



Universidad de Oriente

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial



Obtención del Anticuerpo Monoclonal anti-CD4 en Biorreactor de Ola Applikon 50L



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

Autor: Ing. Giorky Téllez Guillen

Tutores:

Dra. C. Teresita Rodríguez Obaya

Dra. C. Suyén Rodríguez Pérez



Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales
Santiago de Cuba, 2017



*La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el
más comunicable.*

Leonardo Da Vinci

1452- 1519



Dedicatoria

*A mi madre, Ismaire Guillen Fresco
Por su amor y su desvelo
A mi esposa Charlene Yaredis Ntsiba Berg
A mi hija Brenda Téllez Ntsiba
A Jean Claude Barteley y Rosa*



Agradecimientos

A mis tutoras Dra.C. Suyen Rodríguez Pérez y Dra.C. Teresita Rodríguez Obaya por sus orientaciones, apoyo y estímulo en el desarrollo de este trabajo.

A la Ing. Lisset Casado Maceo por brindarme su apoyo permanente durante el desarrollo de este trabajo y las horas interminables del transcurso de la maestría.

Al Lic. Jorge Infante por su apoyo, confianza y contribución en mi formación como profesional.

Al MSc. Pablo de los Ángeles Vitón por toda la experiencia transmitida, ayudando a mi formación como especialista de fermentación.

A mis compañeros de trabajo Ing. Alexi, Ing. Henry, MSc. Osmany y Lic. Karina por su amistad y todos los momentos de buenas y de malas que hemos compartido.

A mi colectivo de Producción de Inóculos y Fermentaciones por la preocupación y afecto brindado durante todo este tiempo.

A mis nuevos compañeros de departamento Logística-Comercial, por haberme recibido y acogido entre ellos.

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

A todo el personal del LABEX-CIM, que de una forma u otra participaron en mi formación como profesional.

Al colectivo de profesores de la Maestría de Biotecnología, en particular a la profesora Dra.C. Rosa Catalina por los conocimientos transmitidos.

A mis compañeros de la maestría que compartieron clases durante estos dos años.

A Fernando y Ana por su apoyo y preocupación.



RESUMEN

El ior® t4 anti-CD4, se utiliza para cuantificar las subpoblacionales linfocitarias t4 a partir de muestra de sangre humana. Este diagnosticador tiene el anticuerpo monoclonal anti-CD4 como ingrediente farmacéutico activo. El presente trabajo tiene como objetivo la propuesta de un proceso productivo *in vitro* para la obtención del anticuerpo monoclonal anti-CD4. Primeramente, se realizó la caracterización de la cinética de crecimiento y producción del Híbrido t4 anti-CD4 en medio de cultivo PFHM-II, en frascos Rollers y en el Biorreactor de olas. El sobrenadante de fermentación mantuvo las mismas características de calidad descritas para la molécula obtenida por el proceso *in vivo*. También se estableció el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad, obteniéndose una pureza superior al 99 % para los lotes purificados. A partir de los resultados experimentales se realizó la propuesta del proceso productivo para satisfacer la demanda de 1g de producto. El análisis económico demostró las ventajas del nuevo proceso sobre el proceso tradicional empleado en LABEX, se determinó el costo directo de producción con un valor de 1546,93 UM.



ABSTRAC

ior® t4 Anti-CD4 is used to quantify subpopulations t4 lymphocyte from a human blood sample. This diagnostizer has the anti-CD4 monoclonal antibody as an active pharmaceutical ingredient. The present work aims at the proposal of an *in vitro* production process for obtaining the anti-CD4 monoclonal antibody. First, the characterization of the growth kinetics and production of Hybridoma t4 anti-CD4 in PFHM-II culture medium was carried out, in Rollers bottles and in Wave Bioreactor. The fermentation supernatant maintained the same quality characteristics as described for the molecule obtained by the *in vivo* process. The purification process was also established by affinity chromatography, obtaining a purity greater than 99% for the purified batches. From the experimental results the proposal of the productive process was made to satisfy the demand of 1g of product. The economic analysis demonstrated the advantages of the new process on the traditional process used in LABEX, the direct cost of production was determined with a value of 1546.93 UM.



Glosario de términos:

Ac: anticuerpo

AcM: anticuerpo monoclonal

ARN: ácido ribonucleico

cel: células

CENPALAB: Centro Nacional de Producciones de Animales de Laboratorios

CO₂: dióxido de carbono

CUP: Peso Cubano

d: días

"ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Siglas del inglés: Enzymelinked ImmunoSorbent Assay).

Fab: fragmento de unión al antígeno

Fc: fragmento cristalizante

g: gramo

h: hora

HAMA: respuestas humorales de anticuerpos humanos antiratón (del inglés human anti-mouse antibody reaction)

IFA: ingrediente farmacéutico activo

Ig: inmunoglobulinas

kDa: kilo dalton

l: litro

LABEX: Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales

LAM: líquido ascítico murino

M: molar

mA: mili ampere

MHC: Complejo de Histocompatibilidad

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar



NaCl: cloruro de sodio

nm: nanómetro

°C: grados celcius

PBS: buffer fosfato salino

pI: punto isoelectrico

PNO: Procedimiento Normalizado de Operación

rpm: revoluciones por minuto

SC: sobrenadante de cultivo

SFB: suero fetal bovino

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SN: Sobrenadante

SNc: Sobrenadante concentrado

TCR: Receptor de linfocitos T

UM: unidad monetaria

v/v: Relación volumen-volumen

V: Voltios

VIH: Virus de inmunodeficiencia adquirida

w/v: relación peso-volumen

Yp/s: rendimiento producto-sustrato

μl: microlitro

μm: micrómetro

%: porciento



1. INTRODUCCION	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. ANTICUERPOS: CARACTERÍSTICAS Y SUS APLICACIONES	3
2.2. LOS HIBRIDOMAS.	5
2.3. LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	6
2.3.1. Los Medios de Cultivo.	7
2.3.2. Etapas del Crecimiento Celular.	8
2.3.3. Variables críticas del Proceso de Producción de Anticuerpos.....	10
2.4. BIORREACTORES	12
2.4.1. Biorreactores de tanque agitado.	12
2.4.2. Biorreactores desechables.....	13
2.5. MODOS DE OPERACIÓN DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS.	15
2.6. PROCESOS DE PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. HIBRIDOMA.....	18
3.2. MEDIO DE CULTIVO.....	18
3.3. PREPARACIÓN DEL CULTIVO CELULAR.	18
3.4. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL HIBRIDOMA T4 anti-CD4.	19
3.5. CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD4.....	22
3.6. PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL.	23
3.7. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	24
3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1. ESTUDIO CINÉTICO DEL HIBRIDOMA T4 ANTI-CD4 EN ROLLER.	29
4.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN PARA LA FERMENTACIÓN CONTINUA.....	32
4.3. ESTABLECIMIENTO DEL PROCESO PRODUCTIVO.....	37
4.3.1. Preparación del Medio de Cultivo.	38
4.3.2. Montaje del Fermentador.	38
4.3.3. Obtención del Inóculo.	38
4.3.4. Corrida de Fermentación.....	39
4.4. CLARIFICACION Y CONCENTRACION DEL SOBRENADANTE.	41
4.5. PURIFICACION DEL ANTI-CD4.....	44
4.6. VALORACIÓN ECONÓMICA DEL PROCESO PRODUCTIVO “in vitro”.....	47
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	49
6. BIBLIOGRAFÍA.....	51
7. ANEXOS.....	58



1. INTRODUCCIÓN

Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX) es un centro dedicado a la investigación, desarrollo y producción, con la aplicación de las técnicas de la biotecnología industrial a la producción y comercialización de medios diagnósticos. Esta unidad realiza un aporte significativo al sistema de salud, poniendo a su disposición productos de interés y amplio uso en el mercado internacional, los cuales son utilizados en la clasificación de grupos sanguíneos y seguimiento de enfermedades del sistema inmune. Uno de estos productos es el ior® t4 anti-CD4 que se emplea para cuantificar las subpoblacionales linfocitarias t4 a partir de muestra de sangre humana (www.cim.co.cu).

Este diagnosticador tiene el anticuerpo monoclonal (AcM) anti-CD4 como ingrediente farmacéutico activo (IFA), el cual se obtiene en LABEX utilizando Biomodelos Animales, empleándose alrededor de 500 ratones balb/c para producir un litro de líquido ascítico murino (LAM), materia prima que es purificada para obtener el producto final (1).

Esta tecnología de producción fue la primera que surgió para la producción industrial de anticuerpos monoclonales y aunque tiene la ventaja de rendir concentraciones de producto relativamente altas, es necesario utilizar miles de animales para obtener cantidades en el orden de los miligramos o gramos de producto. Además, se hace muy difícil purificar el LAM por la diversidad de biomoléculas que contiene incluso como anticuerpos, haciendo más costoso el proceso productivo. Por otro lado, resulta hoy en día un problema ético el empleo de los animales en la biotecnología, además de que el precio de compra y traslado de los mismos al laboratorio se eleva cada vez más y pone riesgo las producciones, por contar con sólo un proveedor de biomodelos animales certificados en todo el país: el Centro Nacional de Producciones de Animales de Laboratorios (CENPALAB) (www.biocubafarma.cu).

Para superar estos aspectos es necesaria la transición a la tecnología *in vitro*, proponiéndose el empleo de fermentadores de ola, los cuales permitirán obtener mayores volúmenes de productos a partir de sobrenadante de cultivo (SC).

El producto de estas fermentaciones será procesado igualmente por técnicas de extracción y purificación, para alcanzar altos niveles de pureza que no permitan interferencias en el diagnóstico a los pacientes. En la transición de tecnologías para obtención de productos, LABEX debe cumplir también con los principios y regulaciones de las producciones farmacéuticas, sometidas a



constantes inspecciones por autoridades sanitarias nacionales, enfocadas a comprobar la calidad de los productos, instalaciones y procesos.

MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

PROBLEMA:

La necesidad de obtener un anticuerpo monoclonal Anti-CD4 en un sistema de producción *in vitro*, que permita obtener mayores volúmenes de IFA a procesar y pueda ser empleado en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades del sistema inmune.

HIPÓTESIS:

Si se establece un proceso productivo *in vitro* se dispondrá de mayores cantidades de una molécula anti-CD4, a un costo menor y que cumpla con los parámetros de calidad establecidos.

OBJETIVO GENERAL:

Proponer un proceso de producción en fermentador de ola para la obtención del Anticuerpo monoclonal Anti-CD4.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Estudiar el comportamiento del Hibridoma t4 productor del anticuerpo monoclonal Anti-CD4 en un fermentador de ola.
- 2- Establecer parámetros operacionales del proceso productivo.
- 3- Evaluar un proceso de separación de la molécula anti-CD4 a partir del sobrenadante de cultivo del fermentador.
- 4- Establecer una comparación entre la producción de Anti-CD4 *in vivo* e *in vitro*.



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANTICUERPOS: CARACTERÍSTICAS Y SUS APLICACIONES

Los anticuerpos son glicoproteínas (proteínas que contienen azúcares) que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). En los mamíferos, hay cinco clases de Ig: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. En algunos mamíferos, las IgG e IgA se dividen en subclases, que se refieren a sus isotipos debido a polimorfismos existentes en la región conservada de la cadena pesada. Estos diferentes isotipos desempeñan funciones diferentes y ayudan a dirigir la respuesta inmune adecuada para cada tipo diferente de “agente” extraño (antígeno). Independientemente de la clase de anticuerpo, todas las inmunoglobulinas contienen un dominio estructural común y se componen de dos copias idénticas.

La **Figura 1** muestra la estructura de una molécula de inmunoglobulina, e ilustra las partes principales del anticuerpo: Las cadenas pesadas aparecen en negro y las ligeras en gris claro. CH son los dominios de la región constante de la cadena pesada; CL es el dominio constante de la cadena ligera. En COOH se identifica el extremo carboxiterminal y con NH, el extremo aminoterminal; mientras Fab y Fc son los fragmentos resultantes de proteólisis. VH es el dominio variable de la cadena pesada; VL, dominio variable de la cadena ligera; mientras en línea discontinua (- - -), se identifican los puentes disulfuros.

Durante la década 1970-1980 se desarrollaron las herramientas que permitieron aislar e immortalizar células productoras de anticuerpos (2; 3). Estas constituyen clones parentales, pues todas las células hijas generadas por división celular de un único clon parental sintetizan anticuerpos con una secuencia aminoacídica similar, es decir, anticuerpos con estructuras similares que reconocen un único epítipo en el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales murinos han sido ampliamente utilizados en la producción de inmunodiagnosticadores y también con fines terapéuticos, pero con menos éxito en esto último; pues el cuerpo humano desarrolla anticuerpos propios dirigidos contra estos AcM murinos, lo que se conoce como respuesta HAMA (*siglas en inglés para Human Anti Mouse Antibodies*) provocando reacciones de toxicidad, poca eficacia en el tratamiento, rápida neutralización y eliminación de los anticuerpos terapéuticos (4; 5).



El mercado de los Anticuerpos monoclonales ha tenido una tendencia a subir en los últimos años del presente siglo, y ya en el 2011 se habían comercializados unos 28, por compañías de Estados Unidos de América (EE. UU) y la Unión Europea (UE). Hoy en día, unos 10 monoclonales son

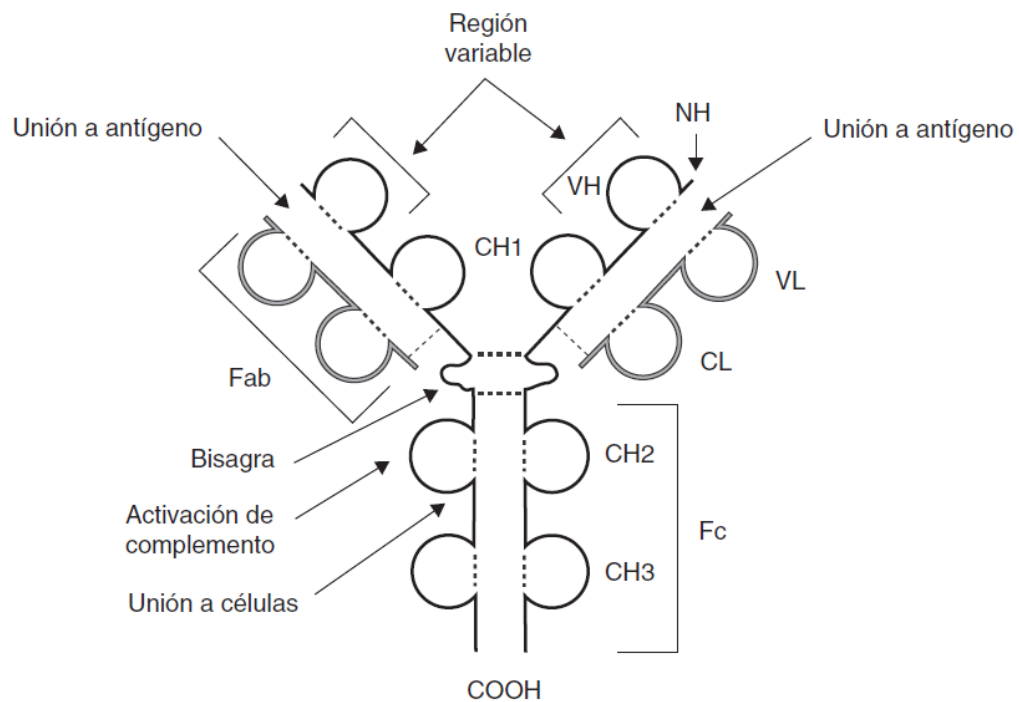


Figura 1. Estructura básica del anticuerpo IgG (6).



ampliamente utilizados, capaces de generar beneficios de más de 1000 millones de dólares cada uno, a las compañías que los comercializan. En el 2012, las ventas mundiales de productos terapéuticos basados en anticuerpos monoclonales superaron los 50 000 millones de dólares. De los 15 medicamentos más vendidos en ese año, seis son moléculas basadas en anticuerpos (7).

