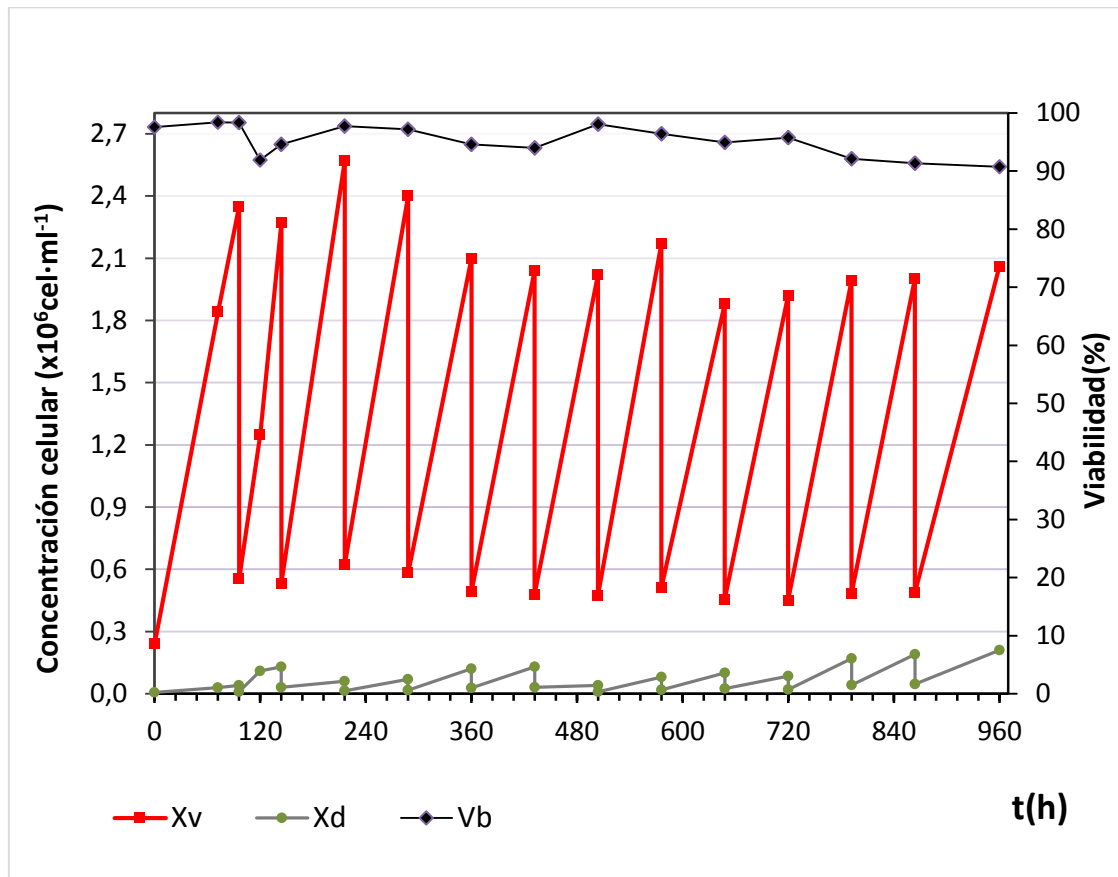


Figura 10. Perfil de crecimiento del Hibridoma anti-B en el Biorreactor de olas con medio de cultivo PFHM.

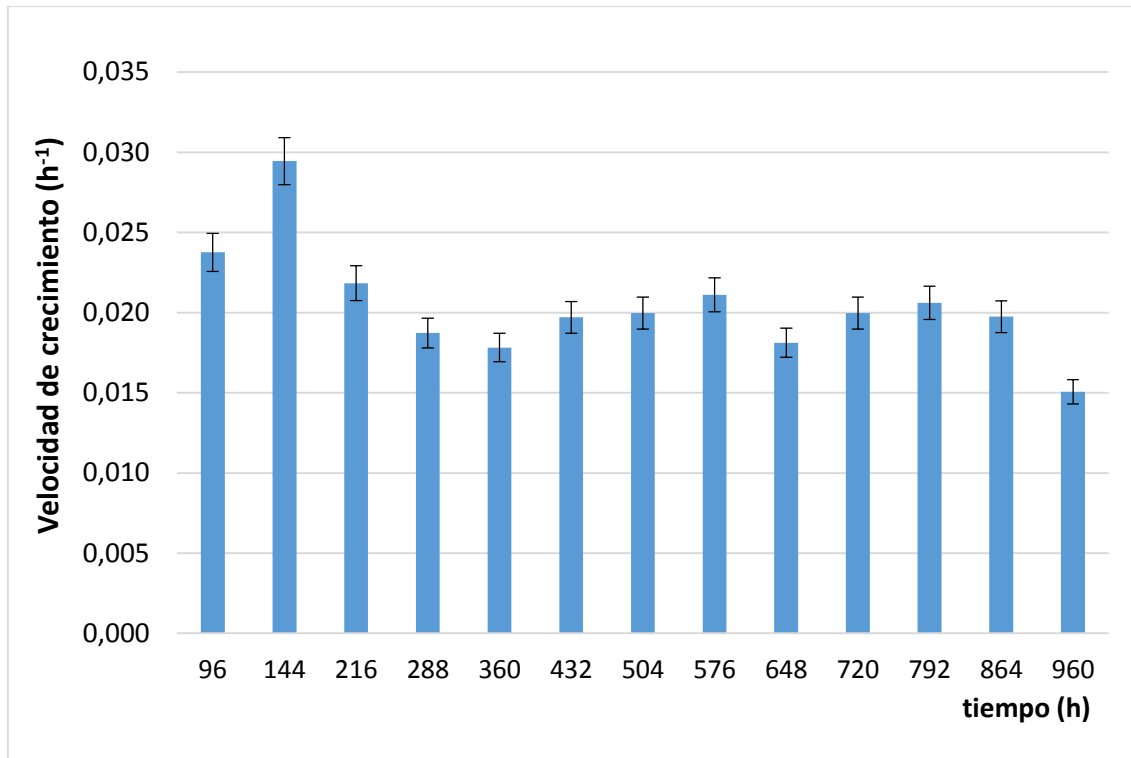


Figura 11. Comportamiento de la velocidad de crecimiento del Hibridoma anti-B en el Biorreactor de olas con medio de cultivo PFHM.

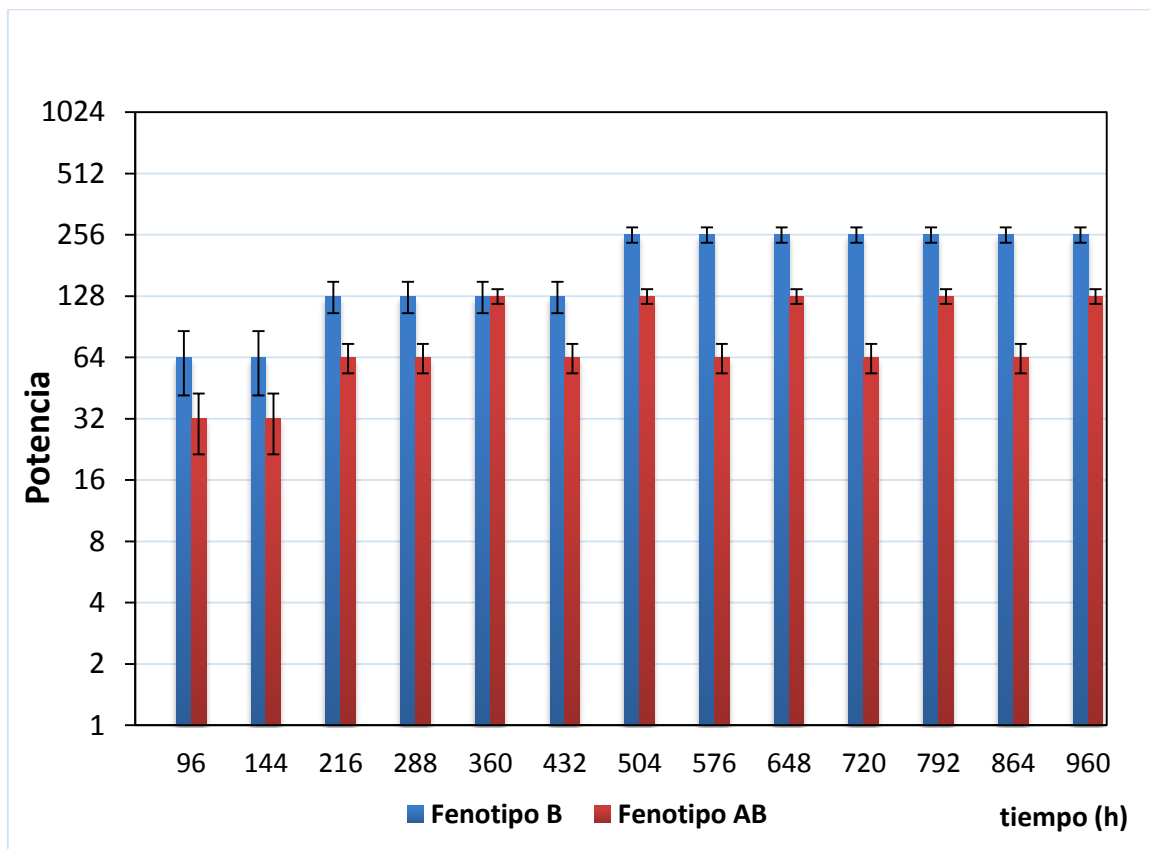


Figura 12. Actividad Biológica del Sobrenadante anti-B durante la corrida de fermentación en Biorreactor de olas con medio PFHM.

En el cultivo se alcanzaron concentraciones celulares superiores a los $2,3 \cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ similares a las obtenidas en los estudios cinéticos como referencia (tabla 2) al estabilizar el tiempo entre las cosechas, y las concentraciones de células vivas se mantuvieron en promedio alrededor de $2 \cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Anexo 13). El perfil de crecimiento celular mostrado en la **figura 10** se corresponde con el reportado por Vítores en el cultivo del Hibridoma 1E10, donde la variación de las concentraciones celulares también fue pequeña (Vítores y col., 2008).

En la **figura 11** se muestra el comportamiento variable de la velocidad de crecimiento, donde en la primera semana del cultivo (144 h) se muestra un crecimiento cercano al de la caracterización cinética, pero a partir de las 288 h de trabajo se obtuvo un valor inferior al de la escala de laboratorio (0.032 h^{-1}), llegando a un valor mínimo de $0,015 \text{ h}^{-1}$ al finalizar la corrida. Una de las razones por las que las células dejan de crecer, es la acumulación de algunos metabolitos que inhiben el crecimiento, los cuales deben ser eliminados del cultivo celular para evitar esta problemática (Shiu y col., 2015).

Según Vítores, a bajas velocidades de dilución del cultivo, puede existir limitación de algún nutriente; por consiguiente, el ambiente es menos favorable para que las células se dupliquen con su velocidad de crecimiento habitual y un número importante de la población puede quedar retenido en alguna fase del ciclo celular con mayor productividad para la formación del producto (Vítores y col., 2008).

En correspondencia, el comportamiento de la actividad biológica del sobrenadante anti-B mostrado en la **figura 12** fue superior a la esperada según los datos del estudio cinético (Anexo 10), donde a las 72 h la potencia de aglutinación mantenía un valor de 64. A partir de las 216 h (9 días) se mantiene en un valor de potencia de aglutinación de 128 para sangre B y se estabiliza en 256 al transcurrir las 480 h (20 d) de corrida productiva. Los valores de potencia de aglutinación para el fenotipo AB, mostraron un desempeño más bajo fluctuando entre 64 y 128, lo cual sugiere que el anticuerpo expresado en el sobrenadante de fermentación, mostró menor especificidad para este grupo sanguíneo. El fenotipo AB, presenta menor concentración de antígenos B sobre la membrana de los eritrocitos y la especificidad y avidéz del anticuerpo influirá sobre el grado de reconocimiento del mismo.

En el Anexo 12 se encuentran el resto de los datos de la corrida de fermentación. Al finalizar la corrida se le determinó la actividad biológica al lote completo de la cosecha de anti-B, obteniéndose una potencia de 128 y 64 para eritrocitos B y AB

respectivamente, estos valores se deben a la mezcla de varios lotes con diferentes potencias y resultaron inferiores a los obtenidos en la fermentación en botellas rotatorias con medio RPMI y PFHM, así como en el líquido ascítico (tabla 4B y 6B).

La cosecha fue filtrada con los filtros SARTOPURE PP2 idicaps®, comercializados por la firma alemana Sartorius™. En la filtración fueron utilizados en total 12 unidades, con tamaño de poro de 8 a 0,2 μm . El sobrenadante anti-B libre de células se almacenó en 4 bolsas con 50 l de volumen cada una. En este proceso el valor de pérdidas estuvo inferior al 2%.

El proceso de concentración de sobrenadante anti-B se realizó empleando cartuchos de hemodiálisis de fibras huecas con tamaño de poro 30 *kDa*, lo que permitió retener el anticuerpo en cuestión. Durante la concentración de la primera bolsa con 50 l de sobrenadante fue medida la potencia en puntos intermedios, para poder definir hasta que volumen era necesario concentrar. En la **tabla 8** se demuestra que al reducir el volumen 5 veces se logró obtener un sobrenadante concentrado anti-B adecuado para ser empleado como materia prima para la formulación del reactivo final al cumplir con la especificación de potencia establecida, así como con los parámetros de avidéz e intensidad (LABEX, 2016).

De la misma forma se concentraron las cuatro bolsas con sobrenadante anti-B filtrado, para un volumen final de 40 l de sobrenadante concentrado los cuales cumplieron con los parámetros de calidad por lo que se pueden emplear en la obtención del Hemoclasificador anti-B.

- **Propuesta del proceso productivo en biorreactores de ola.**

Las principales características del proceso productivo se muestran en la **tabla 9** y en la **figura 12** se encuentra el diagrama de flujo. Para la producción de los 165 l de sobrenadante concentrado anti-B se deberán obtener 825 l de sobrenadante anti-B durante 4 corridas fermentativas, tres de 200 l y una de 225 l, para luego reducir el volumen 5 veces mediante el proceso de concentración. Teniendo en cuenta que en LABEX existen 2 fermentadores, se propone que sean empleados en paralelo para poder acortar el tiempo de operación a 108 días al año. Como se puede observar este tiempo resulta menor a la producción *in vivo* y a la propuesta de cultivo en frascos rotatorios.

Tabla 8. Sobrenadante concentrado anti-B obtenido con medio PFHM, durante la corrida de fermentación en Biorreactor de olas

Concentración	Vol. SN anti-B (l)	Fenotipo B			Fenotipo AB		
		Potencia	Avidez	Intensidad	Potencia	Avidez	Intensidad
1x	50	128	5 s	3 +	64	6 s	2 +
2x	25	256	5 s	3 +	128	6 s	2 +
4x	12.5	512	5 s	4 +	256	6 s	3 +
5x	10	1024	5 s	4 +	512	6 s	3 +

Tabla 9. Propuesta del proceso productivo de obtención de sobrenadante concentrado anti-B, empleando Biorreactores de Olas, para la producción de 30 000 frascos de Hemoclasificador anti-B.

