



LABORATORIOS DE ANTICUERPOS Y  
BIOMODELOS EXPERIMENTALES



**Evaluación del hibridoma C6G4 para la producción *in vitro* del  
reactivo hemoclasificador ior<sup>®</sup> Hemo-CIM Anti-B.**

Tesis en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología  
Mención Biotecnología Industrial

Autor: Lic. Anathais Carola Justiz Limonta

Tutores: Dr.C. Humberto Joaquín Morris Quevedo  
MSc. Alejandro Miranda Ariza

Santiago de Cuba

2013

Quisiera agradecer a todos aquellos que de diferentes maneras participaron y colaboraron conmigo y con este trabajo.

A mi tutor Alejandro, quisiera expresarle mi gratitud por guiar el desarrollo de esta tesis, por su calidad profesional y fundamentalmente humana, su orientación, su apoyo y estímulo constantes, por ser amigo y por haberme permitido formar parte de este trabajo.

A mi tutor Morris, por su revisión crítica del trabajo y por su disposición a solucionar rápidamente toda clase de problemas.

A Yany, Esteban y Osmany, por su colaboración desinteresada, su amistad y por todo lo que me permitieron aprender de ellos.

A mis compañeros de Producción Terminada, por construir un grupo humano excepcional, por su cariño, buen humor, compañerismo, les estoy muy agradecida.

Al colectivo de Control Analítico de LABEX y del CIM por sus aportes imprescindibles en la ejecución de los trabajos experimentales.

Al claustro de profesores del CEBI por el papel jugado en mi formación como máster.

A Lixander, por haber decidido compartir su vida conmigo y que está siempre al pie del cañón.

A Durán, Margarita, Jessica por su dedicación, preocupación y por estar ahí siempre que los necesité.

A mis amigos.

A todos, muchas gracias.

A la memoria de mí querida madre.

A mi motivo de lucha, mi hijito amado.

A mi esposo Lixander por su apoyo incondicional.

A mis segundos padres, mis suegros.

A Jessica para que le sirva de guía y ejemplo.

A todos mis amigos y familiares

## **GLOSARIO DE TÉRMINOS**

$\mu$ máx. app: Velocidad específica de crecimiento máxima aparente.

$\mu$ máx. real: Velocidad específica de crecimiento máxima real.

AcM: Anticuerpo Monoclonal.

CIM: Centro de Inmunología Molecular.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Siglas del inglés: Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo.

IgG: Inmunoglobulina G.

LABEX: Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales.

LAM: Líquido ascítico murino.

qIgG máx.: Velocidad específica de producción de IgG.

SC: Sobrenadante de cultivo

SFB: Suero fetal bovino.

Xt: Concentración de células totales.

Xv: Concentración de células vivas.

PBS: Tampón fosfato salino (Siglas del inglés: Phosphate buffered saline).

## RESUMEN

Los hemoclasificadores son reactivos indispensables en la actividad de la medicina transfusional. Cuba demanda actualmente una cifra significativa de determinaciones para la clasificación sanguínea por lo que se hace necesaria una producción nacional normalizada. Uno de estos reactivos es el ior® Hemo-CIM anti-B obtenido por la tecnología de producción de AcM vía ascitis murina. En el presente trabajo se realizó una evaluación del desempeño del hibridoma C6G4 como productor de AcM Anti-B mediante la tecnología de producción *in vitro*. Este hibridoma fue adaptado a varios medios de cultivo libres de suero seleccionados como candidatos potenciales para un proceso de fermentación. Posteriormente se realizó una caracterización mediante el cálculo de las variables cinéticas de crecimiento y de producción específicas, en cultivos de baja y alta densidad. El ensayo realizado mostró que en el medio PFHM II se obtuvieron los mejores desempeños con respecto al medio tradicional suplementado con suero, así como con los otros medios estudiados. Los sobrenadantes de cultivo caracterizados por diferentes técnicas hematológicas mostraron valores de potencia que no cumplen con los requisitos de calidad establecidos en las regulaciones vigentes. A partir de los resultados experimentales obtenidos, se propone la caracterización del hibridoma C6G4 en la tecnología de fermentación en fibra hueca o la adquisición de una nueva línea celular que cumpla con las especificaciones adecuadas para la producción *in vitro* del hemoclasificador ior® Hemo-CIM anti-B.

## ABSTRACT

Hemoclassifiers are indispensable reagents in the activity of transfusional medicine. Significant amounts of blood group typing determinations for are demanded in Cuba and for this reason national standardized production is needed. ior® Hemo-CIM anti-B produced by murine monoclonal technology constitutes one of these reagents. In the present study the performance of C6G4 hybridoma for the production of monoclonal antibody anti B by *in vitro* technology was evaluated. This hybridoma was adapted to several serum's free culture media as potential candidates for a fermentation process. The characterization was carried out calculating kinetic variables of growth and specific production in high and low density cultures. The results showed that in PFHM II medium the best performance was obtained in comparison to traditional culture medium supplemented with serum and other culture media tested. Culture's supernatants were characterized by different hematological techniques and the potency values achieved showed that none of them meet the quality requirements established in the actual regulations. As judged by the experimental results, the characterization of C6G4 hybridoma by fermentation technology of hollow fiber or acquisition of a new cellular line that meet appropriate specifications for the *in vitro* production of ior® Hemo-CIM anti-B hemoclassifier is proposed.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 El sistema de clasificación sanguíneo ABO.	4
1.2 Reactivos Hemoclasificadores.	4
1.3 Producción de anticuerpos monoclonales.	6
1.3.1 Producción de anticuerpos en ascitis murina.	6
1.3.2 Producción de anticuerpos en sistemas artificiales.	8
1.3.2.1 Medios de cultivo.	8
1.3.2.2 Adaptación de células a nuevos medios de cultivo.	10
1.3.2.3 Crecimiento, productividad y variables críticas.	10
1.4 Sistemas de producción <i>In Vitro</i> .	12
2 MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Hibridoma.	17
2.2 Medios de cultivo.	17
2.2.1 Preparación medios de cultivo.	17
2.3 Condiciones de cultivo.	19
2.4 Adaptación a medios libres de suero.	19
2.5 Determinación del número de generaciones transcurridas.	20
2.6 Caracterización del Hibridoma C6G4 en cultivos de baja densidad.	20
2.6.1 Determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento.	20
2.6.2 Determinación de la velocidad específica de producción.	21
2.6.3 Determinación del tiempo de duplicación.	22
2.7 Caracterización del Hibridoma Anti-B en cultivo de alta densidad.	22
2.8 Concentración de sobrenadantes de cultivo.	23
2.9 Técnicas analíticas.	23
2.9.1 Determinación de la viabilidad y la concentración celular.	23
2.9.2 Determinación de la concentración específica de IgG.	24
2.9.3 Caracterización de los sobrenadantes por técnicas hematológicas.	25
2.10 Procesamiento estadístico.	26
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28

<b>3.1</b>	<b>Adaptación del Hibridoma C6G4 a medios libres de suero.</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Evaluación del hibridoma C6G4 en cultivo de baja densidad celular.</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Evaluación del hibridoma C6G4 en cultivo de alta densidad celular.</b>	<b>37</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Evaluación en cultivo de alta densidad celular por el método 1.</b>	<b>38</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Evaluación en cultivo de alta densidad celular por el método 2.</b>	<b>40</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>49</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>50</b>



## INTRODUCCIÓN

El sistema ABO es el más importante de los grupos sanguíneos humanos en el campo de la medicina transfusional. La clasificación de la sangre es un requisito imprescindible al realizar transfusiones sanguíneas, evitando accidentes postransfusionales que pueden conllevar a hemólisis, anemia, fallo renal, shock o muerte, por la falta de compatibilidad sanguínea <sup>(1)</sup>.

Los reactivos que se emplean para la tipificación sanguínea son llamados hemoclasificadores, y constituyen elementos indispensables en la actividad de los bancos de sangre, laboratorios clínicos y hospitales.

LABEX es una unidad del Centro de Inmunología Molecular, cuya misión está enfocada en la investigación, desarrollo, producción y comercialización de reactivos diagnosticadores (entre ellos los hemoclasificadores) para la evaluación *in vitro* de diferentes enfermedades humanas y promover su introducción y uso en la práctica asistencial del Sistema Nacional de Salud, cumpliendo con las regulaciones nacionales e internacionales vigentes para la fabricación de estos productos.

El departamento comercial de LABEX estimó una demanda para el año 2013 superior a los 5 millones de determinaciones para la clasificación sanguínea según el Sistema ABO. Esta cifra no es insignificante y por tanto, se hace necesario una producción nacional normalizada y estable debido al carácter estratégico que tiene esta actividad tanto en tiempo de paz como en situaciones de guerra o desastres.

Actualmente, la única plataforma de producción de AcM murinos en LABEX es la tecnología de producción de líquido ascítico murino (LAM), la cual se ejecuta en una única área productiva, por lo que la producción de LAM de los distintos productos basados en monoclonales murinos debe realizarse en campaña. En un escenario en el que este centro se encuentra bajo la presión de incrementar las capacidades productivas en sus procesos con miras a ampliar su cartera de productos, así como mejorar la calidad y competitividad de los ya existentes, se ha

decidido modernizar la tecnología de producción del IFA de los hemoclasificadores.

Uno de los reactivos hemoclasificadores comercializados por LABEX es el ior<sup>®</sup> Hemo-CIM anti-B producido a partir de líquido ascítico murino obtenido en ratones balb/c, aunque también se han estudiado los ratones de la línea Ofbalb (F1) como biomodelo alternativo <sup>(2)</sup>. El LAM Anti-B obtenido en el proceso productivo ha presentado históricamente un problema de especificidad, dando una reacción cruzada con hematíes del grupo sanguíneo A, aunque con una potencia de aglutinación muy inferior a la de los hematíes B positivos. Por esta razón, el LAM debe someterse a un procesamiento extra para eliminar la actividad cruzada, el cual consiste en realizar lavados del LAM Anti-B con hematíes del grupo A, con lo que se consigue eliminar las heteroaglutininas por adsorción. Dicho proceso resulta engorroso, ya que requiere de volúmenes significativos de sangre humana, cuyos hematíes deben ser retirados posteriormente por centrifugación. Este proceso trae consigo el aumento de los costos productivos, la afectación de las características organolépticas del LAM al cambiar su color por la hemólisis durante el lavado, incrementa los riesgos de bioseguridad al manipular sangre humana y produce una dependencia del Banco de Sangre Provincial, el cual no siempre posee la cantidad de sangre disponible para ofertarla como un insumo del proceso. La actividad cruzada del LAM Anti-B no se observa en las pruebas de especificidad que se realizan al hibridoma C6G4 antes de ser inoculado en los ratones balb/c, por lo que se concluyó que esta afectación del producto surgía como resultado de la interacción del hibridoma C6G4 con la línea de ratones empleada en la producción. Esta situación impuso plantear como objetivo migrar la etapa de producción del IFA del reactivo hemoclasificador anti-B hacia una plataforma tecnológica *In vitro* alternativa a la producción de AcM vía ascitis murina.

En la actualidad, el reactivo hemoclasificador ior<sup>®</sup> Hemo-CIM anti-B es producido a partir de IFA importado, por lo que resulta aún más atractivo el desarrollo de un

proceso de producción del reactivo hemoclasificador anti-B *In vitro* de origen nacional.

A partir de los antecedentes mencionados se planteó el siguiente **problema**:

- ◆ La tecnología de producción del AcM anti-B a partir del hibridoma C6G4 en ascitis murina no resulta adecuada para obtener un reactivo hemoclasificador anti-B acorde a las regulaciones vigentes.

Como respuesta al problema planteado se formuló la siguiente **hipótesis**:

- ◆ Es posible producir el IFA de un reactivo hemoclasificador anti-B a partir del hibridoma anti-B C6G4 empleando la tecnología de fermentación con células de mamífero.

El **objetivo general** de este trabajo consistió en:

- ◆ Evaluar el desempeño del Hibridoma murino C6G4 en la obtención de AcM Anti-B mediante la tecnología de producción *in vitro*.

Para complementar dicho objetivo se desglosaron los siguientes **objetivos específicos**:

- ◆ Adaptar el Hibridoma Anti-B a diferentes medios de cultivos libres de suero.
- ◆ Evaluar el desempeño del Hibridoma Anti-B en los diferentes medios de crecimiento en sistemas de cultivo de baja densidad celular.
- ◆ Evaluar el desempeño del Hibridoma Anti-B en cultivo de alta densidad celular.

# 1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 El sistema de clasificación sanguíneo ABO.

A principios del siglo XX *Karl Landsteiner* realizó una serie de pruebas que dieron lugar al descubrimiento de los grupos sanguíneos del Sistema de clasificación ABO y al desarrollo de procedimientos rutinarios para su agrupamiento <sup>(3)</sup>.

Dentro del sistema de clasificación ABO se identifican cuatro grupos principales denominados A, B, AB y O. Los antígenos A y B están determinados por los genes A y B, los cuales codifican glucosiltransferasas que adicionan los azúcares que constituyen antígenos A y/o B sobre el antígeno H <sup>(4)</sup> (**Figura 1**). El antígeno A es N-acetilglucosamina y el antígeno B es  $\beta$ -D-galactosa. Los individuos portadores del grupo AB poseen las dos glucosiltransferasas simultáneamente, mientras los individuos con grupo sanguíneo O no poseen ninguna de estas dos, sino que son portadores de un gen O no funcional porque la proteína que produce no determina antígeno de grupo sanguíneo detectable <sup>(5)</sup>.

El sistema de clasificación ABO es el único sistema en el que los anticuerpos recíprocos están uniforme y predeciblemente presentes en el suero de las personas normales que no han tenido exposición a eritrocitos humanos <sup>(6)</sup>. Por lo que una transfusión sanguínea de un grupo del Sistema ABO incompatible entre un receptor y un donante ocasiona manifestaciones de reacción transfusional hemolítica aguda. Las pruebas para la detección de compatibilidad ABO entre un receptor y un donante son el fundamento en el que se basan todas las pruebas pretransfusionales <sup>(7)</sup>.

## 1.2 Reactivos Hemoclasificadores.

Los reactivos hemoclasificadores están incluidos dentro del grupo de reactivos diagnosticadores, entendiéndose como diagnosticador cualquier producto que consista en un reactivo, juego de reactivos, sistema, calibrador, controlador o medio de cultivo, destinado por el fabricante a ser utilizado *in vitro* en el estudio de muestras procedentes del cuerpo humano, incluidas las donaciones de sangre y tejidos, con el objetivo de proporcionar información relativa a un

estado fisiológico o patológico, relacionada a una anomalía congénita, para determinar la seguridad y compatibilidad con receptores potenciales, y/o supervisar medidas terapéuticas<sup>(8)</sup>.

La clasificación de los grupos sanguíneos según el sistema ABO se realiza mediante el enfrentamiento de hematíes procedentes de muestras de sangre periférica con los reactivos hemoclasificadores, provocando una aglutinación selectiva en dependencia de la especificidad del reactivo empleado <sup>(7)</sup>.

Las técnicas hematológicas que más se realizan para la clasificación sanguínea según el Sistema ABO son las de hemaglutinación directa en láminas y tubos, en las que el reactivo es capaz de aglutinar la mayor parte de los eritrocitos antígeno-positivos por contacto directo. Los parámetros que se miden para determinar la calidad del reactivo hemoclasificador son: la avidéz, que es el tiempo que media entre la mezcla del reactivo con los eritrocitos y la aparición de la aglutinación; la especificidad, que es la capacidad del producto para identificar correctamente las muestras carentes del antígeno en cuestión; la intensidad, que se mide como los grados de la reacción de aglutinación; y la potencia, que es el recíproco de la mayor dilución del reactivo que provoca una reacción de aglutinación de intensidad 1+<sup>(9)</sup>.

La regulación vigente para los requisitos de los diagnosticadores utilizados en inmunohematología en Cuba plantea que los hemoclasificadores deben poseer una potencia mínima de 512 frente a los grupos antígeno-positivos y una avidéz máxima de 30 segundos <sup>(9)</sup>.

Los reactivos hemoclasificadores del Sistema ABO eran elaborados inicialmente con mezclas de sueros de individuos previamente estimulados con sustancias del grupo sanguíneo ABO para producir anticuerpos policlonales de alto título. En la actualidad los reactivos hemoclasificadores son producidos con anticuerpos monoclonales procedentes de líneas celulares de cultivo, los cuales permiten una

mayor especificidad y potencia durante la aglutinación al ser comparados con los policlonales <sup>(10)</sup>.

### **1.3 Producción de anticuerpos monoclonales.**

Kohler y Milstein demostraron en 1975 la posibilidad de producir cantidades notables de anticuerpos monoclonales mediante la obtención de células híbridas a partir de la fusión de linfocitos B y células procedentes de mielomas blancos <sup>(11)</sup>, las cuales son llamadas hibridomas y constituyen líneas tumorales inmortalizadas **(Figura 2)**. Entre los mielomas más usados como pareja de fusión a linfocitos B murinos están los derivados del plasmacitoma MOPC21: P3-X63-Ag8, NS-1-Ag4-1(NS-1), NS0, SP2/0-Ag14 <sup>(12 - 14)</sup>. La tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales mantiene su vigencia en la actualidad como una indispensable plataforma de obtención de anticuerpos de alta calidad <sup>(15)</sup>.

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante permitió adaptar a la manipulación de células animales muchas técnicas basadas en la experiencia con microorganismos y se desarrollaron herramientas para crear construcciones genéticas portadoras de los genes codificadores de las cadenas de los anticuerpos <sup>(16, 17)</sup>, los cuales son introducidos en el núcleo de las células de mamíferos diana mediante técnicas de transfección <sup>(18)</sup>. Las células modificadas son conocidas como transfectomas y posibilitan una mayor manipulación genética para potenciar el crecimiento celular y la productividad específica <sup>(19)</sup>. Entre las líneas celulares más empleadas en la industria biotecnológica están las células CHO y el mieloma blanco NS0 <sup>(20-23)</sup>.

#### **1.3.1 Producción de anticuerpos en ascitis murina.**

La primera tecnología de producción industrial de anticuerpos monoclonales fue la de obtención de ascitis murina mediante la inoculación de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de ratones compatibles con las células inoculadas (generalmente ratones balb/c), provocando un crecimiento tumoral en la ascitis que a su vez contiene los anticuerpos monoclonales secretados por las células de

hibridoma. Una vez que el tumor líquido se expande es extraído mediante punciones, y la ascitis vuelve a crecer repitiéndose la operación varias veces hasta la muerte del animal <sup>(24)</sup>.

Entre los atractivos de la tecnología de producción de anticuerpos en ascitis está que no requiere servicios ingenieros de mayor envergadura, ni un alto nivel de capacitación del personal, permite obtener lotes de producción en el orden de los miligramos de producto por lote a concentraciones relativamente altas (mg de anticuerpo/mL) por lo que reduce la necesidad de pasos posteriores de concentración, lo cual se refleja en costos de producción relativamente bajos <sup>(25)</sup>.

A pesar de las ventajas mencionadas también existen cuestionamientos importantes, como es el hecho de que la tecnología está restringida exclusivamente al uso de células compatibles con los ratones hospederos. El escalado está restringido a la cantidad de animales que se pueden explotar simultáneamente, ya que cada animal permite obtener unos pocos mililitros de ascitis por extracción. Se registran además, una alta variabilidad entre los lotes de producción, la materia prima tiende a ser portadora de agentes infecciosos (virus, micoplasmas, entre otros) potencialmente perjudiciales para la salud humana y de un alto perfil de impurezas como grasas, proteínas y otros anticuerpos. También existen implicaciones éticas por el uso continuo de miles de ratones sometidas a altos niveles de estrés y muerte <sup>(26, 27)</sup>.

Las razones anteriormente expuestas han conducido a la emisión de directivas que brindan asistencia institucional a los comités de ética animal en la evaluación de aplicaciones que involucran la producción de anticuerpos monoclonales. Estas directivas han sido desarrolladas en respuesta al reconocimiento de las crecientes necesidades de hacer un énfasis adicional en los principios de reemplazo y refinamiento que se aplican al uso de animales para la producción de anticuerpos <sup>(28)</sup>.

### **1.3.2 Producción de anticuerpos en sistemas artificiales.**

La tecnología de producción *in vitro* se basa en la manipulación de un sistema formado por células mantenidas en un medio de cultivo, en condiciones físicas, químicas y nutricionales controladas, de forma tal que permita la supervivencia y el crecimiento del cultivo <sup>(29)</sup>. Este sistema artificial es el llamado biorreactor, el cual ha ido evolucionando hasta imponerse en la actualidad en el mercado de producción de anticuerpos monoclonales sin que la variante de producción de ascitis haya pasado a un total desuso <sup>(30)</sup>.

La tecnología de producción de proteínas recombinantes, en particular de anticuerpos para aplicaciones terapéuticas, ha tenido un desarrollo notable desde la última década del pasado siglo, debido al uso cada vez mayor de anticuerpos en estudios clínicos y preclínicos. Las ventas de monoclonales se han incrementado principalmente por el rápido consumo de los reactivos monoclonales terapéuticos, el aumento de aprobaciones de estos productos para su aplicación en pacientes, y a la ausencia de genéricos para terapias biológicas. Como ejemplo de este crecimiento, para el 2015 se espera que las ventas de anticuerpos monoclonales alcancen los 67,6 mil millones de dólares, debido a la salida de nuevos terapéuticos tales como el Denosumab y el Teplizumad, lo que indica una tasa compuesta de crecimiento anual de un 13,8% <sup>(31, 32)</sup>.

#### **1.3.2.1 Medios de cultivo.**

Las primeras formulaciones de medios de cultivo para células superiores se obtuvieron a mediados del siglo XX, y las mismas estaban constituidas por una mezcla de componentes básicos que no eran capaces por sí mismas de sostener todas las funciones metabólicas de las células, por lo que estos medios debían ser suplementados con suero sanguíneo de mamíferos <sup>(33, 34)</sup>.

Tradicionalmente, los medios de cultivo para células de mamíferos están compuestos por una mezcla de aminoácidos, glucosa, lípidos, vitaminas, sales inorgánicas, y otros aditivos con funciones no nutricionales tales como tampones



de pH, agentes antioxidantes, agentes protectores de las células ante el estrés hidrodinámico, factores de crecimiento y antibióticos <sup>(35)</sup> **(Figura 3)**.

Los primeros medios de cultivo desarrollados eran medios basales cuya composición no era suficiente para soportar el crecimiento celular, por lo que era necesario suplementarlos con suero animal (preferentemente suero fetal bovino) a una concentración entre un 5% y un 10% (v/v). De esta forma se aporta una amplia variedad de sustancias tales como: nutrientes de bajo peso molecular, proteínas transportadoras de sustancias poco solubles en medios acuosos, hormonas, factores de crecimiento, factores de anclaje entre otros <sup>(36)</sup>. Por otra parte, las proteínas del suero constituyen impurezas en el caldo de cultivo que contiene los anticuerpos y el suero es un potencial portador de agentes infecciosos con riesgos a la salud humana y a las células en cultivo <sup>(37, 38)</sup>. Su alto costo en el mercado es de por sí un incentivo a buscar formulaciones alternativas que prescindan del mismo, pues generalmente resulta el componente más caro de la formulación <sup>(39)</sup>.

Desde la aparición de los medios de cultivo para células de mamífero hasta la actualidad se han desarrollado formulaciones que han eliminado total o parcialmente el suero fetal bovino. De esta forma, el medio de cultivo puede clasificarse en función de su composición. Tal es el caso de los medios basales, dentro de los que se hallan los medios clásicos que deben ser suplementados con suero animal <sup>(40)</sup>; el medio libre de suero cuando el mismo no requiere de suero como suplemento <sup>(41-44)</sup>, medio libre de proteínas cuando el mismo no contiene proteínas en su formulación <sup>(45, 46)</sup>, medios sintéticos cuando todos sus componentes son de origen artificial y medios químicamente definidos cuando se conoce con exactitud todas las sustancias que lo componen y la cantidad exacta en que se hallan presentes <sup>(47, 48)</sup>. En formulaciones de medios libres de suero y aún de proteínas, se emplean componentes de origen vegetal u otros tales como el extracto de levadura, por lo que estos pueden ser libres de componentes de origen animal pero no químicamente definidos <sup>(49, 50)</sup>.

### **1.3.2.2 Adaptación de células a nuevos medios de cultivo.**

Cuando se decide emplear un nuevo medio de cultivo para una línea celular en específico, esta generalmente pasa por una etapa de adaptación en la que el metabolismo se ajusta a las nuevas condiciones impuestas por la composición del nuevo medio. Existen casos en que las células se adaptan rápidamente a las nuevas condiciones, pero generalmente la diferencia de composición trae consigo que transcurra un periodo de adaptación más o menos prolongado, por lo que las células morirían si se transfirieran bruscamente al medio deseado. Por estas razones, en la literatura se describen dos métodos básicos para la adaptación de las células a un nuevo medio de cultivo. Estas consideraciones también se aplican al caso de la adaptación de células a medios libres de suero. En general, se sugiere que el cultivo se encuentre en fase de crecimiento exponencial, con alta viabilidad y las células se siembran al doble de la concentración usualmente empleada <sup>(51-54)</sup>.

El método de adaptación secuencial consiste en ir sustituyendo gradualmente, mediante cambios parciales periódicos, el medio de cultivo de partida por el nuevo medio. En general, se produce un nuevo cambio en la proporción de los dos medios presentes en la etapa de adaptación una vez que las células en cultivo muestran aumento en la concentración celular y en la viabilidad celular <sup>(55)</sup>.

El método de adaptación directa consiste en eliminar de una vez el medio de partida por el medio nuevo. El reemplazo de una formulación de medio por la otra se lleva a efecto “de un golpe”. Este método tiene la ventaja de ahorrar tiempo y recursos aunque las probabilidades de éxito son inferiores al primer método debido a que no todas las líneas celulares soportan un cambio brusco de medio de cultivo <sup>(56)</sup>.

### **1.3.2.3 Crecimiento, productividad y variables críticas.**

Las determinaciones cinéticas en un cultivo permiten conocer las velocidades de los procesos metabólicos que ocurren en un sistema bajo determinadas condiciones prefijadas por el investigador <sup>(57)</sup>. Entre las variables cinéticas mas

estudiadas están la velocidad específica de crecimiento celular y la velocidad específica de producción <sup>(58- 60)</sup>, aunque también se miden otras variables de interés como son el consumo y producción de metabolitos tales como la glucosa <sup>(61)</sup> y el lactato<sup>(62)</sup>, la glutamina<sup>(63)</sup> y el ión amonio<sup>(64)</sup>, así como aminoácidos limitantes en el medio<sup>(65, 66)</sup> entre otros<sup>(67)</sup>.

Al realizar estudios cinéticos en modo discontinuo, el cultivo describe una curva de crecimiento semejante a la que muestra el crecimiento microbiano en cultivo sumergido <sup>(68)</sup> **(Figura 4)**.

En una curva de crecimiento de un cultivo pueden observarse las siguientes fases:

#### Fase de adaptación

En la fase de adaptación o de latencia existe un aparente reposo en el que la velocidad específica de crecimiento es relativamente muy pequeña o cero. Cuando se mide la concentración de células dentro de este período el valor no cambia sustancialmente.

#### Fase exponencial

Una vez que las células se han adaptado al medio, comienzan a dividirse y el cultivo muestra un incremento exponencial de la concentración celular. La velocidad específica de crecimiento alcanza su valor máximo y el cultivo se duplica en el menor tiempo posible para esas condiciones, duración que se conoce como tiempo de duplicación.