En el caso del diagnóstico clínico, existen alrededor de 100 kits diagnósticos diferentes basados en la tecnología de anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado, con aplicaciones en técnicas tan variadas como el Western blot, la inmunocitoquímica, la inmunohistoquímica, el ELISA, la inmunoprecipitación y la citometría de flujo, entre otras (8). De igual forma se ha presentado el reto de lograr procesos más fiables y seguros en una industria donde existe un alto nivel de regulación de los procesos productivos (9).

Por supuesto, nuevos anticuerpos terapéuticos y para diagnóstico vienen en camino, dado el creciente número de estos medicamentos en diferentes fases de ensayo clínico; así como, las utilidades y especificidades de detección de enfermedades, mediante su uso.

El anti-CD4 es utilizado en la immuno-fenotipificación de linfocitos, se aplica ampliamente para el diagnóstico de inmunodeficiencias como la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Esta molécula reacciona con una glicoproteína de aproximadamente 59 kDa de peso molecular, presente en la mayoría de las células T humanas del subtipo auxiliar/ inductor. Esta glicoproteína regula la función del complejo CD3 / TCR, actúa como receptor del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y para las moléculas del Complejo de Histocompatibilidad (MHC) clase II. Se establece que el recuento de la población CD4 en paciente sano debe estar en el rango 32,3% -56,7%, con un promedio de aproximadamente el 45,37% (10).

2.2. LOS HIBRIDOMAS.

El primer método para producir anticuerpos homogéneos o monoclonales con una especificidad conocida fue descrito por Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975. El mismo está basado en la hibridación de linfocitos B procedentes de un Biomodelo previamente inmunizado (generalmente ratón), con células de un mieloma blanco que no secreta anticuerpos y puede dividirse indefinidamente en cultivo celular. Estos aprovechan la especificidad de la molécula de anticuerpo generada por el linfocito B y la capacidad indefinida de división celular del mieloma generando clones específicos. 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), el NS0 y el SP2/0-Ag14) (3; 11; 12).

Durante la técnica de fusión celular no existe forma de controlar la dotación cromosómica de la futura célula híbrida, ya que el núcleo híbrido se forma al azar. De esta manera, gran parte del éxito de la técnica de obtención de un Hibridoma descansa en una correcta selección del clon adecuado entre la gran variedad de clones formados de manera aleatoria. Esto se lleva a cabo básicamente sembrando clones celulares en pocillos individuales, en un medio selectivo conocido como medio HAT, en el cual crecen solamente las células resultantes de la hibridación mieloma-linfocito B. El sobrenadante de cultivo de los pocillos donde hubo crecimiento es estudiado para determinar la presencia de anticuerpos con las características inmunoquímicas deseadas. De esta forma se selecciona el clon adecuado, el cual es expandido en cultivo celular y luego conservado por congelación (2).

La producción económica de proteínas recombinantes en células de mamíferos es dependiente de la selección de las líneas celulares altamente productoras. Este proceso de selección conlleva elevados costos, tiempo, trabajo y depende en gran medida de las habilidades del investigador. Las moléculas de anticuerpos son estructuralmente grandes y complejas, necesitan un correcto plegamiento y ensamblaje de las cadenas polipeptídicas que las conforman, así como de la incorporación de otros elementos no proteicos para lograr las propiedades que poseen. Estas características dificultan notablemente el empleo de microorganismos como sistemas de expresión, aunque se ha logrado expresar con éxito fragmentos de anticuerpos en bacterias (13; 14). Por lo que, es limitado el uso de estas técnicas de ingeniería genética para reducir los costes asociados a procesos productivos y se concentran los esfuerzos en la obtención de mejores Hibridoma o las constantes mejoras en los diseños productivos y las etapas o procesos que lo componen.

2.3.LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

A partir del surgimiento de la tecnología del Hibridoma, se desarrolló la tecnología de producción de AcM inoculando una cantidad discreta del Hibridoma murino secretor, expandido en cultivo en la cavidad peritoneal de ratones compatibles. La misma crece, se desarrolla como un tumor y el LAM es el que se extrae mediante punciones sucesivas en la cavidad peritoneal hasta que el animal muere. El método de producción de AcM en ascitis murina tiene como principales ventajas que no requiere servicios ingenieros de envergadura, ni alto nivel de capacitación del personal; además



que el AcM se obtiene en concentraciones relativamente elevadas, por lo que reduce la probabilidad de pasos posteriores de concentración del producto.

Entre las principales desventajas están la manipulación simultánea de un número elevado de animales inmunodeficientes en áreas bajo condiciones ambientales controladas, lo que limita el escalado productivo; el proceso tiene un bajo nivel de automatización y control, lo que trae consigo alta variabilidad entre lotes, un alto perfil de impurezas proteicas y no proteicas en la ascitis, en la que se incluyen anticuerpos generados por el hospedero; y la posible presencia de agentes infecciosos de origen murino (15; 16). Por otro lado, la técnica está restringida a Hibridoma murinos compatibles con la línea de ratones empleada y no menos importante son las implicaciones éticas referidas a un método que aporta un estrés significativo a los animales, los cuales irremediablemente mueren al final del proceso de extracción de ascitis (17).

Simultáneamente al uso del método de producción de AcM vía ascitis murina, se fueron desarrollando tecnologías de producción *in vitro* en la medida en que la adaptación de la tecnología de fermentación clásica a los requerimientos de las células animales lo permitió, asociado además al desarrollo de sistemas de producción novedosos. La tecnología de producción de AcM mediante biorreactores ha ganado terreno hasta imponerse en la actualidad sin que la producción de ascitis haya caído totalmente en desuso. La tendencia actual refleja el peso del componente bioético en el uso de ratones para la producción de anticuerpos en líquido ascítico. Se reducen paulatinamente los organismos reguladores que aprueban el uso de ratones para estas producciones, justificando el uso de los mismos en la producción de AcM cuando se ha demostrado que los métodos *in vitro* desarrollados en la actualidad resultan inadecuados para una línea celular Hibridoma con un propósito particular (18).

2.3.1. Los Medios de Cultivo.

Las células animales provienen de ambientes naturalmente asépticos y altamente controlados desde el punto de vista físico, químico y bioquímico. Su desarrollo y cultivo fuera de sus localizaciones naturales, requieren el empleo de medios diseñados para suplementar sus amplios requerimientos y condiciones similares a *in vivo*. En general, los medios de cultivo para células de mamíferos están compuestos por una mezcla de aminoácidos esenciales y no esenciales, glucosa, lípidos, vitaminas, sales inorgánicas y otros elementos como tampones de pH, agentes antioxidantes, agentes protectores de las células ante el estrés hidrodinámico, factores de crecimiento y antibióticos, entre otros.



Los primeros medios de cultivo diseñados para células animales fueron medios basales cuya composición trataba de imitar la composición del suero sanguíneo. Varios de estos medios son usados en la actualidad y se caracterizan por la necesidad de ser suplementados con suero animal, pues si no se emplea como aditivo las células en cultivo degeneran y mueren (19).

En los medios libres de suero las células deben adaptarse a un nuevo ambiente donde los factores promotores del crecimiento que posee el suero están ausentes. En muchas ocasiones la adaptación es lenta, ocasionando cambios en los patrones de crecimiento y productividad de la línea celular.

En la actualidad, el suero animal mayoritariamente utilizado es el suero fetal bovino (SFB), el cual es capaz de promover el crecimiento de una amplia variedad de tipos celulares (20). Su disponibilidad y fácil conservación, junto a su rica composición de nutrientes y factores de crecimiento, así como su baja concentración de gammaglobulinas en comparación con otros sueros animales, ha conducido a su adopción como el suplemento estándar de medios basales. Este generalmente se emplea entre un 5 % y un 10 % (v/v) del medio seleccionado (21).

Existen casos en que las células no logran adaptarse a un medio en particular, aún con suplementación de sueros, problema que podría superarse probando con otras formulaciones. Los propietarios intelectuales de las formulaciones libres de suero mantienen protegida la composición del medio de cultivo, de ahí su alto componente innovador, lo que puede dificultar la interpretación de resultados y la optimización del proceso de fermentación (22).

Aunque la ausencia de suero en la composición minimiza las impurezas que acompañan al producto, aspecto importante para la etapa de purificación, se mantienen otras proteínas liberadas por las células en cultivo que pueden tener efectos perjudiciales, como es el caso de las proteasas (23; 24). Al retirar el suero también se pierde el efecto protector del mismo ante el estrés hidrodinámico, problema que suele solucionarse añadiendo suplementos sustitutos para esta función en particular (25; 26) (27).

Ambas estrategias, las variantes de medios suplementados con sueros animales y medios no suplementados, resultan aspectos que deben ser estudiados en las investigaciones de optimización de producciones de AcM, como etapas críticas del proceso.

2.3.2. Etapas del Crecimiento Celular.

Las células animales muestran una curva de crecimiento semejante a la observada en el crecimiento microbiano en cultivos sumergidos (**Fig. 2**) (28).

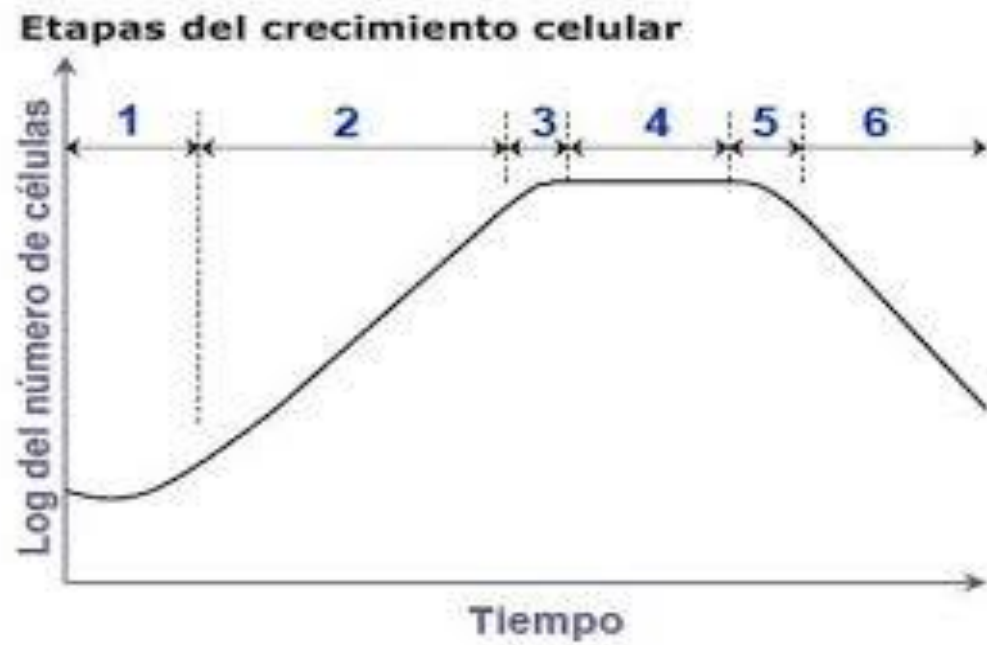


Figura. 2 Curva de crecimiento de un cultivo de células.



Las cinéticas del crecimiento celular y de producción de determinadas biomoléculas, describen las velocidades de transformación de los nutrientes presentes en el medio de cultivo en biomasa y productos, respectivamente. En general, estas velocidades se calculan determinando en intervalos regulares de tiempo, la concentración específica de la sustancia que se consume o se produce, así como la concentración celular en el cultivo (29). Según la fase en la cual se determina, pueden darnos información valiosa para evaluar el crecimiento, o la propia producción de los compuestos de interés. Las diferentes fases que se describen son:

- **Fase de adaptación:**

Durante la fase de adaptación o rezago, las células se adaptan a las condiciones de crecimiento. Es el período en el que las células individuales están madurando y no tienen aún la posibilidad de dividirse. Durante la misma se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas (30).

- **Fase exponencial:**

La fase logarítmica o exponencial es un período caracterizado por la duplicación celular. El número de nuevas células que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población actual. Si el crecimiento no se limita, la duplicación continuará a un ritmo constante, por lo tanto, el número de células de la población se duplica con cada período de tiempo consecutivo. Para este tipo de crecimiento exponencial, la representación gráfica del logaritmo del número de células frente al tiempo genera una línea recta, de ahí su nombre. El crecimiento exponencial no puede continuar indefinidamente, porque el medio llega pronto al agotamiento de nutrientes, mientras se acumulan los desechos. Es por ello que la extensión de esta fase y la velocidad que la caracteriza, estarán afectadas por las condiciones de crecimiento que afecta a la frecuencia de los eventos de división celular y a la probabilidad de que ambas células hijas sobrevivan (30).

- **Fase de Aceleración negativa:**

Describe el período intermedio entre la fase exponencial y la fase siguiente, conocida como fase estacionaria. En la curva de crecimiento se muestra como la zona donde la pendiente de la curva al final de la fase exponencial comienza a disminuir, debido a que los nutrientes alcanzan valores de concentración sub-óptimos, por lo que el desempeño del cultivo comienza a limitarse. La concentración de células continúa aumentando, pero esta vez a una velocidad inferior a la velocidad específica de crecimiento máxima, y va disminuyendo paulatinamente. Durante esta etapa ocurre un empobrecimiento del medio de cultivo, acompañado de la inducción de síntesis de metabolitos



que pueden resultar tóxicos o inhibitorios para el crecimiento. Esta fase se conoce también como fase limitante (31).

- **Fase estacionaria:**

Las condiciones del cultivo se han vuelto desfavorables hasta el punto en que la velocidad específica de muerte celular se iguala a la velocidad específica de crecimiento, por lo que la concentración de células vivas se mantiene relativamente constante en su valor máximo. Durante esta etapa ocurren cambios importantes en la fisiología del cultivo, pues las células en cultivo deben adaptar su maquinaria metabólica a un escenario adverso (30).