Volumen de SN conc. anti-B (l) x año - IFA	165
Dilución en la formulación	5:1
Volumen de SN anti-B x año (l)	825
Cantidad de Biorreactores de Ola	2
Rendimiento de SN/ Biorreactor(l)	200-225
Volumen de SN x Corrida (l)	400-425
Volumen de SN conc. para formulación x lote (l)	40-45
Lotes x año	4
Corridas de fermentación x año	2
Tiempo x corrida (d)	54
Tiempo x año (d)	108

* Pérdidas pocas, las asume el proceso de concentración que se realiza *a posteriori*.

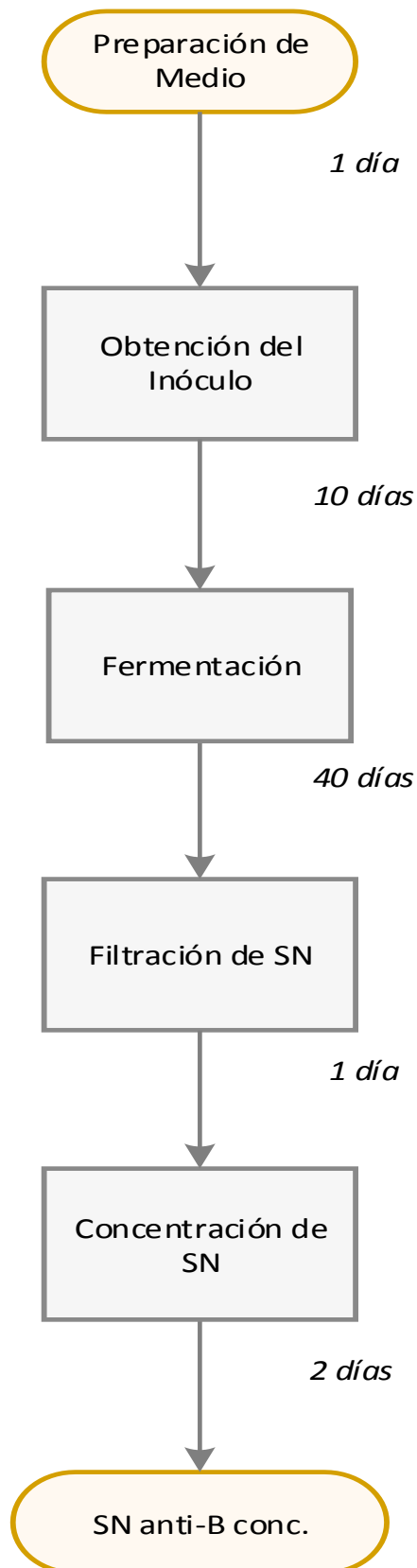


Figura 12. Esquema del Proceso Productivo de Obtención de Sobrenadante concentrado anti-B con medio PFHM empleando Biorreactor de olas.

IV.3 - VALORACIÓN ECONÓMICA DE LOS PROCESOS PRODUCTIVOS PROPUESTOS PARA LA OBTENCIÓN DEL ACM ANTI-B.

El estudio económico es un paso clave para identificar la viabilidad del establecimiento de un nuevo proceso productivo y permite elegir la variante más factible sobre la base económica.

Las propuestas de los procesos productivos realizadas para producir el Hemoclasificador anti-B, tienen como principal diferencia el sistema de fermentación a emplear; puesto que las variantes de medios de cultivo estudiadas resultaron similares o favorecedor para el RPMI, en los estudios cinéticos, aunque en el fermentador de ola se seleccionó la opción PFHM por ser la más económica por los volúmenes que se manejan.

Partiendo de la consideración anterior, en este trabajo se realizó una valoración económica sobre la base de la estimación del costo de producción directo para las etapas de obtención de IFA, y de producto terminado (formulación y llenado) así como se determinaron los ingresos y utilidades que generarían cada proceso. Para ello se tomó como base cubrir la demanda predicha de 30 mil frascos del reactivo anti-B.

Para el análisis fueron confeccionadas las diferentes fichas de costo de cada etapa productiva, las que se pueden encontrar en el anexo 13, 14 y 15. Los gastos directos asociados a las etapas de obtención de LAM o sobrenadante de cultivo anti-B de cada variante se muestran en las figuras 13,14 y 15.

Como se puede observar en la **figura 13** para la producción de 2,86 l de LAM anti-B, el costo directo es de **20 534.64 UM**. La etapa que requiere de mayores gastos es la de *Cuarentena*, porque en la misma se incurre en la adquisición de los ratones en CENPALAB, donde cada uno tiene un precio de 27.48 CUP y para la producción de un lote se utilizan 500 animales (tabla 4). Si en LABEX se crearán las condiciones idóneas para la reproducción de los ratones, los gastos de producción disminuirán significativamente, puesto que el costo unitario de los modelos animales estaría alrededor de 3 CUP.

Si se consideran las pérdidas calculadas al proceso, se debe incrementar en un 25% el costo, resultando aproximadamente 25 600 UM para obtener el IFA, del cual solo se obtendrían 11, 44 l de formulado utilizando una dilución 1:4.

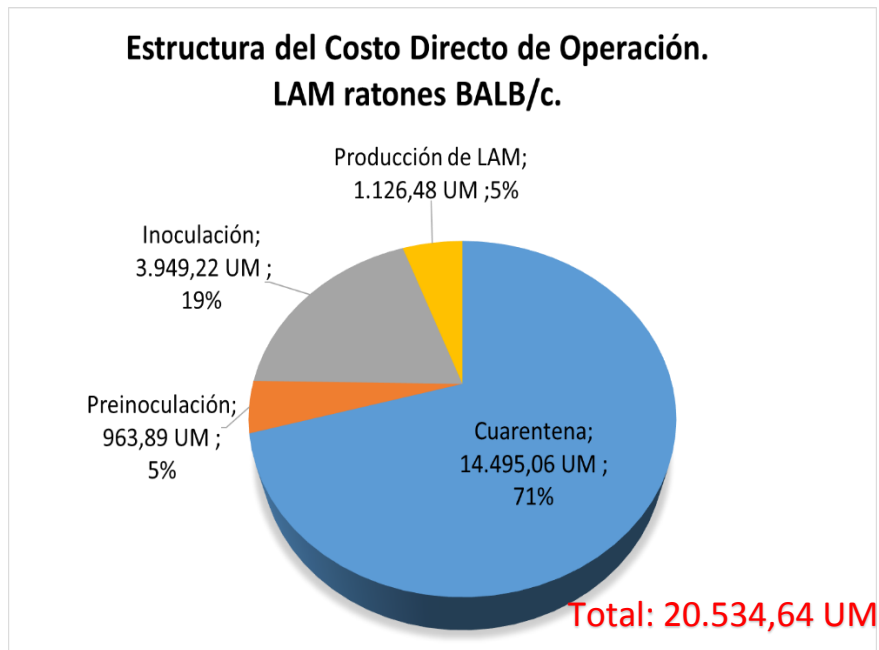


Figura 13. Gastos directos de Operación del proceso de producción de 2,86 L de LAM anti-B.

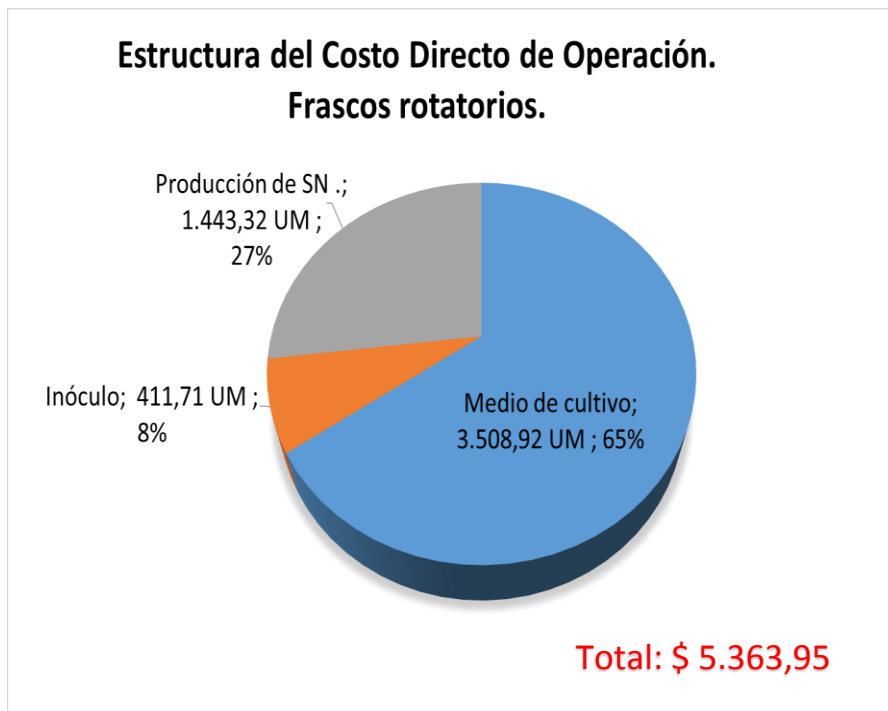


Figura 14. Gastos directos de Operación del proceso de producción de 33 L de SN anti-B en fermentación en frascos rotatorios.

La variante de fermentación en frascos rotatorios, cuya evaluación se muestra en la **figura 14**, resulta en un costo total de **5 363.95 UM** para la producción de 33 l de sobrenadante anti-B, con un 65% que pertenece a la etapa de preparación de medios; demostrándose que la utilización de suero fetal bovino aumenta los costos de las materias primas en los procesos biotecnológicos.

Por último, en la **figura 15** se muestra el desglose de los gastos para la obtención de 40 l de sobrenadante concentrado (IFA) empleando fermentadores de olas, donde cada corrida productiva tiene un costo total de operaciones 2.5 veces superiores al anterior proceso *in vitro* (**13 551.16 UM**) y cuya etapa de mayor importancia la constituye la propia fermentación con 9 683.85 UM. Sin embargo, cuando se analiza la ficha de costo 4 (anexo 15) se puede apreciar que el componente de salario es significativo igualmente, donde se gastarían 8 448.17 CUP para un **87.2 %** del componente de fermentación sobre el costo de operaciones, debido a la necesidad de emplear trabajadores por turnos para la atención del fermentador.

En la gráfica de la **figura 16**, se realizó una comparación de las tres variantes productivas, de los gastos totales correspondientes a la producción de 30 mil frascos de reactivo anti-B, donde la producción en ratones se convierte en la menos rentable, con un total de **611 898.96 UM/a**; por lo cual resultan mucho más atractivas las alternativas *in vitro*, entre las cuales se destaca la fermentación en frascos rotatorios con un gasto total anual de **290 422.99 UM/a**, siguiéndole la propuesta con biorreactores de olas con **293 964.34 UM/a**. La poca diferencia entre ambas se resarce si se valora que con esta última se obtiene un volumen de IFA superior, disminuyendo el número de corridas necesarias al año con respecto a los frascos rotatorios (tablas 7 y 8).

Para determinar las ganancias o utilidades que generaría cada alternativa, se calcularon los ingresos por concepto de ventas a partir de la estimación del precio de venta nacional de un frasco de Hemoclasificador anti-B como **30.6 CUP**, como actualmente se comercializa por LABEX. Por tanto, para 30 000 frascos los ingresos serían de **918 000 CUP/a**. Como se observa en la figura 16, con el proceso de producción de LAM se obtendría prácticamente la mitad de las ganancias comparados con el resto de las variantes, donde con la producción en frascos rotatorios el valor sería de **655 490.44 UM/a**, representando una diferencia aproximada de 30 000 UM con respecto a la alternativa en biorreactores de olas.

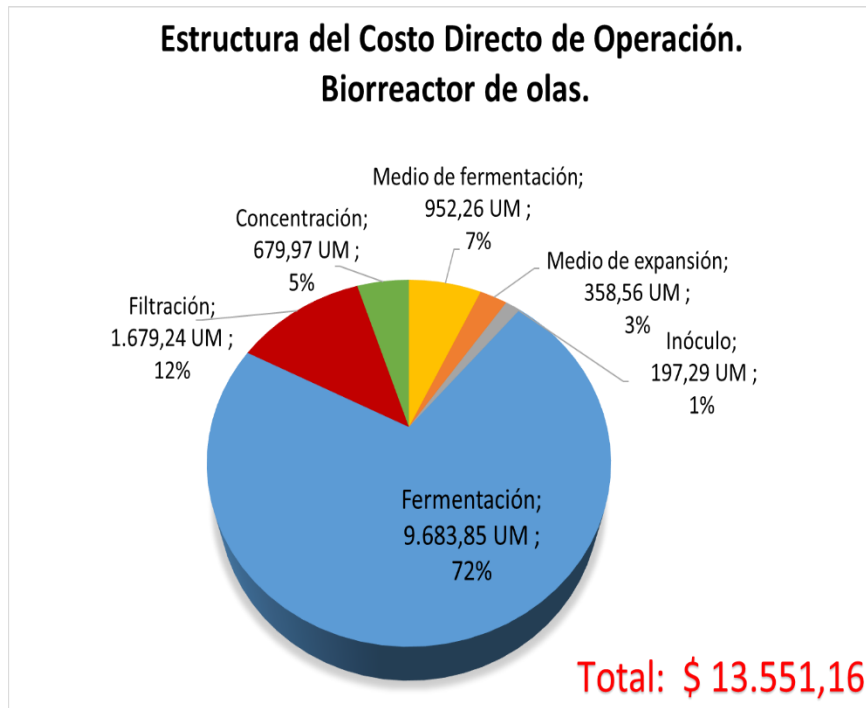
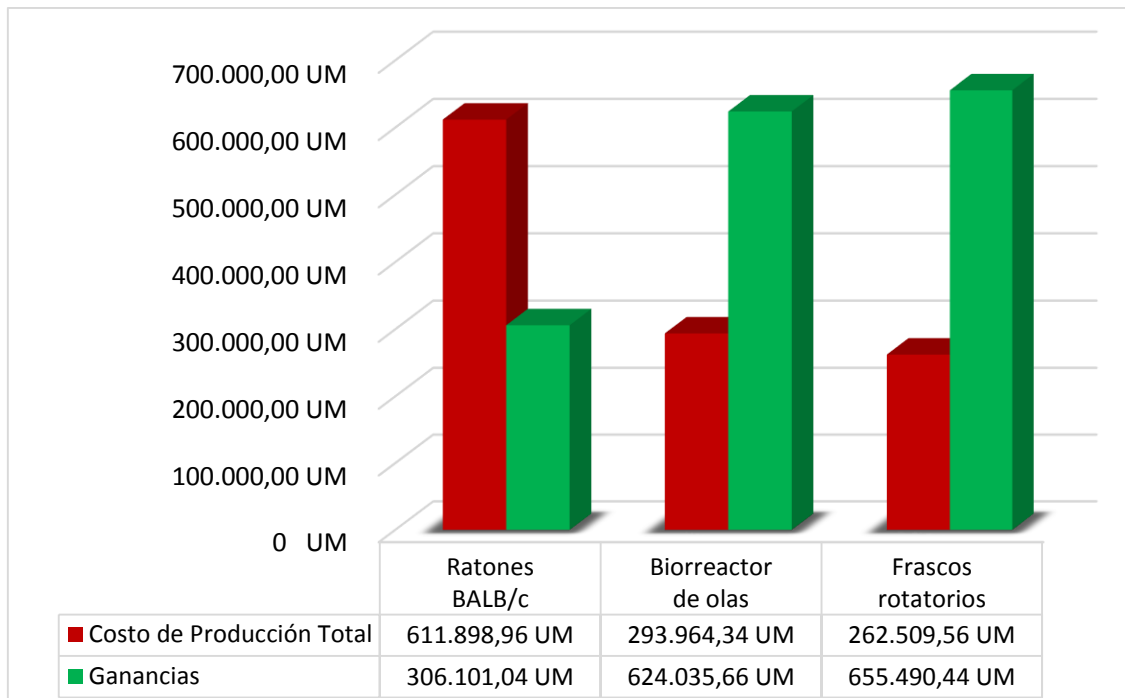


Figura 15. Gastos directos de Operación del proceso de producción de 40 L de SN conc. anti-B.