#### Fase estacionaria

El consumo de los nutrientes por un lado y la acumulación de desechos metabólicos por otro, altera negativamente las condiciones del medio, por lo que la velocidad de muerte celular aumenta, y a su vez, la velocidad de crecimiento se desacelera hasta un punto en que queda a un valor igual pero inverso a la velocidad de muerte, por lo que se genera un equilibrio que mantiene relativamente constante la concentración celular.

## Fase de muerte

Las condiciones del cultivo se tornan más adversas, las reservas de energía del medio de cultivo están exhaustas y la velocidad de muerte supera a la velocidad de crecimiento. La concentración de células vivas disminuye y se observa una caída progresiva de la viabilidad del cultivo hasta que la gran mayoría de las células mueren.

Los resultados del comportamiento cinético de una línea celular están íntimamente relacionados con el comportamiento de los parámetros operaciones establecidos, por lo que estos constituyen variables críticas de los procesos fermentativos y deben establecerse valores o intervalos óptimos para el proceso. Entre estas variables se encuentran: la temperatura <sup>(69, 70)</sup>, el pH <sup>(71)</sup> y la osmolaridad <sup>(72)</sup>, la densidad de oxígeno disuelto <sup>(73)</sup>, la agitación del cultivo <sup>(74-76)</sup>, entre otras.

### **1.4 Sistemas de producción *In Vitro*.**

El biorreactor está definido como un sistema cerrado en el cual se desarrollan reacciones bioquímicas que involucran sistemas biológicos <sup>(77)</sup> (en este caso células animales). Durante el proceso de biocatálisis se obtiene el producto deseado, el cual generalmente es biomasa o una proteína expresada. El papel primario del biorreactor es contener el proceso de producción de biomasa y proteínas <sup>(29)</sup>.

El diseño y selección de biorreactores para células animales está influenciado por las características específicas de la línea celular, los servicios ingenieros con que se cuenta, así como los aspectos económicos y regulatorios <sup>(30)</sup>.

El tipo y configuración del biorreactor influye notablemente en los resultados del cultivo, el cual generalmente persigue obtener altas concentraciones de células y productos como resultado de la eficiencia del proceso <sup>(78)</sup>.

Existe una amplia variedad de diseños de biorreactores empleados en el cultivo de células de mamíferos <sup>(79)</sup>. Atendiendo a las exigencias en la investigación,

desarrollo y producción estos diseños pueden estar sujetos a diversos criterios de clasificación.

Esta variedad de diseños se refleja en el nivel de complejidad, pudiendo encontrarse biorreactores con elevado nivel de automatización e instrumentación en sus controles mientras otros requieren de equipamiento externo para los controles más básicos, como es el caso de incubadoras para la temperatura o zarandas y bases para la agitación<sup>(80)</sup>; la escala de producción varía desde unos pocos mililitros hasta los miles de litros<sup>(81, 82)</sup>, llegando a la escala de kilogramos de producto recombinante<sup>(83)</sup>; los materiales de fabricación varían desde los tradicionales acero y cristal hasta los más recientes de plástico que han dado origen a la industria biotecnológica de biorreactores desechables<sup>(84)</sup>. Los biorreactores también pueden dividirse en homogéneos, en los cuales las células se encuentran distribuidas uniformemente en el cultivo bajo la acción de los mecanismos de agitación, y heterogéneos, en los que las células se encuentran retenidas ya sea por anclaje a un soporte o por confinamiento dentro de una estructura cuyos bordes permiten el intercambio de sustancias y energía con la fase móvil del sistema<sup>(85)</sup>. Los biorreactores homogéneos en general soportan cultivos con concentraciones de células y productos relativamente bajas debido a las dificultades para suministrar el oxígeno y la agitación requeridos a altas densidades celulares sin provocar daños al cultivo por las fuerzas de cizalla y la formación de espuma. Entre sus principales ventajas están los años de experiencia en el uso de reactores convencionales (tales como el tanque agitado **(Figura 5)**), disponibilidad del “know-how” en diseño y operaciones estériles, buena transferencia de masa, mezclado homogéneo, la facilidad para la toma de muestras representativas y para la determinación de la concentración celular en el cultivo y el alto potencial de escalado volumétrico<sup>(86)</sup>.

Entre los biorreactores heterogéneos están el biorreactor de lecho empacado **(Figura 6)**<sup>(87)</sup> y el biorreactor de fibra hueca<sup>(88, 89)</sup> **(Figura 7)**. Considerando una densidad celular máxima teórica de  $5 \times 10^8$  células/mL, a 1 litro de cultivo de alta densidad le corresponden 50 L de cultivo en suspensión a  $1 \times 10^7$  células/mL.

Entre sus ventajas están las altas densidades celulares y de producto, la baja demanda de suero como suplemento en caso de necesitarse, estabilidad del cultivo a largo plazo, fácil manipulación y bajo costo. Entre sus principales desventajas están un limitado escalado, problemas con la transferencia de masa (gradientes de concentración), dificultad para determinar la concentración celular, y riesgos de daños al producto por la actividad proteolítica <sup>(85)</sup>.

Entre los sistemas de fermentación heterogéneos se encuentra el biorreactor CELLine **(Figura 8)**. Este está constituido por una unidad desechable con un diseño simple de tipo frasco de cultivo que contiene dos cámaras separadas por una membrana de diálisis que permite el paso de moléculas menores de 10 kD, el cual no requiere aditamentos especiales excepto una incubadora para el control de la temperatura. El biorreactor CELLine permite obtener densidades celulares en el orden de  $10^7$  células/mL y concentraciones en el orden de los miligramos de anticuerpo/mL en dependencia de la productividad de la línea celular. Sin embargo, el volumen de producción queda limitado por la pequeña capacidad de su cámara de cultivo, y su utilidad queda restringida a la producción a escala de laboratorio, donde se requieran modestos lotes de producto para experimentos de evaluación y selección de cultivos de alta densidad celular, así como la obtención de cantidades discretas de un producto bajo investigación <sup>(90, 91)</sup>.

Modos de cultivo.

Los modos de operación clásicos: cultivo por lote, cultivo por lote alimentado y cultivo continuo también se emplean en los procesos que utilizan células animales. A estos modos se añade el cultivo continuo con retención de biomasa, el cual busca incrementar los rendimientos productivos con células de mamíferos <sup>(92)</sup> **(Figura 9)**.

En el cultivo por lote o cultivo en “batch” las células son inoculadas en el biorreactor, donde crecen hasta alcanzar una concentración deseada de productos o células, y entonces son cosechados. En este modo de cultivo no hay flujo de

entrada ni de salida, solo el oxígeno es suministrado de forma continua debido a su baja solubilidad en el medio acuoso <sup>(93)</sup>. El modo de cultivo batch se caracteriza por alcanzar concentraciones celulares relativamente bajas, generalmente por debajo de  $5 \times 10^6$  células/mL, la concentración de producto puede alcanzar hasta los 200 mg/L aunque generalmente está por debajo de los 100 mg/L, posee baja demanda de control de procesos, la concentración de nutrientes y de productos de desecho se mantiene en constante cambio durante todo el proceso <sup>(57, 94)</sup>.

En el cultivo por lote alimentado o “fed-batch”, las células son inoculadas y el cultivo se mantiene en modo “batch” hasta alcanzar una concentración celular específica. Entonces se adicionan nutrientes claves o limitantes concentrados en volúmenes relativamente pequeños durante el proceso de fermentación para mantener la suficiencia de los mismos hasta que todo el cultivo es cosechado al final <sup>(95)</sup>. Este modo de operación se caracteriza por tener un tiempo de residencia de células y producto más largo que en modo “batch”. Igualmente la concentración celular y la fase de cultivo estacionaria suelen ser notablemente superiores. Ambos aspectos repercuten en un incremento de la productividad volumétrica del cultivo, no obstante hay que señalar que el producto que se va acumulando en el proceso permanece expuesto un mayor tiempo a la acción proteolítica generadas por las células muertas <sup>(96)</sup>.

En el modo de operación continuo el cultivo comienza en batch hasta alcanzar una densidad celular determinada. A partir de este punto se añade medio permanentemente hacia el biorreactor y simultáneamente se retira suspensión celular con producto. Los flujos de entrada y salida se ajustan a una misma velocidad <sup>(97)</sup>. Esta velocidad de recambio, (o velocidad de dilución) puede ser variada en el rango que oscila entre cero (batch) hasta la velocidad específica máxima de crecimiento de las células. El modo de cultivo continuo permite mantener condiciones de cultivo relativamente constantes (estado estacionario) e incrementa la productividad total al poseer un tiempo de fermentación más largo que los modos “batch” y “fed-batch” <sup>(98)</sup>.

Una variante al recambio continuo de volumen es el cultivo semicontinuo, en el que el cambio de volumen se realiza de manera intermitente, en una extensión semejante al recambio en modo continuo para el mismo intervalo de tiempo <sup>(99)</sup>. El suministro de medio y la cosecha se realizan en períodos de tiempo tales que la variación de la concentración de las sustancias claves no sufran cambios que comprometan al cultivo, lográndose una estabilidad relativa con fluctuaciones periódicas del cultivo <sup>(100, 101)</sup>.

El cultivo continuo con retención de biomasa o cultivo en perfusión es semejante al modo continuo, pero se diferencia de este porque al cosechar las células se mantienen dentro del fermentador mediante un dispositivo de retención celular <sup>(102)</sup>. La perfusión es frecuentemente empleada para aumentar la baja productividad inherente a los procesos productivos basados en células de mamíferos <sup>(103)</sup>. El modo de cultivo en perfusión permite mantener altas concentraciones celulares durante largos periodos de tiempo y cosechar una mayor cantidad de producto que en los otros modos de cultivo <sup>(104, 105)</sup>, por lo que es recomendable para escalados productivos en el orden de los kilogramos de productos por año. Las principales desventajas son las mismas observadas en los cultivos continuos, con una demanda de control de procesos aun superior <sup>(106)</sup>.



## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones correspondientes a los laboratorios de Expansiones Celulares y de Servicios Analíticos de LABEX, y en los laboratorios de Servicios Analíticos del CIM.

### 2.1. Hibridoma.

La línea celular de trabajo fue el Hibridoma Anti-B, derivado del clon C6G4<sup>(107)</sup>. El Hibridoma Anti-B es el producto de la fusión de células del mieloma murino P3/X63.Ag8.653 con linfocitos del bazo de ratones balb/c previamente inmunizados con el antígeno B sintético. El producto de secreción es una inmunoglobulina murina del tipo IgG2b, la cual reconoce específicamente al antígeno B en la superficie celular de los eritrocitos humanos, desencadenando la aglutinación de los mismos.

### 2.2. Medios de cultivo.

Se emplearon cuatro medios de cultivo: medio RPMI 1640, medio PFHM II, medio MyeloCIM y medio HybriCIM.

#### 2.2.1. Preparación medios de cultivo.

**RPMI 1640 (Gibco™, Invitrogen):** Formulación basal desarrollada en la década de los años 60 del siglo pasado para el cultivo de leucocitos normales y neoplásicos. La formulación mostrada es la vigente en LABEX para la expansión celular de hibridomas durante el proceso de preparación de inóculos para la producción de LAM en ratones balb/c<sup>(108)</sup>: RPMI 1640 en polvo (10,34 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), Piruvato de Sodio (0,11 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), 2-Mercaptoetanol (0,01 mL/L), Hepes (4,30 g/L), Suero Fetal Bovino (80 mL/L).

**PFHM II (Gibco™, Invitrogen):** Esta formulación libre de proteínas fue diseñada y optimizada para el crecimiento libre de suero de hibridomas y la producción de anticuerpos monoclonales. La misma se tomó en cuenta como posible alternativa para el futuro desarrollo de un proceso de producción del anticuerpo monoclonal por fermentación empleando el Hibridoma Anti-B. Para la ejecución del trabajo experimental el medio fue preparado y suplementado como sigue: PFHM II en polvo (15,01 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), Pluronic F-68 (1,00 g/L).

**MyeloCIM (CIM, Cuba):** Formulación libre de proteínas químicamente definida, desarrollada por el Departamento de Investigación y Desarrollo del CIM como alternativa de uso de PFHM II. Para la ejecución del trabajo experimental el medio fue preparado y suplementado como sigue: MyeloCIM en polvo (12,18 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,20 g/L), Citrato férrico (0,025 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), 2-Mercaptoetanol (0,0039 g/L), Hepes (2,50 g/L), Pluronic F-68 (1,00 g/L).

**HybriCIM (CIM, Cuba):** Formulación libre de proteínas químicamente definida, desarrollada por el Departamento de Investigación y Desarrollo del CIM como alternativa de uso de PFHM II. Para la ejecución del trabajo experimental el medio fue preparado y suplementado como sigue: HybriCIM en polvo (14,20 g/L), Bicarbonato de Sodio (2,00 g/L), L-Glutamina (0,30 g/L), Pluronic F-68 (1,00 g/L).

Los medios fueron esterilizados mediante filtración por dos membranas de acetato de celulosa con porosidad de 0,45 µm y 0,20 µm inmediatamente después de ser preparados. Posteriormente los medios fueron sometidos a una cuarentena mediante incubación a 37°C durante 48 horas y finalmente se almacenaron a 5 ± 3°C para su uso durante un período máximo de 60 días.

### **2.3 Condiciones de cultivo.**

Los cultivos fueron incubados a 37°C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%. La expansión de los cultivos y la primera etapa de la adaptación se realizó en frascos estándar para cultivo celular en suspensión CELLSTAR® (Greiner Bio-One, Alemania) de 50 mL y de 650 mL <sup>(109)</sup>.

### **2.4 Adaptación a medios libres de suero.**

El Hibridoma Anti-B en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 8% fue adaptado a los medios libres de suero empleando el método de adaptación secuencial. La presencia del medio suplementado se fue disminuyendo en un 25% cada vez que el cultivo alcanzó alta confluencia y las células mostraron morfología típica al ser observadas a 200 aumentos en un microscopio óptico invertido Eclipse TS100 (Nikon, Japón).

Una vez que las células alcanzaron alta confluencia en medio libre de suero el cultivo se pasó a frascos agitados con impelente magnético para completar la adaptación tomándose en cuenta los criterios siguientes:

- ✓ El cultivo alcanza concentración de células vivas superior a  $1 \times 10^6$  células/mL.
- ✓ El cultivo alcanza viabilidad celular superior al 90%.
- ✓ El sobrenadante de cultivo obtenido al sembrar las células a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/mL e incubar durante siete días muestra una intensidad de aglutinación directa en láminas  $\geq 3+$  frente a hematíes humanos pertenecientes a los grupos B y A<sub>1</sub>B según Sistema de Clasificación ABO.

Al cumplirse los criterios de adaptación las células fueron congeladas y preservadas en nitrógeno líquido para su posterior empleo en la investigación.

## **2.5 Determinación del número de generaciones transcurridas.**

El número de generaciones celulares transcurridas en un intervalo de tiempo dado se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$N_g = \frac{T_t}{T_D}$$

Donde:

**N<sub>g</sub>**: número de generaciones.

**T<sub>t</sub>**: tiempo de duración del cultivo.

**T<sub>D</sub>**: tiempo de duplicación.

## **2.6 Caracterización del Hibridoma C6G4 en cultivos de baja densidad.**

Para la caracterización cinética del Hibridoma Anti-B en cultivos de baja densidad se empleó el frasco agitado por impelente magnético (frasco spinner) como sistema modelo del biorreactor del tipo tanque agitado. Los ensayos se realizaron en modo de cultivo discontinuo y se ejecutaron de igual manera para los medios de cultivo propuestos. Se utilizaron tres frascos spinner de 1000 mL de capacidad, empleando un volumen de trabajo de 500 mL de cultivo celular por frasco con una concentración celular inicial de  $2,5 \times 10^5$  células/mL y viabilidad celular mínima de 90%. En el momento de siembra y cada 24 horas se tomó una muestra del cultivo de cada frasco para determinar la viabilidad celular y concentración de células vivas, muertas y totales. Posteriormente las muestras tomadas fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 1 minuto para coleccionar el sobrenadante de cultivo, el cual fue conservado entre 2-8°C hasta su posterior caracterización.

### **2.6.1 Determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento.**

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. Para el cálculo de la misma se empleó la siguiente fórmula:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln X_F - \ln X_0}{t_F - t_0}$$

Donde:

$\mu_{m\acute{a}x}$ : velocidad específica de crecimiento máxima.

$X_F$ : concentración celular en el último punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial.

$X_0$ : concentración celular en el primer punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial.

$t_F$ : tiempo transcurrido en el último punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial.

$t_0$ : tiempo transcurrido en el primer punto de la curva en la fase de crecimiento exponencial.

Se asumió el valor de la velocidad específica de crecimiento máxima del hibridoma C6G4 en cada medio como la media de las velocidades específicas de crecimiento máximas determinadas en el cultivo de los tres frascos empleados.

### 2.6.2 Determinación de la velocidad específica de producción.

La velocidad específica de producción se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$q_P = \frac{1}{T_v} \frac{d[IgG]}{dt}$$

Donde:

$q_P$ : Velocidad específica de producción.

$T_v$ : Cantidad de células vivas.

$[IgG]$ : Concentración de IgG.

Se asumió el valor de la velocidad específica de producción del Hibridoma Anti-B en cada medio como la media de las velocidades específicas de producción determinadas en el cultivo de los tres frascos empleados.

### 2.6.3 Determinación del tiempo de duplicación.

El tiempo de duplicación es el tiempo en que la concentración de células se duplica, teniendo su menor valor cuando el cultivo se encuentra en fase de crecimiento exponencial. El tiempo de duplicación se calculó por la siguiente fórmula:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Donde:

$t_d$ : tiempo de duplicación de las células en fase de crecimiento exponencial.

$\mu_{m\acute{a}x}$ : velocidad específica de crecimiento máxima.

Se asumió el tiempo de duplicación del Hibridoma Anti-B en cada medio como la media de los tiempos de duplicación determinados en el cultivo de los tres frascos empleados.

### 2.7 Caracterización del Hibridoma Anti-B en cultivo de alta densidad.

Para la caracterización cinética del Hibridoma Anti-B en cultivos de alta densidad se empleó como sistema modelo el biorreactor CELLLine modelo CL1000 (Integra Biosciences, Suiza). Se desarrollaron dos métodos de fermentación empleando los medios de cultivos candidatos, los cuales se describen a continuación:

Método 1: El biorreactor se inoculó con 30 millones de células en un volumen de 15mL ( $2,0 \times 10^6$  células viables/mL) de medio de cultivo. Se incubó a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con CO<sub>2</sub> al 5% durante 7 días, momento en que se realizó la cosecha.

Método 2: El biorreactor se inoculó con 100 millones de células en un volumen de 15 mL ( $6,7 \times 10^6$  células viables/mL) de medio de cultivo. Se incubó a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 días, momento en que se realizó la cosecha.

En cada método se realizaron cinco experimentos fermentativos. En cada experimento se determinó la concentración celular, la viabilidad del cultivo, el volumen de cosecha, concentración de anticuerpo y actividad biológica del sobrenadante. Las mediciones celulares se realizaron en el momento de la cosecha. Se asumió el valor de cada variable medida como la media de los valores obtenidos en los cinco experimentos fermentativos realizados.

## **2.8 Concentración de sobrenadantes de cultivo.**

La concentración de los anticuerpos en sobrenadante de cultivo se llevó a cabo mediante filtración en concentradores de centrifuga Vivaspin 2 (Sartorius, Alemania). Se aplicaron 2mL de sobrenadante en el concentrador, se centrifugó a 1500 r.p.m y 4°C durante varios períodos de 5 minutos hasta que el volumen se redujo a la mitad de su valor inicial. Los concentrados fueron conservados a 4°C durante un tiempo no mayor a 7 días hasta su caracterización.

## **2.9 Técnicas analíticas.**

### **2.9.1 Determinación de la viabilidad y la concentración celular.**

El cálculo de la concentración celular y de la viabilidad del cultivo se realizó mediante conteo en cámara de Neubauer, aplicando el método de exclusión con el colorante Tripán azul al 0,4%<sup>(110)</sup>. Se mezclaron 100 µL de suspensión celular con 100 µL de Tripán azul al 0,4% y la mezcla se depositó en la cámara de Neubauer. Se observó al microscopio óptico y se contaron y sumaron por separado la cantidad de células vivas, muertas y totales de los cuatro cuadrantes de la cámara.

La concentración celular se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$X = S \div n \times F_{dil} \times 10^6 \text{ células/mL}$$

Donde:

**X:** Concentración de las células vivas, muertas o totales según el caso a determinar (células/mL).

**S:** Suma de la cantidad de células vivas, muertas o totales según el caso a determinar.

**n:** Número de cuadrantes de la Cámara de Neubauer .

**F<sub>dil</sub>:** Factor de dilución de la muestra en Tripán azul al 0,4%. Es el inverso de la dilución.

La viabilidad del cultivo se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$Viab = \frac{Sv}{St} \times 100 \%$$

Donde:

**Viab:** viabilidad del cultivo (%)

**Sv:** suma de la cantidad de células vivas de los cuatro cuadrantes.

**St:** suma de la cantidad de células totales de los cuatro cuadrantes.

### 2.9.2 Determinación de la concentración específica de IgG.

La concentración de IgG en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante la técnica ELISA tipo sándwich <sup>(111)</sup>. Se recubrieron placas para ELISA aplicando un reactivo policlonal anti-IgG de ratón (molécula completa) producido en carnero, y las placas se incubaron 2 horas a 37°C. Se lavaron los pozos tres veces con solución de lavado Tampón fosfato salino (PBS) -Tween 20 al 0,05% en un lavador de placas automático Wellwash 4 MK 2 (Thermo electron corporation, China). Se aplicaron las muestras en dos diluciones (1:500-1:1000 para las muestras menos concentradas y 1:1000-1:2000 para las más concentradas) por triplicado cada dilución. Las diluciones se realizaron en solución de lavado -BSA 0,25%. Se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora. Se lavaron los pozos tres



veces con solución de lavado y se aplicó un reactivo anti-IgG de ratón (fracción Fab) producido en carnero conjugado con Peroxidasa de rábano picante. Se incubó a 37°C durante 1 hora. Los pozos se lavaron tres veces con solución de lavado (250 µL/pozo) y se aplicó solución sustrato (2 mg de OPD-5 mL de Tampón Citrato-Fosfato pH 5-10 µL de Peróxido de hidrógeno al 37%) y se incubó a 25°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción añadiendo Ácido Sulfúrico al 10%, y se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas DIAREADER UV ELx800 (DIALAB, Austria). Para determinar la concentración de cada muestra, los valores fueron extrapolados en una curva patrón de IgG murina.

### **2.9.3 Caracterización de los sobrenadantes por técnicas hematológicas.**

A los sobrenadantes de cultivo obtenido de la cinética de crecimiento y las cosechas de biorreactor CELLline se le determinó especificidad de reconocimiento, potencia, avidéz e intensidad mediante técnica de hemaglutinación directa<sup>(112)</sup>. La técnica se ejecutó en láminas para la determinación de la avidéz y la intensidad, y en tubos para la determinación de la potencia. Como referencia se empleó un reactivo Anti-B monoclonal (CENTIS Diagnósticos®).

La aglutinación se leyó siguiendo escala de 1+ hasta 4+ según se describe a continuación:

4+: Aglutinación total de los eritrocitos en un solo cúmulo grande en un fondo claro.

3+: Dos o tres 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 se considera negativa.

0: No aglutinación.

### **Determinación de Potencia:**

Se utilizaron 3 muestras de células de hematíes AB, 2 muestras de B, 2 muestras de A y 2 muestras de O. Todas las muestras se lavaron tres veces con solución salina fisiológica por 10 minutos a 1500 r.p.m. Se preparó una suspensión al 2% de hematíes en solución salina fisiológica. Luego se procedió a realizar diluciones dobles seriadas de las muestras en tampón fosfato pH 7,5 y se mezclaron 100 µL de cada dilución con 100 µL de suspensión de eritrocitos al 2%, se homogenizó y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 1 minuto a temperatura ambiente y se realizó la lectura de la aglutinación.

### **Determinación de avidéz e intensidad:**

Se preparó previamente una suspensión al 40% de hematíes en solución salina fisiológica. Se enfrentaron en una lámina 50 µL de sobrenadante de cultivo con 50 µL de la suspensión de hematíes, mezclando con ayuda de un aplicador. Se midió el tiempo desde que se comenzó a mezclar hasta que aparecieron los aglutinados según inspección visual.

## **2.10 Procesamiento Estadístico**

Los resultados de las mediciones de concentración celular y la concentración de producto, los cálculos de las velocidades específicas máximas de crecimiento y de producción, así como los gráficos de los ensayos de cultivo a baja y a alta densidad celular en los diferentes medios de cultivo fueron registrados y procesados en el programa Microsoft Excel 2010 del paquete informático Microsoft Office 2010.

Se realizaron análisis de varianza de clasificación simple con posteriores comparaciones múltiples por la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparar los resultados obtenidos según la variable estudiada en los diferentes medios de cultivo. Los resultados fueron registrados en gráficos de comparación de medias

y desviación estándar. El procesamiento estadístico se realizó empleando el programa SPSS 11.5 para Windows, en una computadora Intel ® Core ™ 2Duo con ambiente Microsoft Windows XP SP3.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Adaptación del hibridoma C6G4a medios libres de suero.

El hibridoma C6G4 fue adaptado a tres medios libres de suero como candidatos alternativos al medio tradicional RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 8% (v/v).

En los tres casos se aplicó el método de adaptación secuencial publicado en el manual de uso del medio PFHM II. Se comenzó por la descongelación y expansión celular en el medio RPMI 1640 suplementado con suero, y seguidamente se realizaron cambios graduales de la combinación del medio de partida y del medio libre de suero presentes en el cultivo, hasta concluir con el cultivo en un 100% del medio libre de suero.

#### Adaptación del hibridoma C6G4 a medio PFHM II

El proceso de adaptación del hibridoma C6G4 al medio PFHM II tuvo una duración total de 53 días, periodo en el que se estima transcurrieron 73 generaciones. La duración de las diferentes etapas del proceso de adaptación y las combinaciones de medio de cultivo aplicadas en cada etapa se comportó de la siguiente manera:

- ◆ Cultivo estacionario 100% RPMI 1640 con 0% PFHM II: 6 días
- ◆ Cultivo estacionario 75% RPMI 1640 con 25% PFHM II: 3 días
- ◆ Cultivo estacionario 50% RPMI 1640 con 50% PFHM II: 4 días
- ◆ Cultivo estacionario 25% RPMI 1640 con 75% PFHM II: 13 días
- ◆ Cultivo estacionario 0% RPMI 1640 con 100% PFHM II: 17 días
- ◆ Cultivo agitado 100% PFHM II: 10 días

Durante los primeros 26 días del proceso de adaptación (desde la descongelación hasta el momento en que se empleó la combinación de un 25% de RPMI 1640 – 75% de PFHM II) el cultivo mostró una rapidez en el cambio de coloración hacia el amarillo superior a la observada en el cultivo tradicional en RPMI 1640. Ello es atribuible al hecho de comenzar con una concentración celular de siembra

superior, lo que trae consigo una tasa de transformación del medio superior. La siembra inicial a una mayor concentración también fue la causa de que se alcanzaran altas densidades celulares en periodos más cortos (en uno o dos días) que en el cultivo tradicional, donde los pases de cultivo se realizan cada tres días. Durante estas cuatro primeras etapas no se observaron prácticamente células muertas en el cultivo. Cuando se eliminó el medio RPMI 1640 del cultivo, quedando las células en PFHM II al 100%, no se observaron cambios durante los primeros tres pases. Posteriormente se apreció una disminución tanto en la velocidad de incremento de la densidad celular como en la del cambio de coloración del cultivo, por lo que los intervalos entre cada pase fueron de tres a cinco días. Durante esta etapa también se observó un incremento en la cantidad de células muertas en suspensión, mientras la gran mayoría de las células viables que estaban adheridas al fondo del frasco de cultivo comenzaron a desprenderse. Estas células en suspensión se transfirieron a nuevos frascos y desde entonces quedó eliminada la adherencia de las mismas a los frascos. Las células en cultivo estacionario siempre mostraron una viabilidad celular inferior a 80%, situación que se contrarrestó al pasar a cultivo agitado en frascos spinner. El período de adaptación concluyó cuando el cultivo alcanzó una concentración de  $1,52 \times 10^6$  células vivas/ mL con una viabilidad de 93%.