- **Fase de muerte:**

Por último, las condiciones del cultivo se han vuelto más agresivas, las reservas de energía del medio de cultivo están exhaustas, la velocidad de muerte supera a la velocidad de crecimiento. La concentración de células vivas disminuye, llega a ser superada por la concentración de células muertas y se observa una caída progresiva de la viabilidad del cultivo.

Al realizar estudios cinéticos se puede llegar a conocer como se relaciona la velocidad de producción de la línea celular con las diferentes fases del cultivo, brindando una información valiosa a la hora de establecer estrategias en el diseño del proceso de fermentación (30).

2.3.3. Variables críticas del Proceso de Producción de Anticuerpos.

En la producción de Anticuerpos existen varios factores o variables que requieren ser atendidos para llevar eficientemente el proceso. A continuación, esbozaremos algunos de ellos, que además pueden ser manipulados durante un proceso de optimización o mejoras, teniendo resultados superiores a los que tradicionalmente se obtenían.

- **Temperatura:**

Es una de las variables críticas más estudiadas en el mantenimiento saludable de los cultivos celulares. Pequeñas variaciones en este parámetro pueden conducir a la muerte del cultivo, o a serias alteraciones de la cinética de crecimiento y producción de las células (32). Aunque la temperatura ideal para el crecimiento de la mayoría de las células de mamíferos es 37 °C, se ha observado que puede no ser la temperatura ideal para la producción de anticuerpos monoclonales y otras proteínas recombinantes (33).



- **pH:**

Es considerado uno de los parámetros más importantes para el cultivo de células de mamíferos, por el impacto que causa su variación sobre el crecimiento del cultivo, la productividad, el metabolismo celular, y la glicosilación de las proteínas. El cultivo debe mantener valores de pH similares a los fisiológicos, evitando la tendencia a la basicidad excesiva en los inicios del cultivo, y sin caer muy por debajo de 7.0 durante el resto del tiempo. Valores entre 6.6 y 7.4 son usualmente aceptables (34). Los valores más altos dentro del rango aceptable favorecen el crecimiento celular. Al transcurrir el tiempo y acumularse sustancias acidulantes como el ácido láctico, el valor de pH disminuye desfavoreciendo el crecimiento celular, pero esta condición puede mejorar la productividad específica (35).

- **Demanda de Oxígeno (DO):**

Las células de mamíferos requieren oxígeno para la producción de energía a partir de fuentes orgánicas de carbono. Mantener oxígeno disponible en el cultivo es un parámetro importante para el cultivo. La cantidad de oxígeno disuelto (DO) en el medio depende de diversos factores, entre los que se encuentran la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR, *siglas en inglés para Oxygen Transference Rate*), que depende a su vez de la geometría del sistema y del mecanismo de suministro de oxígeno, la temperatura, la presión parcial de oxígeno, la presión total dentro del equipamiento de fermentación, la velocidad de agitación y la velocidad con que ocurren los procesos de transferencia de masa en el equipo. Otros factores a tener en cuenta son la velocidad de crecimiento celular, las fuentes de carbono y la velocidad específica de consumo de oxígeno por las células, lo que conduce a estado de equilibrio dinámico de DO. Aunque la DO no afecta negativamente los niveles de crecimiento celular y de producción en un rango relativamente amplio (entre 20 y 100 % de saturación de aire), en ocasiones puede tener consecuencias negativas en la calidad del producto, específicamente en los patrones de glicosilación. Por otro lado, niveles bajos de DO en el cultivo pueden afectar la viabilidad celular (36). Durante el escalado puede resultar problemático mantener los niveles correctos de DO en el cultivo porque los métodos existentes para este propósito no aseguran alta oxigenación sin causar algún daño celular (37; 38; 39). Incrementar los niveles de DO en el cultivo, minimizando los daños celulares es objeto de investigación y desarrollo en la actualidad (40).



2.4. BIORREACTORES

Un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos; en muchos casos son procesos fermentativos, de ahí que reciban igualmente el nombre de fermentadores. Este proceso que se desarrolla en su interior puede ser aerobio o anaerobio, en dependencia de la presencia o no de oxígeno. Podemos encontrar biorreactores de variadas formas, volúmenes, materiales de construcción, formas de operar, etc. (Anexo 1). Los que más comúnmente observamos en las industrias son de geometría cilíndrica, variando en tamaño desde algunos milímetros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados en acero inoxidable.

2.4.1. Biorreactores de tanque agitado.

El biorreactor de tanque agitado está constituido por un vaso provisto de uno o varios impelentes para mantener la homogeneidad dentro el mismo (**Fig. 3**). La biomasa y los gases se encuentran en el seno del líquido formando parte de una única mezcla. La adición de oxígeno al interior del vaso tiene varias maneras de realizarse. La más difundida es a partir de un aditamento horadado que se coloca en la parte inferior (“*sparger*”) y que suministra un flujo de burbujas de aire que además de aportar el oxígeno al cultivo, contribuye a mantener la mezcla entre las capas del líquido. Sin embargo, este modo de oxigenación se reporta como la fuente de mayor aporte de esfuerzos mecánicos para el cultivo en suspensión, mayor aún que los introducidos por la agitación (41). Como se había comentado, se ha reportado que el empleo de medios libres de suero eleva la sensibilidad del cultivo a dichos esfuerzos (23).

La principal ventaja que ofrecen los biorreactores de tanque agitado es la posibilidad del escalado. La mayor escala actualmente reportada para la explotación industrial, es 20 000 l para la operación de cultivos por lote o “*batch*” y por lote incrementado o “*fed batch*”, y de 2 000 l para la operación en perfusión con el empleo de “*spinfilter*” como aditamento de retención celular (22).



Figura. 3 Biorreactor de tanque agitado de 1500 L empleado en las producciones del Centro de Inmunología Molecular.



2.4.2. Biorreactores desechables.

En la industria biofarmacéutica actual, los requerimientos para el diseño de un biorreactor difieren sustancialmente de aquellos de hace 50 años. Hoy en día las nuevas estrategias de cultivo permiten obtener alta densidad celular, con altos rendimientos de productos biotecnológicos, que deben cumplir con elevados estándares de calidad y normatividad compleja en su producción. Lo anterior obliga el desarrollo de nuevas tecnologías para suplir estas necesidades, por lo que en los últimos diez años el diseño y uso de biorreactores desechables ha crecido notablemente.

Los biorreactores de un solo uso, disponibles por varios proveedores, hoy en día son robustos y proporcionan el alto rendimiento necesario para la fabricación comercial de productos biofarmacéuticos. Los avances significativos en los diseños de estos biorreactores, mecanismos de agitación acoplados y sus sistemas de sensores, han contribuido a la adopción creciente de reactores desechables desde el laboratorio a la escala de producción. Los proveedores de biorreactores desechables, siguen trabajando estrechamente con los clientes para atender las necesidades cambiantes, como premisa para su empleo en tecnologías de alto requerimientos basados en las de las terapias celulares y génicas de próxima generación y el bioprocesamiento continuo (42).

Los beneficios de la tecnología desechable son principalmente: la eliminación de largos procesos de limpieza, esterilización, calificación, validación, reducción de tiempo entre lotes; el procesamiento de diferentes productos en la misma área; entre otros, lo que conlleva a la disminución de los costos que implican esta serie de procedimientos, haciendo cada vez más accesibles económicamente su empleo a escala industrial. Estos han sido diseñados en su mayoría para cultivos con baja demanda de oxígeno y calor, pues las velocidades de agitación y capacidades de transferencia de oxígeno y calor son en general menores que las que pueden alcanzarse en biorreactores convencionales de acero inoxidable (43; 44). Un ejemplo de biorreactor desechable es el de Olas.



- **Biorreactor de Ola**

Este consiste en una bolsa desechable, pre-esterilizada, flexible en forma de “almohada” y colocada en una superficie que se mueve (**Fig. 4**). El control de temperatura se lleva a cabo en la superficie metálica sobre la que descansa la bolsa, y el oxígeno disuelto y el pH son medidos en línea por electrodos desechables, controlados por un sistema de adquisición y control adicional. La bolsa se llena con medio de cultivo hasta la mitad de su capacidad y es inflado con aire (oxígeno o mezclas de gases) usando un filtro también desechable de 0.22 μm . Un gran número de compañías presentan diseños similares. Ejemplos de estos son comercializados en el mercado farmacéutico como el Wave Bioreactor® o el Appiflex®, de Applikon (www.applikonbio.com) (ver figura 4); o los BIOSTAT® y el CultiBag RM®, de Sartorius-stedim (www.sartoriusstedim.com), los que han sido ampliamente comercializado por tener un sistema robusto de adquisición y control de los parámetros de cultivo como lo es el BioPAT® que es de gran aceptación entre operarios e ingenieros de proceso.



Figura 4. Wave Bioreactor® de Sartorius-stedim (www.sartoriusstedim.com).



2.5. MODOS DE OPERACIÓN DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS.

Los bioprocesos o fermentaciones pueden ser clasificados en función de su modo de operación en (45; 46):

- Fermentaciones en lote (Batch).

Se trata de un sistema cerrado, en el que en al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. En los procesos a escala industrial, se interrumpe la fermentación al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte celular (metabolitos secundarios). Se trata de un método robusto, bien conocido y que precisa de instalaciones simples. Sin embargo, la utilización de los medios materiales y humanos no es óptima, por cuanto se ha de comenzar cada ciclo nuevamente después de reponer los medios e inóculos.

- Fermentaciones en lote incrementado (Feed-batch).

Es básicamente similar a la fermentación discontinua, pero en este caso, algunos sustratos se añaden paulatinamente a diferentes intervalos de tiempo a lo largo del proceso, reponiendo los nutrientes agotados al cultivo celular. También es un método robusto, bien conocido, que precisa de instalaciones simples, además, ofrece una mejora en la producción.

Sin embargo, la utilización de los medios materiales y humanos sigue sin ser óptima (47).

- Fermentaciones en Continuo.

En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de cultivo con los microorganismos, se extrae simultáneamente del sistema. Se trata de un proceso continuo que permite una buena utilización de los recursos materiales y humanos. Sin embargo, requiere una atención mucho mayor que los modos de operación anteriores para lograr el mantenimiento de la estabilidad, por ejemplo, en la composición del sustrato y de la esterilidad del sistema.

- Fermentaciones en Perfusión.

Esta operación es semejante al modo continuo. La diferencia consiste en que las células se mantienen dentro del fermentador mediante un dispositivo de retención celular, los cuales presentan variados diseños y operan bajo diferentes principios de operación, y en dependencia de esto pueden hallarse ubicados adentro o afuera del biorreactor. La perfusión es frecuentemente



empleada para aumentar la baja productividad inherente a los procesos productivos basados en células de mamíferos (48; 49). El modo de cultivo en perfusión permite mantener altas concentraciones celulares durante largos períodos de tiempo y cosechar una mayor cantidad de producto que en los otros modos de cultivo ya antes mencionado, 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 (50).

- Fermentaciones en semicontinuo.

Es básicamente similar a la fermentación discontinua, pero en este caso, la fermentación no termina cuando se alcanza el volumen de trabajo, se le extrae un volumen determinado (no superior al 10 %) en la misma medida que algunos sustratos se añaden escalonadamente a lo largo del proceso. También es un método robusto, bien conocido, que precisa de instalaciones simples, además, ofrece una mejora en la producción. Sin embargo, la utilización de los medios materiales y humanos sigue sin ser óptima (47; 51).

2.6. PROCESOS DE PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Las células y organismos contienen una gran cantidad de componentes diferentes, muchos de los cuales tienen propiedades similares, lo que dificulta su separación o purificación. Entre ellos, las proteínas constituyen una fracción sustancial y son el objetivo más habitual de las técnicas bioquímicas de purificación, y el que precisa y permite más variedad de ellas por la heterogeneidad de sus características (52; 53).

Para la purificación de estas moléculas como paso previo a su estudio o utilización, suele ser necesario utilizar uno o varios pasos, que consisten en procedimientos de fraccionamiento o separación de manera progresiva de las proteínas de otras sustancias, en los que se aprovechan sus propiedades fisicoquímicas. La idea principal no es tanto minimizar la pérdida de proteína, como la de eliminar los otros componentes de la mezcla, de manera que solo quede la sustancia requerida o de interés (52; 54).

Las técnicas de purificación son aplicables a la la mayoría de las muestras biológicas y entre ellas, las técnicas cromatográficas son las que tienen mayor versatilidad y aplicación, aunque también se suelen aplicar otras como la precipitación diferencial o el isoelectroenfoque. Los procedimientos para separación cromatográfica de proteínas y otras biomoléculas suelen basarse en uno o varios



criterios: solubilidad, carga iónica, polaridad, tamaño y forma molecular, unión específica a otras moléculas, entre otros (55).

En general, para el trabajo con anticuerpos nos referiremos a biomoléculas o solutos tipo proteínas, que son los grandes protagonistas de los procesos cromatográficos bioquímicos.

Aunque los anticuerpos muestran una alta variabilidad en cuanto a orígenes, clases y subclases, los elementos básicos en las estrategias generales de purificación tienen un carácter genérico, los que permiten un enfoque global durante el desarrollo de estos procesos. Estos principios básicos como captura, purificación intermedia y pulido, son claves en el orden de optimizar la calidad, el rendimiento y la productividad global (56). La prioridad es concentrar, y estabilizar el producto lo más pronto posible, removiendo las impurezas críticas durante el procesamiento.

Hay que tomar en cuenta también que las moléculas son sometidas a mayor riesgo de alteración estructural mientras más pasos cromatográficos se empleen, lo que también afecta el recobrado final del producto y su actividad biológica, con repercusiones desde el punto de vista económico y práctico (57).

Las moléculas de anticuerpo varían en su solubilidad y estabilidad frente a factores físico-químicos. El punto isoeléctrico (pI) se encuentra típicamente entre 5-9, y varía principalmente debido al contenido de carbohidratos insertados en la estructura. Las técnicas de purificación de anticuerpos no son muy diferentes a las empleadas en otras proteínas, y se enfocan principalmente en su bioafinidad, carga eléctrica, hidrofobicidad y tamaño molecular (58).

En los procesos más recurridos de purificación de anticuerpos, el primer paso después de la cosecha es la clarificación, de la cual se obtiene una solución libre de células, generalmente diluida, que será aplicada al primer paso de recobrado. En la clarificación el sobrenadante es centrifugado o filtrado a través una cascada de filtración con una porosidad desde 8 μm hasta 0.22 μm paulatinamente (53). El paso de procesamiento siguiente está enfocado en la captura del producto. Existe un número elevado de esquemas propuestos para el recobrado inicial de AcM, destacándose el empleo de la cromatografía de afinidad, técnica que provee una alta selectividad para la molécula de interés (59). Cuando al anticuerpo purificado tiene una aplicación *in vitro*, no se requieren pasos de purificación intermedia pues el paso de captura por cromatografía de afinidad eleva la pureza del producto a más de 95% (55; 60).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. HIBRIDOMA.