Teniendo en cuenta lo anterior se puede concluir que la propuesta más factible desde el punto de vista económico para la producción del reactivo anti-B, es la de frascos rotatorios y medio de cultivo RPMI + 8 % de SFB, la que a su vez representa un tiempo de operación de 150 días al año (tabla 7).

IV.4 - VALORACIONES GENERALES DE LOS PROCESOS PRODUCTIVOS.

Los resultados planteados hasta el momento en el desarrollo de este trabajo permiten realizar una comparación de los procesos productivos a partir de las ventajas y desventajas que ofrecen cada uno de ellos.

La alternativa donde se obtiene mayor calidad de la IFA para la producción del Hemoclasificador anti-B, es la producción de LAM en ratones *BALB/c*, con valores de potencia muy superiores al resto de las variantes (tabla 3.B), sin embargo, ofrece las mayores desventajas desde el punto de vista económico, por el elevado precio de compra que tienen los biomodelos y el alto por ciento de pérdidas del proceso, lo cual eleva el número de animales necesarios a 9158, además de las implicaciones bioéticas que representa su uso.

Por otro lado, las alternativas *in vitro* representan variantes más factibles, compiten entre ellas, principalmente en cuanto a la calidad del sobrenadante y el costo de producción, prevaleciendo siempre la opción en frascos rotatorios con medio de cultivo RPMI + 8 % de SFB sobre la fermentación en biorreactores de olas y medio PFHM. Esto se debe fundamentalmente a que el Hibridoma anti-B en el medio con suero tiene un desempeño productivo superior al medio libre de suero y proteínas (tabla 2), lo cual influye en que se requiera una etapa de concentración posterior a la fermentación en biorreactores de olas, aumentando 5 veces los volúmenes a producir con respecto a los frascos rotatorios.

No ha de olvidarse que la alternativa más rentable (frascos rotatorios) tiene como principal desventaja el uso de suero fetal bovino, lo que trae consigo efectos negativos para el proceso productivo tales como la variabilidad entre lotes, el aumento de los gastos asociados a la etapa de preparación de medio, que representa el mayor componente en el costo total del proceso productivo y las consideraciones bioéticas por la utilización de animales para la obtención del suero (figura 13). Si se comparan en cuanto al tiempo productivo, las alternativas de producción de LAM y frascos rotatorios consumen igual tiempo 150 días, sin embargo, con los biorreactores de olas solo se requieren 108 días.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

V.1 - CONCLUSIONES

1. El crecimiento del Hibridoma anti-B (clon BMS-4) en frascos rotatorios y fermentación por lote, se caracterizó por una concentración máxima de células vivas de $2.51 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ en medio de cultivo PFHM, valor dos veces superior a la obtenida en RPMI + 8% SFB; mientras que la velocidad de crecimiento máxima y el tiempo de duplicación fueron similares en ambos medios, alrededor de 0.03 h^{-1} y 21.4 h respectivamente.
2. En la adaptación del Hibridoma anti-B en medio PFHM los valores de potencia no superaron los 512 según exige la regulación (256 para fenotipo B y 128 para fenotipo AB). En el medio RPMI con Suero Fetal Bovino (8%) y cultivo por lote, se obtuvieron los resultados de potencia por encima de lo establecido por regulación (4096 con el fenotipo B y 2048 con fenotipo AB). La adición de insulina y glutamina no influyó en la mejora de la productividad de la línea celular con PFHM.
3. La producción del IFA anti-B en ratones *BALB/c* se caracterizó por una alta variabilidad productiva, un rendimiento promedio de 5.7 ml de LAM anti-B por biomodelo y 25.8% de pérdidas de volumen en el proceso de clarificación del lote. La actividad biológica del producto cumplió con los parámetros de calidad (≥ 512) frente a los fenotipos ensayados.
4. En el proceso *in vitro* en frascos rotatorios y medio de cultivo RPMI, se obtuvieron lotes de sobrenadante anti-B con resultados de actividad biológica que cumplieron los rangos establecidos por la especificación de calidad. Sin embargo, en la fermentación en el biorreactor de olas, con medio PFHM, el sobrenadante cumple los requisitos para avidez e intensidad, pero se obtuvo una potencia de aglutinación de 128 y 64 para eritrocitos B y AB, respectivamente; por lo que necesita de una etapa posterior de concentración, para que la IFA cumpla con los estándares de calidad según regulación 59/2011.
5. Se realizaron las propuestas de los tres procesos productivos, uno *in vivo* y dos *in vitro*, para cubrir una demanda de 30 mil frascos de Hemoclasificador anti-B. En los procesos *in vitro* se eliminan los cuestionamientos éticos a la tecnología.

6. El proceso *in vivo* se caracteriza por un tamaño de lote mayor (500 ratones), con una mayor concentración de AcM anti-B en la IFA que rinde 41 l para formulación, pero requiere al menos 19 lotes al año. Por su parte el proceso productivo *in vitro* con frascos rotatorios, rinde un volumen de IFA por lote similar al anterior (< 3 l), sin posibilidad de diluir, requiriendo 25 lotes al año, producidos en 80 biorreactores. En los biorreactores de ola, se obtienen mayor volumen de IFA a formular por lote (40-45 l), por lo que requiere de sólo 4 fermentaciones al año, aunque se ha de concentrar 5 veces el sobrenadante obtenido.
7. Se realizó una comparación económica de las tres variantes productivas para la producción de 30 mil frascos de reactivo Hemoclasificador anti-B, donde la producción *in vivo* se convierte en la menos rentable, con un costo de producción total de 611 898.96 UM/a; resultando mucho más atractivas las alternativas *in vitro*, entre las cuales se destaca la fermentación en frascos rotatorios con un gasto total anual de 290 422.99 UM/a, siguiéndole la propuesta con biorreactores de olas con 293 964.34 UM/a.
8. La propuesta más factible desde el punto de vista técnico-económico para la producción del reactivo anti-B, es la de frascos rotatorios y medio de cultivo RPMI + 8 % de SFB, la que a su vez representa un tiempo de operación de 150 días al año y una ganancia de 655 490.44 UM/a.

V.2 - RECOMENDACIONES

1. Estudiar otras estrategias en el proceso fermentativo en frascos rotatorios que permitan aumentar el volumen productivo y mejorar la productividad de la variante seleccionada para disminuir los tiempos de operación al año.
2. Estudiar otros tipos de medios de cultivo libres de suero, que permitan aumentar la productividad del Hibridoma anti-B y disminuir los costos del proceso productivo sin deteriorar los parámetros de calidad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abhyankar A., Gandhi N., Panchal P., Iyer Y., Patel M. (2012). *Indigenously developed monoclonal antibody specific for human blood group B*. Journal of Hematological Malignancies, 2 (2):18-24.
- Abijana G. (2011). *Obtención de un reactivo monoclonal anti-D in vitro*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Aiba, Humprey y Millis. (1970). *Biochemical Engineering*. Ed. Ciencia y Técnica, La Habana.
- Aj S., Md J., Fe M., Br W. (1990). *Role of insulin-like growth factors and the type I insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells*. J. Biol. Chem., 265(34): 21172-21178.
- Applikon Biotechnology. (2014). *Cultivation Systems from Discovery to Production*. Single use Catalog,: 22-26.
- Arathoon W., Birch J. (1985). *Large scale cell culture in biotechnology*. Science, 232:1390-1395.
- Arora M. (2013). *Medios de cultivo celular: una revisión*. Mater Methods, 3:175.
- Ávila S. (2015). *Establecimiento de un proceso productivo in vitro para la obtención de un reactivo hemoclasificador anti-D*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Behme S. (2009). *Production facilities*. En: Manufacturing. Ed. Wiley VCH, Weinheim: 227-275.
- Berson R., Friederichs G. (2008). *A self-feeding roller bottle for continuous cell culture*. Biotechnol. Prog., 24:154-157.
- Boedeker B. (2014). *Disposables for Biomanufacturing. A User's Perspective*. BioProcess International, 12(8):67-68.
- Brewer J., Randall T., Parkhouse R., Corley, R. (1994). *Mechanism and subcellular localization of secretory IgM polymer assembly*. The Journal of Biological Chemistry, 269:17339-17348.

- Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. (2010). *Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database*. *Altex*, 27: 53-63.
- Butler M. (2005). *Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68(3):283-291.
- Butler M. (2015). *Serum and Protein Free Media*. En: *Animal Cell Culture*. M. Al-Rubeai (ed.). Ed. Springer, Switzerland, Vol.9: 223-234.
- Cao T., Y-Q Z. (2015). *Viability and proliferation of L929, tumor and hybridoma cells in the culture media containing sericin protein as a supplement or serum substitute*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99:7219–7228.
- Cárdenas N. (2013). *Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas)*. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Castillo R., Gavilondo J. (1989). *Producción in vivo de Anticuerpos Monoclonales*. Curso postcongreso “Tecnología de Obtención y Producción de Anticuerpos Monoclonales Murinos”. La Habana.
- Castillo R., Veloso A. (1990). *Procedimiento para obtener anticuerpos monoclonales mediante el trasplante de hibridomas in vivo*. *Biocología Aplicada*, 7(1):102-105.
- CECMED. (2011). *Regulación No. 59-2011. Requisitos De Los Diagnosticadores Utilizados En Inmunohematología*.
- Cerdas-Quesada C. (2015). *Uso de anticuerpos monoclonales en inmunohematología y bancos de sangre*. *Rev. Colegio de Microb. Quim. Clin.*, 21(1):7-11.
- Chang T. (1980). *Production of monoclonal antibodies in serum free medium*. *J. Immunol. Methods*, 39: 369–375.
- Chico E., Rodríguez G., Figueredo A. (2008). *Bioreactors for animal cells*. En: L. Castilho (ed.), *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. Ed. Taylor & Francis, 1ra Ed., New York: 221-223.
- Christie A., Butler M. (1994). *Growth and metabolism of a murine hybridoma in cultures containing glutamine-based dipeptides*. *GIBCO Focus*, 16 (1): 9-13.

Chung J., Sinskey A., Stephanopoulos G. (1998). *Growth Factor and Bcl-2 Mediated Survival During Abortive Proliferation of Hybridoma Cell Line*. *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (2):163-171.

Corning Incorporated. (2010). *Corning® Roller Bottles Selection and Use Guide*. NY 14831-0001.

Coppo, Baez. (2010). Grupos sanguíneos. Disponible en: <http://www.bioapuntes.cl/apuntes/grupos.htm>. Consultado el 19 de agosto de 2016.

Dewar V., Voet P., Denamur F., Smal J. (2005). *Industrial Implementation of in Vitro Production of Monoclonal Antibodies*. *ILAR Journal*, 46 (3): 307-313.

Didier C. (2008). *Optimización de la producción de eritropoyetina humana recombinante (rhepo) mediante el cultivo de células animales*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Argentina.

Doran P., García L. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Acribia:468.

Drapeau D., Luan Y., Popoloski J., Richards D., Cohen D., Sinacore M., Adamson D. (1994). *Extracellular insulin degrading activity creates instability in a CHO-based batch-refeed continuous process*. *Cytotechnology*, 15 (1-3):103-109.

Dutton R., Scharer J., Moo-Young M. (1998). *Descriptive parameter evaluation in mammalian cell culture*. *Cytotechnology*, 26:139-152.

Ecker D., Ransohoff T. (2014). *Mammalian Cell Culture Capacity for Biopharmaceutical Manufacturing*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 139:185–225.

Eibl R., Eibl D. (2008). *Bioreactors for mammalian cells: general overview*. En: *Cell and tissue reaction engineering*. R. Eibl, D. Eibl, R. Pörtner, G. Catapano y P. Czermak (ed.). Ed. Springer, Heidelberg: 55–82.

Eibl R., Kaiser S., Lombriser R., Eibl D. (2010). *Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86: 41-49.

Erm S., Adamberg K., Vilu R. (2014). *Multiplying steady-state culture in multi-reactor system*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(11):2361-2370.

Esparraguera Y. (2006). *Obtención de un reactivo hemoclasificador con el hibridoma anti A IHI-15 en biomodelos murinos Ofbalb (F1) y Balb/c*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.

Even M., Sandusky C., Barnard N. (2006). *Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations*. Trends in Biotechnology, 24 (3):105-108.

Expert Committee on Biological Standardization. (2006). *International Standards for Minimum Potency of Anti-A and Anti-B Blood Grouping Reagent*. Annual Report by World Health Organization (WHO), Switzerland.

Fahey C. (2002). *Investigation of Large Scale Production and Quantification Methodology of Monoclonal Antibodies (MAbs)*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Dublin City University, Irlanda.

Faife E., Rodríguez T., Rabaza Y., Badía T., Victores S., Castillo A. (2008). *Effects of selection and adaptation of NS0 cells to protein-free medium on the properties, affinity and biological activity of a monoclonal antibody*. Biotecnología Aplicada, 25: 247-253.

Fischer M., Wolfram W., B. C., Böhmig, G., Wahrmann, M. y Eibl, M. (2015). *Surface plasmon resonance analysis shows an IgG-isotype-specific defect in ABO blood group antibody formation in patients with common variable immunodeficiency*. Frontiers in Immunology, 6: 211.

Flickinger M., Drew S. (1999). *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Edición I. John Wiley & Sons.

Frahm B., Blank H., Cornand P., Oelner W., Guth U. (2002). *Determination of dissolved CO₂ concentration and CO₂ production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement*. Journal of Biotechnology, 99 (2):133-148.