A continuación, se sembraron células adaptadas en tres pozos de una placa de cultivo de 24 pozos a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/mL en cada pozo y se colectó el sobrenadante de cultivo después de siete días de incubación. Al sobrenadante obtenido mostró una concentración de IgG de 55,7 mg/L, mientras las pruebas de actividad biológica evidenciaron una intensidad de 4+ frente a hematíes del grupo sanguíneo B y 3+ frente a hematíes del grupo sanguíneo A<sub>1</sub>B.

#### Adaptación del hibridoma C6G4 a medio MyeloCIM

El hibridoma C6G4 fue adaptado al medio MyeloCIM en un período de 49 días, estimándose 61 generaciones transcurridas durante el proceso de adaptación. La

duración de las etapas del período de adaptación así como las combinaciones de medio de cultivo aplicadas en cada etapa mostró el siguiente comportamiento:

- ◆ Cultivo estacionario 100% RPMI 1640 con 0% MyeloCIM: 6 días
- ◆ Cultivo estacionario 75% RPMI 1640 con 25% MyeloCIM: 4 días
- ◆ Cultivo estacionario 50% RPMI 1640 con 50% MyeloCIM: 4 días
- ◆ Cultivo estacionario 25% RPMI 1640 con 75% MyeloCIM: 10 días
- ◆ Cultivo estacionario 0% RPMI 1640 con 100% MyeloCIM: 10 días
- ◆ Cultivo agitado 100% MyeloCIM: 15 días

Durante el proceso de adaptación el cultivo mostró un patrón semejante al observado en el caso de la adaptación al PFHM II. Al igual que en el caso anterior, no hubo cambios notables hasta que el cultivo estuvo en MyeloCIM al 100%, observándose igualmente un aumento en la cantidad de células muertas en suspensión. La viabilidad celular se incrementó al final mediante pases en cultivo agitado en frascos spinner, alcanzando una concentración de  $1,33 \times 10^6$  células vivas/ mL y una viabilidad de 96%.

La concentración de IgG en el sobrenadante obtenido a partir de la placa de cultivo fue de 39,1 mg/L. La intensidad fue de 4+ frente a hematíes del grupo sanguíneo B y de 3+ frente a hematíes del grupo sanguíneo A<sub>1</sub>B.

#### Adaptación del hibridoma C6G4 a medio HybriCIM.

El hibridoma C6G4 fue adaptado al medio HybriCIM en un período de 62 días, en el que se estima transcurrieron 59 generaciones. La duración de las diferentes etapas del período de adaptación y las combinaciones de medio de cultivo aplicadas en cada intervalo se comportó del siguiente modo:

- ◆ Cultivo estacionario 100% RPMI 1640 con 0% HybriCIM: 6 días
- ◆ Cultivo estacionario 75% RPMI 1640 con 25% HybriCIM: 6 días
- ◆ Cultivo estacionario 50% RPMI 1640 con 50% HybriCIM: 6 días
- ◆ Cultivo estacionario 25% RPMI 1640 con 75% HybriCIM: 12 días

- ◆ Cultivo estacionario 0% RPMI 1640 con 100% HybriCIM: 15 días
- ◆ Cultivo agitado 100% HybriCIM: 17 días

El patrón de comportamiento del hibridoma C6G4 durante la adaptación al medio HybriCIM se caracterizó por una tasa de incremento en la densidad celular y de cambio de coloración del cultivo inferior a los dos casos anteriores. En los demás aspectos no se observaron diferencias notables. Fue necesario un número mayor de pases de cultivo en HybriCIM al 100% para que el mismo alcanzara una concentración de células viables superior al millón de células por mililitro. Al final de la adaptación el cultivo alcanzó una concentración de  $1,02 \times 10^6$  células vivas/mL y una viabilidad de 92%. El sobrenadante colectado de la placa de 24 pozos mostró una concentración de 28,7 mg/L de IgG, una intensidad de 4+ frente a hematíes del grupo sanguíneo B y 3+ frente a hematíes del grupo sanguíneo A<sub>1</sub>B. Los resultados de la adaptación del hibridoma C6G4 a los medios libres de suero aparecen resumidos en la **Tabla 1**.

La adaptación de células de mamífero a medios libres de suero tiene el incentivo económico de la reducción de costos <sup>(113)</sup>. La disminución o eliminación de proteínas no deseadas en el caldo de cultivo simplifica el posterior procesamiento de la materia prima <sup>(114)</sup> y elimina riesgos a la salud provocados por agentes infecciosos presentes en el suero animal <sup>(115-117)</sup>. El método de adaptación secuencial o de reducción de suero es el más popular ya que reduce el nivel de daño a los cultivos durante la adaptación en comparación con el método directo <sup>(118)</sup>. La adaptación a medios libres de suero y químicamente definidos se ha establecido dentro de las buenas prácticas de cultivo celular <sup>(119)</sup>.

El periodo total de adaptación del hibridoma C6G4 al medio libre de suero para los tres medios evaluados estuvo entre los 49 y 62 días. Otros trabajos reportan un periodo de adaptación de líneas celulares e hibridomas a la ausencia de suero de hasta siete semanas, y otras dos a siete semanas más para adaptar las células al cultivo en suspensión. Los periodos de adaptación medidos en este caso fueron inferiores o similares a estos resultados <sup>(120, 121)</sup>. La primera parte de la adaptación

no suele ser problemática ya que el cultivo todavía contiene cantidades significativas de suero. Los cambios en el cultivo se comenzaron a observar a concentraciones de suero por debajo de los 2,5%, lo que ha sido reportado por otros investigadores <sup>(122)</sup>. La disminución de la velocidad de crecimiento durante la adaptación, específicamente por debajo de 2,5% de suero y en ausencia total de éste, también ha sido descrita en trabajos anteriores. Al eliminar la presencia de suero en el cultivo durante la adaptación, las células quedan privadas de las hormonas y factores de crecimiento con efectos pro-mitóticos presentes en el mismo. Este es el periodo más drástico para las células, las que se vuelven muy sensibles a procedimientos comunes de cultivo celular, tales como centrifugaciones y aplicaciones de enzimas como la tripsina. Muchas células no son capaces de tolerar el cambio y mueren <sup>(122)</sup>. Durante el período crítico de la adaptación las células deben eliminar la dependencia de los factores del suero, enfocándose más en los factores autocrinos, proceso que ocurre mediante un reordenamiento de los receptores de membrana <sup>(123)</sup>. Estos cambios pueden involucrar modificaciones en las respuestas de las células a las citocinas presentes en el cultivo. Fukumoto y Tanaka han referido que líneas celulares hibridomas múridas cambiaron en la respuesta a la interleucina IL-6 durante la adaptación a medio libre de suero, pasando de un efecto pro-mitótico a uno anti-mitótico mediante la modificación de la vía de internalización de la señal JAK/STAT3<sup>(124, 125)</sup>. En general, el proceso de adaptación tuvo cambios positivos en la concentración de IgG secretada. La concentración de IgG en PFHM II y en MyeloCIM fue notablemente superior al medio de referencia RPMI 1640 suplementado con suero. En el caso del medio HybriCIM el resultado fue semejante al medio control. Tampoco la especificidad de reconocimiento y el efecto aglutinante del anticuerpo resultaron afectados por la adaptación, el cual ha mostrado una mayor afectación sobre los patrones de glicosilación de las proteínas secretadas <sup>(126)</sup>.



### 3.2 Evaluación del hibridoma C6G4 en cultivo de baja densidad celular.

La evaluación del hibridoma C6G4 en el cultivo de baja densidad celular se llevó a cabo mediante la caracterización del crecimiento y la productividad del hibridoma en el medio tradicional RPMI 1640 y los tres medios libres de suero a los que fue adaptado (PFHM II, MyeloCIM e HybriCIM). Para la caracterización del crecimiento se registraron en intervalos de 24 horas la viabilidad celular y la concentración celular. Ello que permitió definir las fases de la curva de crecimiento del cultivo bajo las condiciones prefijadas y calcular la velocidad específica de crecimiento máxima, con cuyo valor se determinó posteriormente el tiempo de duplicación del cultivo en fase de crecimiento exponencial y el número de generaciones transcurridas durante el período de adaptación para los tres medios libres de suero. Al mismo tiempo, se pudo determinar la concentración de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo con muestras tomadas a intervalos de 24 horas. Con el valor de concentración de IgG se calculó la velocidad específica de producción en los diferentes intervalos de muestreo, lo que permitió analizar la relación entre crecimiento y la productividad en cada caso.

#### Evaluación en medio RPMI 1640

La caracterización del hibridoma C6G4 en medio RPMI 1640 (**Figura 10**) tuvo una duración de 10 días (240 horas), momento en que la viabilidad del cultivo cayó por debajo del 20%. Los valores de las distintas variables medidas durante el ensayo cinético se muestran en la **Tabla 2**. Durante las primeras 24 horas se observó un incremento en la concentración celular por lo que no se registró una fase de latencia en estas condiciones. Posteriormente el cultivo entró en fase de crecimiento exponencial hasta las 72 horas, momento en que se registraron los valores máximos de concentración de células viables y totales del experimento:  $1,51 \times 10^6$  células/mL y  $1,57 \times 10^6$  células/mL respectivamente. Estos valores permitieron calcular una velocidad específica de crecimiento máxima de  $0,028 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 24,76 horas en la fase de crecimiento exponencial. La viabilidad celular se mantuvo sobre el 90% durante esta etapa, alcanzando su valor máximo de 98%, mientras la concentración de células muertas estuvo en los

valores mínimos del experimento. Desde la siembra hasta las 72 horas se registraron aumentos de la concentración de IgG en el sobrenadante de cultivo, alcanzando 13,83 µg/mL al final de la fase de crecimiento exponencial. Durante esta etapa se registró el valor máximo en la velocidad específica de producción de IgG de todo el experimento, el cual fue de  $5,11 \times 10^{-7}$  µg/célula.h, por lo que los valores de las velocidades específicas de crecimiento y de producción coincidieron en la fase de crecimiento exponencial. Para esta etapa no se registró aglutinación frente a hematíes del grupo B y para A<sub>1</sub>B presentó una potencia de 2. A partir de las 72 horas, la concentración de células vivas comenzó a disminuir gradual e irreversiblemente hasta el final del experimento. No se registró fase de meseta posterior a la fase de crecimiento exponencial. La concentración de células viables cayó paulatina e irreversiblemente hasta el final del experimento, mientras la concentración de células totales también mostró valores inferiores con algunos incrementos relativos justificados por el aumento de la concentración de células muertas. La concentración de células muertas aumentó sostenidamente hasta el final con un valor máximo de  $0,97 \times 10^6$  células/mL. La concentración de IgG aumentó hasta las 240 horas, alcanzando al final una concentración de 32,55 µg/mL, pero a una velocidad inferior a la registrada en la fase de crecimiento exponencial. Con los incrementos en la concentración de IgG en esta fase final también aumentó la actividad biológica, rindiendo a las 144 horas una potencia de 2 frente a los hematíes del grupo B y de 4 frente a los del grupo A<sub>1</sub>B. A las 168 horas la potencia se incrementó hasta 4 para los hematíes del grupo B y estos valores se mantuvieron constantes hasta el final del experimento. No mostró aglutinación frente a hematíes del grupo A.

### Evaluación en medio PFHM II

La caracterización cinética del hibridoma C6G4 en medio PFHM II (**Figura 11**) tuvo una duración de 11 días. Los valores de las distintas variables medidas durante el ensayo cinético se muestran en la **Tabla 3**. En las primeras 24 horas se observó una fase de latencia prácticamente sin crecimiento del cultivo. Posteriormente el cultivo entró en la fase de crecimiento exponencial hasta las 72

horas. En esta etapa el cultivo alcanzó la concentración celular máxima ( $1,64 \times 10^6$  células viables/mL y  $1,80 \times 10^6$  células totales/mL) y una viabilidad celular máxima de 95%. Igualmente se registró la velocidad específica de crecimiento máxima de  $0,040 \text{ h}^{-1}$ , lo que corresponde a un tiempo de duplicación de 17,31 horas. Hasta el final de la fase de crecimiento exponencial, la concentración de IgG aumentó sostenidamente hasta los  $26,50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , alcanzándose en esta etapa una velocidad específica de producción máxima de  $7,74 \times 10^{-7} \text{ }\mu\text{g/célula.h}$ . El sobrenadante de cultivo presentó una potencia de 2 frente a hematíes del grupo sanguíneo A<sub>1</sub>B a las 48 horas. A las 72 horas la misma se incrementó a 4 frente a hematíes del grupo sanguíneo A<sub>1</sub>B y a 2 frente a hematíes del grupo sanguíneo B. Terminada la fase de crecimiento exponencial el cultivo entró en la fase de muerte sin registrarse una fase de meseta entre ambas. En la fase de muerte la concentración de IgG alcanzó su valor máximo de  $75,33 \text{ }\mu\text{g/mL}$  en la muestra correspondiente a las 240 horas. Por su parte, la potencia del sobrenadante aumentó paulatinamente hasta 16 frente a hematíes del grupo sanguíneo B y a 8 frente a hematíes del grupo sanguíneo A<sub>1</sub>B. No mostró aglutinación frente a hematíes del grupo A.

#### Evaluación en medio MyeloCIM

La caracterización cinética del hibridoma C6G4 en medio MyeloCIM (**Figura 12**) tuvo una duración de 10 días. Los valores de las distintas variables medidas durante el ensayo cinético se muestran en la **Tabla 4**. Durante las primeras 24 horas se registró una fase de latencia. Posteriormente el cultivo entró en la fase de crecimiento exponencial hasta las 72 horas, registrándose la mayor velocidad específica de crecimiento de  $0,036 \text{ h}^{-1}$ , con un tiempo de duplicación de 19,15 horas. Durante la fase de crecimiento exponencial se alcanzó la concentración máxima de  $1,44 \times 10^6$  células viables/mL y  $1,50 \times 10^6$  células totales/mL, con una viabilidad máxima de 96%. La concentración de IgG en esta etapa alcanzó un valor de  $14,13 \text{ }\mu\text{g/mL}$  y se registró la velocidad específica de producción máxima de  $6,07 \times 10^{-7} \text{ }\mu\text{g/célula.h}$ . Al final de la fase de crecimiento exponencial el sobrenadante de cultivo presentó una potencia de 2 frente a los dos grupos

sanguíneos. No se registró fase de meseta y el cultivo pasó a la fase de muerte hasta las 240 horas. En esta etapa la concentración de IgG se incrementó hasta un valor máximo de 40,22 µg/mL al final del experimento, mientras la potencia del sobrenadante llegó a 4 frente a los hematíes del grupo B y A<sub>1</sub>B. No mostró aglutinación frente a hematíes del grupo A.

### Evaluación en medio HybriCIM

La caracterización cinética del hibridoma C6G4 en medio HybriCIM (**Figura 13**) tuvo una duración de 10 días. Los valores de las distintas variables medidas durante el ensayo cinético se muestran en la **Tabla 5**. Se observó una fase de latencia durante las primeras 24 horas. Posteriormente el cultivo entró en la fase de crecimiento exponencial hasta las 72 horas, alcanzando la viabilidad celular máxima de 94%, una velocidad específica de crecimiento máxima de 0,027 h<sup>-1</sup>, un tiempo de duplicación de 25,29 horas y una velocidad específica de producción de 4,03 x 10<sup>-7</sup> µg/célula.h. La concentración de células continuó aumentando hasta las 96 horas, registrándose una desaceleración de la velocidad específica de crecimiento sin llegar a ser una fase de meseta. En esta etapa el cultivo llegó a los valores máximos de 1,03 x 10<sup>6</sup> células viables/mL y 1,20 x 10<sup>6</sup> células totales/mL, mientras el sobrenadante de cultivo alcanzó una concentración de IgG de 11,50 µg/mL y no mostró potencia de aglutinación frente a hematíes del grupo B y 2 frente al grupo A<sub>1</sub>B. Transcurridas 96 horas el cultivo, entró en fase de muerte, en la que la concentración de IgG en el sobrenadante alcanzó un valor máximo de 28,29 µg/mL a las 240 horas, y el sobrenadante alcanzó una potencia máxima de 4 frente a hematíes de los dos grupos sanguíneos B y A<sub>1</sub>B. No mostró aglutinación frente a hematíes del grupo A.

Los ensayos en los diferentes medios coincidieron en tener una fase de crecimiento exponencial entre las 48 y las 72 horas, mostrando una fase de adaptación en las primeras 24 horas, excepto en el medio RPMI 1640; y en que a partir de las 72 horas los cultivos pasaron a la fase de muerte sin mostrar una meseta, excepto en el medio HybriCIM que tuvo una desaceleración entre las 72 y las 96 horas. El análisis estadístico evidenció que la concentración celular máxima

en el cultivo en PFHM II fue superior a los tres restantes, en HybriCIM fue inferior, mientras que en MyeloCIM y RPMI 1640 tuvieron resultados intermedios sin diferencias significativas entre ellos (**Anexos 1 y 2**). La concentración máxima de anticuerpos en PFHM II fue el único resultado significativamente superior, mientras que no hubo diferencias entre los otros tres (**Anexo 3**). En cuanto a la velocidad específica de crecimiento máxima, no se observaron diferencias entre los pares PFHM II-MyeloCIM y RPMI1640-HybriCIM, pero sí entre los dos pares, obteniéndose mejores resultados en el PFHM II y el MyeloCIM (**Anexo 4**). La velocidad específica de producción máxima fue superior en PFHM II sobre los tres medios restantes, mientras la determinada en MyeloCIM no arrojó diferencias significativas con RPMI 1640 y fue significativamente superior con respecto al medio HybriCIM (**Anexo 5**). En la **Tabla 6** se muestran los valores de las cinéticas específicas de crecimiento y producción de IgG del hibridoma en los cuatro medios de cultivo utilizados.

En general, las curvas de concentración celular y de producto obtenidas en todos los ensayos se correspondieron con los patrones reportados para los cultivos de hibridomas en modo batch <sup>(127, 128)</sup>. Los ensayos de caracterización en modo batch suelen ser útiles en la predicción del comportamiento cinético de los cultivos para el escalado, en particular la fase de crecimiento brinda información valiosa, aun cuando el modo de cultivo a utilizar en el escalado sea continuo o perfusión <sup>(129)</sup>.

### **3.3 Evaluación del hibridoma C6G4 en cultivo de alta densidad celular.**

La evaluación del hibridoma C6G4 en cultivo de alta densidad celular se realizó mediante procesos de fermentación en modo discontinuo en biorreactores CELLline. Se evaluaron dos métodos de fermentación para cada medio de cultivo, los que diferían entre sí por la concentración celular de siembra y el tiempo de incubación transcurrido entre la siembra y la cosecha del biorreactor. A pesar de las diferencias entre los métodos, en ambos se respetaron las indicaciones reflejadas en el protocolo general de uso publicado por el fabricante <sup>(130)</sup>.

### 3.3.1 Evaluación en cultivo de alta densidad celular por el método 1.

Para cada medio de cultivo se ejecutaron cinco procesos fermentativos, los que se caracterizaron por tener una concentración de siembra de  $2,00 \times 10^6$  células viables/mL ( $30 \times 10^6$  células viables) en un volumen de 15 mL y una duración de 7 días. La viabilidad del cultivo al inocular el biorreactor fue de 92%. Los resultados generales obtenidos en los distintos medios de cultivo se muestran en las **Figuras 14 y 15**.

#### Evaluación en medio RPMI 1640 por el método 1

En las mediciones realizadas a las cosechas ejecutadas al séptimo día de cada proceso fermentativo se registró una concentración de  $8,53 \times 10^6$  células viables/mL y  $20,77 \times 10^6$  células totales/mL, con una viabilidad celular de 41%. El volumen final de sobrenadante cosechado tuvo un valor de 26,9 mL, con una concentración de IgG en el sobrenadante de cultivo de 1,30 mg/mL, correspondiendo a una masa acumulada de 35,00 mg de IgG. La potencia del sobrenadante fue de 64 frente a hematíes del grupo sanguíneo B y 16 frente a hematíes del grupo A<sub>1</sub>B. Los resultados obtenidos en cada lote de fermentación se muestran en la **Tabla 7**.

#### Evaluación en medio PFHM II por el método 1

Las cosechas arrojaron una concentración celular de  $9,30 \times 10^6$  células viables/mL y  $22,64 \times 10^6$  células totales /mL, correspondiéndose con una viabilidad celular de 41%. Se obtuvo un volumen de sobrenadante al final del proceso de 29,4 mL por cosecha. La concentración de IgG fue de 2,99 mg/mL, para una masa final de 88,15 mg de anticuerpos por fermentación. La potencia fue de 256 frente a hematíes del grupo sanguíneo B y 128 frente a hematíes del grupo A<sub>1</sub>B. No mostró aglutinación frente a hematíes del grupo A. Los resultados obtenidos en cada lote de fermentación se muestran en la **Tabla 8**.

### Evaluación en medio MyeloCIM por el método 1

En los procesos fermentativos en medio MyeloCIM se determinó en las cosechas una concentración de  $8,10 \times 10^6$  células viables/mL,  $22,50 \times 10^6$  células totales /mL y una viabilidad celular de 36%. Se cosechó un volumen de sobrenadante rico en anticuerpos de 28,3 mL por fermentación. Al sobrenadante de cultivo se le determinó una concentración de IgG de 1,61 mg/mL y una masa de 46,47 mg de IgG. La actividad biológica arrojó una potencia de 128 frente a hematíes del grupo sanguíneo B y 32 frente a hematíes del grupo A<sub>1</sub>B. No mostró aglutinación frente a hematíes del grupo A. Los resultados obtenidos en cada lote de fermentación se muestran en la **Tabla 9**.

### Evaluación en medio HybriCIM por el método 1

Las cosechas a partir de los procesos fermentativos en medio HybriCIM arrojaron una concentración celular de  $5,83 \times 10^6$  células viables/mL,  $13,53 \times 10^6$  células total /mL y una viabilidad celular de 43%. El volumen de sobrenadante rico en anticuerpos fue de 25,7 mL por fermentación, con una concentración de IgG de 0,82 mg/mL en el sobrenadante y una masa de 21,10 mg por proceso fermentativo. La actividad biológica resultó en una potencia de 64 frente a hematíes del grupo sanguíneo B y 16 frente a hematíes del grupo A<sub>1</sub>B. No mostró aglutinación frente a hematíes del grupo A. Los resultados obtenidos en cada lote de fermentación se muestran en la **Tabla 10**.

En el análisis estadístico aplicado no hubo diferencias significativas en la concentración de células viables y totales entre los distintos medios de cultivo, excepto en el medio HybriCIM con resultados inferiores a los tres restantes (**Anexos 6 y 7**). En cuanto a la viabilidad celular solamente se registraron diferencias significativas entre el medio HybriCIM y el MyeloCIM, cuyas medias fueron la mayor y la menor del ensayo, respectivamente (**Anexo 8**). El análisis sobre la concentración de IgG reflejó que no hubo diferencias entre los resultados en los medios HybriCIM y RPMI 1640, cuyos valores medios fueron los más bajos. La concentración en MyeloCIM no tuvo diferencias significativas con respecto a

RPMI 1640, pero si con respecto al HybriCIM. El resultado en medio PFHM II fue significativamente superior a los obtenidos en los medios restantes, siendo el medio de cultivo en el que el hibridoma C6G4 mostró una mayor productividad global y específica (**Anexo 9**). Estos resultados corroboran los resultados obtenidos en la evaluación del hibridoma en cultivo de baja densidad.

### **3.3.2 Evaluación en cultivo de alta densidad celular por el método 2.**

Para cada medio de cultivo se desarrollaron cinco procesos fermentativos, las que se caracterizaron por tener una concentración de siembra de  $6,67 \times 10^6$  células viables/mL ( $100 \times 10^6$  células viables) en un volumen de 15 mL y una duración de 3 días. La viabilidad celular al comienzo del proceso fue de 92%. Este método es una variación realizada al método original con el propósito de obtener los mismos rendimientos productivos en un menor tiempo. Los resultados generales obtenidos en los distintos medios de cultivo se muestran en la **Figura 16**.

#### Evaluación en medio RPMI 1640 por el método 2

En las mediciones realizadas a las cosechas realizadas al tercer día de cada fermentación se registró una concentración de  $15,84 \times 10^6$  células viables/mL y  $27,32 \times 10^6$  células totales/mL, lo que corresponde a una viabilidad celular de 58%. Se obtuvo un volumen de sobrenadante de 26,8 mL por cosecha, con una concentración de IgG de 0,86 mg/mL y una masa final de 23,20 mg. Los resultados obtenidos en cada lote de fermentación se muestran en la **Tabla 7**.

#### Evaluación en medio PFHM II por el método 2

La concentración celular de las cosechas en medio PFHM II fue de  $17,27 \times 10^6$  células/mL y de  $29,78 \times 10^6$  células totales/mL, para una viabilidad celular de 58%. El volumen de cosecha por proceso fue de 29,2 mL, con una concentración de IgG de 1,98 mg/mL y una masa final de 58,27 mg de anticuerpos por fermentación. Los resultados obtenidos en cada lote de fermentación se muestran en la **Tabla 8**.



### Evaluación en medio MyeloCIM por el método 2

La concentración celular por cosecha en medio MyeloCIM fue de  $15,04 \times 10^6$  células viables/mL y de  $29,60 \times 10^6$  células totales/mL, para una viabilidad celular de 51%. Se cosecharon 28,50 mL de sobrenadante rico en anticuerpos por proceso, con una concentración de IgG de 1,07 mg/mL, y una masa final de 30,79 mg de anticuerpos por fermentación. Los resultados obtenidos en cada lote de fermentación se muestran en la **Tabla 9**.

### Evaluación en medio HybriCIM por el método 2

La concentración celular de las cosechas en medio HybriCIM fue de  $10,81 \times 10^6$  células viables/mL, de  $17,80 \times 10^6$  células totales/mL, y la viabilidad celular fue de 61%. Se cosecharon 25,60 mL de sobrenadante por proceso fermentativo, con una concentración de IgG de 0,67 mg/mL y una masa final de 17,37 mg de anticuerpos. Los resultados obtenidos en cada lote de fermentación se muestran en la **Tabla 10**.

La potencia de aglutinación directa en tubo medida para cada medio de cultivo fue similar a la obtenida con el método 1.