El Hibridoma utilizado en este estudio es el **t4 anti-CD4**, para la obtención del AcM anti-CD4. El mismo se encuentra conservado en crioviales, en el banco celular del LABEX, a -196°C y en atmósfera de nitrógeno.

3.2. MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo empleado en este trabajo fue PFHM-II, formulación libre de sueros y proteínas perteneciente a la línea de productos Gibco® de Invitrogen Life Technologies™; (www.lifetechnologies.com). El medio fue suplementado de la siguiente forma (w/v): PFHM II en polvo (15.01 g/l), Bicarbonato de Sodio (2 g/l), L-Glutamina (0.30 g/l), Glucosa (1g/l) y Pluronic F-68 (1 g/l). El medio preparado fue esterilizado por filtración a través de membranas filtrantes con un tamaño de poro de 0.22 µm y posteriormente se le monitoreó la esterilidad a 37 °C durante 48 horas. Se conservó en un rango de temperatura de 2- 8 °C hasta su uso.

3.3. PREPARACIÓN DEL CULTIVO CELULAR.

Se descongeló un criovial del banco maestro de t4 anti-CD4, el cual contenía 10 millones de células en 1 ml de medio PFHM-II para realizar los estudios cinéticos y el inóculo de fermentación. Este cultivo fue transferido a un frasco de 25 cm² e incubado a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %. La expansión de los cultivos, así como la primera etapa del inóculo se realizó en frascos estándar CELLSTAR® para cultivo celular en suspensión desde 50 mL y de 650 mL (*Greiner Bio-one™*) (www.gbo.com).

Los ensayos cinéticos, así como la parte final del inóculo se realizaron en frascos rotatorios, también conocidos como frascos Rollers® (*Greiner Bio-one™*). La velocidad de agitación empleada fue de 6 r.p.m, en una rolera CELLspin®.

La fermentación fue realizada en Biorreactores de Ola (Wave Bioreactor®) de Applikon™, utilizando bolsas desechables de polietileno con volumen total de 50 L y volumen de trabajo de 25 l, controlando la mezcla de gases de aire y CO₂ mediante la unidad de control automático del fermentador (www.applikon-biotechnology.com).



Para conocer diferentes condiciones de operación del biorreactor se estudiaron los factores: volumen y velocidad de agitación. Las variables de respuesta fueron: Concentración de células vivas, concentración de anticuerpos, productividad, tiempo de duplicación y velocidad específica de crecimiento celular.

3.4. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL HIBRIDOMA T4 ANTI-CD4.

La caracterización cinética de crecimiento y producción del Hibridoma t4 anti-CD4 fue realizada en el medio de cultivo PFHM-II.

Para la caracterización del crecimiento en este medio se sembraron tres frascos rollers de 2000 ml con un volumen efectivo de 500 ml, a una concentración de $0,3 \cdot 10^6$ células/ml y viabilidad celular superior al 90 %. A partir de la hora de siembra y cada 24 horas, se tomaron muestras de 1,5 ml de cada frasco. A cada muestra se les determinaron la concentración de células vivas, la concentración de células muertas, la concentración de células totales y la viabilidad celular. Posteriormente cada muestra fue centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante libre de células fue conservado de 4-8°C hasta su caracterización posterior.

También se caracterizan los cultivos realizados en el Fermentador de Ola. Para ello las cosechas de sobrenadante de cultivo obtenidas de la fermentación fueron filtradas, empleando filtros SARTOPORE 2 (Sartorius®) en una cascada de filtración con tamaño de poro desde 8µm hasta 0.22 µm para eliminar todas las células. La concentración del sobrenadante se realizó empleando un cartucho de fibra hueca para hemodiálisis con una porosidad de 30kDa. El sobrenadante de cultivo concentrado, fue conservado en refrigeración de 4-8°C para su posterior procesamiento.

- Valor de concentración celular y la viabilidad del cultivo.

El cálculo de la **concentración celular** y la **viabilidad del cultivo** se efectuaron mediante conteo en Cámara de Neubauer, aplicando el método de exclusión con el colorante vital Tripán azul al 0.4% (61). Primeramente, 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. La cámara montada se observó al microscopio óptico y se contó por separado la cantidad de células vivas (teñidas), muertas (no teñidas) y totales, de los cuatro cuadrantes de la cámara por separado.

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



$$X_{v,m,t} = \frac{S_{v,m,t}}{n} \times Fd \times Fc \text{ --- Ecuación 1}$$

Donde:

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

S_{v,m,t}: suma de la cantidad de las células vivas, muertas o totales según el caso a determinar.

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

Fd: factor de dilución de la muestra en Tripán azul al 0,4 %. En este caso es igual a 2, por resultar el inverso de la dilución (1:2).

Fc: factor constante de la cámara, igual a 10^4 . Es derivado del volumen que encierra un cuadrante de la cámara, en ml.

La viabilidad del cultivo se muestra como el porcentaje que representan las células vivas respecto a las células totales en una suspensión celular. Se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$Vb = \frac{S_v}{S_t} \times 100 \text{ --- Ecuación 2}$$

Donde:

Vb: viabilidad del cultivo (%)

S_v: suma de la cantidad de células vivas.

S_t: suma de la cantidad de células totales.

- Determinación de la Velocidad Específica de Crecimiento (μ).

Se calculó la velocidad específica de crecimiento a partir de la variación de la concentración de células vivas. El valor máximo de velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) se calculó a partir del ajuste lineal de la curva en la fase de crecimiento exponencial. Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento se empleó la fórmula siguiente:



$$\mu_{max} = \frac{\ln x_f - \ln x_0}{t_f - t_0} \text{ --- Ecuación 3}$$

Donde:

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

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

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

t_0 : tiempo transcurrido en el primer punto de fase de crecimiento exponencial (h).

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

- Determinación del Tiempo de Duplicación (t_d).

El tiempo de duplicación consiste en el tiempo en que la concentración celular se duplica, y se calcula en la fase exponencial, empleando la fórmula siguiente:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \text{ --- Ecuación 4}$$

Donde:

t_d : tiempo de duplicación del cultivo en fase de crecimiento exponencial (h).

- Determinación de la velocidad de dilución (D).

El cultivo durante la fermentación se operó en modo semicontinuo, donde la velocidad de dilución se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$D = \frac{V_i}{V_{ferm} \cdot \Delta t} \text{ --- Ecuación 5}$$

Donde:

D: velocidad de dilución (d^{-1}).

V_i : Volumen de recambio (l)

V_{ferm} : Volumen Fermentador (l).

Δt : intervalo entre adiciones (d)



3.5. CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD4.

La caracterización de la producción de AcM para reconocimiento del CD4 a partir del Hibridoma t4 anti-CD4 fue realizada igualmente en el medio de cultivo PFHM II.

Para ello se tomaron los sobrenadantes de las muestras obtenidas de cultivos en Rollers y los sobrenadantes concentrados de la fermentación en Reactores de Ola, centrifugados o concentrados, preservados de 4-8 °C; como refiere el **acápito 3.4**.

Las concentraciones celulares se determinaron según los métodos descritos en el acápito anterior. Para la determinación de los anticuerpos producidos como IgG se utilizó una inmunolectroforésis - ELISA tipo sándwich (62); la que se describe en el **acápito 3.7**.

Para su caracterización se definen varios parámetros, cuyos cálculos se realizan según las ecuaciones descritas a continuación.

- **Determinación de la velocidad específica de producción (q_p).**

$$q_p = \frac{1}{X_v} \frac{dP}{dt} \text{ --- Ecuación 6}$$

Donde:

q_p : Velocidad específica de producción ($\mu\text{g cel}^{-1}\text{h}^{-1}$).

X_v : Concentración de células vivas (cel ml^{-1}).

P : Concentración de IgG ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

t : tiempo (h)

Para ello se define la etapa de mayor interés o concentración de la molécula de interés, en este caso las IgG.

- **Determinación de la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s).**

Para su cálculo se toma como referencia el consumo de glucosa, por ser el sustrato de mayor accesibilidad e importancia en la bioquímica de estos procesos. La determinación de glucosa se describe en el **acápito 3.7**.

$$q_s = -\frac{1}{X_v} \frac{dS}{dt} \text{ --- Ecuación 7}$$



Donde:

qs: Velocidad específica de consumo de glucosa ($\text{g cel}^{-1}\text{h}^{-1}$).

S: Concentración de glucosa (g l^{-1})

Xv: Concentración de células vivas (cel ml^{-1}).

3.6. PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL.

La purificación del AcM anti-CD4 se realizó empleando una Cromatografía de afinidad y una Diálisis, como segundo paso para obtener la proteína en el buffer final de formulación.

Para la primera etapa se utilizó un equipo cromatográfico **Äkta Explorer®** (Amershampharmacia BiotechTM), que consta de tres módulos: el medidor de absorbancia a 280nm para la detección de las proteínas, el medidor de pH/Conductividad y la bomba peristáltica; todos ellos acoplados a un ordenador con el programa computacional **Unicorn- 4.12®**, el que permitió registrar los datos de la corrida en un cromatograma.

- Condiciones de la Cromatografía de afinidad.

Para cargar la columna, se utilizó la matriz proteína A (AbSolute®) (54). Se preparó una columna XK50/20 con 50 ml de gel, para la purificación de un gramo de IgG en cada corrida, empleando un flujo de 19.6 ml min^{-1} .

Los pasos del protocolo de purificación fue el siguiente:

- 1- Equilibrar la columna con Tris 50 mM, NaCl 1M pH 7.5.
- 2- Aplicación del sobrenadante concentrado.
- 3- Lavado de la columna con Tris 50 mM, NaCl 1M pH 7.5.
- 4- Elución de la proteína de interés con Buffer Citrato 0,1 M pH 4.0.
- 5- Ajustar el pH del purificado a 7 con Tris 3M.
- 6- Regeneración de la columna aplicando Buffer Citrato 0.1M pH 3.

- Desarrollo de la Diálisis.

Al purificado obtenido del paso cromatográfico, se le sometió a una diálisis en Buffer Fosfato Salino pH 7,2 por 24 h, empleando una membrana de porosidad 30 kDa de la firma Spectrum; realizando tres recambios antes de su culminación (63).



- **Determinación del recobrado del proceso.**

El recobrado del proceso de purificación se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Recobrado \%} = \frac{M_{\text{purificado}}}{M_{\text{aplicada}}} \times 100 \text{ --- Ecuación 8}$$

Dónde:

$M_{\text{purificado}}$: Masa del AcM purificado (g).

M_{aplicada} : Masa del AcM en el Sobrenadante concentrado (g).

La masa del anticuerpo se calcula a partir de la concentración en el volumen total de la muestra colectada

3.7. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

- **Determinación de la concentración específica de IgG por Elisa.**

La concentración de inmunoglobulinas en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante un ELISA tipo sandwich (64). Se aplicaron para cada muestra dos diluciones (v/v), consistentes en 1:25-1:400 para las muestras menos concentradas y 1:100-1:1600 para las más concentradas, realizándose por triplicado cada dilución. Las diluciones se realizaron en PBS 1X, Tween 20 al 0,05 %, BSA 0,25 %. Se incubaron las placas a 37 °C durante 1 hora. Se lavaron los pocillos tres veces con PBS 1X, Tween 20 al 0,05 % y posteriormente se aplicó un reactivo anti-IgG de ratón, producido en carnero, conjugado con Peroxidasa. Se incubó a 37 °C durante 1 hora. Los pozos se lavaron nuevamente tres veces con PBS 1X, Tween 20 al 0,05 % (200 µl/pozo). Se aplicó solución sustrato consistente en: 2 mg de OPD (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride), 5 ml de Tampón Citrato-Fosfato pH 5, 10 µl de Peróxido de hidrógeno al 37 % y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones. Se detuvo la reacción añadiendo Ácido Sulfúrico al 10 %, y se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de placa *Dialab*®. Para determinar la concentración de cada muestra, los valores de densidad óptica obtenidos fueron extrapolados en una curva patrón estándar (Anexo 2).



- **Determinación de la concentración de proteínas.**

Se procedió según el método Espectrofotometría de absorción molecular UV cercano, que se rige por la ley de Lambert – Beer, basándose en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV, de acuerdo a lo establecido en el procedimiento G10 PNO 0045 en productos obtenidos de Fermentación en forma de purificados y de concentrados. Para llevar a cabo la determinación de la concentración de la proteína en las muestras se esperó a que el equipo realizara el programa interno de autocalibración que dura aproximadamente 30 segundos y se introdujo la longitud de onda 280 nm. Se utilizó buffer PBS 1X como blanco y las demás mediciones se realizaron con las muestras de purificados, a las que se le realizó previamente una dilución 1/10 v/v. Se ajustó a cero el equipo con el blanco y se tomó el valor de absorbancia de cada muestra. Se seleccionó el coeficiente de extinción 0,694 que corresponde a las IgG, incluyendo el anti-CD4, y la concentración se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_{\text{purificado}} = A \times C_e \times D \text{ --- Ecuación 9}$$

Donde:

$C_{\text{purificado}}$: Concentración de Ac del purificado (mg ml^{-1})

A: Absorbancia

C_e : Coeficiente de Extinción

D: Dilución de la muestra

- **Determinación de la especificidad de reconocimiento del anticuerpo.**

Para determinar especificidad del AcM de interés producido en la fermentación, se empleó el método de inmunofluorescencia indirecta usando la Citometría de Flujo, tomando como muestras los sobrenadantes de cultivos de las cosechas de fermentación, los concentrados y el propio purificado. Se emplearon controles positivos comerciales anti-CD4 de la firma comercial DAKO® en cada ensayo.

Para esto se añadió 100 μl de sangre total humana y 20 μl de las diluciones del control positivo comercial y del AcM a evaluar en cada tubo de ensayo. Los tubos se agitaron suavemente con el vórtex e incubados de 2 a 8 °C durante 30 min. Se añadió a cada tubo 20 μl de la dilución de trabajo del anti-ratón conjugado, agitados con el vórtex e incubados durante 30 min. Luego se añade a cada



tubo 2 ml de solución lisante y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Inmediatamente se centrifugó y se procedió a los lavados correspondientes a 1200 rpm durante 5 min a 4°C, y se desechó el sobrenadante. Para la lectura de las muestras se re-suspendieron en 500 µl de PBS 1X, se agitaron los tubos suavemente y se filtró a 40 µm como tamaño de poro.

Para leer las muestras en el Citómetro de Flujo (*Gallius* de la firma *Coulter*) se utilizaron las plantillas de adquisición específicos para linfocitos. El ensayo se analizó en el programa WinMDi® y se compararon los resultados obtenidos con los criterios de aceptación. Según procedimiento G10 PNO 009 Inmunofluorescencia por Citometría de Flujo (65).