Franěk F., Hohenwarter O., Katinger H. (2000). *Plant Protein Hydrolysates: Preparation of Defined Peptide Fractions Promoting Growth and Production in Animal Cells Cultures*. Biotechnol. Prog., 16 (5):688-692.

Fröhlich H., Villian L., Melzner D., Strube J. (2012). *Membrane Technology in Bioprocess Science*. Chem. Ing. Tech., 84: 905-917.

Fuentes D., González R., González B., Negrín N. (2003). *Monoclonales, Estudio de los tumores sólidos desarrollados por los ratones durante la producción de Anticuerpos*. Vaccimonitor, 12 (3):11-14.

- Galván A. (2013). *Selección de un medio de cultivo alternativo para la producción del anticuerpo monoclonal Nimotuzumab*. Tesis de grado, Universidad de La Habana, La Habana.
- García A. (2011). *Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos*. Neurología, 26 (5): 301-306.
- GE Company. (2008). *Cultivation of hybridoma cells in suspension using WAVE Bioreactor System 200*. WAVE Bioreactor System. En: Cell culture procedures. Procedure 28-9308-88 AA. Obtenido en www.gelifesciences.com/wave. Consultado el 30 de junio de 2016.
- GE Healthcare. (2012). *Highly efficient inoculum propagation in perfusion culture using WAVE Bioreactor™ systems*. Obtenido en www.gelifesciences.com. Consultado el 18 de enero de 2017,
- González E., Otero O., Amín N., Reyes F., Cuello M., Ramírez F. (2015). *Producción, purificación y caracterización del AcM contra polisacárido capsular Vi de Salmonella Typhi y su aplicabilidad en ensayos de identidad*. Revista Bioprocesos, 1(3):1-12
- González R. (2000). *Principios básicos de escalado*. Centro de Estudios de Combustión y Energía. Universidad de Matanzas, Cuba.
- Goswami J., Sinskey A., Steller H., Stephanopoulos G., Wang, D. (1999). *Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells*. Biotechnol. Bioeng., 62 (6): 632-640.
- Greenfield E. (2014). *Generating Monoclonal Antibodies*. En: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2da ed.
- Griffiths B. (1986). *Scaling-up of animal cell cultures*. En: R. Freshney, Animal Cell Culture: A Practical Approach, Ed. IRL Press Oxford UK, 1ra Ed.: 33-70.
- Grispan S. (1983). *Grupos Sanguíneos ABO Y Rh*. Rev. Medica Honduras, 51:103-114.
- Gronemeyer P., Ditz R., Strube, J. (2014). *Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing*. Bioengineering, 1:188-212.
- Hashmi F., Cail R., Islam M., Saleem Z., Amin U., Hussain K., Saeed H. (2014). *Adaptation of WM-68 Hybridoma Cell-line in Minimal Serum and Serum Free Culture Conditions*. Pakistan J. Zool, 46 (2): 355-362.

- Hayter P., Kirkby N., Spier R. (1992). *Relation between hybridoma growth and monoclonal antibody production*. Enzyme Microb. Technol.,14: 454-461.
- Henry O., Kwok E., Piret J. (2008). *Simpler Noninstrumented Batch and Semicontinuous Cultures Provide Mammalian Cell Kinetic Data Comparable to Continuous and Perfusion Cultures*. Biotechnol. Prog., 24: 921-931.
- Hernández A. (2014). *Establecimiento del proceso de fermentación para el anticuerpo monoclonal anti-CD45*. Tesis de Diploma, Universidad de La Habana, La Habana.
- Hernández H. (2003). *Microbiología Industrial*. 1ra.Edición. EUNED. San José de Costa Rica.
- Hernández R. (2015). *Tendencias principales en la manufactura biofarmacéutica: 2017*. Pharmaceutical Technology en Español, 13(4): 5-10.
- Hesse F., Wagner R. (2000). *Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures*. Trends Biotechnol., 18 (4):173-180.
- Horn M., Zuercher A., Imboden M., Rudolf M., Lazar H., Wu, H. (2010). *Preclinical in vitro and in vivo characterization of the fully human monoclonal IgM antibody KBPA101 specific for Pseudomonas aeruginosa serotype IATS-O11*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54: 2338-2344.
- Howell J. (1993). *Introduction*. En: J. Howell, V. Sánchez y R. Field, Membranes in bioprocessing: theory and applications. Ed. Chapman & Hall, London: 203-242.
- Huang Y., Hu W., Rustandi E., Chang, K. (2010). *Maximizing Productivity of CHO Cell Based Fed-Batch Culture Using Chemically Defined Media Conditions and Typical Manufacturing Equipment*. Biotechnol. Prog., 26 (5): 1400-1410.
- Iáñez E. (2005). Ciclo celular y crecimiento. Obtenido en <http://www.MicrobiologíaAgral.com>. Consultado el 20 de noviembre de 2016.
- Ilag L. (2011). *Immunoglobulin M as a vaccine adjuvant*. Medical Hypotheses, 77: 473-478.
- Invitrogen Corporations. (2001). *Hybridoma Cells*. Obtenido en www.invitrogen.com. Consultado el 20 de diciembre de 2016.
- Iyer Y., Vasantha K., Manisha P., Jadhav S., Gupte S., Mohanty D. (2006). *Production of murine monoclonal anti-B*. INDIAN J MED RES, 123: 561-564.

- Jackson L., Trudel L., Fox J., Lipman, N. (1999). *Monoclonal antibody production in murine ascites. II. Production characteristics.* Lab Anim Sci., 49 (1):81-86.
- Jochems A., Van der Valks F., Stafleu B. (2002). *The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem?* ATLA,30:219-227.
- Justiz A. (2013). *Evaluación del hibridoma C6G4 para la producción in vitro del reactivo hemoclasificador ior® Hemo-CIM Anti-B.* Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Keen M. (1995). *The culture of rat myeloma and rat hybridoma cells in a protein-free medium.* Cytotechnology, 17:193-202.
- Kreutz F. (1997). *Production of highly pure monoclonal antibodies without purification using a hollow fiber bioreactor.* Hybridoma, 16:485-486.
- LABEX. (2009). *ESP-1227 Anti-B.*
- LABEX. (2012). *01 PNO. 005 Congelación de células.*
- LABEX. (2015). *01 PNO.002 Conformación de los Bancos Celulares.*
- LABEX. (2016). *ESP.47.5002 LAM anti-B.*
- LABEX. (2016). *ESP.5060 Sobrenadante anti-B.*
- LABEX. (2016). *ESP-5061 Sobrenadante concentrado anti-B.*
- LABEX. (2017). *Informe del Plan de Negocios 2018 a los trabajadores.*
- Lee Y.-K., Teoh A.-P, Yap P.-K. (1997). *Regulation of glucose and glutamine uptake and the production of monoclonal antibody in hybridoma cultures.* Enzyme and Microbial Technology, 21: 429-435.
- LeFloch F., Tessier B., Chenuet S., Guillaume J-M., Cans P., Goergen J-L. (2006). *Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells.* Cytotechnology, 52: 39-53.
- Leno M., Merten W., Hache J. (1992). *Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production in Semicontinuous Culture.* Biotechnology and Bioengineering, 39: 596-606.

- León G., Cruz C., Rojas L. (2004). *Producción de Anticuerpo Monoclonal (Acmo) con Especificidad Anti B, para ser utilizado como Reactivo de Hemoclasificación.* Investigación Clínica, 45 (2):145-157.
- Li F., Vijayasankara N., Shen A., Kiss R., Amanullah A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2 (5): 466-477.
- LifeTechnologies. (2014). *Hybridoma-Serum Free Media (SFM)*. Obtenido en www.lifetechnologies.com. Consultado el 20 de diciembre de 2016.
- Little M., Kipriyanov S., Gall F., Moldenhauer G. (2000). *Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies.* Immunology Today, 21(8):364-370.
- Liu H., Ma J., Winter C., Bayer R. (2010). *Recovery and purification process development for monoclonal antibody production.* *MAbs*, 2: 480-499.
- Ljunggren J., Haggstrom L. (1994). *Catabolic Control of Hybridoma Cells by Glucose and Glutamine Limited Fed Batch Cultures.* Biotechnology and Bioengineering, 44: 808-818.
- Mader A., Chromikova V., Kunert R. (2013). *Recombinant IgM expression in mammalian cells: A target protein challenging biotechnological production.* Advances in Bioscience and Biotechnology, 4: 38-43.
- Makeneni S., Ji Y., Watson DC., Young NM., Woods R. (2014). *Frontiers in Immunology.* Obtenido en www.frontiersin.org. Consultado el 11 de julio de 2016
- Maldonado J. (2016). *Experimentación con biomodelos animales en ciencias de la salud.* Avances en Biomedicina, 5(3):1-10.
- Marcus D. (1969). *The ABO and Lewis blood-group system immunochemistry, genetics and relation to human disease.* N Engl. J. Med., 280: 994-1006.
- Marks L. (2014). *Monoclonal antibodies and the transformation of blood typing.* *MAbs*, 6 (6): 1362-1367.
- Marx U. (2000). *Monoclonal antibody production.* ATLA, 25: 121-137.
- Mauter M. (2009). Environmental life-cycle assessment of disposable bioreactors. *BioProcess Int.*, 7 (4): 18-28.

- McDonnell S. (2015). Production of Antibodies in Hybridoma and Non-hybridoma Cell Lines. *En: M. Al-Rubeai (Ed.), Animal Cell Culture*. Ed. Springer, Switzerland, Vol. 9: 65-88.
- Milland J., Sandrin M. (2006). *ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation*. *Tissue Antigens*, 68: 459–466.
- Milstein C., Köhler G. (1975). *Continues Culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 256:495-497.
- Miranda A. (2011). *Evaluación del Hibridoma t4 anti-CD4 para la producción in vitro del AcM IOR -T4*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Morbach S., Krämer R. (2003). *Impact of transport processes in the osmotic response of Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.*, 104: 69–75.
- Morgan S., Darling D., García J. (1995). *Cultivo de células animales*. Ed. Acribia, Zaragoza. España.
- National Research Council. (1999). *Monoclonal Antibody Production*. Washington DC, National Academy Press.
- Nocito I. (2015). *Requerimientos de Cultivos Celulares*. Curso de Postgrado “Introducción al Cultivo de Células Eucariotas”. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
- Nuñez S. (2014). *Estimación y Control de procesos biotecnológicos multivariados*. Tesis doctoral, Universidad de La Plata, Argentina.
- Ohlin M., Zouali M. (2003). *The human antibody repertoire to infectious agents: implications for disease pathogenesis*. *Molecular Immunology*, 40: 1-11.
- Ozturk S., Palsson B. (1990a). *Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production*. *Journal of Biotechnology*, 16: 259-278.
- Ozturk S., Palsson B. (1990b). *Loss of Antibody Productivity During Long-Term Cultivation of a Hybridoma Cell Line in Low Serum and Serum-Free Media*. *Hybridoma*, 9 (2): 167-175.

- Palomino F. (2016). *Fisiología del sistema ABO una mini-revisión narrativa*. Medicina Transfusional, 13 (1):16-20.
- Pandey S. (2010). *Hibridoma technology for production of monoclonal antibodies*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2: 88-94.
- Patenaude S., Seto N., Borisova S., Szpacenko A., Marcus S., Palcic M. (2002). *The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis*. Nat. Struct. Biol., 9: 685-690.
- Patnaik S., Helmberg W., Blummenfeld O. (2012). *BGMUT: NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems*. Nucleic Acids Res., 40: 1023-1029.
- Portner R. (2015). *Bioreactor for mamalian cell*. En: M. Al-Rubeai (Ed.), Animal Cell Culture, Ed. Springer. Switzerland, Vol. 9: 89-136.
- Puisseaux G. (2016). *Evaluación Técnica – Económica de un sistema de Biorreactores de Ola para la obtención del reactivo hemoclasificador anti-B*. Tesis de grado, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Rao G., Moreira A., Brorson K. (2009). *Disposable bioprocessing: the future has arrived*. Biotechnol. Bioeng., 102: 348–356.
- Rao G., Kostov Y., Moreira A., Frey D., Hanson M., Jornitz M. (2009). *Non-Invasive Sensors as Enablers of “Smart” Disposables*. Bioprocess International, 7(1): 24-27.
- Rivero R. (2010). *OCLC WorldCat Identities*. Obtenido en <http://www.oclc.org/research/researchworks>. Consultado el 6 de abril de 2016,
- Rodríguez M., Costa A., Henriques M., Azeredo J., Oliveira R. (2010). *Technological Progresses in Monoclonal Antibody Production Systems*. AIChE, 26: 332–351.
- Sapatnekar S. (2015). *Molecular Typing for Red Blood Cell Antigens*. American Association for Clinical Chemistry. Obtenido en <https://www.aacc.org/>. Consultado el 11 de julio de 2016.
- Sargent B. (2012). *Using Bioreactors to Improve Antibody Production in Hybridoma Cells*. Obtenido en <http://cellculturedish.com>. Consultado el 13 de diciembre de 2016.
- Schwarz HP., Dorner F. (2003). *Karl Landsteiner and his major contributions to haematology*. British Journal of Hematology, 121 (4): 556-565.

- Shiu P-J., Ju Y-H., Chen H-M., Lee C-K. (2015). *Effect of Complex Nutrients and Repeated-Batch Cultivation of Halobacterium salinarum on enhancing Bacteriorhodopsin Production*. J. Microb. Biochem. Technol., 7 (5):289-293.
- Shukla A., Gottschalk U. (2013). *Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing*. Trends in Biotechnology, 31(3):147-154.
- Shukla A., Kandula J. (2008). *Harvest and Recovery of Monoclonal Antibodies from Large-Scale Mammalian Cell Culture*. BioPharm International, 7: 34–45
- Simón M. (2015). *Bioreactor Design for Adherent Cell Culture. The Bolt-On Bioreactor Project, Part I: Volumetric Productivity*. BioProcess International, 13(1): 28-32.
- Skirzewski M. (2015) *Grupos Sanguíneos*. ppt. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Obtenido en www.ucla.edu.ve/dmedicin/departamentos/. Consultado el 24 de noviembre del 2016.
- Soria N. (2010). *Obtención y evaluación del líquido ascítico murino hemoclasificador anti-B en las líneas de ratones Obf1b (F1) y Balb/c*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Spalter S., Kaveri S., Bonnin E., Mani J., Cartron J., Kazatchkine M. (1999). *Normal Human Serum Contains Natural Antibodies Reactive With Autologous ABO Blood Group Antigens*. Blood, 93 (12): 4418-4424.
- Tang Y-J., Ohashi R., Hamel J-F. (2007). *Perfusion Culture of Hybridoma Cells for Hyperproduction of IgG2a Monoclonal Antibody in a Wave Bioreactor-Perfusion Culture System*. Biotechnol. Prog., 23 (1): 255-264.
- Téllez G. (2017). *Obtención del Anticuerpo Monoclonal Anti-CD4 en Biorreactor de Olas Applikon 50L*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Tharmalingam T., Ghebeh H., Wuerz T. (2008). *Pluronic Enhances the Robustness and Reduces the Cell Attachment of Mammalian Cells*. Mol. Biotechnol., 39: 167-177.
- Vicente Y. (2015). *Obtención de un clon estable de una línea celular hibridoma para la producción del AcM racotumomab*. Tesis de Maestría en Ingeniería de los Procesos Biotecnológicos, Universidad de la Habana, La Habana.