El análisis estadístico aplicado mostró que no hubo diferencias significativas en la concentración de células totales entre los resultados en medio PFHM II, MyeloCIM y RPMI 1640, mientras que la concentración de células viables en MyeloCIM resultó inferior con respecto al medio PFHM II, cuyo valor se mantuvo sin diferencias con respecto al valor en el medio RPMI 1640. El valor de concentración celular en el medio HybriCIM resultó significativamente inferior al resto de los medios tanto en las células viables como en las totales (**Anexos 10 y 11**). En cuanto a la viabilidad celular no se registraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en RPMI 1640, PFHM II e HybriCIM, no así con MyeloCIM en el que se obtuvieron resultados significativamente inferiores con respecto al resto de los medios (**Anexo 12**). El análisis sobre la concentración de IgG reflejó que no hubo diferencias entre los resultados de los medios RPMI 1640 y MyeloCIM, siendo el medio PFHM II el que obtuvo resultados significativamente

superiores al resto de los medios. En el medio HybriCIM se obtuvieron los resultados más bajos, excepto al compararlo con RPMI 1640 con el cuál no hubo diferencias significativas (**Anexo 13**).

Al comparar los valores promedios de los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo entre los dos métodos empleados, se observó que con el método 2 se obtuvieron mayores concentraciones celulares con una viabilidad celular superior en más de 15 puntos porcentuales con respecto al método 1. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con la concentración de IgG, siendo superior en el método 1 en más de 0,5 mg/mL.

Estos resultados generan una contradicción aparente puesto que una mayor concentración de células debe generar una mayor cantidad de IgG. Al introducir el factor tiempo en el análisis se alcanza una concentración celular superior por el método 2 al ser inoculado el biorreactor con una cantidad de células tres veces mayor y luego incubar por un período de tiempo inferior a la mitad del método 1. Objetivamente, el método 2 logró producir aproximadamente el 68% de la IgG producida en el método 1, empleando solamente el 42% del tiempo. No se conoce cuál fue el comportamiento de la curva de crecimiento en el biorreactor entre el punto inicial de siembra y el punto final de cosecha. No obstante, si se tomaran en cuenta los valores iniciales y finales, y se calculara el área bajo la recta que une estos dos puntos, la cantidad de células generadas por el método 1 (interpretadas como el valor del área bajo la recta) sería superior a la del método 2, por lo que se infiere que si los patrones de crecimiento desarrollados por los dos métodos no fueran muy diferentes, al menos durante los tres primeros días, es muy probable que la cantidad de células haya sido superior en el método 1, lo cual justificaría la mayor concentración de IgG registrada en este. Otra aparente contradicción fue que a pesar de la diferencia de concentración de IgG existente entre ambos métodos para un mismo medio de cultivo, no se observaron diferencias en los resultados de las pruebas de actividad biológica realizadas. Una posible interpretación a este resultado es que una parte de la IgG detectada en el citoplasma por la técnica de ELISA no sea biológicamente activa, debido a la gran

cantidad de células muertas presentes en el cultivo. Cuando las células pierden la integridad de membrana el contenido intracelular se libera al medio. Parte de ese contenido serían las moléculas incompletas o inmaduras de IgG, que si podrían ser cuantificadas por la técnica de ELISA, pero no tendrían la propiedad de aglutinar hematíes. Al tener la viabilidad celular un valor tan bajo el aporte de moléculas inactivas podría ser significativo. Las células muertas también liberarían enzimas con actividad proteolítica que podrían potenciar la inactivación de moléculas con un tiempo de residencia relativamente largo en el caldo de cultivo. Cabe señalar que la técnica de hemaglutinación posee una sensibilidad inferior a la técnica de ELISA. En la técnica de ELISA desarrollada para este caso <sup>(111)</sup> se elaboró una curva patrón de IgG murina de concentración conocida. Este rango de concentraciones debe abarcar los posibles valores de concentración que se espera tengan las muestras que van a ser procesadas. Simultáneamente se aplican las muestras directamente o previamente diluidas para que la concentración de la muestra esté dentro del rango de la curva patrón. Al aplicar posteriormente el monoclonal conjugado y el sustrato se desarrolla una reacción colorimétrica cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración dentro de un rango específico. Tanto la reacción inmunoquímica de adherencia como la reacción enzimática colorimétrica poseen alta sensibilidad, y el valor final es generado por la lectura de absorbancia de manera automática. No así es el caso de la técnica de hemaglutinación, en la cual la intensidad de la reacción es medida dentro de una escala lógica que es leída e interpretada por visualización directa de la reacción. Esta escala de intensidad de la reacción está conformada por cuatro valores referentes a la intensidad del aglutinado, desde 1+, cuando se observan múltiples aglutinados muy pequeños pero definidos, en un fondo rojo, hasta 4+ cuando los hematíes aglutinan en un solo cúmulo. Por otra parte, la potencia de aglutinación es el recíproco de la mayor dilución del reactivo que provoca una reacción de aglutinación de 1+ <sup>(9)</sup>. En la práctica de laboratorio, la mayor dilución se determina elaborando diluciones dobles seriadas del reactivo a evaluar, para luego ser enfrentado con la suspensión de hematíes. Durante la ejecución de esta técnica se puede observar como la intensidad de aglutinación en

varias diluciones se mantiene constante, lo que significa que valores de concentración notablemente diferentes pueden ser evaluados dentro de un mismo valor de intensidad de aglutinación.

Según la información disponible por el fabricante, el biorreactor CELLine está diseñado para alcanzar densidades celulares en el orden de  $3 \times 10^7$  células/mL y rendimientos productivos de 30,24 mg de anticuerpo por cosecha <sup>(131)</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo están en un rango de valores comparable, con valores de concentración celular superiores a los  $2 \times 10^7$  células/mL (excepto en el medio HybriCIM, con valores inferiores), y valores de concentración de IgG entre 21,10 mg en medio HybriCIM y 88,15 mg en medio PFHM II. En otros trabajos revisados con líneas celulares hibridomas en biorreactores CELLine, la concentración de producto ha oscilado entre los 0,22 y 1,50 mg/mL, y entre 23 y 210 mg de masa total de IgG acumulada en varias cosechas <sup>(132, 133)</sup>. Estos resultados revisados sobre el uso del biorreactor CELLine se encuentran en el mismo rango que los obtenidos en el presente trabajo.

En pruebas de cuantificación de IgG y determinación de potencia realizadas al líquido ascítico murino obtenido en ratones balb/c inoculados con este hibridoma (en procesos productivos) se determinó que con una concentración celular de inóculo de  $1 \times 10^6$  células viables/0,5mL/ratón, la ascitis tenía una concentración promedio de  $4,67 \times 10^6$  células viables/mL, 10,6 mg de IgG/mL y una potencia de aglutinación de 2048 frente a hematíes del grupo sanguíneo B y 1024 frente a hematíes del grupo sanguíneo A<sub>1</sub>B <sup>(134)</sup>.

A pesar de que el biorreactor CELLine está diseñado para la producción de anticuerpos monoclonales en cultivos de alta densidad celular, los rendimientos productivos obtenidos fueron inferiores a los que se obtienen por vía ascitis para el mismo hibridoma. Resalta el hecho de que en la ascitis murina se alcanzan valores de potencia de 2048 y 1024 frente a hematíes de los grupos sanguíneos B y A<sub>1</sub>B respectivamente con una concentración celular notablemente más baja que la alcanzada en el biorreactor CELLine. Una explicación para esto podría ser la diferencia entre el ambiente presente en la cavidad peritoneal del ratón balb/c y la

cámara artificial con medio de crecimiento del biorreactor empleado. La línea celular estudiada es un hibridoma murino por lo que las células deben ser muy sensibles al entorno físico, químico y biológico de la línea de ratón que les dio origen. El medio "ideal" provisto por la cavidad peritoneal del ratón podría influir notablemente en el desempeño del hibridoma en cuanto a crecimiento y productividad específicos se refiere. Por otro lado, el entorno artificial del biorreactor solo cuenta con los componentes del medio de cultivo, que carece de los factores y mediadores bioquímicos y hormonales presentes en un organismo animal. Además, como el cultivo se realizó en modo discontinuo no se efectuaron reemplazos de medio, lo que trae consigo el agotamiento de los nutrientes y la acumulación de los subproductos metabólicos con potencial efecto citotóxico. Otro dato importante al analizar la diferencia de resultados obtenidos entre los sistemas (*in vivo* e *in vitro*), es que al extraer el líquido ascítico murino se forman coágulos de fibrina y grasa que atrapan una parte importante de las células presentes. Estos coágulos son retirados del líquido antes de este sea analizado y procesado en las etapas siguientes del proceso de producción. De igual manera durante la extracción se queda otra parte significativa de células en la cavidad peritoneal, ya sea por estar las células adheridas a los tejidos del animal, o por formar tumores sólidos que no son retirados durante la punción. A partir de esta información se puede suponer que los valores de potencia obtenidos en el líquido ascítico realmente no se corresponden con los valores de concentración celular determinados a partir de las células en suspensión en la ascitis, siendo los valores reales de concentración de células totales y viables muy superiores a los mostrados.

Otro aspecto importante es el hecho de que las regulaciones vigentes para la producción de hemoclasificadores en Cuba exigen una potencia de aglutinación de los reactivos hemoclasificadores en valor mínimo de 512<sup>(9)</sup>. La producción de anticuerpos en sobrenadante de cultivo no alcanzó en ninguno de los casos el valor de potencia mínima requerida para la formulación de un reactivo hemoclasificador comercial según las regulaciones vigentes; por lo que se realizaron pruebas de concentración por ultrafiltración con el objetivo de conocer a

qué nivel de concentración sería necesario someter el sobrenadante para cumplir con la regulación.

Las pruebas de concentración se realizaron solamente con los lotes de sobrenadante obtenidos en medio PFHM II a partir de CELLLine por ser estos los que presentaron una mayor potencia de aglutinación. Se concentraron los diez lotes por separado (cinco lotes a partir de cada método de producción).

Se observó que en todos los casos los concentrados alcanzaron una potencia de 2048 frente a hematíes del grupo B y de 1024 frente a hematíes del grupo A<sub>1</sub>B, no mostró aglutinación frente a hematíes del grupo A, en un volumen final 4 veces menor al volumen de partida. El hecho de tener que concentrar el sobrenadante producido por un sistema de cultivo de alta densidad celular no resulta atractivo por los costos económicos derivados de tener que producir un volumen de sobrenadante cuatro veces superior al necesario para producir la cantidad de determinaciones según la demanda nacional actual, y posteriormente incrementar los costos durante el proceso de concentración del anticuerpo. Resulta importante señalar que durante la búsqueda no se encontró un diseño de biorreactor similar al del CELLLine para producir anticuerpos a una escala superior a la de laboratorio. Por lo que el escalado se realizaría en otro biorreactor heterogéneo que permita alcanzar densidades celulares y de producto superiores. Un candidato atractivo sería el biorreactor tipo fibra hueca. A diferencia del CELLLine, el biorreactor de fibra hueca alcanza las mayores densidades celulares reportadas, en el orden de  $10^9$ - $10^{10}$  células/mL<sup>(88)</sup>, alcanzando la densidad de un tejido animal. Por otro lado, existe diversidad en los modelos comerciales, los cuales permiten producir desde el orden de los miligramos hasta los gramos de producto por proceso de fermentación<sup>(135)</sup>. Para llegar a una definición más certera sobre la idoneidad del hibridoma C6G4 para su explotación por vía *in vitro*, sería conveniente realizar un estudio del desempeño del mismo mediante la fermentación en fibra hueca.

Otra alternativa para incrementar el desempeño del hibridoma en sistema *in vitro* sería realizar clonaciones mediante diluciones limitantes que permitan identificar clones con mejores rendimientos. Las células en cultivo procedentes de la

generación de un hibridoma, independientemente de proceder de un mismo clon de partida, son susceptibles de sufrir mutaciones con efectos importantes en el crecimiento y la productividad específica, que posteriormente son conservadas durante el proceso de división celular. Ello trae consigo que durante el transcurso de un tiempo se generen subpoblaciones celulares presentes simultáneamente en el cultivo. Mientras unas subpoblaciones pueden ser portadoras de mutaciones no deseadas, otras pueden ser portadoras de células con crecimiento y productividad muy superiores a los valores medios registrados en el cultivo que las contiene.

En caso de que las propuestas realizadas no ofrezcan los resultados esperados, se recomienda mantener la plataforma de producción de la materia prima del reactivo hemoclasificador anti-B por ascitis murina, y buscar ofertas de líneas celulares secretoras de anticuerpos monoclonales anti-B con prestaciones superiores, adecuadas para su explotación en sistemas de fermentación, cuyo sobrenadante tenga la concentración adecuada para evitar pasos de concentración posteriores.

## CONCLUSIONES

1. El hibridoma C6G4 fue adaptado exitosamente a los tres medios de cultivo libres de suero y proteínas seleccionados; en todos los casos el anticuerpo secretado por las células adaptadas mantuvo la especificidad de reconocimiento por el antígeno B sanguíneo.
2. El hibridoma C6G4 mostró las mayores velocidades específicas de crecimiento y producción de anticuerpos en el medio de cultivo PFHM II. Sólo se evidenciaron resultados inferiores al medio tradicional suplementado con suero RPMI 1640 en el medio HybriCIM.
3. El patrón observado en el crecimiento y productividad del hibridoma C6G4 en cultivo de alta densidad tuvieron un orden semejante al obtenido en los ensayos cinéticos en bajas densidades celulares. Los valores de potencia obtenidos no satisfacen los requisitos de calidad establecidos en las regulaciones vigentes para la producción de reactivos hemoclasificadores.
4. El sobrenadante del hibridoma C6G4 alcanzó la potencia requerida según las regulaciones de producción de hemoclasificadores tras ser concentrado a un volumen cuatro veces menor; no obstante estos resultados no resultan atractivos para el desarrollo de un proceso productivo *in vitro*.



## RECOMENDACIONES

1. Evaluar el desempeño del hibridoma C6G4 en un sistema de fermentación de tipo fibra hueca, como una alternativa para incrementar la concentración del anticuerpo Anti-B en el sobrenadante de cultivo, y con ello la calidad biológica del mismo.
2. Obtener subclones del hibridoma C6G4 con mayor crecimiento y productividad específicos mediante técnicas de selección por dilución limitante.
3. Realizar la búsqueda de ofertas para la adquisición de una nueva línea celular productora de un anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno B sanguíneo, con especificaciones adecuadas para el desarrollo de un proceso de producción de un reactivo hemoclasificador anti-B por tecnología *in vitro*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reid ME, Lomas-Francis C. The Blood Group Antigen Facts Book. 2 ed. New York: Elsevier Academic Press; 2004.
2. Soria NE, Morris HJ, Rivera S, Gutiérrez E. Obtención y evaluación del líquido ascítico murino hemoclasificador anti-B en las líneas de ratones Ofbalb (F1) y Balb/c. Rev Cubana Invest Bioméd. 2010; 29(4):454-462.
3. Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des blutserums und der Lymphe. ZblBakt 1900;27:357-392
4. Denomme GA. Molecular basis of blood group expression. Transfus Apher Sci. 2011 Feb; 44(1):53-63.
5. Yamamoto F., Clausen H., White T., et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABC system. Nature 1990; 345:229-233.
6. Reid ME, Lomas-Francis C. The Blood Group Antigen Facts Book. 2 ed. New York: Elsevier Academic Press; 2004.
7. Asociación argentina de Hemoterapia e Inmunoematología. Manual Técnico de la AABB. 15 ed. Buenos Aires, Argentina: American Association of Blood Banks; 2007.
8. Regulación No. 50-2012. Clases de riesgo de los diagnosticadores. CECMED-MINSAP, 2012.
9. Regulación No. 59-2011. Requisitos de los diagnosticadores utilizados en inmunoematología. CECMED-MINSAP, 2011.
10. Takahashi J, Seno T, Yamashita N, Tanaka F, Hirayama F, Yamano H, et al. Reactivity of monoclonal antibodies against ABH, Lewis and P-related antigens. Transfus Clin Biol 2002; 9:61.
11. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of determined specificity. Nature. 1975; 256: 495-497.

12. Shulman M. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*. 1978; 276: 269-270.
13. Gorfien S, Paul B, Walowitz J, Keem R, Biddle W, Jayme D. Growth of NSO cells in protein-free chemically defined medium. *Biotechnol Prog*. 2000; 16(5): 682-687.
14. Dewar V, Voet P, Denamur F, Smal J. Industrial implementation of *in vitro* production of monoclonal antibodies. *ILAR Journal*. 2005; 46(3): 307-313.
15. Zhang C. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol*. 2012; 901:117-135.
16. Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Advanced drugs delivery reviews*. *Advanced Drugs Delivery Reviews*. 2006; 58:671-685.
17. Costa RA, Rodrigues EM, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010; 74(2):127-138.
18. Twyman RM. Gene transfer to animal cells. *Advanced methods*. 1 ed. s.l.: Garland Science/BIOS Scientific Publishers; 2005.
19. Rossi DL, Rossi EA, Goldenberg DM, Chang CH., A new mammalian host cell with enhanced survival enables completely serum-free development of high-level protein production cell lines. *Biotechnol Progress*, 2011; 27: 766–775.
20. Burky JE, Wesson MC, Young A, Farnsworth S, Dionne B, Zhu Y, et al. Protein-free fed-batch culture of non-GS NS0 cell lines for production of recombinant antibodies. *Biotechnol Bioeng*. 2007; 96(2):281-293.
21. Zhao L, Fan L, Zhang X, Tan W. Metabolic characteristics of GS-nS0 myeloma cells producing anti-CD25 monoclonal antibody in serum-free culture. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2009; 25(7):1069-1076.
22. Grainger RK, James DC. CHO cell line specific prediction and control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation. *Biotechnol Bioeng*. 2013.
23. Jadhav V, Hackl M, Druz A, Shridhar S, Chung CY, Heffner KM, et al. CHO microRNA engineering is growing up: Recent successes and future challenges. *Biotechnol Adv*. 2013.

24. Jackson CK, Trudel LJ, Fox JG, Lipman NS. Monoclonal antibody production in murine ascites. I. Clinical and pathologic features. *Lab. Anim. Sci* 1999; 49(1), 70-80.
25. Yokoyama WM. Production of monoclonal antibody supernatant and ascites fluid. *Curr Protoc Mol Biol*. 2008
26. Peterson NC. Behavioral, clinical, and physiologic analysis of mice used for ascites monoclonal antibody production. *Comp Med*. 2000; 50(5):516-526.
27. NHMRC. Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes: The assessment and alleviation of pain and distress in research animals. 2008. Disponible en: <http://www.nhmrc.gov.au/files/nhmrc/publications/attachments/ea18.pdf> Acceso el 17 de enero de 2011.
28. NHRMC. Guidelines for monoclonal antibody production. 2008. Disponible en: <http://www.ag.gov.au/cca> Acceso el 17 de enero de 2011.
29. Eibl R, Eibl D, Pörtner R, Catapano G, Czermak P. *Cell and Tissue Reaction Engineering. Principles and practice*. Springer; 2008.
30. Howard GC, Kaser MR. *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*. CRC Press; 2013.
31. Elvin JG, Couston RG, van der Walle CF. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm*. 2013; 440(1):83-98.
32. Global Industry Analysts, Inc. *The Future of Monoclonal Antibodies - Market Forecasts to 2015, Competitive Benchmarking, Product Pipeline and Deals Analysis*. s.l.: PRWeb News Center. 2009. Disponible en: <http://www.marketresearch.com/product/display.asp?productid=2515126> Acceso el 11 de febrero de 2011.
33. Eagle. H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. 1955; 122:501-504.
34. Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of Normal Human Leukocytes. *JAMA*. 1967; 199: 519-524.

35. Product\_Information\_Sheet. RPMI-1640 Medium. Sigma-Aldrich Inc. 2007. Disponible en <[www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/r4130pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r4130pis.pdf)> Acceso el 3 de marzo de 2011.
36. Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. Trends Biotechnol. 2006; 23(6): 105-108.
37. Megha S, Even Chad B. Sandusky and Neal D. Barnard. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. Trends Biotechnol. 2006; 24(3).
38. Xia H, Vijayaraghavan B, Belák S, Liu L. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. PLoS One. 2011; 6(12).
39. Newman C. Serum- free cell culture – the ethical, scientific and economic choice. The Biomedical Scientist. 2003. Disponible en: <[http://www.drhadwentrust.org/downloads/publications/The\\_Biomedical\\_Scientist2003.pdf](http://www.drhadwentrust.org/downloads/publications/The_Biomedical_Scientist2003.pdf)> Acceso el 3 de marzo de 2011.
40. Shah, G. Why do we still use serum in the production of biopharmaceuticals? Dev. Biol. Stand. 1999; 99:17–22
41. Shibuya K, Haga R, Namba M. A serum substitute for fed-batch culturing of hybridoma cells. Cytotechnology. 2008; 57(2):187-197.
42. Zhang H, Wang H, Liu M, Zhang T, Zhang J, Wang X, et al. Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. Cytotechnology. 2013; 65(3):363-78.
43. Lonza W. Inc. BioWhittaker®UltraDOMA™ Serum-free Hybridoma Medium. s.l.: Lonza Walkersville, Inc. 2009. Disponible en: <[www.lonza.com](http://www.lonza.com)>. Acceso el 3 de marzo de 2011.
44. Biochrom AG. ISF-1. Serum-free media for hybridoma culture. s.l.: Biochrom AG. 2009. Disponible en: <[http://www.biochrom.de/fileadmin/user\\_upload/service/Tipps\\_und\\_Hinweise/englisch/090922\\_hintergrundinformation\\_isf1\\_eng\\_1.pdf](http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/Tipps_und_Hinweise/englisch/090922_hintergrundinformation_isf1_eng_1.pdf)> Acceso el 7 de marzo de 2011.

45. Invitrogen life technologies. Serum-free and protein-free media for hybridoma culture. Invitrogen Corporation. 2003. Disponible en: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/3559.pdf> Acceso el 7 de marzo de 2011.
46. Spens E, Häggström L. Defined Protein-Free NS0 Myeloma Cell Cultures: Stimulation of Proliferation by Conditioned Medium Factors. *Biotechnol Prog.* 2005; 21(1): 87-95.
47. Invitrogen life technologies. CD Hybridoma Medium. Invitrogen Corporation. 2007. Disponible en: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3951%20CD%20Hybridoma.pdf> Acceso el 7 de marzo de 2011.
48. Invitrogen life technologies. CD CHO Medium. Invitrogen Corporation. 2011. Disponible en: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3868CDCHO.pdf> Acceso el 9 de marzo de 2011.
49. Merten OW. Safety issues of animal products used in serum-free media. *DevBiol Stand.* 1999; 99:167-180.
50. Voodla K, Rumvolt R, Drews M. Extract of Selenium-enriched Yeast Enhances Growth and Production Parameters of Mammalian Cell Lines in Serum-free Suspension Cultures. *Journal Biotechnol.* 2010; 150:400.
51. Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Cunnah P, Melton DW, Azeredo J, et al. Advances and Drawbacks of the Adaptation to Serum-Free Culture of CHO-K1 Cells for Monoclonal Antibody Production. *Appli Biochem Biotechnol.* 2013; 169(4):1279-1291.
52. Ozturk S, Kaseko G, Mahaworasilpa T, Coster HG. Adaptation of cell lines to serum-free culture medium. *Hybrid Hybridomics.* 2003; 22(4):267-272.
53. Taschwer M, Hackl M, Hernández BJA, Leitner C, Kumar N, Puc U, et al. Growth, productivity and protein glycosylation in a CHO EpoFc producer cell line adapted to glutamine-free growth. *J Biotechnol.* 2012; 157(2):295-303.
54. Arunakumari A, Dai X-P, Goldstein J, Kloth C, Ghebremariam H, Maclsaac G, et al. The Impact of Cell Culture Medium on Cell Line and Process Development Timelines and Strategies. *BioPharm International Supplements;*

2009,

Jun

2.

<<http://www.biopharminternational.com/biopharm/Downstream+Processing+Articles/The-Impact-of-Cell-Culture-Medium-on-Cell-Line-and/ArticleStandard/Article/detail/601146>> Acceso el 18 de marzo de 2011.

55. Sinacore MS, Charlebois TS, Harrison S, Brennan S, Richards T, Hamilton M, et al. CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins. *Biotech Bioeng.* 1996; 52:518–528.
56. Johnson T. Promises and Pitfalls of Cell Line Adaptation. Some Basic Protocols. *BioProcess International Supplement.* May 2006. Disponible en: <[http://www.bioprocessintl.com/multimedia/archive/00077/0643ar08su\\_77558a.pdf](http://www.bioprocessintl.com/multimedia/archive/00077/0643ar08su_77558a.pdf)> Acceso el 18 de marzo de 2011.
57. Ozturk SS, Palsson BO. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnol Prog.* 1991; 7(6):481-494.
58. Barford JP, Phillips PJ, Marquis CP, Harbour C. Biosynthesis of protein products by animal cells. Are growth and non-growth associated concepts valid or useful? *Cytotechnology.* 1996; 21: 133–148.
59. Merten OW. Batch production and growth kinetics of hybridomas. *Cytotechnology.* 1988; 1(2):113-121.
60. Goergen JL, Marc A, Engasser JM. Comparison of specific rates of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous cultures. *Cytotechnology.* 1992; 10(2):147-155.
61. Mulukutla BC, Khan S, Lange A, Hu WS. Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol.* 2010; 28(9):476-484.
62. Omasa T, Higashiyama K, Shioya S, Suga K. Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnol Bioeng.* 1992; 39(5):556-564.

63. Genzel Y, Ritter JB, König S, Alt R, Reichl U. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnol Prog.* 2005; 21(1):58-69.
64. Schneider M, Marison IW, von Stockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol.* 1996; 46(3):161-185.
65. Read EK, Bradley SA, Smitka TA, Agarabi CD, Lute SC, Brorson KA. Fermentanomics informed amino acid supplementation of an antibody producing mammalian cell culture. *Biotechnol Prog.* 2013; 29(3):745-753.
66. Kang S, Mullen J, Miranda LP, Deshpande R. Utilization of tyrosine- and histidine-containing dipeptides to enhance productivity and culture viability. *Biotechnol Bioeng.* 2012; 109(9):2286-2294.
67. Mahboudi F, Abolhassan MR, Azarpanah A, Aghajani-Lazarjani H, Sadeghi-Haskoo MA, Maleknia S, et al. The Role of Different Supplements in Expression Level of Monoclonal Antibody against Human CD20. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2013; 5(3):140-147.
68. Hernández H. *Microbiología Industrial.* 1 ed. San José de Costa Rica. : EUNED; 2003.
69. Bloemkolk JW, Gray MR, Merchant F, Mosmann TR. Effect of temperature on hybridoma cell cycle and MAb production. *Biotechnol Bioeng.* 1992; 40(3): 427-431.
70. Chong SL, Mou DG, Ali AM, Lim SH, Tey BT. Cell growth, cell-cycle progress, and antibody production in hybridoma cells cultivated under mild hypothermic conditions. *Hybridoma (Larchmt).* 2008; 27(2):107-111.
71. Schmid G, Blanch HW, Wilke CR. Hybridoma growth, metabolism, and product formation in HEPES-buffered medium: II. Effect of pH. *Biotechnol Letters.* 1990; 12(9): 633-638.
72. Ozturk SS, Palsson BO. Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng.* 1991; 37(10):989-993.
73. Haas J, Tröbs T, Clemens C, Wunder M, Rüger M, Schulz TW. Online Determination of Oxygen Uptake and Carbon Dioxide Production Rates in



- Mammalian Cell Culture Using Mass Spectrometry. *Cells and Culture. ESACT Proceedings, SpringerNetherlands*.2010; 4:683-687.
74. Hu W, Berdugo C, Chalmers JJ. The potential of hydrodynamic damage to animal cells of industrial relevance: current understanding. *Cytotechnology*. 2011; 63(5): 445–460.
75. Kunas KT, Papoutsakis ET. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnol. Bioeng.*2009; 102: 977–987.
76. Legazpi L, Laca A, Díaz M. Kinetic analysis of hybridoma cells viability under mechanical shear stress with and without serum protection. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2009; 32(6):717-722.
77. van'tRiet K, Tramper J. *Basic Bioreactor Design. Electrical Engineering and Electronics Series.* Taylor & Francis, 1991.
78. Abu-Absi SF, Yang L, Thompson P, Jiang C, Kandula S, Schilling B, et al. Defining process design space for monoclonal antibody cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2010; 106(6):894-905.
79. Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Technological progresses in monoclonal antibody production systems. *Biotechnol Prog.* 2010; 26(2):332-351.
80. Hart C. *Product Focus: Analytical and Preparative Instrumentation.* *Journal of Biomolecular Screening.* 2013; 18(6): 756-758.
81. Zhang X, Stettler M, De Sanctis D, Perrone M, Parolini N, Discacciati M, et al. Use of Orbital Shaken Disposable Bioreactors for Mammalian Cell Cultures from the Milliliter-Scale to the 1,000-Liter Scale. *Disposable Bioreactors. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology.* Springer Berlin Heidelberg. 2010; 115: 33-53.
82. Shukla AA, Thömmes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* 2010; 28(5): 253-261.