- **Evaluación de pureza del AcM.**

Para la evaluación del criterio de pureza de esta proteína obtenida de la familia de las IgG, se utilizaron dos técnicas con diferentes principios de funcionamiento: la electroforesis y la cromatografía; permitiendo corroborar los resultados.

• **Electroforesis.**

Se seleccionó una electroforesis en condiciones desnaturizantes según Procedimiento Normalizado de Operación A5 PNO.003 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). Para su desarrollo se preparó los geles de poliacrilamidas con duodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE). Una vez preparados los geles separador y concentrador, se procedió al montaje de la cámara electroforética. Para ello se añadió cuidadosamente entre los dos cristales la solución del gel separador hasta una altura aproximadamente de 5mm, por debajo de la posición que ocupa el peine en el gel concentrador y se recubrió con una solución que permitió eliminar las burbujas existentes que pudieran interferir en la corrida y resolución de las muestras. Luego se adicionó la solución del gel concentrador hasta superar el borde superior del cristal delgado y se colocó el peine de 10 pozos. Una vez polimerizado el gel concentrador se retiró el peine, se lavaron los pozos con agua para inyección y se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis. Se añadió 800mL de tampón de corrida Tris aminometano previamente enfriado.

Para la corrida de las muestras, se tomó como referencia una concentración de proteína en la misma de 3.75 – 5 µg, para lo que se diluyó con *buffer sample* una solución inicial de la muestra de AcM con concentración de 0.25 mg ml⁻¹. Previo a la corrida se calentaron las muestras a 100°C durante 5 min, para su desnaturización.



En la corrida de las muestras y el revelado de los geles se añadió tampón de corrida en los reservorios de la cámara y se realizó previo una pre-corrida durante 15 minutos, a una corriente de 30 mA y un voltaje de 120 V. Una vez transcurridos los 15 minutos se eliminó el tampón de corrida incorporado a los pocillos y se aplicaron las muestras o el patrón. En el primero se aplicó 10 μ l del patrón de peso molecular (*Biorad*) y a continuación se aplicaron 15 μ l de las muestras. Después de aplicadas las muestras, se comenzó la corrida a 100 V, la misma intensidad, durante 1.5 h aproximadamente, hasta que se observó que el frente de corrida llegó al gel tapón.

Una vez terminada la corrida se desarmó la cámara para recuperar el gel, y se sometió al proceso de revelado. Para ello se tiñó el gel con una solución de tinción de Azul de Coomassie al 2% (1g/500 ml) durante no menos de 30 minutos, en agitación lenta. Luego se eliminó esta solución de tinción cuidadosamente y se destiñó con solución decolorante de solución de ácido acético (10%, v/v), en agitación suave, hasta visualizar las bandas de proteínas y el resto del gel quedó transparente. Se detuvo la reacción lavando con agua destilada. Para su conservación y obtención de la imagen, el gel se deshidrató colocándolo en un secador durante 45 minutos a 80°C, se escaneó la corrida y se imprimió la imagen correspondiente.

- **HPLC**

Para determinar la pureza por cromatografía líquida de alta presión-HPLC, se utilizó la modalidad de filtración en gel por exclusión molecular, utilizando una columna TSK-GEL G3000 SWXL. Para el análisis de las corridas se utilizó el software *LC Solution*® versión 1.03 SP6 (*Shimadzu Corporation*).

Se vertieron en dos viales 250 μ l del material de trabajo de referencia: MRT Bh-R3. En un tercer vial se vertió el mismo volumen del material de referencia diluido 1:20 (v/v) con Buffer Fosfato Salino 0,01 M pH 7.2 (PBS). La concentración de la muestra se ajustó con PBS a 5 mg ml⁻¹ de proteínas. Luego de ajustar el equipo, se colocaron las muestras en el auto-inyector, se equilibró la columna 15 min antes de comenzar la corrida, se inyectó por duplicado cada uno de los viales del control y de la muestra; posteriormente se analizaron los resultados obtenidos en el cromatograma.

- **Determinación de la concentración de Glucosa.**

La determinación de la concentración de Glucosa en los sobrenadantes y medios de cultivo se determinó utilizando un medidor de Glucosa SUMA SENSOR SXT(A) basado en una reacción



enzimática en sensores previamente preparados para medición en suero sanguíneo. Para mayor exactitud a cada muestra se midió por duplicado.

3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Para los estudios cinéticos se realizó seguimiento de los parámetros escogidos en el tiempo.

Se realizó un diseño multifactorial para conocer las mejores condiciones de operación del biorreactor. Se estudiaron dos factores (volumen y velocidad de agitación) y las variables de respuesta fueron: concentración de células vivas, concentración de anticuerpos, productividad, tiempo de duplicación y velocidad específica de crecimiento celular. La comparación de las varianzas obtenidas en cada tratamiento, se realizó mediante ANOVA tipo II y posteriormente las medias se compararon por el método de mínimas distancias (LS) con un nivel de aceptación de 95% ($\alpha= 0,05$). El programa estadístico que se utilizó fue el *Statgraphics Centurion V* para Windows 7.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tecnología de cultivo de células de mamíferos se ha convertido en un campo importante en la biotecnología moderna, especialmente en el área de la salud humana. Productos bien establecidos de células de mamífero comprenden vacunas virales, proteínas terapéuticas recombinantes, así como anticuerpos monoclonales para diagnóstico (60; 66; 67). Todas estas aplicaciones se basan en el cultivo de células primarias o líneas celulares establecidas bajo condiciones controladas.

Mediante el cultivo del Hibridoma t4, es obtenido el anticuerpo monoclonal Anti-CD4 que se utiliza en la evaluación cuantitativa de los linfocitos T cooperadores y, por ende, en los estudios de seguimiento de VIH/SIDA, enfermedades del sistema inmune entre otras inmunodeficiencias (68).

Un paso importante para obtener mayores producciones de anticuerpos monoclonales usando tecnología *in vitro*, es realizar los estudios cinéticos que permitan la caracterización del crecimiento y comportamiento del Hibridoma en las nuevas condiciones de trabajo que serán aplicadas, en el establecimiento de nuevos procesos productivos.

El Hibridoma T4 anti-CD4 se deriva del clon 93/24/51, el cual es producto de la fusión de células de mieloma de ratón p3/x63.ag8.653 y linfocitos del bazo de ratones Balb/c previamente inmunizados con linfocitos T auxiliares de sangre periférica de donantes sanos. El producto de secreción es una inmunoglobulina de ratón del tipo IgG_{2b}, que reconoce específicamente al antígeno de superficie celular CD4 humano, marcador de la diferenciación de la subpoblación de linfocitos T auxiliares/inductores.

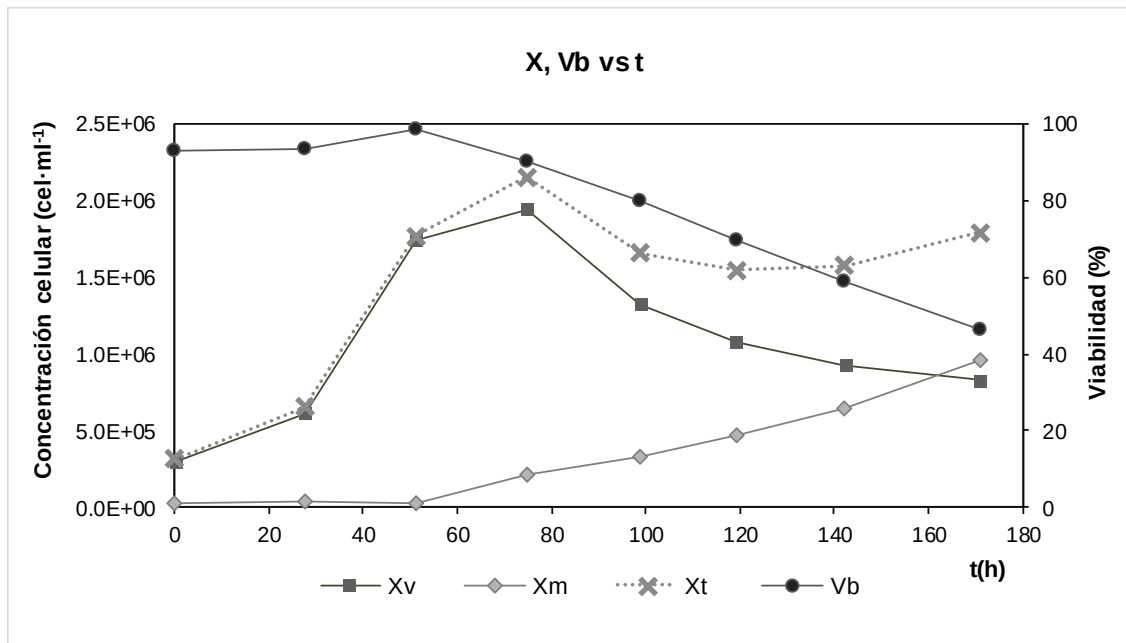
4.1. ESTUDIO CINÉTICO DEL HIBRIDOMA T4 ANTI-CD4 EN ROLLER.

En la cinética de los cultivos celulares, uno de los aspectos que hay que tener en cuenta es la formación de producto, lo cual va a determinar la estrategia fermentativa más apropiada para la producción.

Este estudio se realizó a escala de laboratorio primariamente en frascos Roller, porque este sistema presenta semejanzas con el biorreactor de ola, al no tener impelentes para la agitación del cultivo, sino una base de agitación externa. La **figura 5**, muestra el perfil de crecimiento, formación de producto, consumo de glucosa y viabilidad del cultivo del Hibridoma bajo estudio, que expresa el AcM anti-CD4.



(A)



(B)

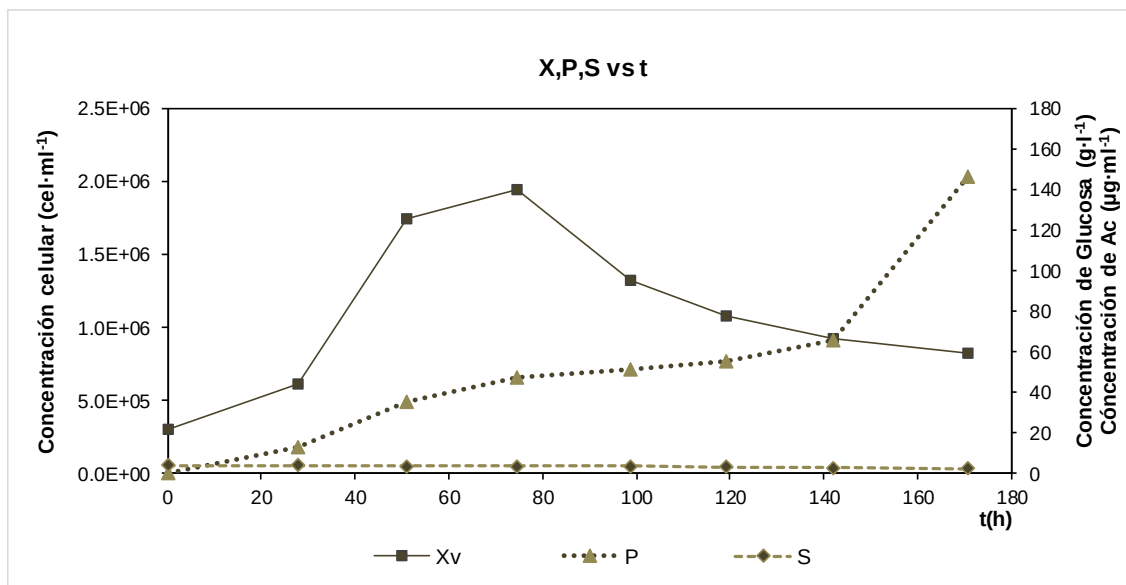


Figura 5. Curvas de crecimiento y producción del Hibridoma T4 en medio de cultivo PFHM-II en Frascos Rollers. (A), descripción en función de parámetros cinéticos; (B) descripción en función de parámetros productivos.

Xv: Concentración de células vivas, Xm: Concentración de células muertas,
 Xt: Concentración de células totales, Vb: Viabilidad P: Concentración de Ac.
 S: Concentración de glutamina, t: tiempo



Como se puede observar en el perfil de la figura 5 (A), durante las primeras 24 h transcurre la fase de adaptación celular, donde las células presentan la menor velocidad de crecimiento. A continuación, la concentración de células vivas aumenta hasta las 48 h de cultivo, correspondiéndose con la fase de crecimiento exponencial, durante esta la viabilidad del cultivo es superior al 95% y la concentración de anticuerpos aumenta progresivamente, como se observa. Luego sigue la fase de desaceleración, disminuyendo la velocidad de crecimiento del cultivo, y a partir de las 72 h transcurre la fase de muerte celular. Sin embargo, resulta interesante que la concentración del anticuerpo, medido mediante la técnica de ELISA, sigue en aumento hasta valores de $146,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ debido a la acumulación de este en el sobrenadante de cultivo. Algunos autores han reportado que las células sometidas a senescencia apoptótica tienden a aumentar la producción de algunas proteínas por la secreción o liberación al medio del anticuerpo intracelular acumulado (36).

En la fase de crecimiento exponencial, la velocidad específica de crecimiento del Hibridoma t4 alcanza un valor de $\mu_{\text{max}} = 0.046 \text{ h}^{-1}$ para un $t_d = 15.2 \text{ h}$, que comparado con los resultados obtenidos por Miranda en 2011 ($\mu_{\text{max}} = 0,034 \text{ h}^{-1}$ para un $t_d = 20,4 \text{ h}$) para la obtención del mismo anticuerpo, fueron superiores como resultados (1). Esto puede deberse a que el autor referido utilizó frascos Spinner donde la agitación por impelente provoca a las células un mayor estrés mecánico, a diferencia de los frascos Roller (69; 70; 71).

Por su lado, la velocidad específica de producción de AcM calculada fue de $4,11 \cdot 10^{-7} \mu\text{g cel}^{-1} \text{h}^{-1}$ durante la fase exponencial. En fermentaciones donde se utilizó el mismo medio de cultivo para la producción del anticuerpo Nimotuzumab o hR3, se reportó una $q_p = 2 \cdot 10^{-7} \mu\text{g cel}^{-1} \text{h}^{-1}$ (72). Por lo que el tipo de biomolécula y el hibridoma utilizado, determina la velocidad específica a la cual se producen los diferentes anticuerpos, aun cuando las condiciones de cultivo sean muy similares. También las condiciones de operación del fermentador determinan una mayor o menor productividad. Por ejemplo, en este trabajo de desarrollo de tecnologías para la producción de Anti-CD4, los cultivos en lote obtenidos superan a los que se obtienen por Zorrilla en el 2011, operando en el mismo modo pero en frascos spinner el cultivo de un hibridoma en medio suplementado con suero, donde obtuvo una q_p de $1,5 \cdot 10^{-7} \mu\text{g cel}^{-1} \text{h}^{-1}$ (73).