Victores, Castillo, Faifer, Rabasa, Rodríguez, Rojas, Figueredo. (2008). *Cultivos semicontinuos como herramienta para la caracterización celular del hibridoma murino 1E10*. *Biología Aplicada*, 25: 149-154.

Vitón P. (1998). *Adaptación del hibridoma productor del Anticuerpo monoclonal ior-t3 a un Medio Libre de Suero*. Tesis de Maestría en Ingeniería de los Procesos Biotecnológicos, Universidad de La Habana, La Habana.

Vitón P., Rodríguez T., Téllez G., Casado L., Soler A., Zorrilla H., Hernández A. (2015). *Comportamiento en cultivo de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales leucocitarios: Parte I. Estudios cinéticos a pequeña escala del hibridoma L3 productor del AcM α CD45*. *Bioprocesos*, 1 (1):1-5.

Vollmers H., Brändlein S. (2009). *Natural antibodies and cancer*. *New Biotechnology*, 25: 294-298.

Wessman S., Levings R. (1999). *Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production*. *Dev. Biol. Stand.*, 99: 3-8.

Wittig O., Alonso JA., Romano EL., Montañó RF. (2006). *Producción de anticuerpos monoclonales con especificidad por los grupos sanguíneos A y B. Evaluación de su uso como reactivos hemoclasificadores*. *Investigación Clínica*, 47 (33): 253-264.

Wolfram W., Sauerwein K., Binder C., Eibl-Musil N., Wolf H., Fischer M. (2016). *Pneumococcal Polysaccharide Vaccination elicits IgG anti-A/B Blood group antibodies in healthy individuals and Patients with Type I Diabetes Mellitus*. *Frontiers in Immunology*, 7: 493.

Wurm F. (2004). *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. *Nat. Biotechnol.*, 22: 1393-1398.

Xie H. (2012). *Ratones y ratas de laboratorio*. *Methods*, 2: 113.

Yee D., Paik S., Lebovic G., Marcus R., Favoni R., Cullen K. (1989). *Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer*. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.*, 3 (3): 509-517.

Yuki N. (2005). *Carbohydrate mimicry: a new paradigm of autoimmune disease*. *Current Opinion Immunology*, 17: 577-582.

Zhang J., Robinson D. (2005). *Development of Animal-free, Protein-Free and Chemically-Defined Media for NS0 Cell Culture*. Cytotechnology, 21 (1): 87-95.

Zhou W., Hu W. (1995). *Effect of insulin on a serum-free hybridoma culture*. Biotechnology and Bioengineering, 47: 181-185.

Zielke H., Zielke C., Ozand, P. (1984). *Glutamine a Major Energy-Source for Cultured Mammalian-Cells*. Federation Proceedings, 43 (1): 121-125.

Otros Sitios Web Consultados:

<https://www.cecmecmed.cu>. Consultado el 10 de enero del 2017.

<http://www.laboratoriomicrovet.com./medios a.html>. Consultado el 21 de diciembre del 2016.

<https://www.fishersci.com/shop/products>. Consultado el 2 de diciembre del 2016.

<https://www.fishersci.es/es/es/catalog/search>. Consultado el 10 de enero del 2017.

VII. ANEXOS

ANEXO 1. *Frascos rotatorios empleados en la producción de AcM (Coorning Incorporated, 2010).*



ANEXO 2 *Biorreactor de olas Applikon (Applikon, 2014).*



ANEXO 3. Comparación de los tiempos de las etapas para iniciar la fermentación entre el Biorreactor Convencional y el Desechable. (Tomado de Rao y col., 2009).

Tipo de Biorreactor			
Tanque Agitado, Convencional		De Olas, Desechable	
Desmontaje	15 min	Montaje	5 min
Limpieza	30 min	Adición de Medio	30 min
Montaje	15 min	Calibración de DO y pH	5 min
Calibración de pH	15 min	Inoculación	15 min
Esterilización/Enfriamiento	2 h		
Adición de Medio	30 min		
Calibración de DO	30 min		
Inoculación	15 min		
Tiempo total	4 h 30 min	Tiempo total	55 min

ANEXO 4 Biorreactor de Olas (*Wave Bioreactor*[®] de ApplikonTM) empleado en este estudio.



ANEXO 5 Descripción de la forma de expresar el Grado de reacción de aglutinación.

Cruces	Formas de Aglutinación.
4+	Aglutinación total de los eritrocitos en un solo cúmulo grande en un fondo claro.
3+	2 ó 3 aglutinados grandes en un fondo claro.
2+	Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.
1+	Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.
±	Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos. (Esta reacción es negativa). No aglutinación
0	No aglutinación.

ANEXO 6 *Análisis estadístico para la comparación de los parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B en medio RPMI Y PFHM.*

Tabla ANOVA para Xv por FORMULACION

Tabla ANOVA para Xv por FORMULACION

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,65335	1	2,65335	874,73	0,0000
Intra grupos	0,0121333	4	0,00303333		
Total (Corr.)	2,66548	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para Xv por FORMULACION

Método: 95,0 porcentaje Duncan

FORMULACION	Casos	Media	Grupos Homogéneos
RPMI	3	1,18333	x
PFHM	3	2,51333	x

Contraste	Sig.	Diferencia
PFHM - RPMI	*	1,33

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para μ máx por FORMULACION

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00000416667	1	0,00000416667	12,50	0,0241
Intra grupos	0,00000133333	4	3,33333E-7		
Total (Corr.)	0,0000055	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para μ máx por FORMULACION

Método: 95,0 porcentaje Duncan

FORMULACION	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PFHM	3	0,0316667	x
RPMI	3	0,0333333	x

Contraste	Sig.	Diferencia
PFHM - RPMI	*	-0,00166667

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para td por FORMULACION

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,481667	1	0,481667	3,66	0,1284
Intra grupos	0,526667	4	0,131667		
Total (Corr.)	1,00833	5			

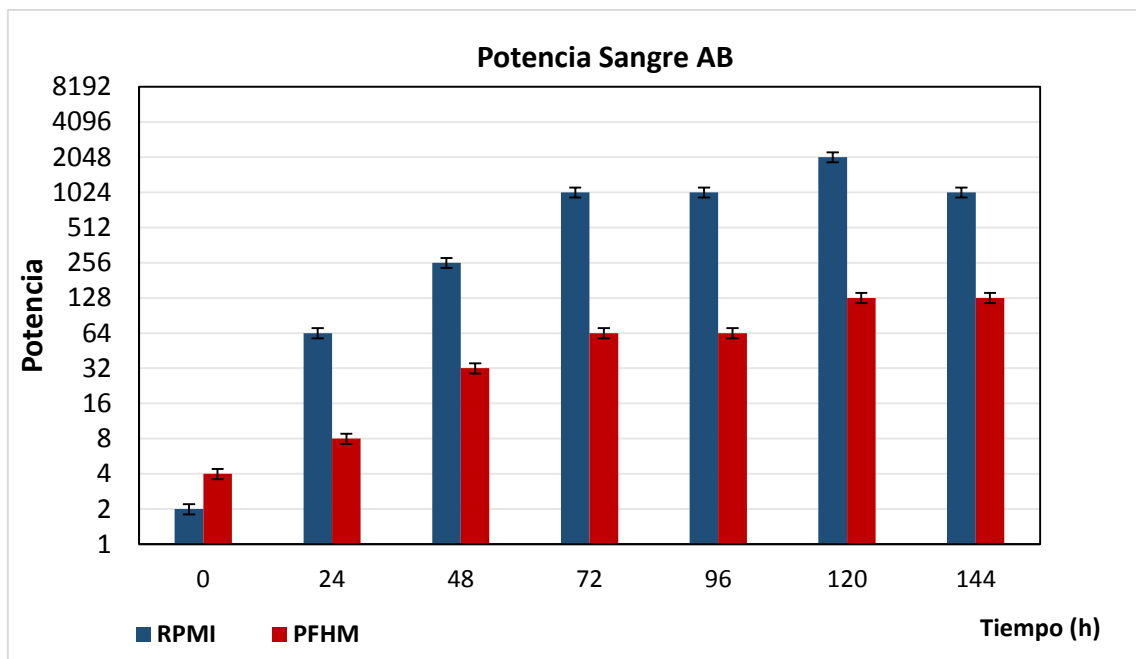
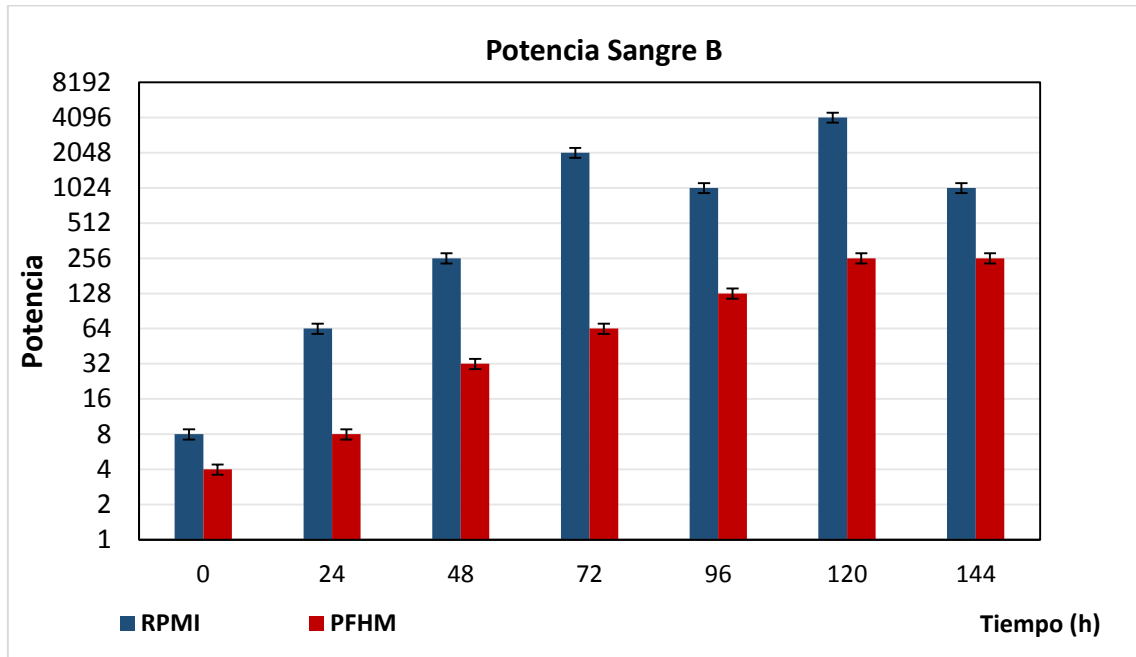
Pruebas de Múltiple Rangos para td por FORMULACION

Método: 95,0 porcentaje Duncan

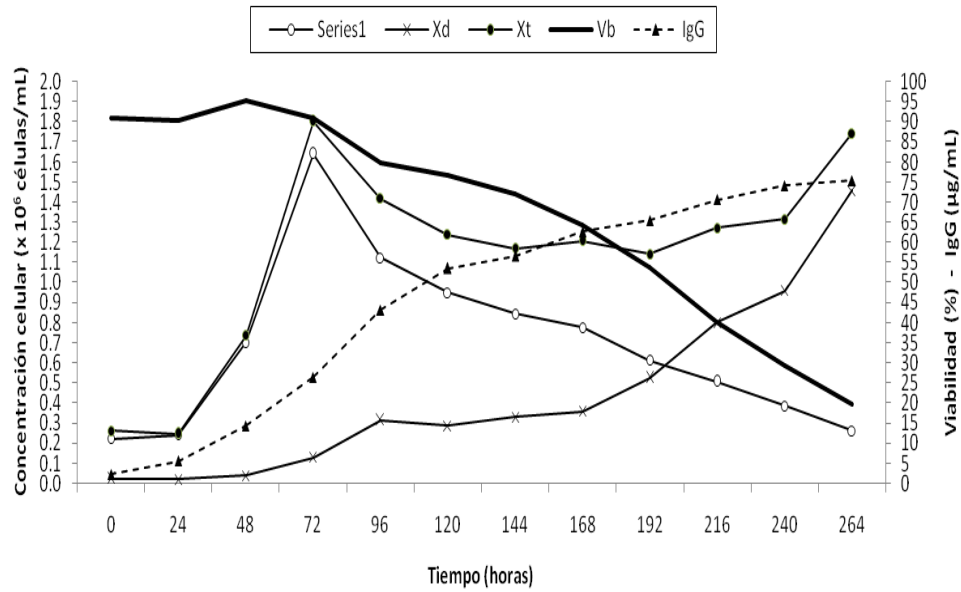
FORMULACION	Casos	Media	Grupos Homogéneos
RPMI	3	21,1	x
PFHM	3	21,6667	x

Contraste	Sig.	Diferencia
PFHM - RPMI		0,566667

ANEXO 7 *Productividad del Hibridoma anti-B en los medios de cultivo RPMI Y PFHM.*



ANEXO 8 Caracterización del Hibridoma anti-B clon C6G4 en medio de cultivo PFHM. (Tomado de Justiz, 2013).