83. De Jesus M, Wurm F. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharma Biopharma* 2011; 78(2): 184-188.
84. Eibl R, Kaiser S, Lombriser R, Eibl D. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 86(1):41-49.
85. Chico E, Rodríguez G, Figueredo A. Bioreactors for animal cells. [aut. libro] Moraes AM, Augusto EFP, Butler M. En: Castilho LR. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy.* s.l.: Taylor & Francis; 2008.
86. Vermasvuori R, Hurme M. Economic comparison of diagnostic antibody production in perfusion stirred tank and in hollow fiber bioreactor processes. *Biotechnol Prog.* 2011; 27(6):1588-1598.
87. Meuwly F, Ruffieux PA, Kadouri A, von Stockar U. Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: bioprocess and biomedical applications. *Biotechnol Adv.* 2007; 25(1):45-56.
88. Cadwell J. New development in hollow-fiber cell culture. American Biotechnology Laboratory. 2004. Disponible en: [www.fibercellsystems.com/documents/ABL-Cadwell.pdf](http://www.fibercellsystems.com/documents/ABL-Cadwell.pdf) > Acceso el 21 de marzo de 2011,
89. FiberCell Systems Inc. Hollow fiber bioreactors and related products. 2008. Disponible en: <http://www.fibercellsystems.com/documents/brochure.pdf> > Acceso el 21 de marzo de 2011.
90. Karuppaiya A, Cheah SH, Mohd S, Kamal WH, Zulkifli MH. Generation and characterization of monoclonal antibodies against prostate-specific antigen. *Hybridoma (Larchmt).* 2009; 28(2):133-137.
91. Hamid SS, Cheah SH. Generation and characterization of a high-affinity monoclonal antibody for MUC1 measurement in breast cancer. *Hybridoma Larchmt.* 2011; 30(2):137-143.
92. Li F, Vijayasankaran N, Shen Ay, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs.* 2010; 2(5):466-479.

93. Aiba S, Humprey AE, Millis NF. Biochemical Engineering. La Habana: Ciencia y Técnica; 1970.
94. Dorka P, Fischer C, Budman H, Scharer JM. Metabolic flux-based modeling of mAb production during batch and fed-batch operations. Bioprocess Biosyst Eng. 2009; 32(2):183-196.
95. Kochanowski N, Siriez G, Roosens S, Malphettes L. Medium and feed optimization for fed batch production of monoclonal antibody in CHO cells. BMC Proceeding. 2011; 5 Suppl 8:75.
96. Pollock J, Ho SV, Farid SS. Fed-batch and perfusion culture processes: economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty. Biotechnol Bioeng. 2013; 110(1):206-219.
97. Hiller GW, Aeschlimann AD, Clark DS, Blanch HW. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium. Biotechnol Bioeng. 1991; 38(7):733-741.
98. Fluri DA, Tonge PD, Song H, Baptista RP, Shakiba N, Shukla S, et al. Derivation, expansion and differentiation of induced pluripotent stem cells in continuous suspension cultures. Nat Methods. 2012; 9(5):509-516.
99. Huang TK, Plesha MA, McDonald KA. Semicontinuous bioreactor production of a recombinant human therapeutic protein using a chemically inducible viral amplicon expression system in transgenic plant cell suspension cultures. Biotechnol Bioeng. 2010; 106(3):408-421.
100. Vítores S, Castillo A, Faife E, Rabasa Y, Rodríguez Y, Rojas L, et al. Semicontinuous cultures as tool for characterization of murine hybridoma 1E10 cells. BA, 2008; 25(2): 155-159.
101. Vítores S, Castillo A, Faife E, Rabasa Y, Rodríguez Y, Rojas L, et al. Semi-Continuous cultures as a tool for cell line characterization during process development Cells and Culture ESACT Proceedings. 2010; 4: 161-164.
102. Clincke MF, Mölleryd C, Samani PK, Lindskog E, Fäldt E, Walsh K, et al. Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE Bioreactor™-part II:

Applications for antibody production and cryopreservation. *Biotechnol Prog.* 2013; 29(3):768-777.

103. Sen S, Roychoudhury PK. Step-up/step-down perfusion approach for increased mAb 520C9 production by a hybridoma cell line. *Biotechnol Lett.* 2013; 35(2):153-163.
104. Baptista RP, Fluri DA, Zandstra PW. High density continuous production of murine pluripotent cells in an acoustic perfused bioreactor at different oxygen concentrations. *Biotechnol Bioeng.* 2013; 110(2):648-655.
105. Tang YJ, Ohashi R, Hamel JF. Perfusion culture of hybridoma cells for hyperproduction of IgG (2a) monoclonal antibody in a wave bioreactor-perfusion culture system. *Biotechnol Prog.* 2007; 23(1):255-264.
106. Lin LJr, Wang SS, Wu MH, Oh-Yang CC. Development of an integrated microfluidic perfusion cell culture system for real-time microscopic observation of biological cells. *Sensors (Basel).* 2011; 11(9):8395-8411.
107. Miranda A. Hibridoma Anti-B. ESP-1129. Sistema de Gestión de la Calidad de LABEX; 2009.
108. Cintra D. Preparación de medios de cultivo. O1.PNO.001. Sistema de Gestión de la Calidad de LABEX; 2012.
109. Miranda A. Expansiones en cultivos celulares. O1 PNO.003. Sistema de Gestión de la Calidad de LABEX; 2012.
110. Cintra D. Conteo celular en cámara de Neubauer. O1 PNO.006. Sistema de Gestión de la Calidad de LABEX; 2012.
111. Solozabal J. Medición de la concentración de IgG de ratón por el método ELISA (Procedimiento Normalizado de Operación # 5171 del CIM); 2012.
112. Romaguera Y. Determinación de la actividad biológica de los sueros hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB. A5 PNO.002. Sistema de Gestión de la Calidad de LABEX; 2012.
113. DREWS M, HUNT R. Growth and Production Characteristics of Four Mammalian Cell Lines on a Cost-Effective Serum-Free Medium. *En Cells and Culture.* Springer Netherlands, 2010:223-227.

114. Lee J, Tscheliessnig A, Chen A, Lee YY, Adduci G, Choo A, et al. Adaptation of hybridomas to protein-free media results in a simplified two-step immunoglobulin M purification process. *J Chromatogr A*. 2009; 1216(13):2683-2688.
115. Xia H, Vijayaraghavan B, Bela'k S, Liu L. Detection and Identification of the Atypical Bovine Pestiviruses in Commercial Foetal Bovine Serum Batches. *PLoS ONE*. 2011; 6(12).
116. Ståhl K, Beer M, Schirrmeier H, Hoffmann B, Bela'k S, et al. Atypical 'HoBi'-like pestiviruses—recent findings and implications thereof. *Vet Microbiol*. 2010; 142: 90–93.
117. Wessman SJ, Levings RL. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev. Biol. Stand*. 1999; 99: 3-8.
118. Johnson T. Promises and Pitfalls of Cell Line Adaptation. Some Basic Protocols. *BioProcess International Supplement*. May 2006. <[http://www.bioprocessintl.com/multimedia/archive/00077/0643ar08su\\_77558a.pdf](http://www.bioprocessintl.com/multimedia/archive/00077/0643ar08su_77558a.pdf)> Acceso el 31 de marzo de 2011.
119. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, FexSvenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*. 2010; 24(4):1053-1063.
120. Qi YM, Greenfield PF, Reid S. Evaluation of a simple protein free medium that supports high levels of monoclonal antibody production. *Cytotechnology*. 1996; 21(2):95-109.
121. Miranda A. Evaluación del Hibridoma t4 anti-CD4 para la producción in vitro del AcM IOR -T4. [Tesis de Maestría]. Cuba: UO-LABEX; 2011.
122. Costa AR, et al. Strategies for adaptation of mAb-producing CHO cells to serum-free medium. *BMC Proceedings*. 2011; 5 Suppl 8.
123. Ozturk SS, Palsson BO. Physiological Changes during the Adaptation of Hybridoma Cells to Low Serum and Serum-Free Media. *Biotechnol Bioeng*. 1991; 37: 35-46.

124. N. Jenkins et al. (eds.), Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7–10, 2009, ESACT Proceedings 5, DOI 10.1007/978-94-007-0884-6\_66, Springer Science+Business Media B.V. 2012.
125. Tanaka M, Yamashita T, Terada S. The Effect of Interleukin-6 and Leukemia Inhibitory Factor on Hybridoma Cells. En *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. Springer Netherlands, 2009: 47-51.
126. Lefloch F, Tessier B, Chenuet S, Guillaume JM, Cans P, Goergen JL, et al. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. *Cytotechnology*. 2006; 52(1):39-53.
127. Merten OW. Batch production and growth kinetics of hybridomas. *Cytotechnology*. 1988; 1(2):113-121.
128. Goergen JL, Marc A, Engasser JM. Comparison of specific rates of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous cultures. *Cytotechnology*. 1992; 10 (2):147-155.
129. Henry O, Kwok E, Piret JM. Simpler noninstrumented batch and semicontinuous cultures provide mammalian cell kinetic data comparable to continuous and perfusion cultures. *Biotechnol Prog*. 2008; 24(4):921-931.
130. WHEATON. CELLLine™ Bioreactors. Advanced Cell Cultivation Devices. User Manual. P/N 50099778 Rev. 08/12. Copyright © 2012 WHEATON Industries, Inc. Printed in USA.
131. INTEGRA Biosciences AG. CELLINE Disposable Bioreactor for Efficient Protein Expression. 90099\_V03\_Flyer\_CELLLine. Disponible en: [http://www.integra-biosciences.com/sites/pdf/flyer/90099\\_V03\\_Flyer\\_CELLLINE\\_EN.pdf](http://www.integra-biosciences.com/sites/pdf/flyer/90099_V03_Flyer_CELLLINE_EN.pdf) Acceso el 11 de abril de 2011.
132. Wolf M. Comparison of batch vs. CELLLine culture for production of monoclonal antibody in vitro as alternatives to ascites. Application: Murine Hybridoma. CELLLine Technical Report II.
133. Baumann F. Small-scale Biomanufacturing Benefits from Disposable Bioreactors. *BioPharm International*. 2005; 18(12).

134. Soria N. Obtención de un reactivo hemoclasificador anti B con el hibridoma C6G4 en Biomodelos murinos Ofbalb (F1) y Balb/c. [Tesis de Maestría]. Cuba: UO-LABEX; 2010.
135. FiberCell Systems Inc. Hollow fiber bioreactors and related products. 2008; <<http://www.fibercellsystems.com>> Acceso el 11 de abril de 2011.
136. Jeremy Mark Berg, Lubert Stryer, John L. Tymoczko. Bioquímica. Barcelona, Reverte, 2007. Cap 11. Pag. 315. Disponible en : <[http://books.google.com/cu/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA315&lpg=PA315&dq=bioqu%C3%ADmica+de+grupos+sangu%C3%ADneos&source=bl&ots=LTwML6Bq7z&sig=2hW0t\\_4mB\\_gclK4pttdhSqi2foM&hl=es-419&sa=X&ei=D709UvSaFIS0yAHvnYG4AQ&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/cu/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA315&lpg=PA315&dq=bioqu%C3%ADmica+de+grupos+sangu%C3%ADneos&source=bl&ots=LTwML6Bq7z&sig=2hW0t_4mB_gclK4pttdhSqi2foM&hl=es-419&sa=X&ei=D709UvSaFIS0yAHvnYG4AQ&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false)> Acceso el 15 de abril de 2011.
137. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. HYBRIDOMA, 2010; 1(2): 17.
138. Karimi A, Golbabaie F, Mehrnia MR, Neghab M, Mohammad K, Nikpey A, et al. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. Iranian J Environ Health Sci Eng. 2013; 10(1):6.
139. Kaufman JB, Wang G, Zhang W, Valle MA, Shiloach J. Continuous production and recovery of recombinant Ca<sup>2+</sup> binding receptor from HEK 293 cells using perfusion through a packed bed bioreactor. Cytotechnology. 2000; 33(1-3), 3-11.

**Tabla 1.** Evaluación del proceso de adaptación del hibridoma C6G4 a medios libres de suero

<b>Evaluación</b> Variables	<b>Medios de cultivo</b>			<b>Criterios de aceptación</b>
	PFHM II	MyeloCIM	HybriCIM	
Xv <sub>máx</sub> (x 10 <sup>6</sup> células/mL)	1,52±0,12	1,33±0,11	1,02±0,05	> 1,0
Viabilidad celular (%)	93±2	96±2	92±2	>90%
IgG (mg/L)	55,7±2,5	39,1±2,9	28,7±4,5	≥ 23
Intensidad (Grupo B)	4+	4+	4+	≥ 3+
Intensidad (Grupo A <sub>1</sub> B)	3+	3+	3+	≥ 1+

Cada medición se realizó por triplicado. Se muestran valores promedios.



**Tabla 2.** Datos primarios obtenidos a partir del ensayo cinético en medio RPMI 1640

Frasco	Tiempo (horas)	Xv (MC/mL)	Xd (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	IgG (mg/L)	Potencia	
							B	A <sub>1</sub> B
1	0	0,23	0,03	0,26	90	1,59	0	0
	24	0,37	0,02	0,39	96	4,28	0	0
	48	0,86	0,02	0,88	98	12,10	0	2
	72	1,49	0,11	1,60	93	13,70	0	2
	96	1,04	0,23	1,27	82	17,28	2	2
	120	0,84	0,31	1,15	73	17,91	2	2
	144	0,62	0,41	1,03	60	20,08	2	4
	168	0,53	0,65	1,18	45	24,23	4	4
	192	0,45	0,96	1,41	32	30,44	4	4
	216	0,32	1,07	1,39	23	31,73	4	4
	240	0,23	1,05	1,28	18	32,40	4	4
2	0	0,23	0,03	0,26	90	1,57	0	0
	24	0,47	0,02	0,49	96	4,23	0	0
	48	0,86	0,02	0,88	98	11,98	0	2
	72	1,47	0,08	1,55	95	13,53	0	2
	96	1,09	0,24	1,33	82	17,10	2	2
	120	0,83	0,37	1,20	69	17,74	2	2
	144	0,82	0,59	1,41	58	19,82	2	4
	168	0,67	0,76	1,43	47	23,97	4	4
	192	0,49	0,95	1,44	34	30,14	4	4
	216	0,37	0,75	1,12	33	31,32	4	4
	240	0,21	1,03	1,24	17	32,05	4	4
3	0	0,23	0,03	0,26	90	1,57	0	0
	24	0,36	0,02	0,38	96	4,82	0	0
	48	0,82	0,02	0,84	98	12,15	0	2
	72	1,55	0,05	1,60	97	14,26	0	2
	96	1,02	0,42	1,44	71	17,93	2	2
	120	0,88	0,50	1,38	64	18,00	2	2
	144	0,71	0,44	1,15	62	22,11	2	4
	168	0,64	0,75	1,39	46	22,57	4	4
	192	0,43	0,76	1,19	36	28,97	4	4
	216	0,32	0,87	1,19	27	30,45	4	4
	240	0,20	0,91	1,11	18	33,21	4	4

**Tabla 3.** Datos primarios obtenidos a partir del ensayo cinético en medio PFHM II

Frasco	Tiempo (horas)	Xv (MC/mL)	Xd (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	IgG (mg/L)	Potencia	
							B	A <sub>1</sub> B
1	0	0,22	0,02	0,24	91	1,23	0	0
	24	0,21	0,02	0,23	91	3,11	0	0
	48	0,68	0,03	0,71	96	10,70	2	2
	72	1,66	0,14	1,80	92	18,51	2	4
	96	1,15	0,38	1,53	75	31,11	4	4
	120	0,95	0,33	1,28	74	39,00	4	4
	144	0,79	0,32	1,11	71	44,34	8	4
	168	0,69	0,41	1,10	63	52,35	8	4
	192	0,54	0,50	1,04	52	58,00	8	8
	216	0,51	0,83	1,34	38	61,77	16	8
	240	0,48	0,93	1,41	34	63,41	16	8
	264	0,27	1,66	1,93	14	67,35	16	16
	2	0	0,24	0,02	0,27	90	3,44	0
24		0,29	0,02	0,31	93	8,09	0	0
48		0,74	0,05	0,77	96	18,05	2	2
72		1,69	0,09	1,88	90	34,50	2	4
96		1,04	0,23	1,21	86	55,11	4	4
120		0,91	0,28	1,20	76	68,01	4	4
144		0,86	0,34	1,19	72	69,00	8	4
168		0,80	0,22	1,23	65	71,65	8	4
192		0,67	0,54	1,22	55	72,99	8	8
216		0,52	0,77	1,18	44	76,54	16	8
240		0,39	0,92	1,22	32	81,31	16	8
264		0,33	1,55	1,94	17	86,54	16	16
3		0	0,21	0,03	0,24	89	2,34	0
	24	0,22	0,02	0,24	90	5,60	0	0
	48	0,69	0,04	0,73	94	14,38	2	2
	72	1,57	0,16	1,73	91	26,50	2	4
	96	1,18	0,33	1,51	78	43,11	4	4
	120	0,99	0,25	1,24	80	53,50	4	4
	144	0,88	0,33	1,21	73	56,67	8	4
	168	0,84	0,45	1,29	65	64,00	8	4
	192	0,63	0,54	1,17	54	65,49	8	8
	216	0,49	0,80	1,29	38	71,98	16	8
	240	0,29	1,03	1,32	22	74,16	16	8
	264	0,19	1,17	1,36	14	77,33	16	16

**Tabla 4.** Datos primarios obtenidos a partir del ensayo cinético en medio MyeloCIM

Frasco	Tiempo (horas)	Xv (MC/mL)	Xd (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	IgG (mg/L)	Potencia	
							B	A <sub>1</sub> B
1	0	0,25	0,02	0,27	91	0,96	0	0
	24	0,25	0,02	0,27	93	3,24	0	0
	48	0,63	0,03	0,66	96	10,23	0	2
	72	1,44	0,08	1,52	95	14,82	2	2
	96	1,09	0,24	1,33	82	18,62	2	2
	120	0,87	0,41	1,28	68	20,21	2	2
	144	0,63	0,54	1,17	54	20,08	2	4
	168	0,50	0,72	1,22	41	24,23	4	4
	192	0,39	0,87	1,26	31	32,86	4	4
	216	0,26	0,78	1,04	25	37,56	4	4
	240	0,19	0,87	1,06	18	41,20	4	4
2	0	0,23	0,02	0,25	91	1,07	0	0
	24	0,25	0,02	0,27	93	3,42	0	0
	48	0,66	0,03	0,69	95	9,19	0	2
	72	1,47	0,08	1,55	95	15,10	2	2
	96	1,09	0,15	1,24	88	15,30	2	2
	120	0,83	0,32	1,15	72	19,74	2	2
	144	0,82	0,52	1,34	61	23,82	2	4
	168	0,67	0,67	1,34	50	26,97	4	4
	192	0,49	0,87	1,36	36	33,74	4	4
	216	0,37	1,05	1,42	26	38,12	4	4
	240	0,21	0,90	1,11	19	42,05	4	4
3	0	0,25	0,03	0,28	90	1,05	0	0
	24	0,26	0,01	0,27	96	4,28	0	0
	48	0,66	0,01	0,67	98	11,25	0	2
	72	1,41	0,04	1,45	97	12,46	2	2
	96	1,11	0,45	1,56	71	19,73	2	2
	120	0,87	0,49	1,36	64	20,00	2	2
	144	0,69	0,42	1,11	62	21,21	2	4
	168	0,54	0,63	1,17	46	25,27	4	4
	192	0,43	0,76	1,19	36	29,87	4	4
	216	0,27	0,73	1,00	27	34,05	4	4
	240	0,17	0,77	0,94	18	37,42	4	4

**Tabla 5.** Datos primarios obtenidos a partir del ensayo cinético en medio HybriCIM

Frasco	Tiempo (horas)	Xv (MC/mL)	Xd (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	IgG (mg/L)	Potencia	
							B	A <sub>1</sub> B
1	0	0,25	0,03	0,28	90	0,96	0	0
	24	0,25	0,02	0,27	91	1,45	0	0
	48	0,56	0,04	0,60	94	4,12	0	0
	72	0,95	0,06	1,01	94	10,92	0	2
	96	1,03	0,18	1,21	85	11,26	0	2
	120	0,88	0,41	1,29	68	16,22	2	2
	144	0,63	0,42	1,05	60	18,08	2	2
	168	0,51	0,68	1,19	43	20,35	2	4
	192	0,30	0,61	0,91	33	23,88	4	4
	216	0,22	0,83	1,05	21	25,79	4	4
	240	0,14	0,74	0,88	16	27,32	4	4
2	0	0,23	0,02	0,25	91	0,70	0	0
	24	0,25	0,02	0,27	93	1,40	0	0
	48	0,51	0,03	0,54	94	3,22	0	0
	72	0,96	0,07	1,03	93	10,98	0	2
	96	1,02	0,15	1,17	87	11,30	0	2
	120	0,85	0,33	1,18	72	16,93	2	2
	144	0,69	0,44	1,13	61	18,38	2	2
	168	0,47	0,47	0,94	50	22,43	2	4
	192	0,29	0,56	0,85	34	25,25	4	4
	216	0,21	0,70	0,91	23	26,92	4	4
	240	0,13	0,55	0,68	19	28,12	4	4
3	0	0,25	0,03	0,28	90	0,55	0	0
	24	0,27	0,02	0,29	92	1,34	0	0
	48	0,59	0,04	0,63	94	3,15	0	0
	72	0,96	0,08	1,04	92	10,46	0	2
	96	1,05	0,19	1,24	85	11,93	0	2
	120	0,84	0,33	1,17	72	16,68	2	2
	144	0,61	0,41	1,02	60	18,93	2	2
	168	0,51	0,60	1,11	46	22,94	2	4
	192	0,33	0,73	1,06	31	25,64	4	4
	216	0,24	0,85	1,09	22	27,81	4	4
	240	0,20	1,13	1,33	15	29,42	4	4

**Tabla 6.** Caracterización cinética del hibridoma C6G4 en cultivos de baja densidad celular

<b>Variables</b>	<b>Medios de cultivo</b>			
	RPMI 1640	PFHM II	MyeloCIM	HybriCIM
$\mu_{\text{MÁX}}$ aparente ( $\text{h}^{-1}$ )	0,028±0,004	0,040±0,003	0,036±0,001	0,27±0,001
$\mu_{\text{MÁX}}$ real ( $\text{h}^{-1}$ )	0,028±0,003	0,041±0,001	0,036±0,001	0,27±0,001
t. duplicación (h)	24,76±3,416	17,3±1,511	19,2±0,468	25,3±0,816
$qP_{\text{MÁX}}$ ( $\times 10^{-7}$ $\mu\text{g}/\text{célula.h}$ )	5,11±0,228	7,74±0,544	6,07±0,670	4,03±0,334

**Tabla 7.** Evaluación del hibridoma C6G4 en medio RPMI 1640 en cultivo de alta densidad

Lote	Método 1								Método 2							
	Xv (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	Vol (mL)	IgG (mg/mL)	IgG (mg)	Potencia B A <sub>1</sub> B		Xv (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	Vol (mL)	IgG (mg/mL)	IgG (mg)	Potencia B A <sub>1</sub> B	
1	7,63	18,91	40	25,40	1,26	32,00	64	16	14,98	26,61	56	25,70	0,72	18,50	64	16
2	7,81	19,91	39	26,80	1,45	38,86	64	16	14,67	27,56	53	26,00	0,76	19,76	64	16
3	8,82	20,22	44	26,80	1,13	30,28	64	16	16,90	25,18	67	26,20	0,89	23,32	64	16
4	9,25	22,23	42	26,50	1,32	34,98	64	16	16,61	29,01	57	28,90	0,96	27,74	64	16
5	9,12	22,57	40	29,00	1,34	38,86	64	16	16,03	28,22	57	27,20	0,98	26,66	64	16
<b>Prom</b>	<b>8,53</b>	<b>20,77</b>	<b>41</b>	<b>26,90</b>	<b>1,30</b>	<b>35,00</b>	<b>64</b>	<b>16</b>	<b>15,84</b>	<b>27,32</b>	<b>58</b>	<b>26,80</b>	<b>0,86</b>	<b>23,20</b>	<b>64</b>	<b>16</b>