A pesar que la productividad en el cultivo en lote es mayor en la fase final, resulta importante la caracterización de la fase exponencial porque la fermentación a escala productiva se propone en modo semicontinuo, donde las células no deberán alcanzar la fase de muerte celular.



La velocidad específica de consumo de glucosa fue de $1.93 \cdot 10^{-12}$ g cel⁻¹h⁻¹ este valor es bajo comparado con $1,8 \cdot 10^{-9}$ g cel⁻¹h⁻¹ que reporta Henry y Kwok para otro Hibridoma (74). Algunos hibridomas se caracterizan por un mayor o menor consumo de glucosa. Durante el cultivo se observa que la concentración de glucosa disminuye a medida que aumenta la población de células viables, sin embargo, no se consume toda la glucosa presente en el medio (Figura 5 B). Este aspecto es similar en algunos cultivos de células de mamíferos porque además de la glucosa, la glutamina es otra fuente de carbono y energía en la mayoría de los medios de cultivo y ambos nutrientes son requeridos para el crecimiento celular. La proporción del consumo de cada nutriente depende del estado del metabolismo celular (34).

El Hibridoma en este medio de cultivo alcanzó concentraciones de Ac máximas superiores a los 100 µg ml⁻¹, encontrándose en el rango reportado para este tipo de línea celular (20-200 µg ml⁻¹). Por otro lado, para el cultivo por lotes la literatura refiere una densidad celular de $1-2 \cdot 10^6$ cel ml⁻¹, y en este estudio se obtuvo $1.94 \cdot 10^6$ cel ml⁻¹ (75). Además la productividad obtenida de $4,11 \cdot 10^{-7}$ µg.cel⁻¹h⁻¹ es superior a la que obtuvo Miranda en medio RPMI 1640 suplementado con SFB ($2 \cdot 10^{-7}$ µg cel⁻¹h⁻¹) y ligeramente inferior a la obtenida por el mismo autor en medio MyeloCIM ($5.95 \cdot 10^{-7}$ µg cel⁻¹h⁻¹) (1).

Como se puede apreciar en la **tabla 1**, haciendo un resumen de parámetros importantes del cultivo celular que nos interesa, el comportamiento del Hibridoma en medio PFHM-II indica que se puede realizar el proceso productivo de obtención del anti-CD4 en las condiciones que nos hemos planteado; resultando en un aprovechamiento de los componentes del medio (tomando como base la fuente carbonada) con un rendimiento Yp/s de aproximadamente 0.21, y una productividad volumétrica de más de 120 µg ml⁻¹ de anticuerpo, lo que es considerado como bueno para cultivo de células superiores (76).



Tabla 1. Resumen de los parámetros cinéticos del hibridoma t4 en medio PFHM-II, utilizando Roller como biorreactores.

Parámetro cinético	X_{vmax} (10^6 cel ml^{-1})	μ_{max} (h^{-1})	td (h)	IgG _{max} ($\mu g\ ml^{-1}$)	qp (10^{-7} g cel $^{-1}h^{-1}$)	qs (10^{-12} g cel $^{-1}h^{-1}$)
Roller 1	1.96	0.044	15.8	167.10	0.239	1.39
Roller 2	1.96	0.044	15.8	124.60	0.417	1.39
Roller 3	1.90	0.049	14.1	147.66	0.578	3.02
Promedio	1.94	0.046	15.2	146.45	0.411	1.93
Desv. Est.	0,03	0.002	0.9	21.27	0.169	0.94



4.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN PARA LA FERMENTACIÓN CONTINUA.

Un parámetro importante para tener en cuenta en cultivos agitados es el estrés hidrodinámico generado por el flujo de fluidos y el mezclado. Este parámetro juega un papel de gran importancia en el crecimiento y producción de cada línea celular, como se ha demostrado ampliamente en tanques agitados mecánicamente. Sin embargo, son pocos los reportes relacionados con el efecto del estrés hidrodinámico en cultivos celulares en biorreactores de olas (77).

Otro parámetro a tener en cuenta es la transferencia de oxígeno del líquido hasta las células pues esta depende del diseño del biorreactor y de las condiciones de operación del sistema de cultivo: caudal de aire, volumen del líquido, régimen de agitación, área de transferencia y viscosidad del cultivo. El coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) disminuye con la viscosidad y el volumen del líquido y aumenta con el área de transferencia y la agitación (78; 45; 79).

La forma más fácil de obtener el oxígeno para el biorreactor es por medio del aire, que tiene en su composición un 21% (v/v) de oxígeno y además su suministro es más económico, reduciendo los costos en el proceso de cultivo de células eucariotas superiores (80; 45). En sistemas de cultivo en suspensión, como es el caso, el intercambio gaseoso se produce por difusión simple que puede ser aumentada por la agitación que se realice al cultivo (12).

En el caso del Biorreactor de Ola propuesto, que es un sistema de cultivo con agitación no convencional, la transferencia de oxígeno a las células depende del ángulo de inclinación y la velocidad de la plataforma de agitación, provocando un movimiento ondulado y de esta forma ocurre la transferencia entre la superficie del cultivo con la atmósfera de aire y CO_2 que se crea en el recipiente. Estos parámetros pueden ser fijados en dependencia del volumen útil del reactor, quedando la agitación como parámetro a monitorear.

Este biorreactor tiene como ventaja que, mediante la unidad de control, se pueden controlar automáticamente el flujo de gases para mantener en rangos adecuados el pH y la concentración de oxígeno. La velocidad de oscilación depende del volumen del cultivo, la densidad celular y el tamaño de la bolsa de fermentación. Generalmente, se aumentan las oscilaciones por minuto (rpm) a medida que aumenta la demanda de oxígeno (81).

Para seleccionar los parámetros de operación, que permitieran un buen desempeño del cultivo, en el diseño experimental se estudiaron dos factores críticos y sus interacciones: la velocidad de agitación, en los niveles 17 y 25 rpm y el volumen de trabajo a 15, 20 y 25 l.



Para la fermentación se empleó un sistema de aire comprimido libre de partículas y filtrado con filtros para aire de 0.22µm.

Como variables de respuestas se midieron la cantidad de células vivas, velocidad de crecimiento y productividad. Las características del diseño y el comportamiento de los parámetros cinéticos en cada una de las corridas se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la corrida experimental en el biorreactor de olas Applikon 50L.

Volumen, Agitación	Xv (10 ⁶ cel ml ⁻¹)	IgG (µg ml ⁻¹)	µ (h ⁻¹)	qp (10 ⁻⁷ µg cel ⁻¹ h ⁻¹)
15 l, 17 rpm	1.52 ± 0.25	52.29 ± 7.68	0.033 ± 0.005*	6.13 ± 2.10
15 l, 25 rpm	1.15 ± 0.32	29.37 ± 9.22	0.027 ± 0.004	4.80 ± 1.70
20 l, 17 rpm	2.09 ± 0.07	74.67 ± 4.16*	0.030 ± 0.002*	13.50 ± 3.03*
20 l, 25 rpm	1.46 ± 0.27 ^c	53.03 ± 3.62	0.021 ± 0.002	8.05 ± 3.20
25 l, 17 rpm	0.97 ± 0.12	44.00 ± 7.55	0.024 ± 0.002	10.86 ± 2.20
25 l, 25 rpm	0.85 ± 0.04	28.33 ± 3.21	0.029 ± 0.003	8.11 ± 1.33

*** Mejor valor mostrando diferencias significativas, respecto al resto de los valores en una misma columna.**



La experimentación se realizó en modo semicontinuo, el cual tiene como ventaja, la mejora significativa de la eficiencia del cultivo en comparación con el modo por lote, a pesar de los cambios ambientales constantes que se les imponen a las células, por la extracción y reposición de medio (82). Se inoculó el biorreactor en un volumen total de 15 l y una concentración de $0,4 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} . Una vez adaptadas las células al medio y haber iniciado la fase de crecimiento exponencial, se comenzó a tomar los datos experimentales, utilizando una velocidad de dilución de 0.5 d^{-1} . Para los otros volúmenes estudiados, se aumentó el medio de cultivo hasta alcanzar 20 y 25 l y se ajustó la concentración a $0,4 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} en ambos casos.

Como se puede apreciar en el análisis estadístico realizado para la concentración de células vivas X_v (**Anexo 3**), podemos decir que tanto el volumen y la agitación influyen significativamente por separado en el comportamiento de este parámetro cinético, no siendo así la contribución conjunta de ambos factores. Mediante la prueba de rangos múltiples se compararon las medias de cada tratamiento, resultando en diferencias significativas entre sí. Los mejores valores de X_v se obtuvo para un volumen de 20 l y 17 rpm, para un valor promedio de $2.09 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} ; mientras que para 25 l de volumen y 25 rpm, se tiene la menor concentración celular que fue de $0.85 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} (Tabla 2).

En el caso de 15 l, con agitación de 17 y 25 rpm se obtuvo una concentración celular de $1.52 \cdot 10^6$ y $1.15 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} respectivamente, menor que las fermentaciones a 20 l como era de esperar, estando relacionadas con la productividad que exhibe este Hibridoma y siendo desfavorecida la viabilidad con el incremento de la agitación en todos los casos (Figura 6). Efecto similar se observó a 25 l y la mayor agitación de 25 rpm, donde la concentración celular fue el más bajo resultado obtenido, como se describió anteriormente. Por lo que los resultados con diferentes volúmenes indican que a estas condiciones se debe trabajar a una agitación menor, para disminuir los niveles de espuma en el biorreactor que pueden causar el estrés celular (81).

El incremento de volumen en el reactor aunque podría parecer ser apropiado para incrementar la disponibilidad de nutrientes, los mejores valores se obtienen a 20 l, pues a mayor volumen se muestra afectación del conteo celular (Figura 6), que puede ser causada por insuficiente oxigenación por una baja transferencia de oxígeno a las células; determinando para 25 l una concentración de células vivas menor incluso que el tratamiento con volumen de 15 l, alcanzando sólo $0.97 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} (Tabla 2).



Como podemos observar en el Análisis de Varianza (Anexo 3) que compara las diferentes condiciones y su efecto en la velocidad de crecimiento, mostró que la agitación, el volumen y la interacción entre estos, tienen un efecto estadísticamente significativo y desfavorable sobre la velocidad de crecimiento con un 95,0 % de nivel de confianza. Según el Duncan el comportamiento de este parámetro cinético no tiene diferencia significativa entre 15 y 20 l, para la menor velocidad de agitación, donde se obtiene un resultado similar entre 15 y 25 l para 25 rpm; estableciendo una tendencia a disminuir el valor de este parámetro con el incremento del volumen o la agitación (Tabla 2, Figura 6). El menor valor de $\mu=0.021 \text{ h}^{-1}$ para los 20 l y 25 rpm (Tabla 2). Con respecto a los cultivos de Hibridoma podemos decir que esta velocidad se encuentra en las medias reportadas de 0.020 y 0.035 h^{-1} por la literatura (47; 72; 76). Al analizar la velocidad de agitación el mejor comportamiento de forma general se obtuvo para 17 rpm.

En el gráfico de interacciones de la **Figura 6**, se puede corroborar estos resultados indicando que las mejores condiciones de operación referente a la velocidad de crecimiento celular son a 15 l y 17 rpm con un valor de 0.033 h^{-1} , este valor es importante para la fermentación porque indica el tiempo que demoran las células para duplicar su generación (76).

La productividad específica de producción es una medida de la producción de anticuerpos por célula viable, mientras mayor sea su valor, mayor será la producción de anticuerpos durante la fermentación. Por este motivo se tomó como criterio decisivo para la elección de los parámetros de operación (83; 76).

El análisis de varianza indicó que ambos factores, tienen influencia significativa sobre la productividad celular, sin embargo, la interacción entre ellos no tuvo efecto (Anexo 3). La comparación de las medias obtenidas por cada tratamiento arrojó que para 25 y 20 l el comportamiento es similar estadísticamente (Figura 6), mientras que para 15 l hay una menor productividad. Con respecto a la agitación los mejores resultados se obtuvieron a 17 rpm. En la tabla 2 se puede apreciar como a 17 rpm y 20 l se tienen los mejores valores de productividad, con un promedio de $13,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{g cel}^{-1}\text{h}^{-1}$, acumulándose IgG hasta llegar a una concentración de $74.67 \pm 4.16 \mu\text{g ml}^{-1}$.

La experimentación demostró que a pesar de que el volumen máximo de trabajo en el fermentador es de 25 l, los resultados obtenidos no fueron los mejores. Según la bibliografía un mayor volumen



de trabajo exige de una mayor velocidad de agitación para mantener en el cultivo una adecuada concentración de oxígeno, pero a su vez esto provoca espuma en el fermentador ocasionando daños a las membranas celulares de la línea celular que estamos empleando y por ende la productividad disminuye (81).

El mejor desempeño del cultivo del Hibridoma t4 en el fermentador fue a 20 l y 17 rpm, donde en estas condiciones se observó menor formación de espuma y baja turbulencia, indicando que la geometría del sistema y el modo de agitación son importante a la hora de escoger las variables de operación.