Tiempo (horas)	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264
IgG (mg/L)	2,34	5,60	14,38	26,50	43,11	53,50	56,67	62,67	65,49	70,64	74,16	75,33
Potencia (grupo B)	0	0	2	2	4	4	8	8	8	16	16	16
Potencia (grupo A ₁ B)	0	0	2	4	4	4	4	4	8	8	8	16

ANEXO 9 *Análisis estadístico para la comparación de los parámetros cinéticos del Hibridoma anti-B en las variantes de formulación de medio PFHM.*

Gráfico de Individuos - X_v

Número de observaciones = 9
0 observaciones excluidas

Distribución: Normal
Transformación: ninguna

Gráfico X

Período	#1-9
LSC: +3,0 sigma	3,6034
Línea Central	2,79556
LIC: -3,0 sigma	1,98771

0 fuera de límites

Gráfico MR(2)

Período	#1-9
LSC: +3,0 sigma	0,992438
Línea Central	0,30375
LIC: -3,0 sigma	0,0

0 fuera de límites

Estimados

Período	#1-9
Media de proceso	2,79556
Sigma de proceso	0,269282
MR(2) promedio	0,30375

Sigma estimada a partir del rango móvil promedio

Gráfico de Individuos - μ max

Número de observaciones = 9
0 observaciones excluidas

Distribución: Normal
Transformación: ninguna

Gráfico X

Período	#1-9
LSC: +3,0 sigma	0,0384311
Línea Central	0,0334444
LIC: -3,0 sigma	0,0284577

0 fuera de límites

Gráfico MR(2)

Período	#1-9
LSC: +3,0 sigma	0,00612616
Línea Central	0,001875
LIC: -3,0 sigma	0,0

0 fuera de límites

Estimados

Período	#1-9
Media de proceso	0,0334444
Sigma de proceso	0,00166223
MR(2) promedio	0,001875

Sigma estimada a partir del rango móvil promedio

Gráfico de Individuos - td

Número de observaciones = 9
0 observaciones excluidas

Distribución: Normal

Transformación: ninguna

Gráfico X

Período	#1-9
LSC: +3,0 sigma	23,7475
Línea Central	20,7222
LIC: -3,0 sigma	17,697

0 fuera de límites

Gráfico MR(2)

Período	#1-9
LSC: +3,0 sigma	3,71654
Línea Central	1,1375
LIC: -3,0 sigma	0,0

0 fuera de límites

Período	#1-9
Media de proceso	20,7222
Sigma de proceso	1,00842
MR(2) promedio	1,1375

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

Tabla ANOVA para Xv por FORMULACION

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,55549	2	0,777744	193,36	0,0000
Intra grupos	0,0241333	6	0,00402222		
Total (Corr.)	1,57962	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Xv por FORMULACION

Método: 95,0 porcentaje Duncan

FORMULACION	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PFHM+GLUT	3	2,49	X
PFHM	3	2,51333	X
PFHM+INS	3	3,38333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
PFHM - PFHM+GLUT		0,0233333
PFHM - PFHM+INS	*	-0,87
PFHM+GLUT - PFHM+INS	*	-0,893333

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para μ max por FORMULACION

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0000682222	2	0,0000341111	102,33	0,0000
Intra grupos	0,000002	6	3,33333E-7		
Total (Corr.)	0,0000702222	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para μ max por FORMULACION

Método: 95,0 porcentaje Duncan

FORMULACION	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PFHM+GLUT	3	0,0313333	X
PFHM	3	0,0316667	X
PFHM+INS	3	0,0373333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
PFHM - PFHM+GLUT		0,000333333
PFHM - PFHM+INS	*	-0,00566667
PFHM+GLUT - PFHM+INS	*	-0,006

Tabla ANOVA para td por FORMULACION

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21,0156	2	10,5078	59,48	0,0001
Intra grupos	1,06	6	0,176667		
Total (Corr.)	22,0756	8			

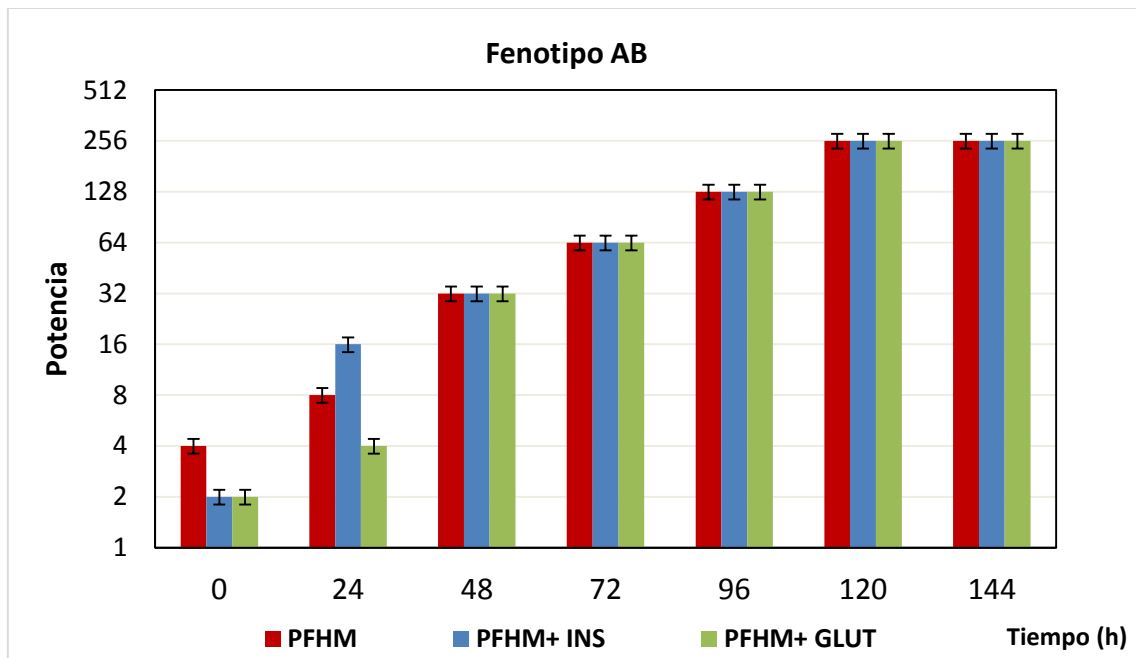
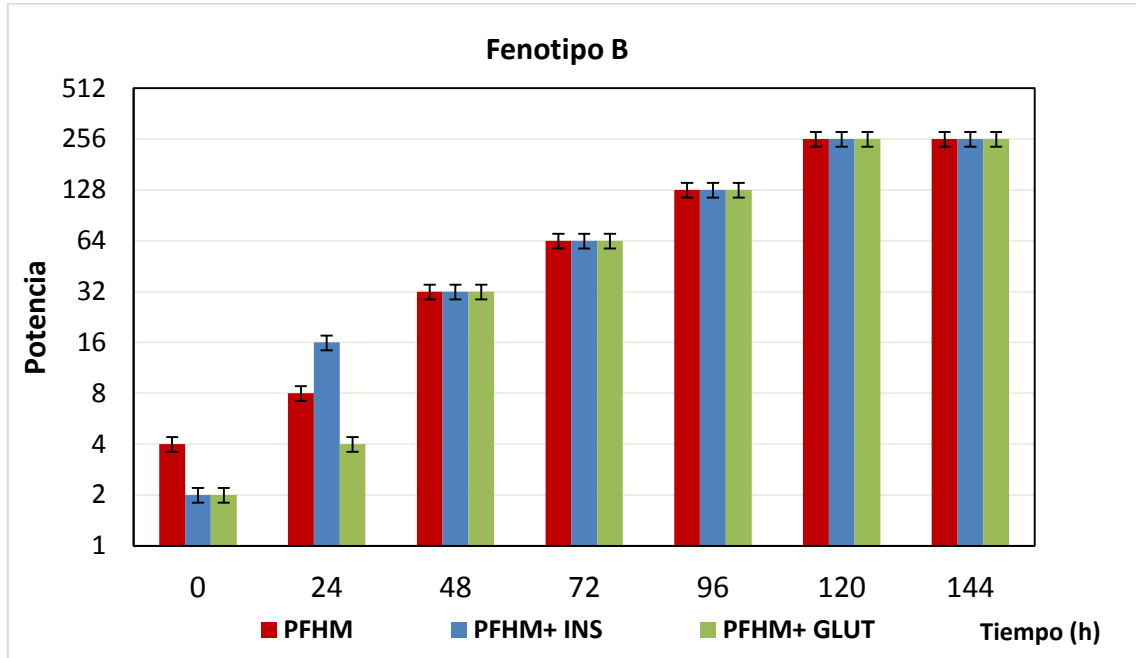
Pruebas de Múltiple Rangos para td por FORMULACION

Método: 95,0 porcentaje Duncan

FORMULACION	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PFHM+INS	3	18,5667	X
PFHM	3	21,6667	X
PFHM+GLUT	3	21,9333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
PFHM - PFHM+GLUT		-0,266667
PFHM - PFHM+INS	*	3,1
PFHM+GLUT - PFHM+INS	*	3,36667

ANEXO 10 *Productividad del Hibridoma anti-B en las variantes de formulación del medio de cultivo PFHM.*



ANEXO 11 *Tablas de los datos de la Producción de sublotos de Sobrenadante anti-B en medio de cultivo RPMI+8% SFB.*

Sublote	V (ml)	Xv (10 ⁶ cel·ml ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	td (h)	Potencia	
					Fenotipo B	Fenotipo AB
1	800	1,50E+06	0,034	20,67	4096	2048
2	800	1,60E+06	0,035	19,88	512	512
3	800	1,62E+06	0,035	19,73	2048	2048
4	800	1,60E+06	0,035	19,88	2048	2048
lote 1	3400	1,58E+06	0,035	20,04	512	512

Sublote	V (ml)	Xv (10 ⁶ cel·ml ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	td (h)	Potencia	
					Fenotipo B	Fenotipo AB
1	800	1,50E+06	0,034	20,67	4096	2048
2	800	1,54E+06	0,034	20,34	512	512
3	800	1,60E+06	0,035	19,88	2048	2048
4	800	1,60E+06	0,035	19,88	1024	512
lote 2	3400	1,56E+06	0,034	20,19	512	512

Sublote	V (ml)	Xv (10 ⁶ cel·ml ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	td (h)	Potencia	
					Fenotipo B	Fenotipo AB
1	800	1,50E+06	0,034	20,67	4096	2048
2	800	1,50E+06	0,034	20,67	512	512
3	800	1,60E+06	0,035	19,88	2048	2048
4	800	1,60E+06	0,035	19,88	1024	512
lote 3	3400	1,55E+06	0,034	20,27	512	512

ANEXO 12 *Datos de la corrida de fermentación del Hibridoma anti-B en medio de cultivo PFHM y en el biorreactor de olas Applikon de 50 l.*

<i>t</i> (h)	<i>Xv</i> (cel·ml)	<i>Xd</i> (cel·ml)	<i>Xt</i> (cel·ml)	<i>Vb</i> (%)	<i>Medio adicionado</i> (l)	<i>Volumen del ferm.</i> (l)	<i>Medio cosechado</i> (l)
0	0,24	0,006	0,246	97,56		20	
72	1,84	0,03	1,87	98,40		19,80	
96	2,35	0,04	2,39	98,33		19,70	15
96	0,55	0,01	0,56	98,33	15,30	20,00	
120	1,25	0,11	1,36	91,91		19,85	
144	2,27	0,13	2,40	94,58		19,70	15
144	0,53	0,03	0,56	94,58	15,3	20,00	
216	2,57	0,06	2,63	97,72		19,85	15
216	0,62	0,01	0,64	97,72	15,15	20,00	
288	2,40	0,07	2,47	97,17		19,85	15
288	0,58	0,02	0,60	97,17	15,15	20,00	
360	2,10	0,12	2,22	94,59		19,70	15
360	0,49	0,03	0,52	94,59	15,3	20,00	
432	2,04	0,13	2,17	94,01		19,70	15
432	0,48	0,03	0,51	94,01	15,3	20,00	
504	2,02	0,04	2,06	98,06		19,70	15
504	0,47	0,01	0,48	98,06	15,3	20,00	
576	2,17	0,08	2,25	96,44		19,70	15
576	0,51	0,02	0,53	96,44	15,3	20,00	
648	1,88	0,10	1,98	94,95		19,85	15
648	0,46	0,02	0,48	94,95	15,15	20,00	
720	1,92	0,09	2,01	95,76		19,70	15
720	0,45	0,02	0,47	95,76	15	20,00	
792	1,99	0,17	2,16	92,13		19,85	15
792	0,48	0,04	0,52	92,13	15	20,00	
864	2,00	0,19	2,19	91,32		19,85	15
864	0,49	0,05	0,53	91,32	10	20,00	
960	2,06	0,21	2,27	90,75		20,00	20

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

ANEXO 13 *Ficha de costo de proceso de producción de Hemoclasificador anti-B a partir de LAM.*

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción			Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	LAM anti-B				2000	U	1	
Etapas	Cuarentena				Resultado	Ratón liberado		
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
	M			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Agua purificada	mL	120000		0,000000	0,000210	0,000000	25,200000	25,200000
Bagazo desmehollado	g	21840		0,000000	0,001731	0,000000	37,801163	37,801163
Pienso de ratas y ratones	g	100000		0,000000	0,000806	0,000000	80,560000	80,560000
Ratón CENPALAB	U	2000		0,000000	27,748240	0,000000	55492,480000	55492,480000
TOTAL				0,000000	27,748986	0,000000	55636,041163	55636,041163
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE			
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL	
Técnico Innovador de 2do nivel (+0,9)		978,50	5,13	10,0	0,00	51,34	51,34	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	10,0	0,00	53,33	53,33	
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		181,35			0,00	9,51	9,51	
TOTAL		2176,35		20,0	0,00	114,18	114,18	
					IMPORTE			
					CUC	MN	TOTAL	
					0,000000	2230,009003	2230,009003	
					0,000000	57980,234086	57980,234086	
					0,000000	28,990117	28,990117	

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción			Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	LAM anti-B				500	U	2	
Etapas	Preinoculación				Resultado	Ratón preinoculado		
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
	M			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Petrolato líquido	mL	250		0,030223	0,012733	7,555625	3,183229	10,738854
Agua purificada	mL	17500		0,000000	0,000210	0,000000	3,675000	3,675000
Alcohol 90°	mL	250		0,000000	0,541246	0,000000	135,311500	135,311500
Pienso de ratas y ratones	g	25000		0,000000	0,000806	0,000000	20,140000	20,140000
Torunda	U	10		0,002024	0,002861	0,020244	0,028609	0,048854
Ratón Liberado	U	500		0,003800	28,990117	1,800000	14495,058521	14496,858521
Guantes quirúrgicos	par	3		0,158082	0,062945	0,468246	0,188835	0,657081
TOTAL				0,191929	29,610917	9,844115	14657,585695	14667,429810
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE			
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL	
Técnico Innovador de 2do nivel (+0,9)		978,50	5,13	4,0	0,00	20,54	20,54	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	15,0	0,00	80,00	80,00	
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	15,0	0,00	80,00	80,00	
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		273,75			0,00	16,41	16,41	
TOTAL		3285,25		34,0	0,00	196,94	196,94	
					IMPORTE			
					CUC	MN	TOTAL	
					0,393765	594,181031	594,574795	
					10,237880	15448,706799	15458,944679	
					0,020476	30,897414	30,917889	

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	LAM anti-B			500	U	3	
Etapas	Inoculación			Resultado	ratón inoculado		
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
	M			CUC	MN	CUC	MN
							TOTAL
Agua Purificada	mL	25000		0,000000	0,000210	0,000000	5,250000
Alcohol 90°	mL	1250		0,000000	0,541246	0,000000	676,557500
EDTA al 2% *9	mL	5		0,000720	0,006875	0,003600	0,037974
Bagazo desmehollado	g	5520		0,000000	0,001731	0,000000	9,554140
Gasa	m	0,3		0,056717	0,059518	0,017015	0,017855
Guantes quirúrgicos	Par	2		0,156082	0,062945	0,312164	0,125890
Jeringuilla desechable de 5mL	U	10		0,140400	0,013000	1,404000	0,130000
Pienso de ratas y ratones	g	25000		0,000000	0,000806	0,000000	20,140000
Torunda	U	25		0,002024	0,002861	0,050611	0,071523
Inóculo anti-B	MC	600		0,121345	3,755618	72,806718	2253,370767
Ratón Preinoculado	U	500		0,020476	30,897414	10,237880	15448,706799
TOTAL				0,497763	35,342222	84,831988	18413,958849
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	4,0	0,00	21,33	21,33
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	14,0	0,00	74,66	74,66
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	10,0	0,00	53,33	53,33
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		277,20			0,00	13,57	13,57
TOTAL		3326,70		28,0	0,00	162,90	162,90
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
				Coefficiente Aplicado para Costo Indirecto	0,040	3,393280	743,074450
				Costo total de Resultado	88,225268	19319,935690	19408,160958
				Costo unitario de Resultado	0,176451	38,639871	38,816322