**Tabla 8.** Evaluación del hibridoma C6G4 en medio PFHM II en cultivo de alta densidad

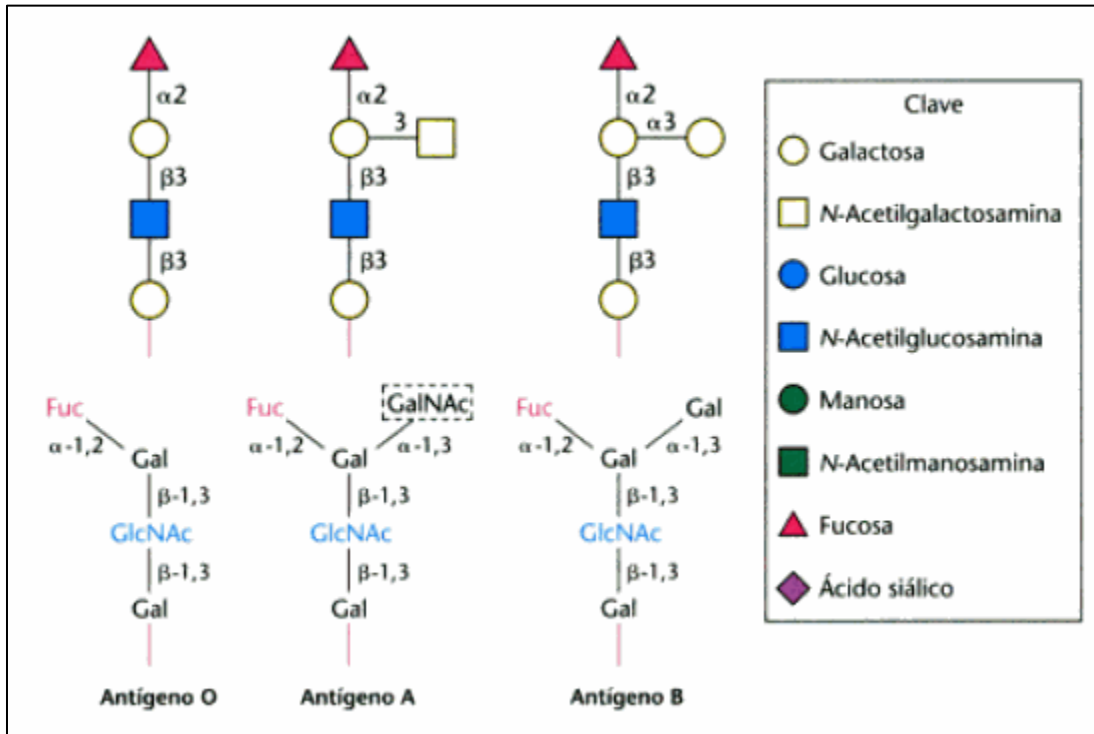
Lote	Método 1								Método 2							
	Xv (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	Vol (mL)	IgG (mg/mL)	IgG (mg)	Potencia B A <sub>1</sub> B		Xv (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	Vol (mL)	IgG (mg/mL)	IgG (mg)	Potencia B A <sub>1</sub> B	
1	8,29	21,58	38	26,60	2,58	68,63	256	128	16,14	27,80	58	25,90	1,63	42,22	256	128
2	8,58	21,91	39	27,40	3,12	85,49	256	128	16,21	28,28	57	27,80	1,85	51,43	256	128
3	9,72	22,67	43	29,80	2,77	82,55	256	128	17,13	28,46	60	29,30	1,98	58,01	256	128
4	10,11	23,40	43	31,20	3,26	101,71	256	128	18,44	32,12	57	32,00	2,38	76,16	256	128
5	9,80	23,62	41	32,00	3,20	102,40	256	128	18,42	32,24	57	31,00	2,05	63,55	256	128
<b>Prom</b>	<b>9,30</b>	<b>22,64</b>	<b>41</b>	<b>29,40</b>	<b>2,99</b>	<b>88,15</b>	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>17,27</b>	<b>29,78</b>	<b>58</b>	<b>29,20</b>	<b>1,98</b>	<b>58,27</b>	<b>256</b>	<b>128</b>

**Tabla 9.** Evaluación del hibridoma C6G4 en medio MyeloCIM en cultivo de alta densidad.

Lote	Método 1								Método 2							
	Xv (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	Vol (mL)	IgG (mg/mL)	IgG (mg)	Potencia B A <sub>1</sub> B		Xv (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	Vol (mL)	IgG (mg/mL)	IgG (mg)	Potencia B A <sub>1</sub> B	
1	7,29	22,68	32	25,10	0,79	19,83	128	64	13,92	27,31	51	25,50	0,92	23,46	128	64
2	7,74	18,97	41	27,30	1,59	43,41	128	64	13,90	28,12	49	27,60	0,99	27,32	128	64
3	9,21	24,51	38	27,00	1,87	50,49	128	64	15,01	29,71	51	29,00	0,86	24,94	128	64
4	7,23	22,54	32	31,10	1,92	59,71	128	64	16,32	31,06	53	29,40	1,09	32,05	128	64
5	9,01	23,82	38	31,00	1,90	58,90	128	64	16,03	31,82	50	31,00	1,49	46,19	128	64
<b>Prom</b>	<b>8,10</b>	<b>22,50</b>	<b>36</b>	<b>28,30</b>	<b>1,61</b>	<b>46,47</b>	<b>128</b>	<b>64</b>	<b>15,04</b>	<b>29,60</b>	<b>51</b>	<b>28,50</b>	<b>1,07</b>	<b>30,79</b>	<b>128</b>	<b>64</b>

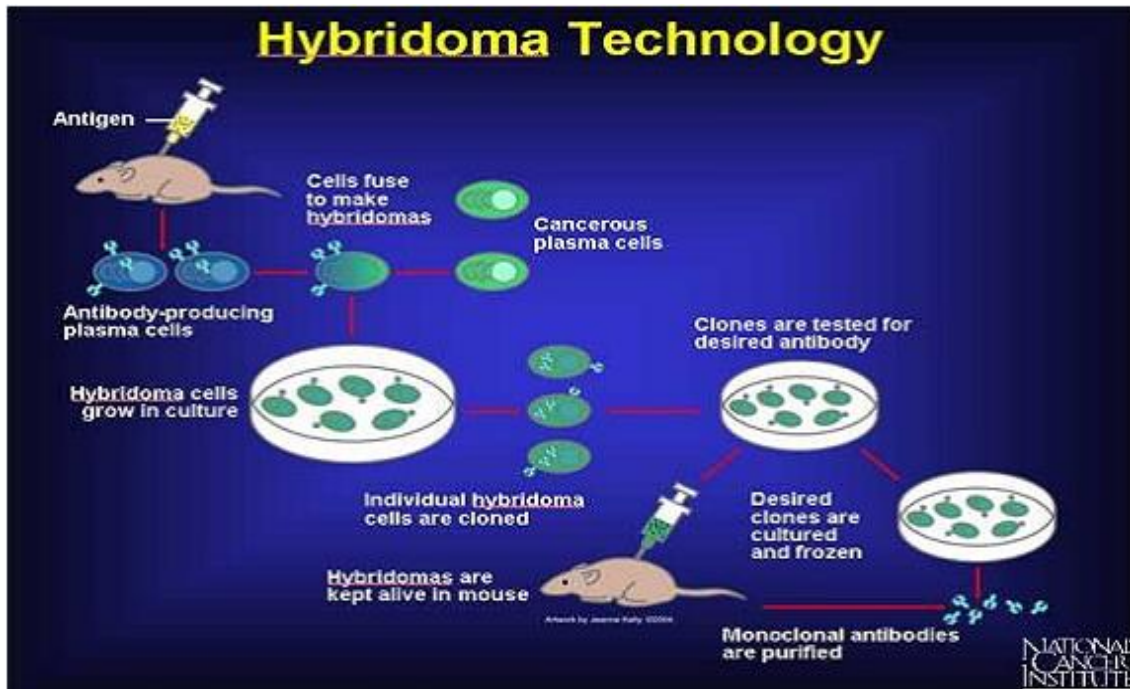
**Tabla 10.** Evaluación del hibridoma C6G4 en medio HybriCIM en cultivo de alta densidad.

Lote	Método 1								Método 2							
	Xv (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	Vol (mL)	IgG (mg/mL)	IgG (mg)	Potencia B A <sub>1</sub> B		Xv (MC/mL)	Xt (MC/mL)	Viab (%)	Vol (mL)	IgG (mg/mL)	IgG (mg)	Potencia B A <sub>1</sub> B	
1	5,02	13,26	38	22,50	0,76	17,10	64	16	9,26	16,29	57	23,60	0,51	12,04	64	16
2	5,39	12,99	41	25,50	0,72	18,36	64	16	10,86	16,30	67	25,30	0,57	14,42	64	16
3	5,98	13,56	44	27,20	0,83	22,58	64	16	10,86	17,80	61	25,80	0,72	18,58	64	16
4	6,32	14,20	45	26,10	0,86	22,45	64	16	11,23	18,94	59	25,90	0,79	20,46	64	16
5	6,42	13,66	47	27,20	0,92	25,02	64	16	11,86	19,68	60	27,40	0,78	21,37	64	16
<b>Prom</b>	<b>5,83</b>	<b>13,53</b>	<b>43</b>	<b>25,70</b>	<b>0,82</b>	<b>21,10</b>	<b>64</b>	<b>16</b>	<b>10,81</b>	<b>17,80</b>	<b>61</b>	<b>25,60</b>	<b>0,67</b>	<b>17,37</b>	<b>64</b>	<b>16</b>



**Figura 1.** Estructura de los polisacáridos antígenicos A, B, O. (Tomado de Berg JM, 2007) (136)

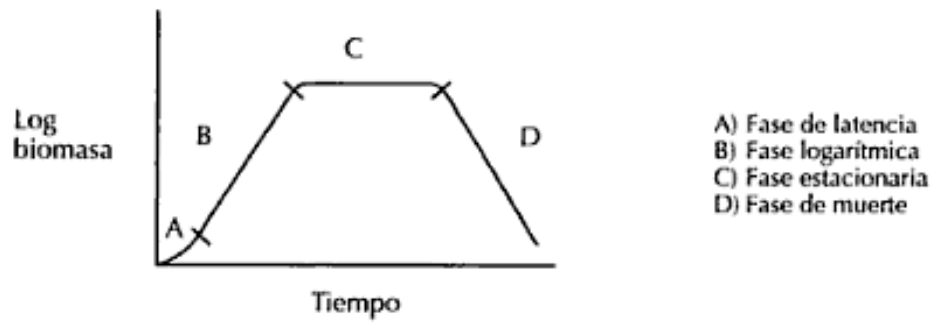




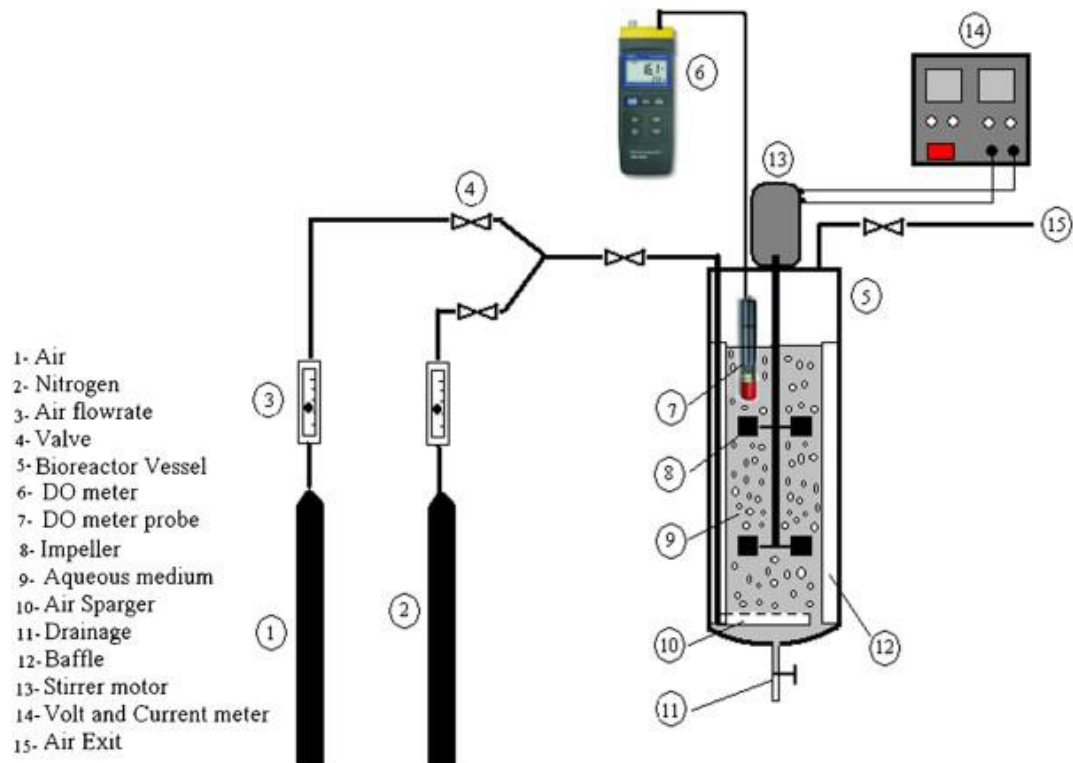
**Figura 2.** Representación esquemática de la tecnología del hibridoma. (Tomado de Pandey S, 2010) <sup>(137)</sup>.

Components	g/L
Calcium Nitrate•4H <sub>2</sub> O	0.1
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.04884
Potassium Chloride	0.4
Sodium Chloride	6.0
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous)	0.8
L-Arginine (free base)	0.2
L-Asparagine (anhydrous)	0.05
L-Aspartic Acid	0.02
L-Cystine•2HCl	0.0652
L-Glutamic Acid	0.02
L-Glutamine	0.3
Glycine	0.01
L-Histidine (free base)	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02
L-Isoleucine	0.05
L-Leucine	0.05
L-Lysine•HCl	0.04
L-Methionine	0.015
L-Phenylalanine	0.015
L-Proline	0.02
L-Serine	0.03
L-Threonine	0.02
L-Tryptophan	0.005
L-Tyrosine•2Na•2H <sub>2</sub> O	0.02883
L-Valine	0.02
D-Biotin	0.0002
Choline Chloride	0.003
Folic Acid	0.001
myo-Inositol	0.035
Niacinamide	0.001
p-Amino Benzoic Acid	0.001
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00025
Pyridoxine•HCl	0.001
Riboflavin	0.0002
Thiamine•HCl	0.001
Vitamin B-12	0.000005
D-Glucose	2.0
Glutathione (reduced)	0.001
HEPES	5.958
Phenol Red (sodium)	0.0053

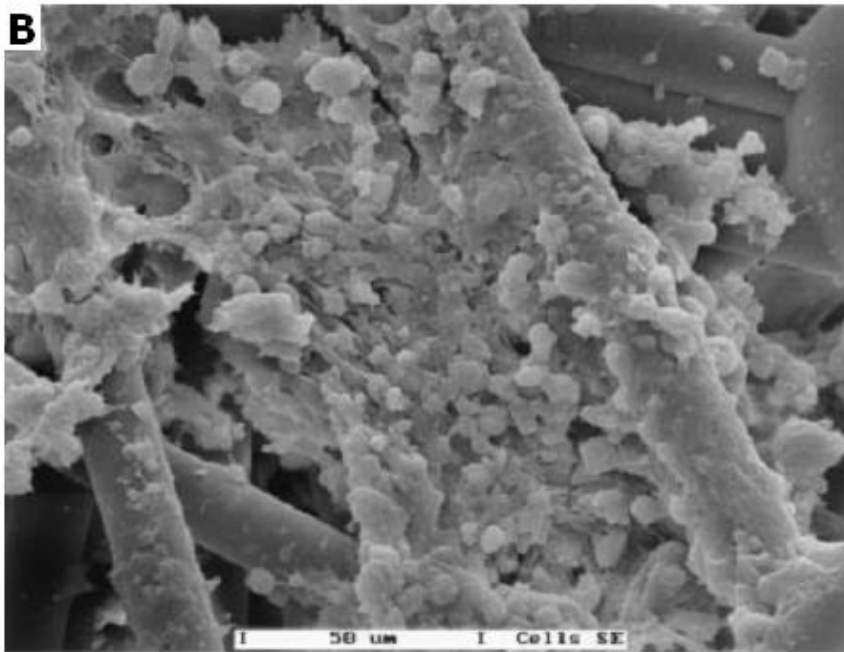
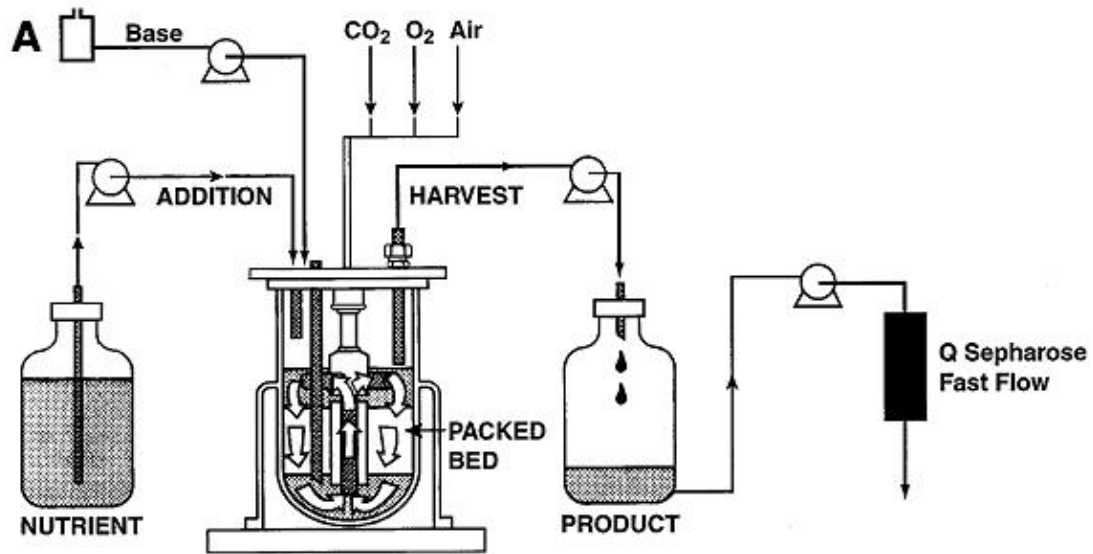
**Figura 3.** Composición del medio de cultivo RPMI 1640 sin suplementos. (Tomado de Product\_Information\_Sheet. RPMI-1640 Medium. Sigma-Aldrich Inc. 2007) <sup>(35)</sup>.



**Figura 4:** Curva típica de crecimiento de un microorganismo en fermentación sumergida. (Tomado de Hernández H, 2003)<sup>(68)</sup>.



**Figura 5:** Vista esquemática de un biorreactor de tipo tanque agitado con otros accesorios. (Tomado de Karimi A, 2013)<sup>(138)</sup>.

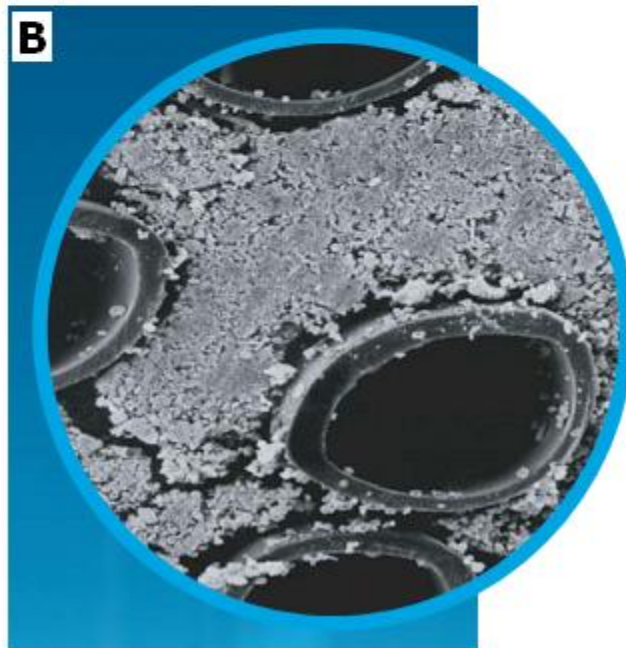
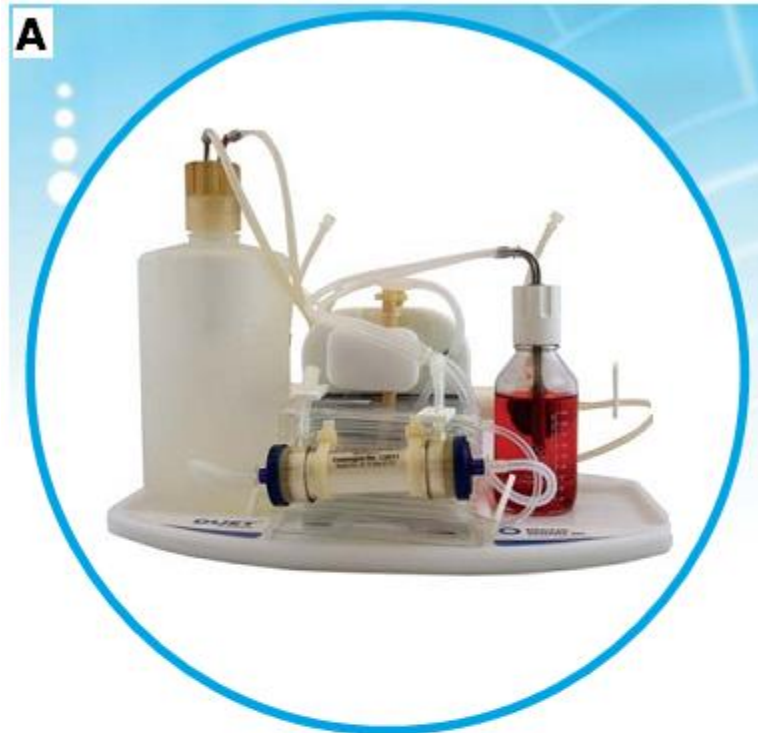


**Figura 6:** Sistema de fermentación en lecho empacado.

**A:** Esquema de producción general para un proceso en lecho empacado.

**B:** Microfotografía de barrido electrónico de los discos de poliéster de un proceso realizado en lecho empacado portando células adheridas. (Tomado de Kaufman JB, 2000)

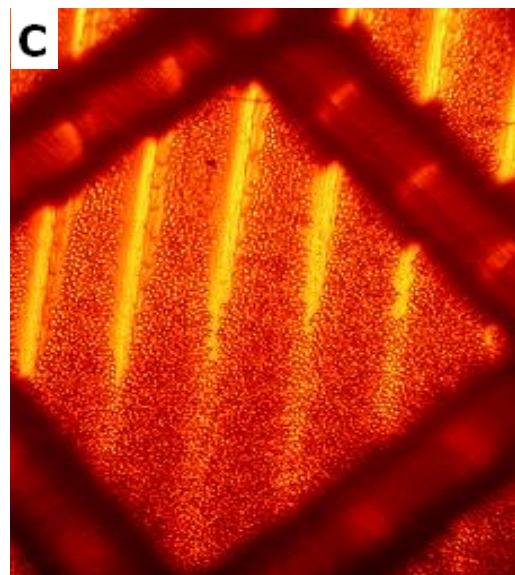
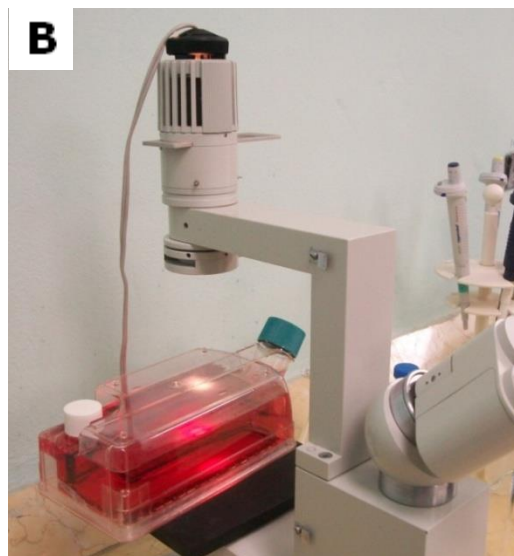
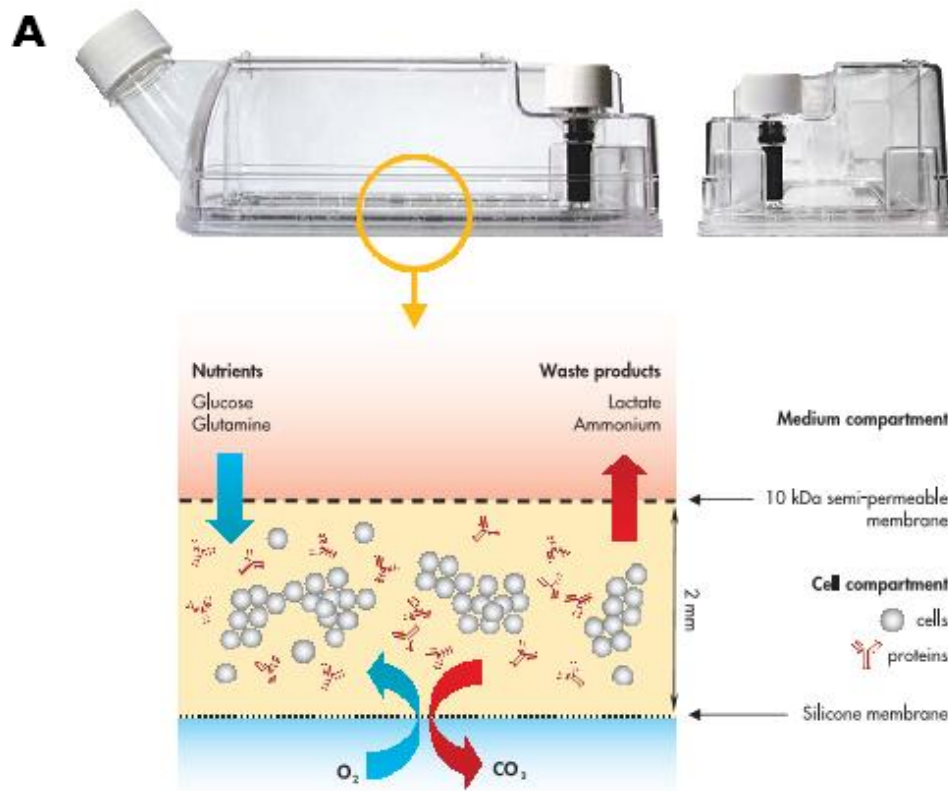
(139)



**Figura 7.** Sistema de fermentación en biorreactor de fibra hueca.

**A:** Imagen del sistema de fermentación FiberCell@Duet™.

**B:** Sección transversal de fibras huecas en un biorreactor de fibra hueca del Sistema FiberCell®. Se muestra el crecimiento a alta densidad celular en el espacio extra-capilar. (Tomado del folleto electrónico: HOLLOW FIBER BIOREACTORS AND RELATED PRODUCTS) <sup>(89)</sup>.

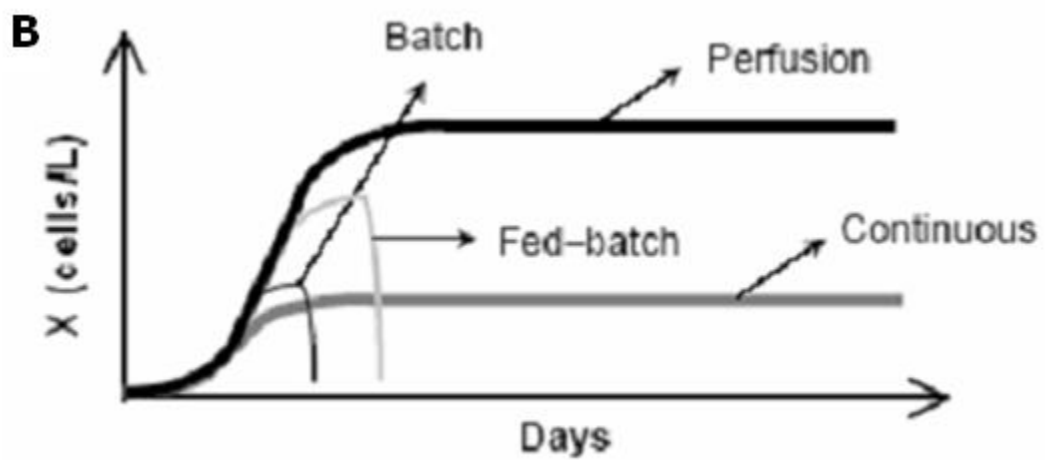
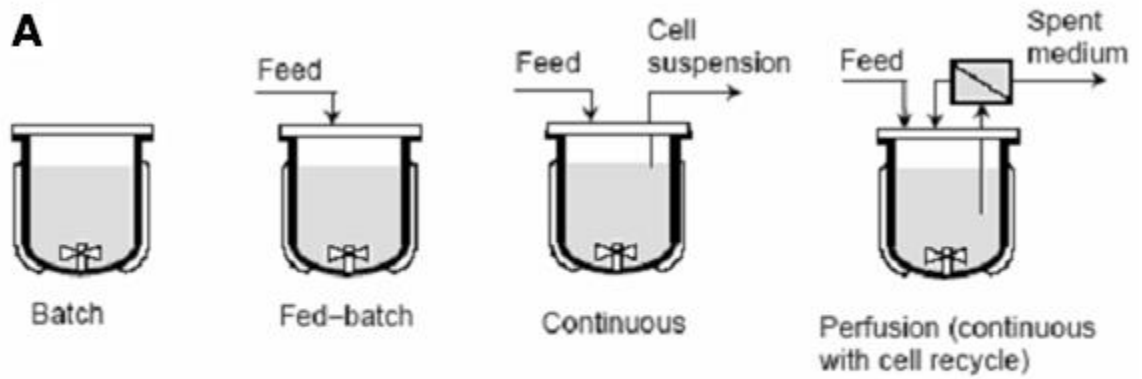


**Figura 8. Biorreactor CELLline.**

**A:** Descripción esquemática de la estructura y funcionamiento del biorreactor CELLline. (Tomado de boletín digital del biorreactor CELLline) <sup>(131)</sup>

**B:** Fotografía de un biorreactor CELLline empleado en el presente trabajo al ser observado al microscopio óptico invertido.