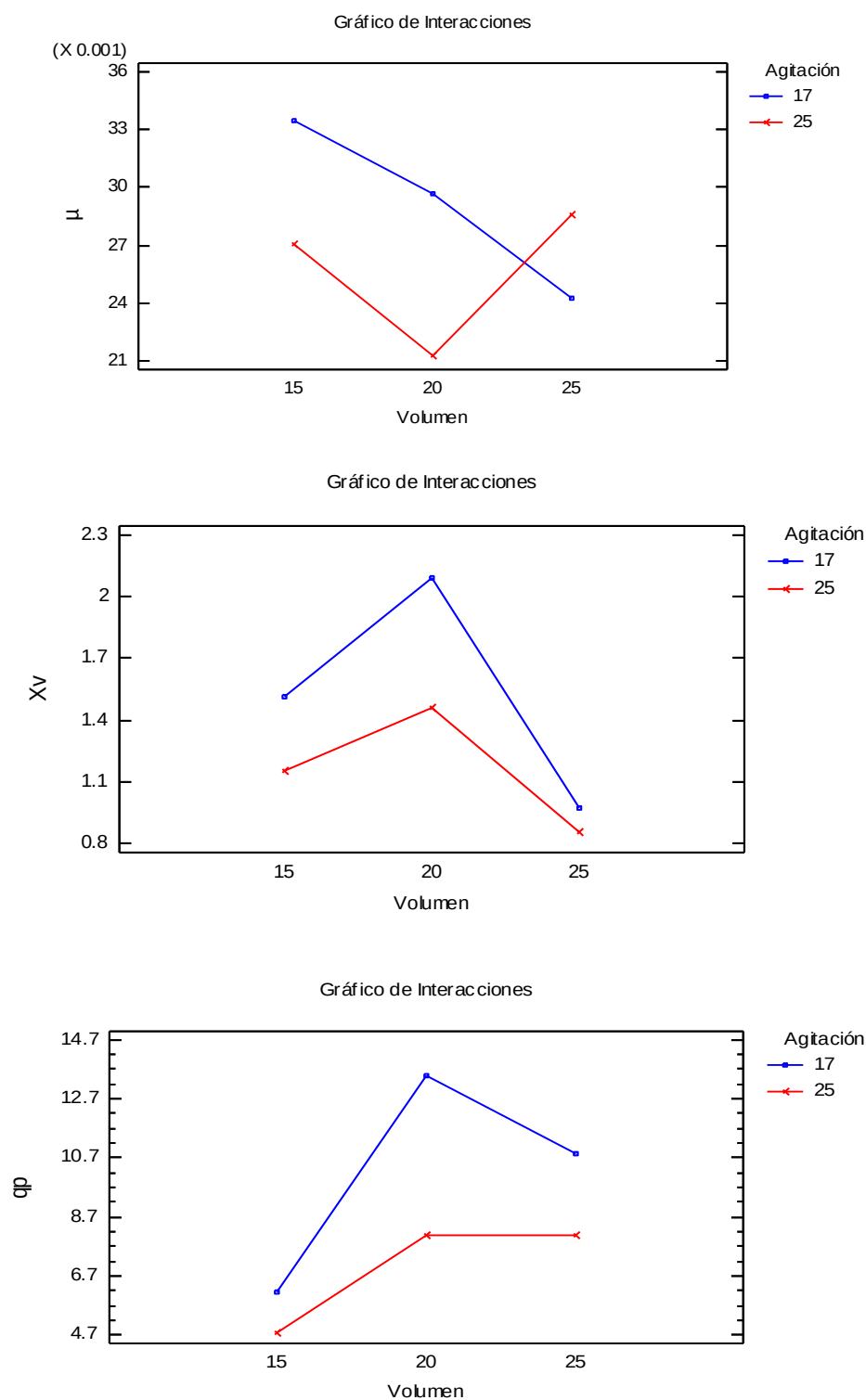


Figura 6. Gráfico de las interacciones entre las variantes de volumen (15 l, 20 l, 25 l) y agitación (17 rpm, 25 rpm) para las diferentes variables de respuesta: μ , velocidad específica de crecimiento; X_v , concentración de células vivas; q_p , productividad celular de anticuerpos.



4.3. ESTABLECIMIENTO DEL PROCESO PRODUCTIVO.

Los procesos de producción de anticuerpos monoclonales en la industria comprenden dos etapas fundamentales: el cultivo celular (fermentación) y la purificación. Antes de iniciar la etapa productiva es necesario tener optimizado el proceso de cultivo celular, lo cual no sólo se logra mediante la selección de clones altamente productivos, sino también, mediante la optimización de la composición del medio y de las condiciones de funcionamiento del biorreactor (84).

Una nueva tendencia para estas producciones es la implantación del sistema de biorreactores de un solo uso, o desechables, los que tienen como ventajas una menor inversión de capital y costos operativos, mejora de la programación de la producción y mayor replicación del proceso. Además, son aplicables en las producciones con calidad, asegurando las buenas prácticas de manufacturas (GMP) (43).

De ahí que se escogiera el Biorreactor de Ola (Wave Bioreactor®) de la firma Applikon™ (**Figura 7**), utilizando bolsas desechables de polietileno con volumen total de 50 l y un volumen de trabajo de 25 l; controlando la mezcla de gases de aire y CO₂ mediante la unidad de control automático del fermentador (www.applikonbiotechnology.com). La selección se hizo por resultar apropiado su relación costo/volumen y según las demandas previas establecidas para este tipo de producto en el país, que no sobrepasan 1 g del AcM en el año, se deben emplear alrededor de 400 € en la adquisición de la bolsa de fermentación para obtener 50 l de sobrenadante anti-CD4 (www.applikonbiotechnology.com).

Por otro lado, el desarrollo de los procesos de purificación se enfoca en la obtención de altos rendimientos y productividades, así como altos grados de pureza. Tradicionalmente los anticuerpos monoclonales han sido purificados por una secuencia de diferentes pasos cromatográficos y operaciones de separación por membrana (85; 86).

Las etapas que comprenden el proceso productivo para la obtención de la molécula anti-CD4 son las siguientes:

- 1- Preparación del medio de cultivo.
- 2- Preparación y montaje del fermentador.
- 3- Obtención del Inóculo.
- 4- Corrida de fermentación.
- 5- Clarificación y Concentración.
- 6- Purificación del sobrenadante.

A continuación, se detallan las características del proceso que se propone, en cada etapa referida.



Figura 7. Wave Bioreactor® (Bioreactor de Ola) utilizado en LABEX de la empresa Applikon (www.applikonbio.com).



4.3.1. Preparación del Medio de Cultivo.

El medio de cultivo constituye el aporte de nutrientes indispensables para el crecimiento de las células. En el proceso productivo propuesto se emplea el PFHM-II que es un medio libre de suero, ya que el mismo fue diseñado y optimizado para el crecimiento de hibridomas y la producción de anticuerpos monoclonales (www.fishersci.com). En procesos anteriores, para la obtención de AcM, se ha utilizado en el CIM el RPMI 1640, medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino.

El medio seleccionado tiene como principal desventaja su adquisición, porque es comercializado por empresas norteamericanas lo que pone en riesgo su suministro constante; sin embargo, por su factibilidad económica y eficiencia en el cultivo, ha sido ampliamente utilizado en la producción de anticuerpos monoclonales por el Centro de Inmunología Molecular, en los últimos diez años.

Por estas razones se prepararon 150 l de este medio de cultivo seleccionado, los cuales fueron empleados tanto en la obtención del inóculo y la fermentación, una vez que se comprobó la esterilidad del mismo.

4.3.2. Montaje del Fermentador.

El Biorreactor de Ola de la firma *ApplikonTM*, al tener un diseño no convencional tiene como operación más crítica, el montaje de la bolsa de fermentación. Esta operación consiste en acoplar al sistema todas las conexiones y sensores necesarios para el suministro y extracción de medio, gases, muestras e inóculo. Esta etapa fue realizada en cabina de flujo laminar, que brinda un ambiente libre de partículas necesario para evitar la contaminación del sistema. Un error en este paso puede comprometer todo el proceso productivo (**Anexo 4**).

4.3.3. Obtención del Inóculo.

El principal objetivo del inóculo es conseguir un alto nivel de biomasa viable en un estado fisiológico óptimo para su uso. Un inóculo adecuado debe estar en fase de crecimiento activo, estar libre de contaminación, y tener capacidad de formación de productos. Para obtener el mismo son esenciales el sistema de cultivo y el medio de producción (87).

Para la generación de la cantidad de células requeridas para la inoculación del fermentador se emplearon sistemas de cultivo estáticos (frascos de cultivo T) en la primera etapa y agitados (frascos *rollers*) en la etapa final. Este último sistema de cultivo fue probado con buenos resultados, durante la evaluación del crecimiento del hibridoma y su productividad (**ver acápite 4.1**).



Para llevar a cabo esta primera etapa de la generación del inóculo se descongeló un ámpula del banco de trabajo, la misma contenía $11 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} con una viabilidad de 96%. Las células fueron expandidas a dos frascos “T” de cultivo de 75 cm^2 a una concentración inicial de $0.3 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} . Una vez alcanzado $150 \cdot 10^6$ cel con un 95% de viabilidad, se pasó a la etapa del cultivo en agitación ya que este permite obtener mayores concentraciones celulares y rendimientos volumétricos, así como facilita el aumento de escala, comparado con el sistema estático. (88).

A partir de este cultivo se sembró un frasco rotatorio con $0.3 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} en 300 ml de medio de cultivo. El cultivo se trabajó cada 48 h y una vez alcanzada una buena confluencia celular se sembraron nuevos frascos, hasta llegar a un máximo de 8 unidades. Estas condiciones permitieron obtener un inóculo de 6300 millones de células en 4 l de medio con una viabilidad de 94 %. La calidad del inóculo influye en el buen desarrollo del proceso de fermentación al reducir el tiempo de la fase de adaptación.

4.3.4. Corrida de Fermentación.

Para empezar la corrida de fermentación se fijaron los parámetros de operación según los resultados obtenidos en el diseño experimental, manteniendo siempre la agitación en 17 rpm que fue donde se obtuvieron los mejores valores de los parámetros cinéticos. El fermentador se inoculó en 15 l y $0.4 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} , en la etapa inicial el modo de trabajo empleado fue de lote incrementado hasta alcanzar los 20 l a las 48 h. A partir de este momento se empezó a aplicar el modo de operación semicontinuo, empleando como estrategia de cosecha 0.2 a 0.5 d^{-1} , siempre que la concentración celular fuera superior de $1.5 \cdot 10^6$ cel ml^{-1} , de esta forma se garantizó el recambio en el fermentador para disminuir los metabolitos tóxicos presentes en el cultivo.

Los días que se obtuvieron concentraciones inferiores al límite establecido, se esperaron 24 h más para realizar la cosecha, estos puntos en su mayoría coinciden con el momento en que se realizaron diluciones al fermentador superiores de 0.4 d^{-1} , lo cual provocó que las células cayeran en la fase de adaptación, lo que sugirió mantener un límite de dilución inferior a 0.4 d^{-1} para obtener un mayor crecimiento celular.

Como resultado, durante la corrida productiva se mantuvo la viabilidad por encima del 90 % con un promedio de 96 ± 2 %, demostrando un excelente estado fisiológico de la línea celular durante toda la fermentación. Las concentraciones celulares diarias estuvieron alrededor de $(1.71 \pm 0.39) \cdot 10^6$ cel ml^{-1} . El comportamiento en la variación de la concentración celular coincide con lo reportado en trabajos previos (89; 47) que refieren a mayores velocidades de dilución se obtienen



menores concentraciones celulares, pero mayor fracción de células viables para el cultivo de Hibridoma en modo semicontinuo (**Figura 8**). La variación de la concentración de glucosa en el medio de cultivo no fue significativa, manteniéndose en $3.16 \pm 0.23 \text{ g l}^{-1}$ como promedio durante toda la corrida, demostrando que el Hibridoma es bajo consumidor de esta fuente de energía, coincidiendo con los datos obtenidos durante el estudio cinético. Se ha demostrado en la literatura que existen Hibridomas que utilizan la glutamina como fuente principal de carbono para su metabolismo, como ya se había hecho referencia anteriormente (90; 20).

La concentración de anticuerpos en los primeros días de la corrida varió constantemente, llegándose a alcanzar valores superiores a 65 mg l^{-1} , sin embargo, a partir de las 435 h se mantuvo más estable, cercana a los 50 mg l^{-1} . Este comportamiento se debe a que en esta etapa se estabiliza las diluciones de trabajo de 0.4 a 0.5 d^{-1} , utilizando como estrategia sacrificar velocidad de crecimiento para mantener una buena viabilidad del cultivo y acumular mayor cantidad de producto (Figura 9).

En los gráficos de la **figura 9**, se observa como durante toda la fermentación no hay un comportamiento estable de los parámetros cinéticos μ y t_d , pues se obtienen valores promedios de 0.015 h^{-1} y 53.26 h respectivamente, inferiores a los obtenidos en el estudio en frascos rotatorios por lote y en la corrida experimental. Este resultado se debe al modo de operación empleado, en donde a medida que se realizan las cosechas varían las poblaciones celulares en el cultivo, por lo que la población celular en el fermentador se vuelve heterogénea y tiende a disminuir la velocidad de crecimiento con el tiempo (46; 47).

La productividad promedio fue de $4 \cdot 10^{-7} \mu\text{g cel}^{-1}\text{h}^{-1}$, con una tendencia variable por la influencia de las "cosechas" realizadas al fermentador que determinó la reducción drástica de este parámetro durante la fermentación (figura 9). La literatura recoge la existencia de una correlación inversamente proporcional entre q_p y μ , como patrón más común entre el crecimiento celular y la producción de anticuerpos para células de Hibridoma, que no se observa sin embargo en este cultivo (91; 92; 93).

En la corrida de fermentación se cosecharon 3 bolsas de sobrenadante con volúmenes cercanos a los 50 l, a las 264, 552 y 792 h. En la **tabla 3** se muestran los valores de los volúmenes de las 3 cosechas, así como las concentraciones de anticuerpos, las que estuvieron alrededor de 42.66 mg l^{-1} y también la masa generada en cada caso. Como se puede apreciar la diferencia entre cada lote no son significativas, por lo que podemos concluir que el proceso fue repetitivo y estable.

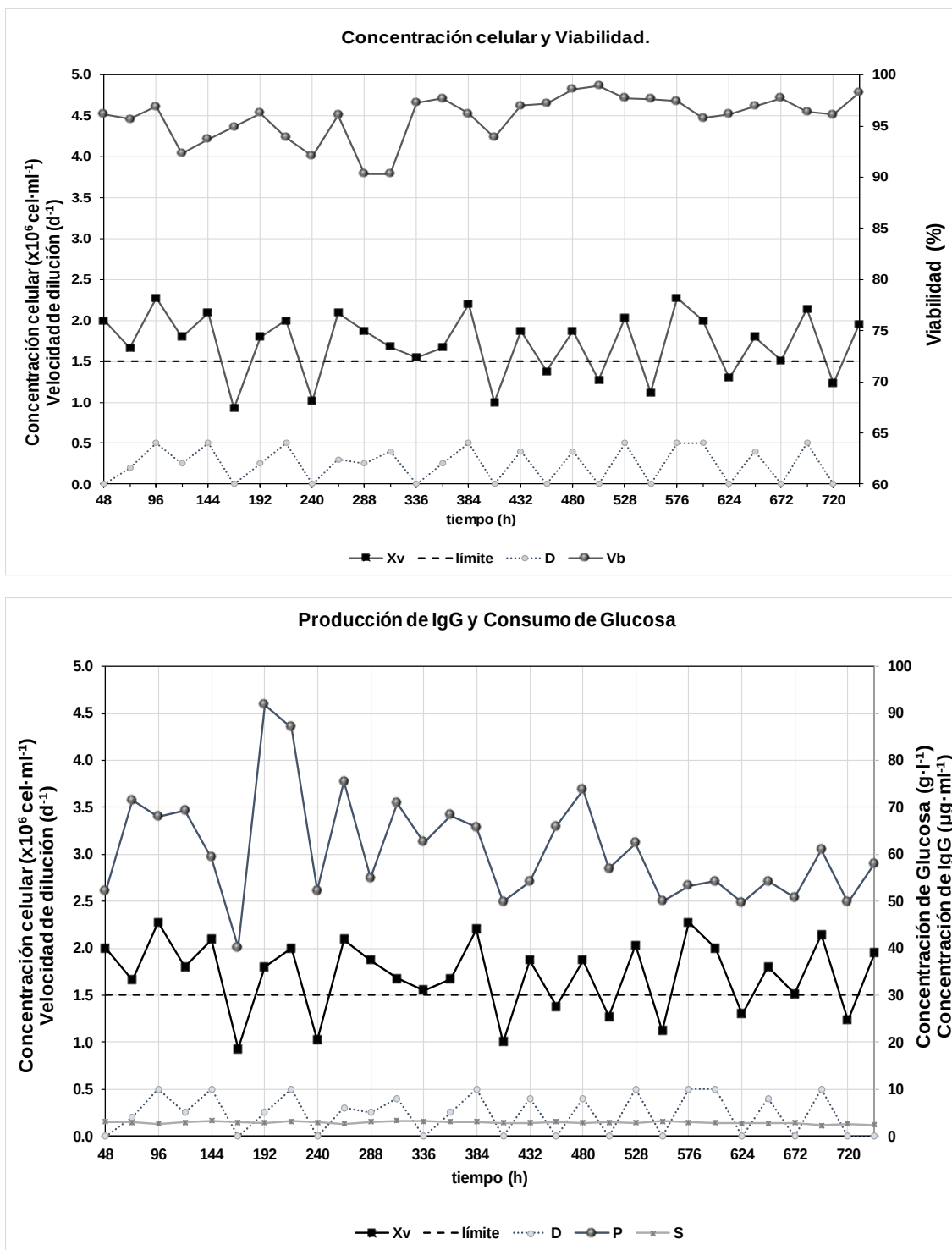


Figura 8. Cinética de Crecimiento y producción del hibridoma t4. Corrida de la fermentación en el Biorreactor de Olas.