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	LAM anti-B			2850	mL	4	
Etapas	Obtención de LAM			Resultado	LAM anti-B		
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
	M			CUC	MN	CUC	MN
							TOTAL
Agua Purificada	mL	50000		0,000000	0,000210	0,000000	10,500000
Alcohol 90°	mL	1250		0,000000	0,000541	0,000000	0,676558
EDTA al 2%	mL	5		0,000720	0,006875	0,003600	0,037974
Bagazo desmehollado	g	5520		0,000000	0,001731	0,000000	9,554140
Gasa	m	0,3		0,056717	0,059518	0,017015	0,017855
Guantes quirúrgicos	Par	14		0,156082	0,062945	2,185148	0,881230
Jeringuilla desechable de 5mL	U	10		0,140400	0,013000	1,404000	0,130000
Pienso de ratas y ratones	g	25000		0,000000	0,000806	0,000000	20,140000
Torunda	U	50		0,002024	0,002861	0,101222	0,143046
Ratón inoculado	U	500		0,176451	38,639871	88,225268	19319,935690
TOTAL				0,532394	38,788358	91,936253	19362,012893
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	20,0	0,00	106,66	106,66
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	20,0	0,00	106,66	106,66
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	10,0	0,00	53,33	53,33
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		277,20			0,00	24,24	24,24
TOTAL		3326,70		50,0	0,00	290,90	290,90
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
				Coefficiente Aplicado para Costo Indirecto	0,040	3,677450	786,116401
				Costo total de Resultado	95,613703	20439,026422	20534,640125
				Costo unitario de Resultado	0,033431	7,146513	7,179944

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	Hemoclasificador anti-B			10000	mL	5	
Etapas	Formulación			Resultado	Formulado anti-B		
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
	M			CUC	MN	CUC	MN
							TOTAL
Albumina Sérica Bovina 30 %	mL	667		0,000000	0,000210	0,000000	0,140070
Azida Sódica	g	9,7		0,000000	0,000541	0,000000	0,005250
Cloruro de Sodio	g	38,4		0,000720	0,006875	0,027648	0,263994
Cloruro de Potasio	g	0,96		0,000000	0,001731	0,000000	0,001662
Hidrogenofosfato de Potasio	g	0,96		0,056717	0,059518	0,054448	0,057137
Hidrogenofosfato di sódico	g	5,568		0,156082	0,062945	0,869065	0,350478
LAM anti-B	mL	2500		0,033431	7,146513	83,578412	17866,281837
Agua purificada	ml	7333		0,000000	0,000210	0,000000	1,539930
Guantes	par	3		0,000000	0,000806	0,000000	0,002417
						0,000000	0,000000
						0,000000	0,000000
TOTAL				0,246950	7,279348	84,529572	17868,642774
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
				0,00		0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		277,20			0,00	4,36	4,36
TOTAL		3326,70		9,0	0,00	52,36	52,36
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
				0,040	3,381183	716,840170	720,221353
				Costo total de Resultado	87,910755	18637,844427	18725,755182
				Costo unitario de Resultado	0,008791	1,863784	1,872576

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	Hemoclasificador anti-B			1818	frasco	6	
Etapas	Llenado y Envase			Resultado	Hemoclasificador anti-B Producto Terminado		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Guantes	par	4	0,000000	6,158611	0,000000	24,634444	24,634444
Membrana de 0,2 µm	u	1	2,890200	0,115600	2,890200	0,115600	3,005800
Membrana de 0,45 µm	u	1	4,629700	0,000000	4,629700	0,000000	4,629700
Membrana de 50 µm	u	1	1,410000	0,000000	1,410000	0,000000	1,410000
Frasco vidrio GL-18, conjunto etagotas	u	1818	3,625700	3,140461	6591,522600	5709,358098	12300,880698
Estuche	u	1818	0,377773	0,000000	686,791314	0,000000	686,791314
Etiqueta	u	2100	0,028290	0,000000	59,409000	0,000000	59,409000
Literatura Interior	u	1818	0,125120	0,000000	227,467615	0,000000	227,467615
Formulado anti-B	mL	10000	0,008791	1,863784	87,910755	18637,844427	18725,755182
TOTAL			13,095574	11,278456	7662,031184	24371,952569	32033,983753
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,0)		1082,50	5,73	10,0	0,00	57,32	57,32
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,0)		1016,50	5,33	10,0	0,00	53,33	53,33
Técnico de Producción (+0,0)		702,0	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
Aux. oper. prep. y elabor. Medic. (+0,8)		702,0	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
Aux. oper. prep. y elabor. Medic. (+0,8)		702,0	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
				0,00	0,00	0,00	0,00
				0,00	0,00	0,00	0,00
				0,00	0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		383,14			0,00	20,10	20,10
TOTAL		4598,14		50,0	0,00	241,25	241,25
				IMPORTE			
				CUC	MN	TOTAL	
Coeficiente Aplicado para Costo Indirecto				0,040	306,481247	984,527932	1291,009179
Costo total de Resultado					7968,512431	25597,726225	33566,238656
Costo unitario de Resultado					4,383120	14,080157	18,463278

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

ANEXO 14 *Ficha de costo de proceso de producción de Hemoclasificador anti-B en Frascos Rotatorios y medio de cultivo RPMI + 8% SFB.*

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		SN anti-B		10000	mL	1	26/10/2016
Etapa		Medio de Cultivo		Resultado	Medio RPMI1640		
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
		M		CUC	MN	CUC	MN TOTAL
RPMI 1640	g	104	1,005144	0,000000	104,535000	0,000000	104,535000
Hepes	g	43	0,875570	0,040300	37,649510	1,732900	39,382410
Bicarbonato de Sodio	g	20	0,065200	0,000000	1,304000	0,000000	1,304000
L-glutamina	g	3	0,000000	0,002000	0,000000	0,006000	0,006000
Piruvato de Sodio	g	1,1	0,000000	0,130076	0,000000	0,144074	0,144074
Agua Purificada	mL	9190	0,000000	0,000210	0,000000	1,929900	1,929900
Suero Fetal Bovino	mL	800	0,399123	0,456307	319,298000	365,045333	684,343333
2-Mercaptoetanol al 0,5% *1	mL	10	0,031717	0,030792	0,317167	0,387922	0,705089
Etanol 90°	mL	500	0,000000	0,000541	0,000000	0,270623	0,270623
Pipeta serológica de 10mL	U	1	0,000000	22,093860	0,000000	22,093860	22,093860
Membrana de acetato de celulosa de 0,2µm (Ø142mm)	U	1	5,300000	0,000000	5,300000	0,000000	5,300000
Membrana de acetato de celulosa de 0,45µm (Ø142mm)	U	1	5,300000	0,000000	5,300000	0,000000	5,300000
Prefiltro (Ø130mm)	U	1	1,940000	0,000000	1,940000	0,000000	1,940000
Sartobran 300	U	1	32,040000	1,281200	32,040000	1,281200	33,321200
Torunda	U	3	0,002024	0,002061	0,006073	0,008583	0,014656
Guantes quirúrgicos	Par	2	0,156082	0,062945	0,312164	0,125890	0,438054
TOTAL			47,114860	24,109992	508,001914	393,026284	901,028198
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	3,0	0,00	17,20	17,20
Técnico Innovador de 1er Nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,71			0,00	2,99	2,99
TOTAL		2300,71		6,0	0,00	36,18	36,18
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado				0,040	20,320077	17,168361	37,488437
Costo total de Resultado					528,321990	446,377384	974,699374
Costo unitario de Resultado					0,052832	0,044638	0,097470

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		SN anti-B		5000	MC	2	
Etapa		Inóculo		Resultado	Inóculo		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Medio RPMI 1640	mL	3000	0,052832	0,044638	158,496597	133,913215	292,409812
Tripán Azul al 0,4%	mL	1	0,128392	0,072260	0,128392	0,072260	0,200652
Etanol 90°	mL	4000	0,000000	0,000541	0,000000	2,164984	2,164984
Banco de trabajo anti B	crioval	1	3,142180	11,154959	3,142180	11,154959	14,297139
Placa de 24 pozos	U	1	0,050000	0,000000	0,050000	0,000000	0,050000
Frasco de cultivo de 25 cm2	U	4	0,443073	0,161926	1,772292	0,647704	2,419996
Frasco roller de 850cm2	U	5	0,523583	0,000000	2,617915	0,000000	2,617915
Pipeta serológica de 5 mL	U	20	0,000000	7,528500	0,000000	150,570000	150,570000
Pipeta serológica de 25 mL	U	20	0,087463	0,010610	1,749267	0,212200	1,961467
Pipeta serológica de 50 mL	U	20	0,000000	0,083211	0,000000	1,664222	1,664222
Tubo de centrifuga de 50 mL	U	4	2,531788	0,000000	10,127152	0,000000	10,127152
Vial de 1,5 mL	U	30	0,004716	0,008586	0,141480	0,257580	0,399060
Punta amarilla 200 µL	U	30	0,410475	0,003215	12,314247	0,096457	12,410704
Punta azul 1000 µL	U	3	0,028453	0,004699	0,085358	0,014097	0,099455
Torunda estéril	U	40	0,002024	0,002861	0,080978	0,114437	0,195414
Guantes quirúrgicos	Par	20	0,156082	0,062945	3,121640	1,258900	4,380540
TOTAL			7,561061	19,138951	193,827496	302,141016	495,968512
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	15,0	0,00	85,98	85,98
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,60	5,33	15,0	0,00	80,01	80,01
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,72			0,00	15,09	15,09
TOTAL		2300,82		30,0	0,00	181,07	181,07
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado				0,040	7,753100	19,328507	27,081607
Costo total de Resultado					201,580596	502,541180	704,121776
Costo unitario de Resultado					0,040316	0,100508	0,140824

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		SN anti-B		33000	mL	3	
Etapa		Producción de Sobrenadante		Resultado	Sobrenadante anti-B		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Medio RPMI 1640	mL	33000	0,052832	0,044638	1743,462568	1473,045367	3216,507935
Tripán Azul al 0,4%	mL	2,5	0,128392	0,072260	0,320980	0,180651	0,501631
Etanol 90°	mL	4000	0,000000	0,000541	0,000000	2,164984	2,164984
Inóculo anti B	MC	5000	0,040316	0,100508	201,580596	502,541180	704,121776
Frasco roller de 850cm2	U	16	0,523583	0,000000	8,377328	0,000000	8,377328
Pipeta serológica de 5 mL	U	80	0,000000	7,528500	0,000000	602,280000	602,280000
Vial de 1,5 mL	U	45	0,004716	0,008586	0,212220	0,386370	0,598590
Punta amarilla 200 µL	U	40	0,410475	0,003215	16,418996	0,128610	16,547605
Torunda estéril	U	160	0,002024	0,002861	0,323911	0,457747	0,781657
Guantes quirúrgicos	Par	10	0,156082	0,062945	1,560820	0,629450	2,190270
TOTAL			1,318421	7,824055	1972,257418	2581,814358	4554,071776
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	50,0	0,00	286,59	286,59
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,60	5,33	50,0	0,00	266,68	266,68
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,72			0,00	50,29	50,29
TOTAL		2300,82		100,0	0,00	603,57	603,57
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado				0,040	78,890297	127,415462	206,305759
Costo total de Resultado					2051,147715	3312,802010	5363,949725
Costo unitario de Resultado					0,062156	0,100388	0,162544

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	Hemoclasificador anti-B			10000	mL	4	
Etapas	Formulación			Resultado	Formulado anti-B		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Albumina Sérica Bovina 30 %	mL	667	0,000000	0,000210	0,000000	0,140070	0,140070
Azida Sódica	g	0,7	0,000000	0,000541	0,000000	0,005250	0,005250
Cloruro de Sodio	g	38,4	0,000720	0,006875	0,027648	0,263994	0,291642
Cloruro de Potasio	g	0,96	0,000000	0,001731	0,000000	0,001662	0,001662
Hidrogenofosfato de Potasio	g	0,96	0,056717	0,059518	0,054448	0,057137	0,111585
Hidrogenofosfato de sódico	g	5,568	0,156082	0,062945	0,869065	0,350478	1,219542
Sobrenadante anti-B	mL	10000	0,062156	0,100388	621,559914	1003,879397	1625,439311
Guantes	par	3	0,000000	0,000806	0,000000	0,002417	0,002417
TOTAL			0,275675	0,233013	622,511074	1004,700404	1627,211478
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		277,20			0,00	4,36	4,36
TOTAL		3326,70		9,0	0,00	52,36	52,36
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado para Costo Indirecto				0,040	24,900443	42,282475	67,182918
Costo total de Resultado					647,411517	1099,344362	1746,755880
Costo unitario de Resultado					0,064741	0,109934	0,174676

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	Hemoclasificador anti-B			1818	frasco	5	
Etapas	Llenado y Envase			Resultado	Hemoclasificador anti-B	Producto Terminado	
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Guantes	par	4	0,000000	6,158611	0,000000	24,634444	24,634444
Membrana de 0,2 µm	u	1	2,890200	0,115600	2,890200	0,115600	3,005800
Membrana de 0,45 µm	u	1	4,629700	0,000000	4,629700	0,000000	4,629700
Membrana de 50 µm	u	1	1,410000	0,000000	1,410000	0,000000	1,410000
Frasco vidrio GL-18, conjunto etagotas	u	1818	3,625700	3,140481	6591,522600	5709,358098	12300,880698
Estuche	u	1818	0,377773	0,000000	686,791314	0,000000	686,791314
Etiqueta	u	2100	0,028200	0,000000	59,409000	0,000000	59,409000
Literatura Interior	u	1818	0,125120	0,000000	227,467615	0,000000	227,467615
Formulado anti-B	mL	10000	0,064741	0,109834	647,411517	1099,344362	1746,755880
					0,000000	0,000000	0,000000
TOTAL			13,151524	9,524606	8221,531946	6833,452504	15054,984450
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en ID (+0,9)		1082,50	5,73	10,0	0,00	57,32	57,32
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	10,0	0,00	53,33	53,33
Técnico de Producción (+0,8)		702,00	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
Aux. oper. prep. y elabor. Medic. (+0,8)		702,00	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
Aux. oper. prep. y elabor. Medic. (+0,8)		702,00	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
					0,00	0,00	0,00
					0,00	0,00	0,00
					0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		383,14			0,00	20,10	20,10
TOTAL		4598,14		50,0	0,00	241,25	241,25
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
		Coefficiente Aplicado para Costo Indirecto		0,040	328,861278	282,987929	611,849207
		Costo total de Resultado			8550,393224	7357,686158	15908,079381
		Costo unitario de Resultado			4,703187	4,047132	8,750319