**C:** Fotografía de la vista de las células en el biorreactor CELLline observadas al microscopio óptico invertido.

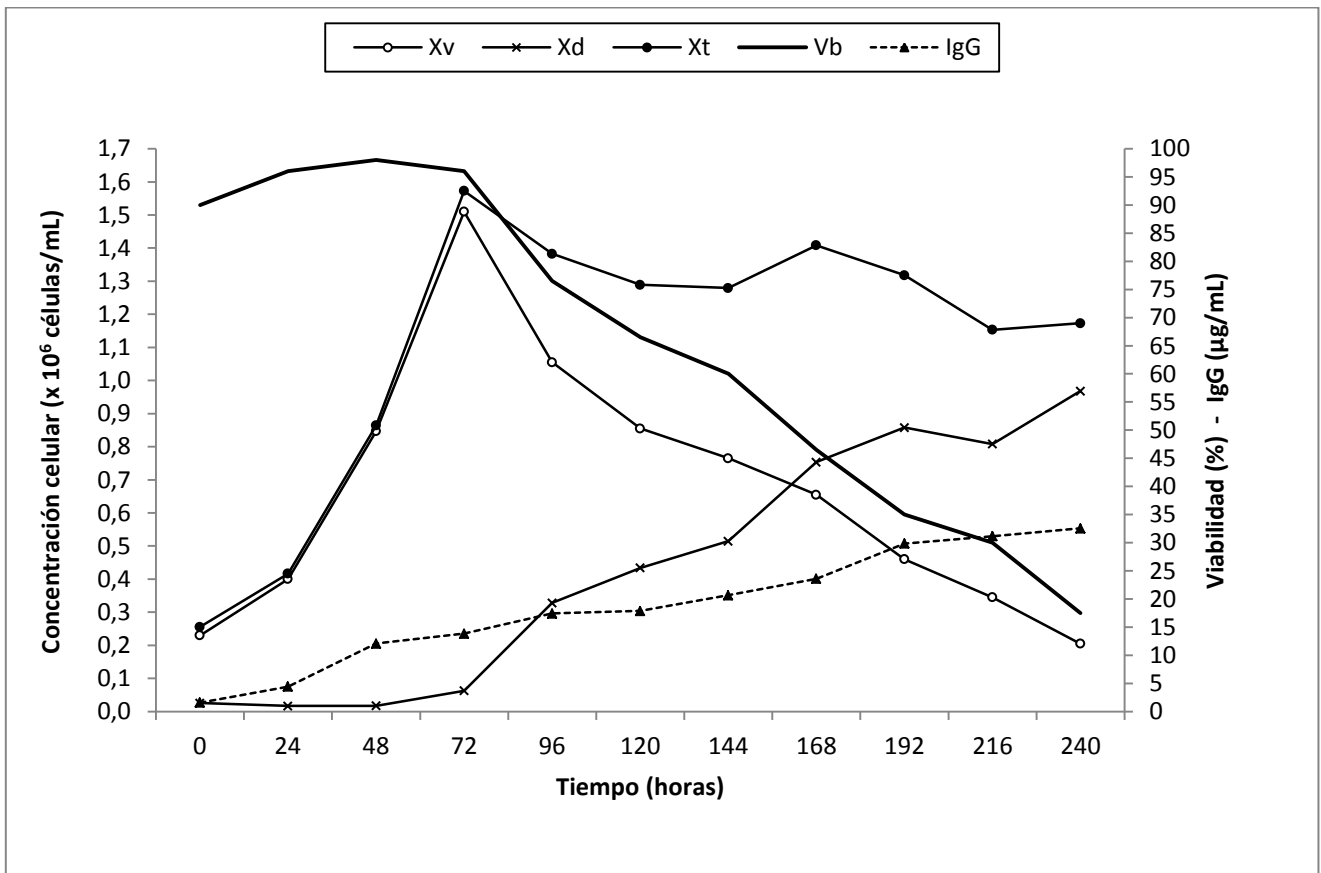


**Figura 9:** Modos de operación en fermentación.

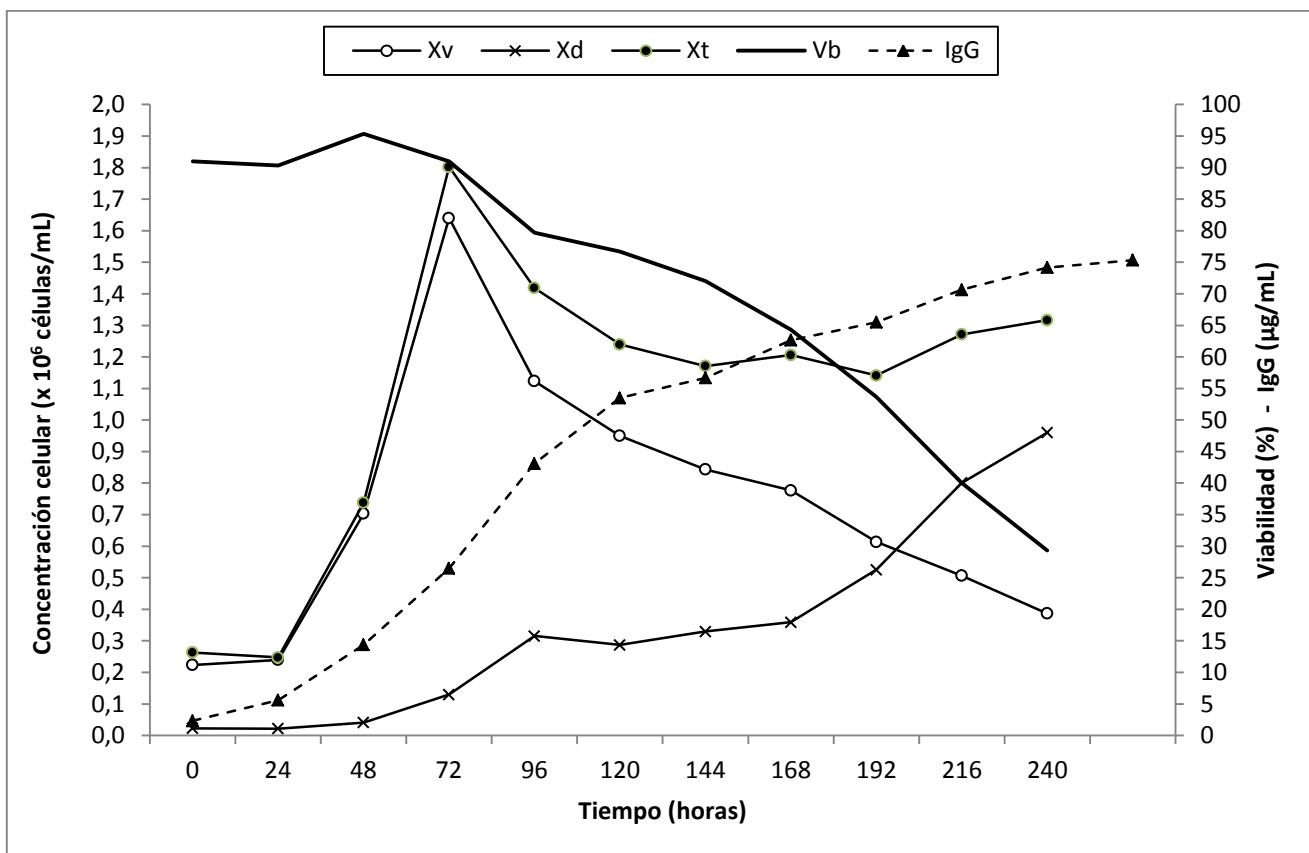
**A:** Representación esquemática de los modos de operación en un fermentador tipo tanque agitado.

**B:** Curvas de crecimiento típicas de los cultivos según el tipo de operación.

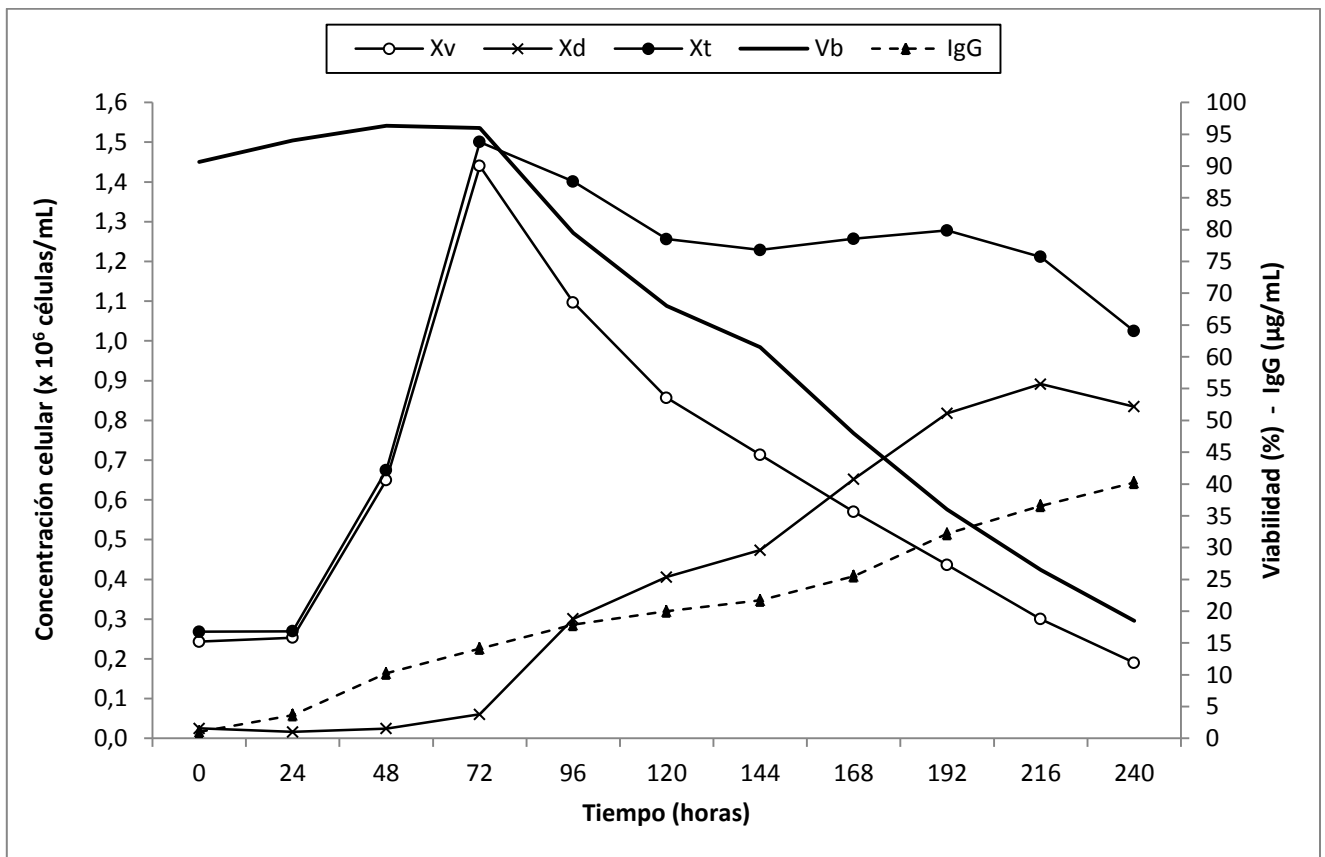




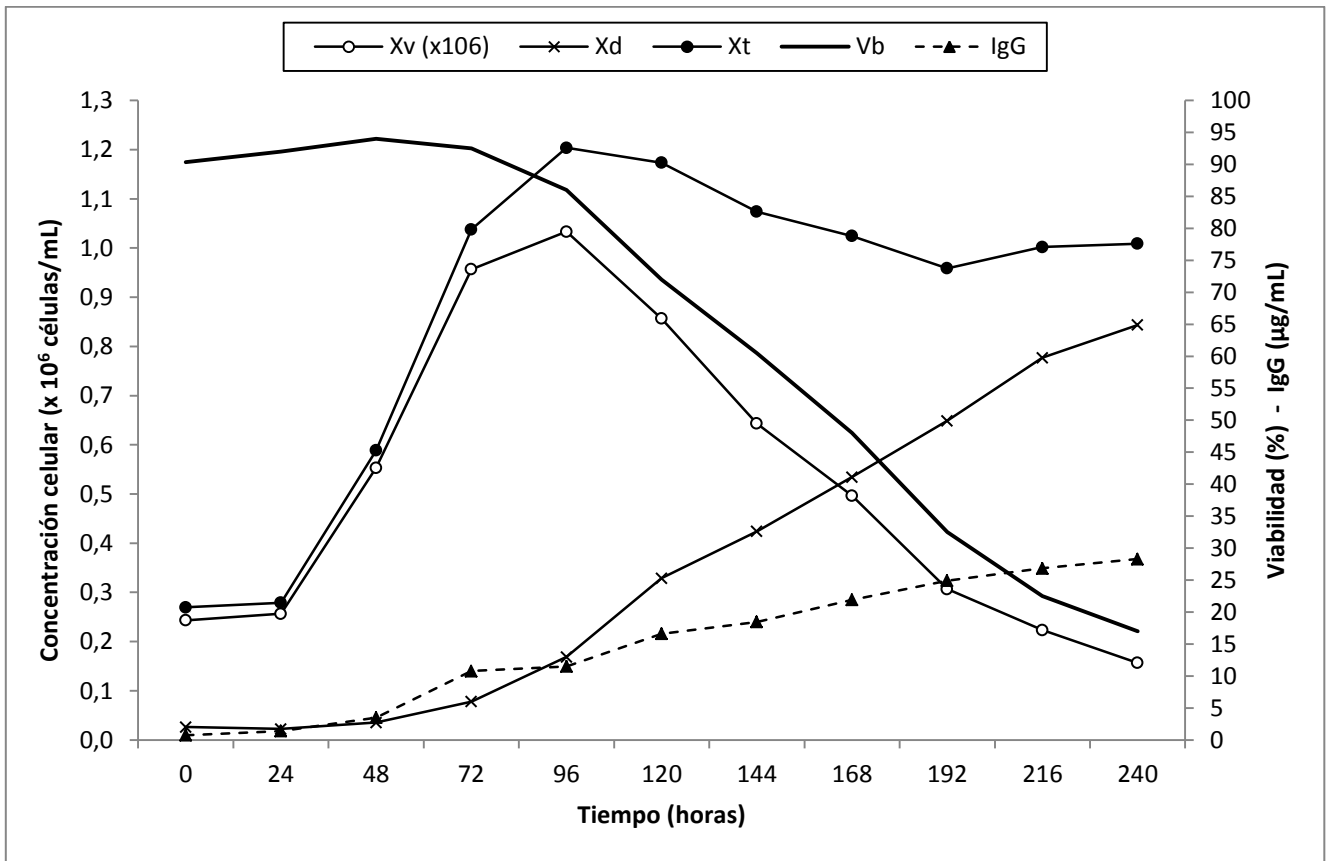
**Figura 10:** Curva promedio de crecimiento y producción del hibridoma C6G4 en medio de cultivo RPMI 1640.



**Figura 11:** Curva promedio de crecimiento y producción del hibridoma C6G4 en medio de cultivo PFHM II.



**Figura 12:** Curva promedio de crecimiento y producción del hibridoma C6G4 en medio de cultivo MyeloCIM.



**Figura 13:** Curva promedio de crecimiento y producción del hibridoma C6G4 en medio de cultivo HybriCIM.

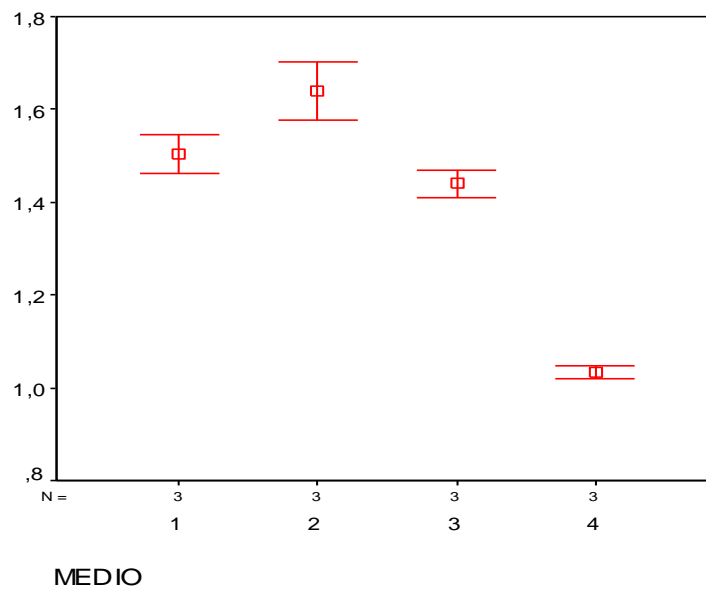
ANOVA XV

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	,613	3	,204	120,741	,000
WithinGroups	,014	8	,002		
Total	,626	11			

Dependent Variable: XV Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-,1367(*)	,03358	,015	-,2442	-,0291
	3	,0633	,03358	,305	-,0442	,1709
	4	,4700(*)	,03358	,000	,3625	,5775
2	1	,1367(*)	,03358	,015	,0291	,2442
	3	,2000(*)	,03358	,002	,0925	,3075
	4	,6067(*)	,03358	,000	,4991	,7142
3	1	-,0633	,03358	,305	-,1709	,0442
	2	-,2000(*)	,03358	,002	-,3075	-,0925
	4	,4067(*)	,03358	,000	,2991	,5142
4	1	-,4700(*)	,03358	,000	-,5775	-,3625
	2	-,6067(*)	,03358	,000	-,7142	-,4991
	3	-,4067(*)	,03358	,000	-,5142	-,2991

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640; 2-PFHM II; 3-MyeloCIM; 4-HybriCIM.



**Anexo 1:** Análisis de varianza simple de la concentración máxima de células viables del hibridoma C6G4 en función del medio de cultivo empleado.

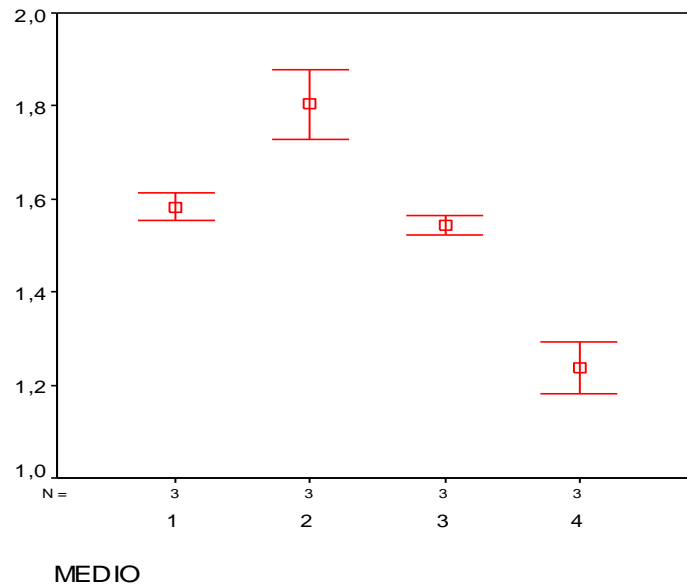
ANOVA XT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	,490	3	,163	65,732	,000
WithinGroups	,020	8	,002		
Total	,510	11			

Dependent Variable: XT Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-,2200(*)	,04069	,003	-,3503	-,0897
	3	,0400	,04069	,763	-,0903	,1703
	4	,3467(*)	,04069	,000	,2164	,4770
2	1	,2200(*)	,04069	,003	,0897	,3503
	3	,2600(*)	,04069	,001	,1297	,3903
	4	,5667(*)	,04069	,000	,4364	,6970
3	1	-,0400	,04069	,763	-,1703	,0903
	2	-,2600(*)	,04069	,001	-,3903	-,1297
	4	,3067(*)	,04069	,000	,1764	,4370
4	1	-,3467(*)	,04069	,000	-,4770	-,2164
	2	-,5667(*)	,04069	,000	-,6970	-,4364
	3	-,3067(*)	,04069	,000	-,4370	-,1764

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 2:** Análisis de varianza simple de la concentración máxima de células totales del hibridoma C6G4 en función del medio de cultivo empleado.

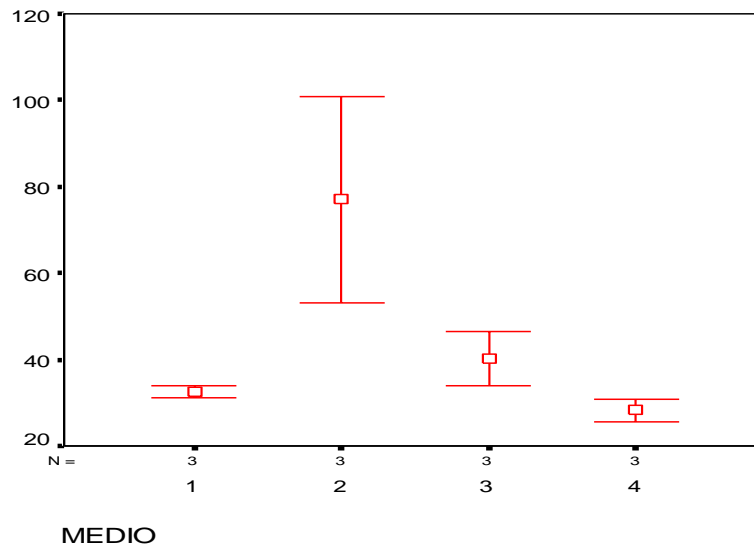
**ANOVA IGG**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	4454,707	3	1484,902	59,595	,000
WithinGroups	199,331	8	24,916		
Total	4654,038	11			

Dependent Variable: IGG Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-44,5200(*)	4,07565	,000	-57,5717	-31,4683
	3	-7,6700	4,07565	,307	-20,7217	5,3817
	4	4,2667	4,07565	,729	-8,7850	17,3183
2	1	44,5200(*)	4,07565	,000	31,4683	57,5717
	3	36,8500(*)	4,07565	,000	23,7983	49,9017
	4	48,7867(*)	4,07565	,000	35,7350	61,8383
3	1	7,6700	4,07565	,307	-5,3817	20,7217
	2	-36,8500(*)	4,07565	,000	-49,9017	-23,7983
	4	11,9367	4,07565	,074	-1,1150	24,9883
4	1	-4,2667	4,07565	,729	-17,3183	8,7850
	2	-48,7867(*)	4,07565	,000	-61,8383	-35,7350
	3	-11,9367	4,07565	,074	-24,9883	1,1150

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 3:** Análisis de varianza simple de la concentración máxima de IgG en función del medio de cultivo empleado.

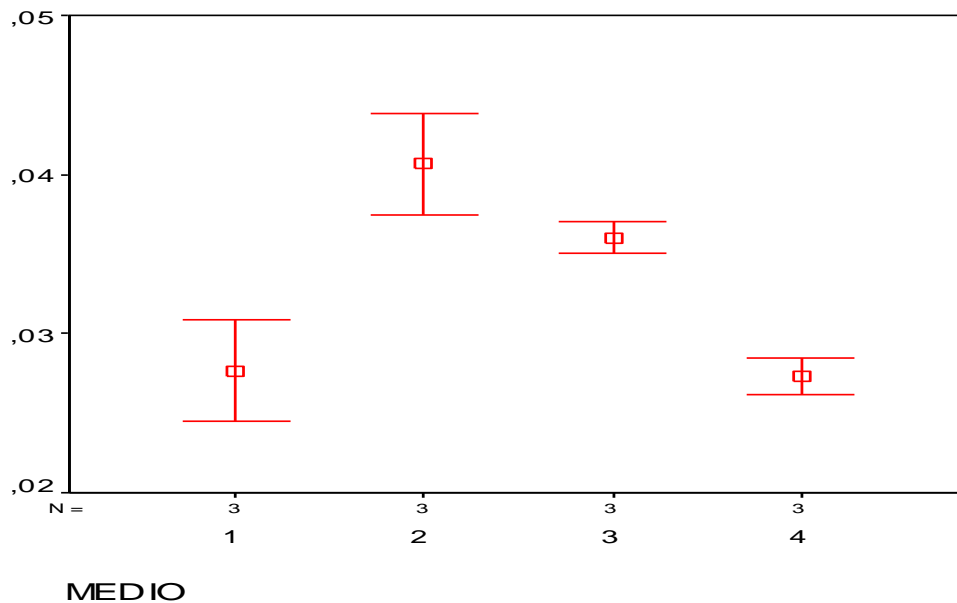
**ANOVA  $\mu$ MÁX**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	,000	3	,000	22,314	,000
WithinGroups	,000	8	,000		
Total	,000	11			

Dependent Variable:  $\mu$ MÁX Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-,01300(*)	,001958	,001	-,01927	-,00673
	3	-,00833(*)	,001958	,012	-,01460	-,00206
	4	,00033	,001958	,998	-,00594	,00660
2	1	,01300(*)	,001958	,001	,00673	,01927
	3	,00467	,001958	,158	-,00160	,01094
	4	,01333(*)	,001958	,001	,00706	,01960
3	1	,00833(*)	,001958	,012	,00206	,01460
	2	-,00467	,001958	,158	-,01094	,00160
	4	,00867(*)	,001958	,009	,00240	,01494
4	1	-,00033	,001958	,998	-,00660	,00594
	2	-,01333(*)	,001958	,001	-,01960	-,00706
	3	-,00867(*)	,001958	,009	-,01494	-,00240

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HyriCIM



**Anexo 4:** Análisis de varianza simple de la velocidad específica de crecimiento máxima en función del medio de cultivo empleado.