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

ANEXO 15 *Ficha de costo de proceso de producción de Hemoclasificador anti-B en Biorreactor de olas y medio de cultivo PFHM.*

FICHA DE COSTO	Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	lor® Hemo-CIM anti-B		10000	mL	1	
Etapas	Medio de Expansión		Resultado	Medio PFHM-II		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
			CUC	MN	CUC	MN TOTAL
PFHM-II	g	153,3	0,150000	0,000000	22,995000	0,000000 22,995000
Glucosa	g	20	0,038360	0,040300	0,767200	0,806000 1,573200
Bicarbonato de Sodio	g	20	0,065200	0,000000	1,304000	0,000000 1,304000
L-glutamina	g	0,3	0,650000	0,000000	0,195000	0,000000 0,195000
Pluronic F-68	g	10	0,230000	0,000000	2,300000	0,000000 2,300000
Agua Purificada	mL	10000	0,000000	0,000210	0,000000	2,100000 2,100000
Alcohol 90°	mL	500	0,000000	0,900000	0,000000	450,000000 450,000000
Acido Clorhídrico	mL	20	0,062800	0,000000	1,256000	0,000000 1,256000
Pipeta serológica de 10mL	U	1	0,330000	0,000000	0,330000	0,000000 0,330000
Sartobran 300	U	1	32,040000	0,000000	32,040000	0,000000 32,040000
Torunda	U	10	0,002024	0,000000	0,020244	0,000000 0,020244
Guantes quirúrgicos	Par	2	0,156082	0,000000	0,312164	0,000000 0,312164
Roller	U	5	2,380000	0,000000	11,900000	0,000000 11,900000
TOTAL			36,104466	0,940510	73,419608	452,906000 526,325608
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE	
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	4,0	0,00	22,93 22,93
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	4,0	0,00	21,33 21,33
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,71			0,00	4,02 4,02
TOTAL		2300,71		8,0	0,00	48,28 48,28
					IMPORTE	
					CUC	MN TOTAL
				0,040	2,936784	20,047579 22,984364
					76,356393	521,237065 597,593458
					0,007636	0,052124 0,059759

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		ior® Hemo-CIM anti-B		5000	MC	2	
Etapa		Inóculo		Resultado	Inóculo de Anti-B		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Medio PFHM-II	mL	5000	0,007636	0,052124	38,178196	260,618533	298,796729
Tripán Azul al 0,4% *3	mL	1,5	0,128392	0,000000	0,192588	0,000000	0,192588
Etanol 90°	mL	1000	0,000000	0,000541	0,000000	0,541246	0,541246
Banco de trabajo anti-B	crioval	1	3,142180	0,000000	3,142180	0,000000	3,142180
Placa de 24 pozos	U	1	0,050000	0,000000	0,050000	0,000000	0,050000
Frasco de cultivo de 25 cm ²	U	1	0,443073	0,000000	0,443073	0,000000	0,443073
Frasco roller de 850cm ²	U	10	2,380000	0,000000	23,800000	0,000000	23,800000
Pipeta serológica de 5 mL	U	14	0,300000	0,000000	4,200000	0,000000	4,200000
Pipeta serológica de 10 mL	U	16	0,330000	0,000000	5,280000	0,000000	5,280000
Pipeta serológica de 25 mL	U	1	0,087463	0,000000	0,087463	0,000000	0,087463
Pipeta serológica de 50 mL	U	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Tubo de centrifuga de 50 mL	U	1	2,531788	0,000000	2,531788	0,000000	2,531788
Tubo de centrifuga de 175 mL	U	24	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Vial de 1,5 mL	U	40	0,004716	0,000000	0,188640	0,000000	0,188640
Punta amarilla 200 µL	U	28	0,410475	0,000000	11,493297	0,000000	11,493297
Punta azul 1000 µL	U	3	0,028453	0,000000	0,085358	0,000000	0,085358
Torunda estéril	U	33	0,002024	0,000000	0,066807	0,000000	0,066807
Guantes quirúrgicos	Par	16	0,156082	0,000000	2,497312	0,000000	2,497312
TOTAL			10,002282	0,052665	92,236701	261,159779	353,396480
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	15,0	0,00	85,98	85,98
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,60	5,33	15,0	0,00	80,01	80,01
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,72			0,00	15,09	15,09
TOTAL		2300,82		30,0	0,00	181,07	181,07
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado				0,040	3,689468	17,689257	21,378725
Costo total de Resultado					95,926169	459,920693	555,846863
Costo unitario de Resultado					0,019185	0,091984	0,111169

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		ior® Hemo-CIM anti-B		200	L	3	
Etapa		Medio Fermentación		Resultado	Medio fermentación	fermentación	
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
PFHM-II	g	3060	0,150000	0,000000	459,000000	0,000000	459,000000
Glucosa	g	400	0,038360	0,040300	15,344000	16,120000	31,464000
Bicarbonato de Sodio	g	400	0,065200	0,000000	26,080000	0,000000	26,080000
L-glutamina	g	6	0,650000	0,000000	3,900000	0,000000	3,900000
Pluronic F-68	g	200	0,230000	0,000000	46,000000	0,000000	46,000000
Agua Purificada	mL	200	0,000000	0,006700	0,000000	1,340000	1,340000
Alcohol 90°	mL	500	0,000000	0,000541	0,000000	0,270623	0,270623
Acido Clorhídrico	mL	400	0,062800	0,000000	25,120000	0,000000	25,120000
Pipeta serológica de 10mL	U	1	0,330000	0,000000	0,330000	0,000000	0,330000
Filtro Sartopore 2 MidiCaps	U	1	219,000000	0,000000	219,000000	0,000000	219,000000
Torunda	U	10	0,002024	0,000000	0,020244	0,000000	0,020244
Guantes quirúrgicos	Par	2	0,156082	0,000000	0,312164	0,000000	0,312164
Bolsa de 200 L	U	1	28,658000	0,000000	28,658000	0,000000	28,658000
Tank liner 200 L	U	1	1,714500	0,000000	1,714500	0,000000	1,714500
TOTAL			251,056966	0,047541	825,478908	17,730623	843,209531
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	6,0	0,00	34,39	34,39
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	6,0	0,00	32,00	32,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,71			0,00	6,03	6,03
TOTAL		2300,71		12,0	0,00	72,43	72,43
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado para Costo Indirecto				0,040	33,019156	3,606234	36,625390
Costo total de Resultado					858,498065	93,762086	952,260151
Costo unitario de Resultado					4,292490	0,468810	4,761301

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO	Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	ior® Hemo-CIM anti-B		200	L	4	26/10/2016
Etapas	Fementación		Resultado	SN Anti-B		
Materias Primas y Materiales	U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
	M		CUC	MN	CUC	MN
					TOTAL	
Medio PFHM-II	L	200	4,202490	0,468810	858,498065	93,762086
Tripán Azul al 0,4% *3	mL	4	0,128392	0,000000	0,513568	0,000000
Etanol 90°	mL	2000	0,000000	0,000541	0,000000	1,082492
Pipeta serológica de 5 mL	U	20	0,300000	0,000000	6,000000	0,000000
Tubo de centrifuga de 50 mL	U	5	2,531788	0,000000	12,658940	0,000000
Vial de 1,5 mL	U	90	0,004716	0,000000	0,424440	0,000000
Punta amarilla 200 µL	U	40	0,410475	0,000000	16,418996	0,000000
Torunda estéril	U	80	0,002024	0,000000	0,161955	0,000000
Guantes quirúrgicos	Par	40	0,156082	0,000000	6,243280	0,000000
Bolsa de Fementación	U	1	227,250000	0,000000	227,250000	0,000000
Inoculo	mL	5000	0,019185	0,001984	95,926169	459,920693
TOTAL			235,095153	0,561336	1224,095413	554,765271
SALARIO DIRECTO	SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA	BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)	1092,50	5,73	180,0	0,00	917,10	917,10
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)	1016,60	5,33	320,0	0,00	1706,78	1706,78
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)	1016,60	5,33	320,0	0,00	1706,78	1706,78
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)	1016,60	5,33	320,0	0,00	1706,78	1706,78
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)	1016,60	5,33	320,0	0,00	1706,78	1706,78
			0,00	0,00	0,00	0,00
			0,00	0,00	0,00	0,00
			0,00	0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)	468,94			0,00	703,95	703,95
TOTAL	5627,84		1440,0	0,00	8448,17	8448,17
				IMPORTE		
				CUC	MN	TOTAL
	Coficiente Aplicado		0,040	48,963817	360,117319	409,081135
	Costo total de Resultado			1273,059229	9363,050288	10636,109517
	Costo unitario de Resultado			6,365296	46,815251	53,180548

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	ior® Hemo-CIM anti-B			200	L	5	28/10/2016
Etapa	Filtración		Resultado	SN Anti-B Filtrado			
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
	M		CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
SN Fermentación	L	200	6,365296	46,815251	1273,059229	9363,050288	10636,109517
Filtro Sartopore 2 MidiCaps 0,22µ	U	4	219,430000	0,000000	877,720000	0,000000	877,720000
Filtro Sartopore 2 MidiCaps 3µ	U	4	42,520000	0,000000	170,080000	0,000000	170,080000
Filtro Sartopore 2 MidiCaps 8µ	U	4	132,900000	0,000000	531,600000	0,000000	531,600000
Torunda estéril	U	20	0,002024	0,000000	0,040489	0,000000	0,040489
Guantes quirúrgicos	Par	4	0,156082	0,000000	0,624328	0,000000	0,624328
Bolsa de 50L	U	4	15,850000	0,000000	63,400000	0,000000	63,400000
TOTAL			417,223403	46,815251	2916,524046	9363,050288	12279,574334
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	8,0	0,00	45,86	45,86
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,60	5,33	8,0	0,00	42,67	42,67
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,72			0,00	8,05	8,05
TOTAL		2300,82		16,0	0,00	96,57	96,57
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado				0,040	116,660962	378,384874	495,045835
Costo total de Resultado					3033,185008	9838,006712	12871,191719
Costo unitario de Resultado					15,165925	49,190034	64,355959

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		Hemo-CIM anti-B		40000	mL	6	26/10/2016
Etapa		Concentración		Resultado	SN Anti-B Concentrado		
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
		M		CUC	MN	CUC	MN
						TOTAL	
SN Filtrado		L	200	15,165925	49,190034	3033,185008	9838,006712
Torunda estéril		U	20	0,002024	0,000000	0,040489	0,000000
Guantes quirúrgicos		Par	4	0,156082	0,000000	0,624328	0,000000
Cartucho de fibra hueca		U	4	10,000000	0,000000	40,000000	0,000000
TOTAL				25,324031	49,190034	3073,849825	9838,006712
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	4,0	0,00	22,93	22,93
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,60	5,33	16,0	0,00	85,34	85,34
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,72			0,00	9,84	9,84
TOTAL		2300,82		20,0	0,00	118,11	118,11
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
		Coeficiente Aplicado		0,040	122,953993	398,244587	521,198580
		Costo total de Resultado			3196,803818	10354,359252	13551,163070
		Costo unitario de Resultado			0,079920	0,258859	0,338779

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		Hemoclasificador anti-B		10000	mL	7	
Etapa		Formulación		Resultado	Formulado anti-B		
Materias Primas y Materiales		U	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
		M		CUC	MN	CUC	MN
						TOTAL	
Albumina Sérica Bovina 30 %		mL	667	0,000000	0,000210	0,000000	0,140070
Azida Sódica		g	9,7	0,000000	0,000541	0,000000	0,005250
Cloruro de Sodio		g	38,4	0,000720	0,006875	0,027648	0,263994
Cloruro de Potasio		g	0,96	0,000000	0,001731	0,000000	0,001662
Hidrogenofostato de Potasio		g	0,96	0,056717	0,059518	0,054448	0,057137
Hidrogenofostato de sódico		g	5,568	0,156082	0,062945	0,869065	0,350478
Sobrenadante conc. anti-B		mL	10000	0,079920	0,258859	799,200954	2588,589813
Guantes		par	3	0,000000	0,000806	0,000000	0,002417
						0,000000	0,000000
TOTAL				0,293439	0,391484	800,152115	2589,410820
SALARIO DIRECTO		SALARIO	TARIFA	HORAS	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		BÁSICO	HORARIA	TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		277,20			0,00	4,36	4,36
TOTAL		3326,70		9,0	0,00	52,36	52,36
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
		Coeficiente Aplicado para Costo Indirecto		0,040	32,006085	105,670892	137,676977
		Costo total de Resultado			832,158199	2747,443195	3579,601395
		Costo unitario de Resultado			0,083216	0,274744	0,357960

Propuesta de un Proceso Productivo para la Obtención de un Reactivo Hemoclasificador anti-B.
Anexos

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto	Hemoclasificador anti-B			1818	frasco	8	
Etapas	Llenado y Envase			Resultado	Hemoclasificador anti-B Producto Terminado		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO	IMPORTE			
			CUC MN	CUC	MN	TOTAL	
Guantes	par	4	0,000000 6,158611	0,000000	24,634444	24,634444	
Membrana de 0,2 µm	u	1	2,890200 0,115600	2,890200	0,115600	3,005800	
Membrana de 0,45 µm	u	1	4,629700 0,000000	4,629700	0,000000	4,629700	
Membrana de 50 µm	u	1	1,410000 0,000000	1,410000	0,000000	1,410000	
Frasco vidrio GL-18, conjunto etagotas	u	1818	3,625700 3,140461	6591,522600	5709,358098	12300,880698	
Estuche	u	1818	0,377773 0,000000	686,791314	0,000000	686,791314	
Etiqueta	u	2100	0,028290 0,000000	59,409000	0,000000	59,409000	
Literatura Interior	u	1818	0,125120 0,000000	227,467615	0,000000	227,467615	
Formulado anti-B	mL	10000	0,083216 0,274744	832,158199	2747,443195	3579,601395	
				0,000000	0,000000	0,000000	
TOTAL			13,169999 9,689416	8406,278628	8481,551337	16887,829965	
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,8)		1082,50	5,73	10,0	0,00	57,32	57,32
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,8)		1016,50	5,33	10,0	0,00	53,33	53,33
Técnico de Producción (+0,8)		702,0	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
Aux. oper. prep. y elabor. Medic. (+0,8)		702,0	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
Aux. oper. prep. y elabor. Medic. (+0,8)		702,0	3,68	10,0	0,00	36,83	36,83
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		383,14			0,00	20,10	20,10
TOTAL		4598,14		50,0	0,00	241,25	241,25
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
				0,040	336,251145	348,911882	685,163028
					8742,529773	9071,708944	17814,238717
					4,808872	4,989939	9,798811