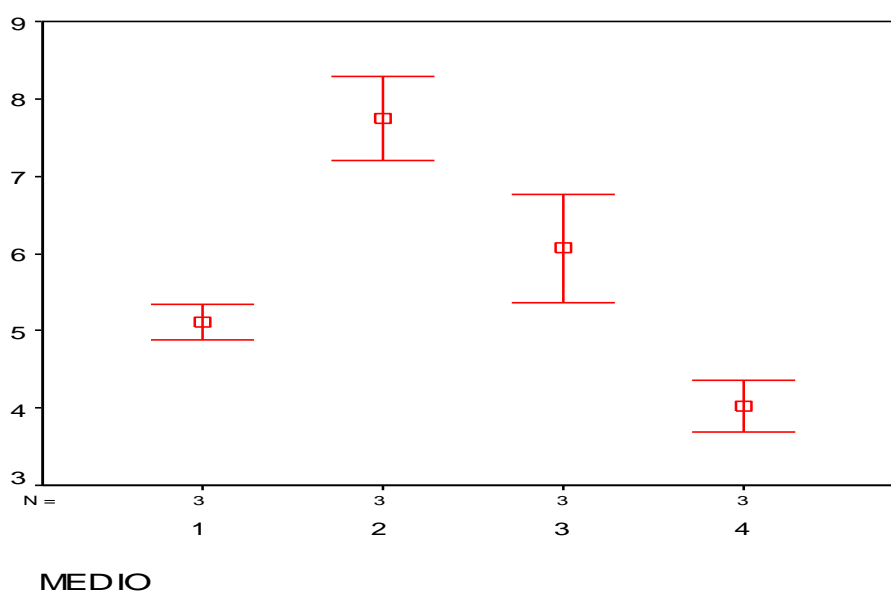
### ANOVA QPMÁX

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	22,271	3	7,424	31,222	,000
WithinGroups	1,902	8	,238		
Total	24,173	11			

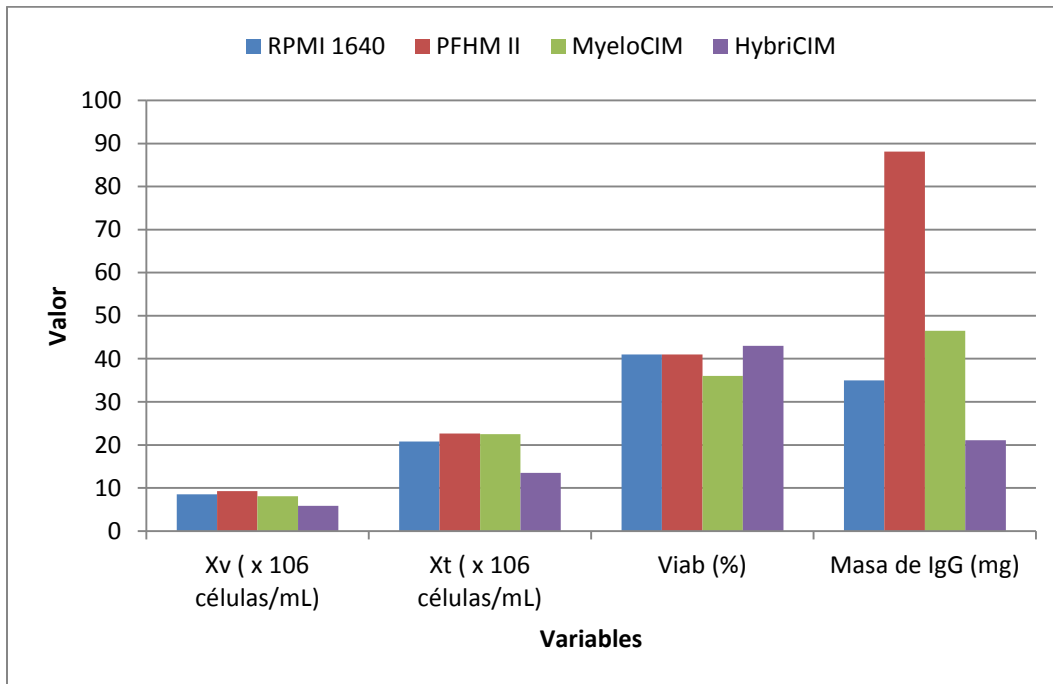
Dependent Variable: QPMÁX Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-2,6233(*)	,39814	,001	-3,8983	-1,3483
	3	-,9567	,39814	,154	-2,2317	,3183
	4	1,0867	,39814	,097	-,1883	2,3617
2	1	2,6233(*)	,39814	,001	1,3483	3,8983
	3	1,6667(*)	,39814	,013	,3917	2,9417
	4	3,7100(*)	,39814	,000	2,4350	4,9850
3	1	,9567	,39814	,154	-,3183	2,2317
	2	-1,6667(*)	,39814	,013	-2,9417	-,3917
	4	2,0433(*)	,39814	,004	,7683	3,3183
4	1	-1,0867	,39814	,097	-2,3617	,1883
	2	-3,7100(*)	,39814	,000	-4,9850	-2,4350
	3	-2,0433(*)	,39814	,004	-3,3183	-,7683

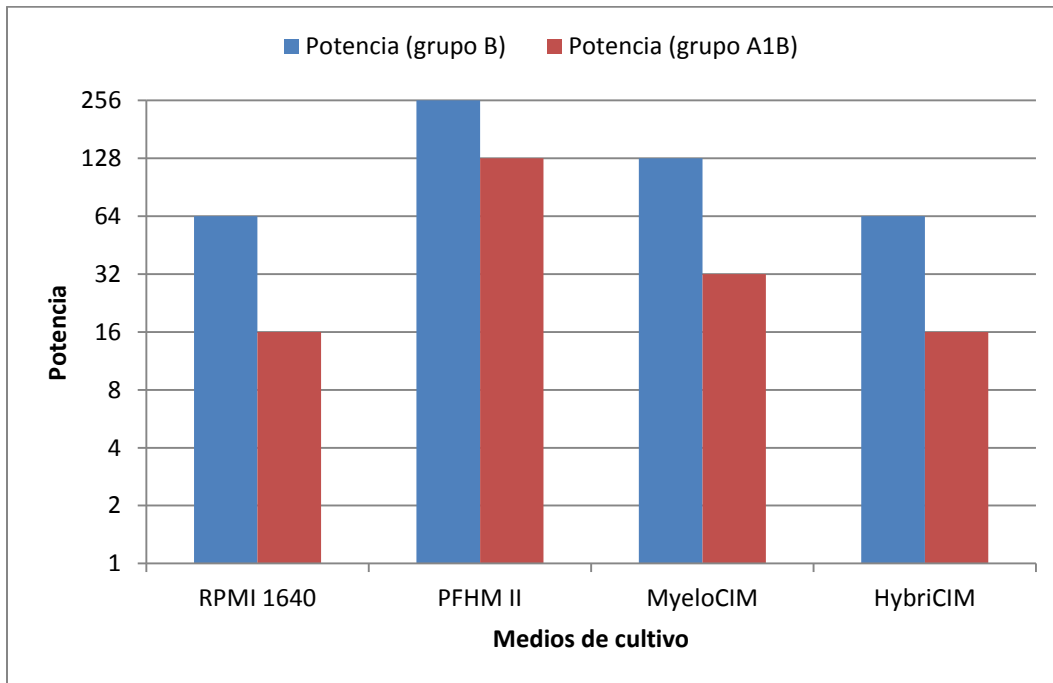
\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 5:** Análisis de varianza simple de la velocidad específica de producción máxima en función del medio de cultivo empleado.



**Figura 14.** Resultados del cultivo del hibridoma C6G4 en cultivo de alta densidad por el método 1 (valores promedios).



**Figura 15.** Valores de potencia de los sobrenadantes de cultivo producidos por el método 1.

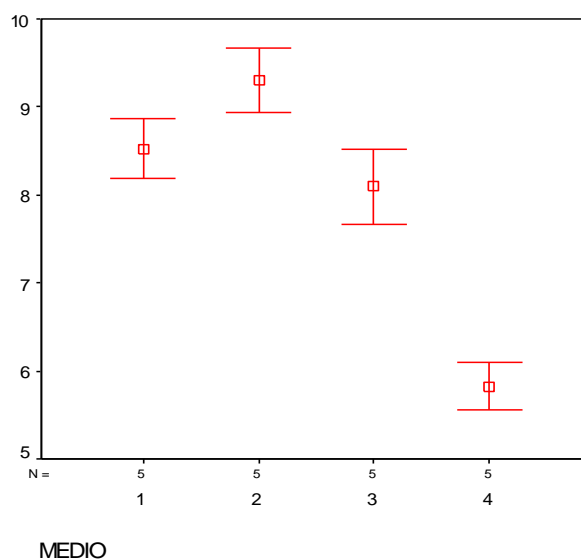
ANOVA XV

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	33,431	3	11,144	17,896	,000
WithinGroups	9,963	16	,623		
Total	43,394	19			

Dependent Variable: XV Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-,7740	,49907	,432	-2,2019	,6539
	3	,4300	,49907	,824	-,9979	1,8579
	4	2,7000(*)	,49907	,000	1,2721	4,1279
2	1	,7740	,49907	,432	-,6539	2,2019
	3	1,2040	,49907	,115	-,2239	2,6319
	4	3,4740(*)	,49907	,000	2,0461	4,9019
3	1	-,4300	,49907	,824	-1,8579	,9979
	2	-1,2040	,49907	,115	-2,6319	,2239
	4	2,2700(*)	,49907	,002	,8421	3,6979
4	1	-2,7000(*)	,49907	,000	-4,1279	-1,2721
	2	-3,4740(*)	,49907	,000	-4,9019	-2,0461
	3	-2,2700(*)	,49907	,002	-3,6979	-,8421

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 6:** Análisis de varianza simple de la concentración de células viables del hibridoma C6G4 en cosecha de cultivo de alta densidad por el método 1.

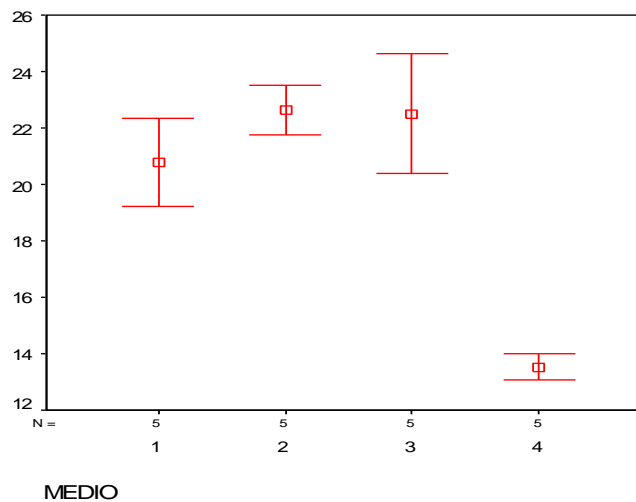
ANOVA XT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	277,698	3	92,566	46,028	,000
WithinGroups	32,177	16	2,011		
Total	309,875	19			

Dependent Variable: XT Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-1,8680	,89690	,201	-4,4340	,6980
	3	-1,7360	,89690	,253	-4,3020	,8300
	4	7,2340(*)	,89690	,000	4,6680	9,8000
2	1	1,8680	,89690	,201	-,6980	4,4340
	3	,1320	,89690	,999	-2,4340	2,6980
	4	9,1020(*)	,89690	,000	6,5360	11,6680
3	1	1,7360	,89690	,253	-,8300	4,3020
	2	-,1320	,89690	,999	-2,6980	2,4340
	4	8,9700(*)	,89690	,000	6,4040	11,5360
4	1	-7,2340(*)	,89690	,000	-9,8000	-4,6680
	2	-9,1020(*)	,89690	,000	-11,6680	-6,5360
	3	-8,9700(*)	,89690	,000	-11,5360	-6,4040

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 7:** Análisis de varianza simple de la concentración de células totales del hibridoma C6G4 en cosecha de cultivo de alta densidad por el método 1.

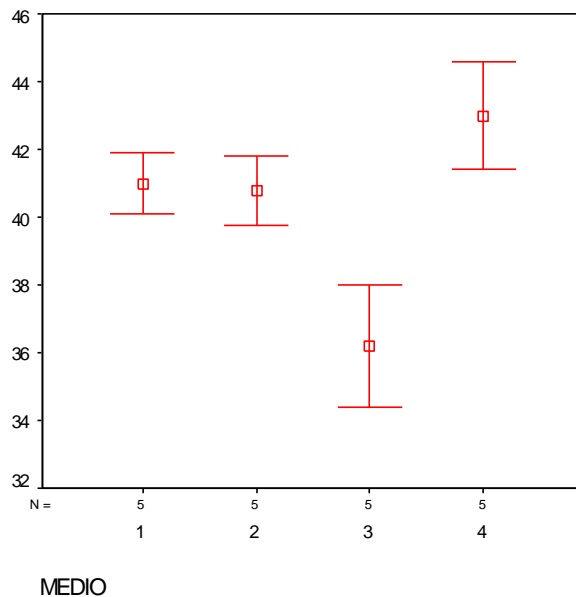
**ANOVA VIAB**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	124,150	3	41,383	4,368	,020
WithinGroups	151,600	16	9,475		
Total	275,750	19			

Dependent Variable: VIAB Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	,20	1,947	1,000	-5,37	5,77
	3	4,80	1,947	,104	-,77	10,37
	4	-2,00	1,947	,736	-7,57	3,57
2	1	-,20	1,947	1,000	-5,77	5,37
	3	4,60	1,947	,125	-,97	10,17
	4	-2,20	1,947	,677	-7,77	3,37
3	1	-4,80	1,947	,104	-10,37	,77
	2	-4,60	1,947	,125	-10,17	,97
	4	-6,80(*)	1,947	,014	-12,37	-1,23
4	1	2,00	1,947	,736	-3,57	7,57
	2	2,20	1,947	,677	-3,37	7,77
	3	6,80(*)	1,947	,014	1,23	12,37

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 8:** Análisis de varianza simple de la viabilidad del hibridoma C6G4 en cosecha de cultivo de alta densidad por el método 1.

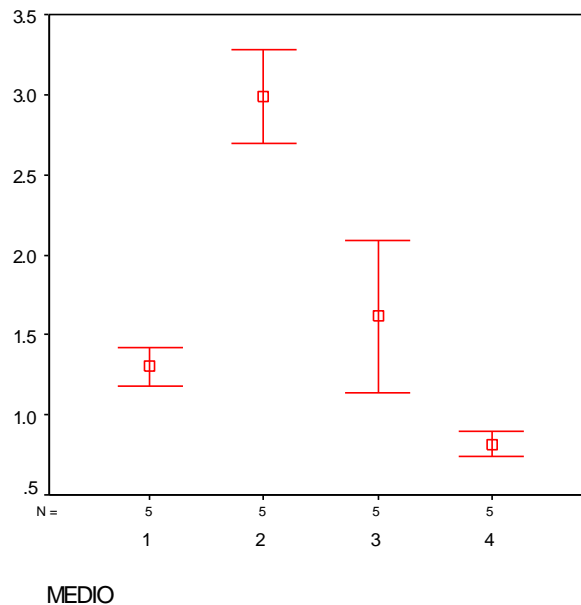
**ANOVA IGG**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	12,987	3	4,329	51,265	,000
WithinGroups	1,351	16	,084		
Total	14,338	19			

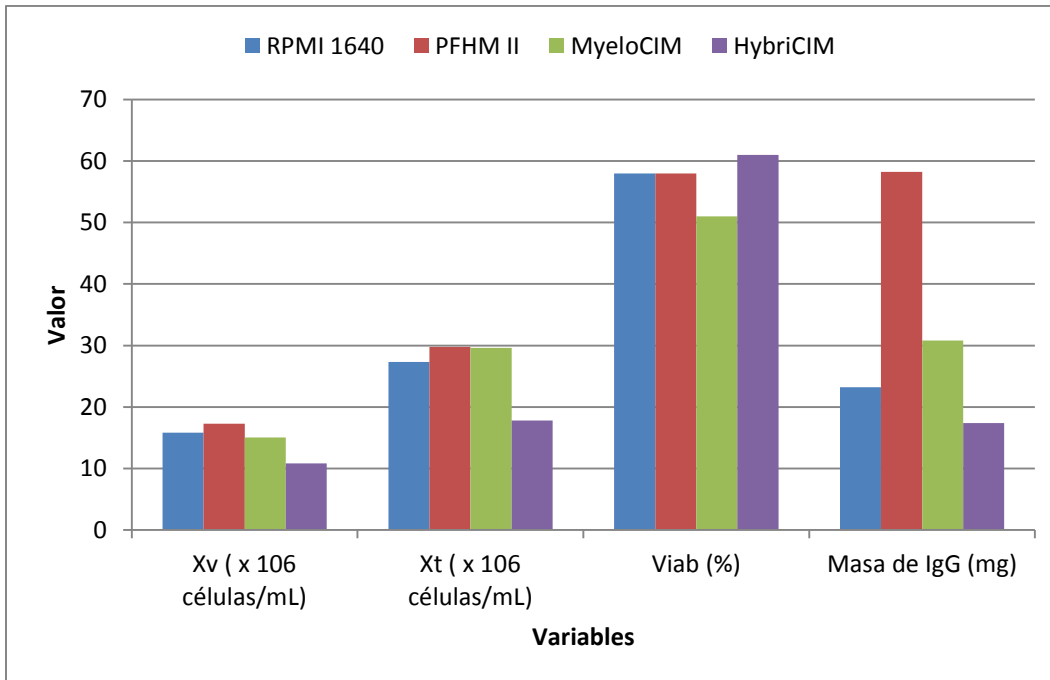
Dependent Variable: IGG Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-1,6860(*)	,18379	,000	-2,2118	-1,1602
	3	-,3140	,18379	,352	-,8398	,2118
	4	,4820	,18379	,078	-,0438	1,0078
2	1	1,6860(*)	,18379	,000	1,1602	2,2118
	3	1,3720(*)	,18379	,000	,8462	1,8978
	4	2,1680(*)	,18379	,000	1,6422	2,6938
3	1	,3140	,18379	,352	-,2118	,8398
	2	-1,3720(*)	,18379	,000	-1,8978	-,8462
	4	,7960(*)	,18379	,003	,2702	1,3218
4	1	-,4820	,18379	,078	-1,0078	,0438
	2	-2,1680(*)	,18379	,000	-2,6938	-1,6422
	3	-,7960(*)	,18379	,003	-1,3218	-,2702

\* The mean difference is significant at the .05 level. Legenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 9:** Análisis de varianza simple de la concentración de IgG del hibridoma C6G4 en cosecha de cultivo de alta densidad por el método 1.



**Figura 16.** Resultados del cultivo del hibridoma C6G4 en cultivo de alta densidad por el método 2 (valores promedios).



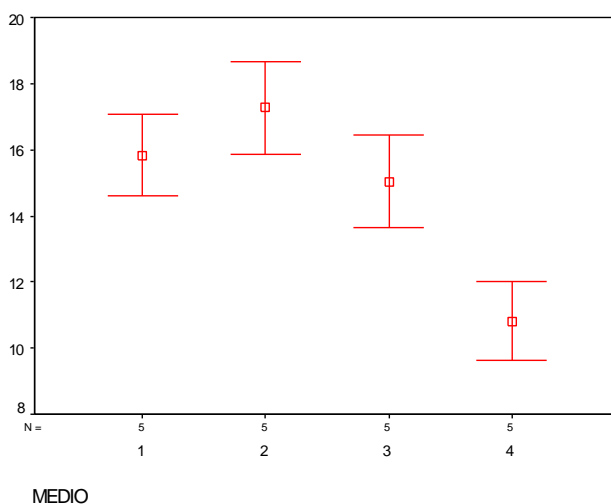
ANOVA XV

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	115,487	3	38,496	34,540	,000
WithinGroups	17,832	16	1,115		
Total	133,320	19			

Dependent Variable: XV Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-1,4300	,66769	,182	-3,3403	,4803
	3	,8020	,66769	,635	-1,1083	2,7123
	4	5,0240(*)	,66769	,000	3,1137	6,9343
2	1	1,4300	,66769	,182	-,4803	3,3403
	3	2,2320(*)	,66769	,019	,3217	4,1423
	4	6,4540(*)	,66769	,000	4,5437	8,3643
3	1	-,8020	,66769	,635	-2,7123	1,1083
	2	-2,2320(*)	,66769	,019	-4,1423	-,3217
	4	4,2220(*)	,66769	,000	2,3117	6,1323
4	1	-5,0240(*)	,66769	,000	-6,9343	-3,1137
	2	-6,4540(*)	,66769	,000	-8,3643	-4,5437
	3	-4,2220(*)	,66769	,000	-6,1323	-2,3117

\* The mean difference is significant at the .05 level. Legenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 10:** Análisis de varianza simple de la concentración de células viables del hibridoma C6G4 en cosecha de cultivo de alta densidad por el método 2.

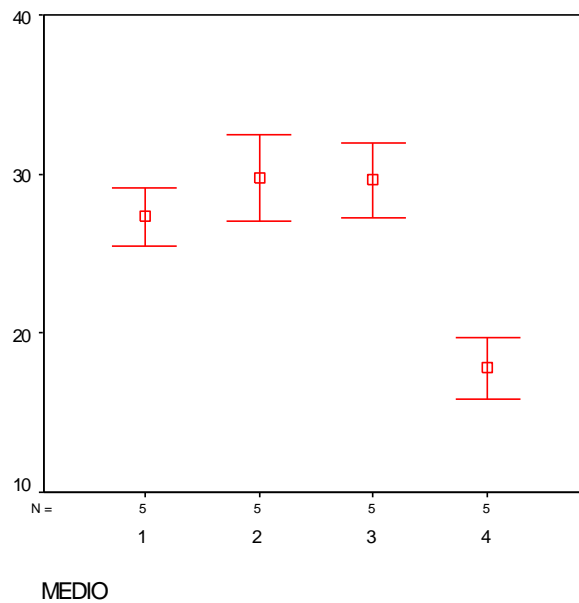
ANOVA XT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	480,766	3	160,255	49,198	,000
WithinGroups	52,118	16	3,257		
Total	532,884	19			

Dependent Variable: XT Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-2,4640	1,14147	,177	-5,7298	,8018
	3	-2,2880	1,14147	,227	-5,5538	,9778
	4	9,5140(*)	1,14147	,000	6,2482	12,7798
2	1	2,4640	1,14147	,177	-,8018	5,7298
	3	,1760	1,14147	,999	-3,0898	3,4418
	4	11,9780(*)	1,14147	,000	8,7122	15,2438
3	1	2,2880	1,14147	,227	-,9778	5,5538
	2	-,1760	1,14147	,999	-3,4418	3,0898
	4	11,8020(*)	1,14147	,000	8,5362	15,0678
4	1	-9,5140(*)	1,14147	,000	-12,7798	-6,2482
	2	-11,9780(*)	1,14147	,000	-15,2438	-8,7122
	3	-11,8020(*)	1,14147	,000	-15,0678	-8,5362

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 11:** Análisis de varianza simple de la concentración máxima de células totales del hibridoma C6G4 en cosecha de cultivo de alta densidad por el método 2.

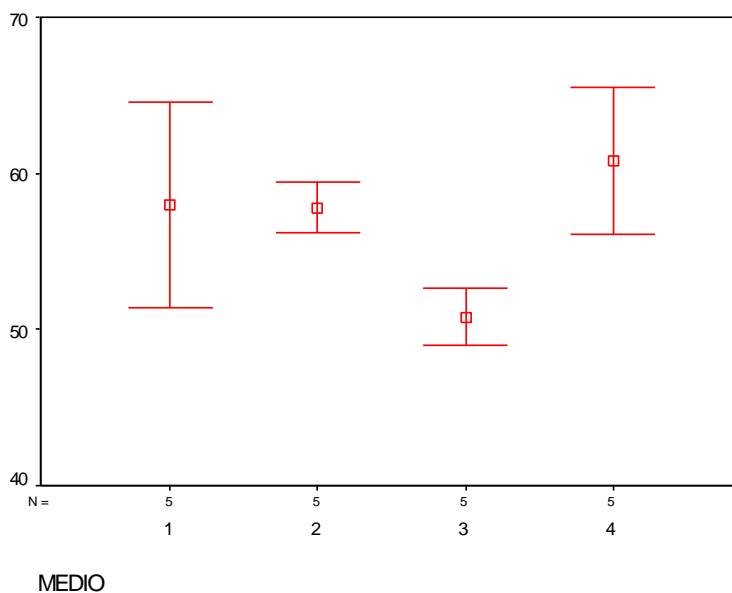
**ANOVA VIAB**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	272,150	3	90,717	7,871	,002
WithinGroups	184,400	16	11,525		
Total	456,550	19			

Dependent Variable: VIAB Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	,20	2,147	1,000	-5,94	6,34
	3	7,20(*)	2,147	,019	1,06	13,34
	4	-2,80	2,147	,574	-8,94	3,34
2	1	-,20	2,147	1,000	-6,34	5,94
	3	7,00(*)	2,147	,023	,86	13,14
	4	-3,00	2,147	,519	-9,14	3,14
3	1	-7,20(*)	2,147	,019	-13,34	-1,06
	2	-7,00(*)	2,147	,023	-13,14	-,86
	4	-10,00(*)	2,147	,001	-16,14	-3,86
4	1	2,80	2,147	,574	-3,34	8,94
	2	3,00	2,147	,519	-3,14	9,14
	3	10,00(*)	2,147	,001	3,86	16,14

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 12:** Análisis de varianza simple de la viabilidad del hibridoma C6G4 en cosecha de cultivo de alta densidad por el método 2.

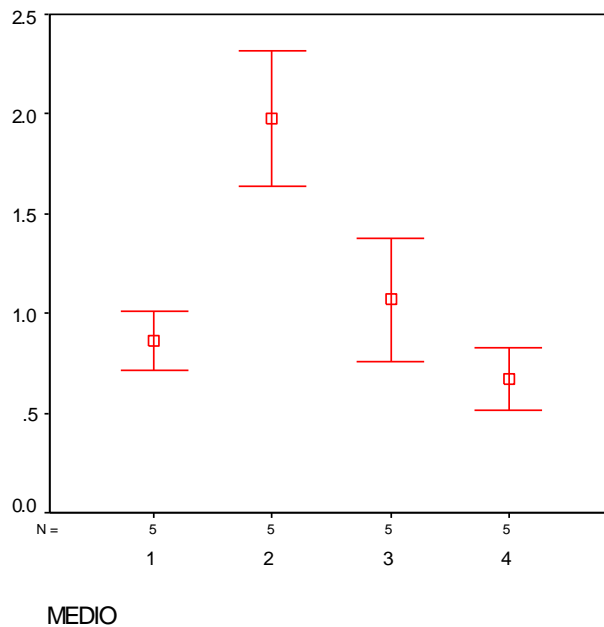
**ANOVA IGG**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BetweenGroups	5,007	3	1,669	39,652	,000
WithinGroups	,673	16	,042		
Total	5,681	19			

Dependent Variable: IGG Tukey HSD

(I) MEDIO	(J) MEDIO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	-1,1160(*)	,12976	,000	-1,4872	-,7448
	3	-,2080	,12976	,405	-,5792	,1632
	4	,1880	,12976	,489	-,1832	,5592
2	1	1,1160(*)	,12976	,000	,7448	1,4872
	3	,9080(*)	,12976	,000	,5368	1,2792
	4	1,3040(*)	,12976	,000	,9328	1,6752
3	1	,2080	,12976	,405	-,1632	,5792
	2	-,9080(*)	,12976	,000	-1,2792	-,5368
	4	,3960(*)	,12976	,035	,0248	,7672
4	1	-,1880	,12976	,489	-,5592	,1832
	2	-1,3040(*)	,12976	,000	-1,6752	-,9328
	3	-,3960(*)	,12976	,035	-,7672	-,0248

\* The mean difference is significant at the .05 level. Leyenda: 1-RPMI 1640, 2-PFHM II, 3-MyeloCIM, 4-HybriCIM



**Anexo 13:** Análisis de varianza simple de la concentración de IgG del hibridoma C6G4 en cosecha de cultivo de alta densidad por el método 2.