Xv: Concentración de células vivas, D: Velocidad de dilución, Vb: Viabilidad
P: Concentración de Ac., S: Concentración de glucosa.

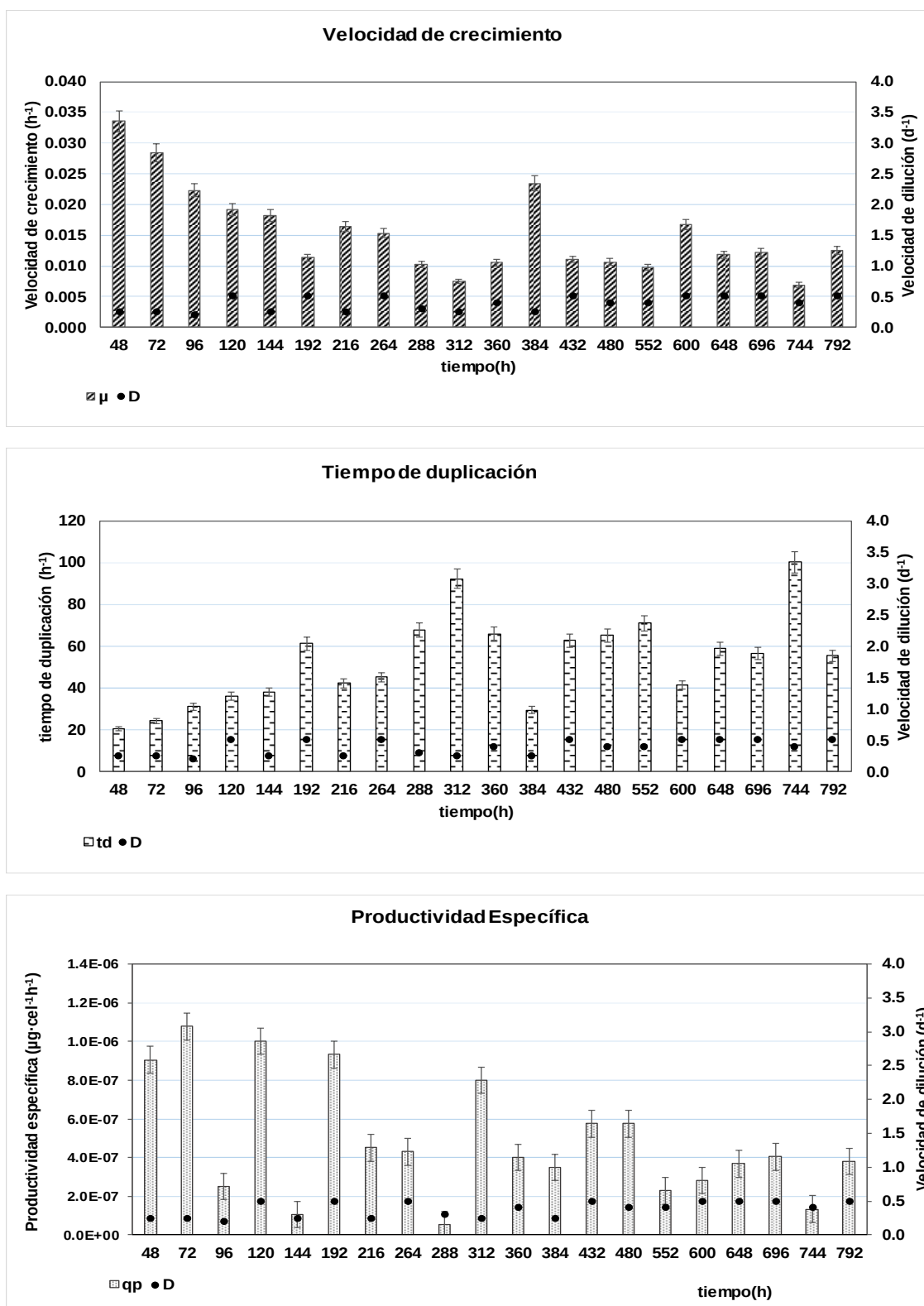


Figura 9. Comportamiento de los Parámetros Cinéticos del hibridoma t4. Corrida de fermentación en el Biorreactor de Olas.



Finalmente, en esta corrida se obtuvo 6 563.26 mg del AcM, masa suficiente para cumplir futuras demandas de este producto.

La obtención de las cantidades deseadas del producto fue muy importante, pero no suficiente para considerar establecido el proceso productivo de fermentación, pues para ello se debía comprobar la calidad de la molécula de anticuerpo monoclonal mediante la prueba de actividad biológica a lo largo del proceso.

Un método muy potente utilizado para evaluar esta actividad biológica *in vitro* es la citometría de flujo, basada en las características morfológicas de las células y en su capacidad de fluorescencia, asociado al reconocimiento específico mediante un anticuerpo secundario conjugado a una molécula fluorescente (94). La técnica emplea como control de referencia el patrón fabricado por la firma DAKO™ que reconoce de un 30 a un 51 % de linfocitos en sangre periférica.

En el **Anexo 5** aparecen los resultados con el patrón, en dos diluciones diferentes, que servirán para evaluar este reconocimiento.

Los resultados mostrados en la tabla 3, de la actividad biológica para cada cosecha fueron superiores al 40% de reconocimiento específico del antígeno CD4+ en superficie celular, lo cual significa que este anticuerpo cumple las especificaciones establecidas.

La propuesta utilizada para fermentación y obtención de inóculo en este trabajo, se aprobó como procedimientos normalizados y es recogido en el documento del Proceso O3 - Obtención de IFA y Sobrenadante de Cultivo (95).

4.4. CLARIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL SOBRENADANTE.

Se han utilizado varios tipos de operaciones unitarias para la cosecha y clarificación de productos expresados extracelularmente a partir de cultivos de células de mamíferos. Las técnicas claves incluyen centrifugación, microfiltración, filtración en profundidad, filtración a través de membranas de tamaño absoluto de poros, adición de floculantes para mejorar otros pasos de cosecha y cromatografía en lecho expandido (96).

El método empleado fue filtración tangencial con membrana, muy utilizado en la industria biotecnológica, por consistir en una operación simple y brindar un permeado totalmente libre de células. Sin embargo, tiene como principal limitación que, en dependencia de los componentes del



cultivo, puede ocurrir la obstrucción de la membrana, debido a la aglomeración de células durante el proceso.

Las tres cosechas durante la fermentación del Hibridoma t4 fueron filtradas, con solo un 10 % de pérdida de volumen por retención en las membranas de los filtros utilizados; quedando un volumen final por bolsas filtrada de 45, 50 y 45 l respectivamente, con una masa de anticuerpos superior a los 1700 mg y en todas las cosechas el anticuerpo mantiene un % de reconocimiento en el rango establecido de 30 % a 51 % según la especificación (Tabla 3). Estas pérdidas se encuentran en el rango reportado para el proceso de clarificación y purificación, que establece como límite un 70% de recobrado y por tanto, menos del 30 % de pérdidas (60).

Para disminuir el volumen de carga y el tiempo de aplicación del sobrenadante de cultivo en el proceso de purificación, se decidió introducir un método de concentración previo al proceso cromatográfico. Para la concentración de cada bolsa de sobrenadante filtrado fue empleado un cartucho de fibras huecas con tamaño de poro de 30 kDa, lo que permitió la retención del anticuerpo en la corriente de circulación. La principal ventaja de este dispositivo es su fácil manipulación y bajo costo de operación, además los elementos de la membrana pueden recuperarse y reutilizarse (97). Su principal inconveniente es que no puede ser emplear con sobrenadantes de muy alta concentración debido a que su superficie activa se puede agotar en muy poco tiempo.

En el proceso de concentración se redujo el volumen entre 1.3 y 2.4 l para un factor de concentración superior a 20 veces. Estos concentrados fueron caracterizados y los resultados se muestran en la **tabla 4**, donde se observa una alta eficiencia en el proceso, superior al 90 %. En el caso del lote D41Sc1303, fue mayor el volumen procesado, por lo que presenta la menor concentración de anticuerpos con respecto al resto de los lotes, debido al agotamiento del cartucho de concentración, el cual puede ser reutilizado hasta tres veces, como demostró el presente estudio (98).

Al comparar el promedio de porciento de reconocimiento tanto del sobrenadante concentrado (47.83 %) como del filtrado (48.33 %), se obtiene que la diferencia es no significativa, por lo que se concluye que el proceso de concentración propuesto es efectivo al permitir reducir más de 20 veces el volumen inicial de producto y mantener la integridad y la propiedad de reconocimiento de la molécula de anti-CD4.



La tendencia histórica en la producción “*in vivo*” de LAM anti-CD4 en LABEX tiene como características la obtención de un litro de producto a partir de 500 ratones, donde la concentración oscila entre 1.5 – 2 g l⁻¹ de anticuerpos. Cuando se compara estos datos con los resultados obtenidos en la concentración de sobrenadante (Tabla 4) se puede observar que a pesar de que la tecnología *in vivo* brinda mayor concentración de producto, cuando se emplea el biorreactor de ola se pueden obtener menores cantidades de impurezas a separar mediante la cromatografía, además de eliminar los problemas bioéticos asociados al uso de animales de laboratorio.



Tabla 3. Datos de las cosechas de fermentación (A) y filtrado mediante filtración tangencial con membrana (B).

A)

Cosecha	Lote	Volumen (l)	Concentración (mg l ⁻¹)	Masa (mg)	Actividad Biológica (%)
1	D41S1301	50	40,22	2011	42,6
2	D41S1302	54	41,19	2224	51,0
3	D41S1303	50	46,56	2328	51,4
Promedio		51 ± 2	42,66 ± 3,42	2188 ± 162	48,3 ± 4,9

B)

Lote	Volumen (l)	Concentración (mg l ⁻¹)	Masa (mg)	Actividad Biológica (%)	% Pérdidas
D41S1301	45	40,22	1809,9	42,60	10
D41S1302	50	41,19	2059,5	51,00	7
D41S1303	45	46,56	2095,2	51,40	10
Promedio	47	42,66	1988,2	48,33	9
Desv. Estd	3	3,00	155,0	5,00	1



Tabla 4. Caracterización del Sobrenadante de la fermentación concentrado.

Lote	Volumen (l)	Concen- tración (mg l ⁻¹)	Masa (mg)	Eficiencia (%)	Reducción del Volumen	Actividad Biológica (%)
D41Sc1301	1,3	1309	1702	94	34,6	47,0
D41Sc1302	1,7	1137	1933	94	23,5	49,4
D41Sc1303	2,4	843	2023	97	20,8	47,1
Promedio	1,8	1096	1886	95	26	47,8
Desv. Estd	0,6	236	166	2	7	1,4



4.5. PURIFICACIÓN DEL ANTI-CD4.

El método de separación cromatográfico más usado para purificar la mayoría de las especies de IgG es la Cromatografía de Afinidad, usando el empaquetamiento con matrices consistente en Proteína A (99). La Proteína A, originalmente derivada de una cepa de *Staphylococcus aureus*, está compuesta por un único polipéptido de una masa molecular de 42 kDa. La misma posee la propiedad de unirse a moléculas de IgG por la fracción constante, lo que naturalmente aprovecha el microorganismo para bloquear la respuesta del sistema inmune. El estándar actual es una versión recombinante truncada de 32 kDa que exhibe la misma afinidad por la IgG que la proteína nativa, pero que, a la vez, posee propiedades de uniones no específicas considerablemente menores (100).

La captura de proteínas “diana” de la cosecha cruda define las etapas de procesamiento *downstream* restantes. Cuanto más eficiente y selectiva sea la captura, menos complicadas serán las siguientes operaciones de cromatografía, filtración, formulación y acabado. Para anticuerpos monoclonales, la captura invariablemente selecciona preferencialmente la cromatografía de afinidad con resinas de Proteína A (101).

Para realizar la separación del anticuerpo monoclonal anti-CD4 contenido en el sobrenadante concentrado se empleó la cromatografía de afinidad como paso de captura y concentración de la molécula, siguiéndole luego un cambio de buffer empleando membranas de diálisis de 10 KDa. Este proceso es el mismo que se emplea para la obtención de este AcM, purificado a partir de Líquido Ascítico Murino (LAM) (102).

Fueron realizadas 6 corridas productivas donde se dividió cada lote de sobrenadante concentrado en dos volúmenes iguales para su aplicación a la columna. El perfil cromatográfico que se obtuvo se muestra en el **Anexo 6**, el cual cumple con el patrón reportado (1; 100).

En todos los casos quedó registrado la elución en un pico único, lo que reflejó la alta pureza de las proteínas salientes. La altura del pico es una medida indirecta de la masa de anticuerpos introducidos al sistema en los sobrenadantes aplicados, y es también un reflejo de la concentración de anticuerpos en el purificado. Las características del proceso establecido se muestran en la **tabla 5**.



Tabla 5. Resultados de la purificación del sobrenadante concentrado.

Lote del purificado	APLICADO			ELUIDO			RECOBRADO (%)
	Volumen S _{Nc} (ml)	Conc. AcM (mg ml ⁻¹)	Masa (mg)	Volumen (ml)	Conc. (mg ml ⁻¹)	Masa (mg)	
D41P1302	550	1.309	719.95	96	4.80	459.36	63.80
D41P1304	550	1.309	719.95	99	5.26	520.74	72.33
D41P1305	850	1.137	966.45	100	5.26	526.00	54.43
D41P1306	850	1.137	966.45	96	6.76	526.00	67.15
D41P1307	1200	0.843	1011.60	99	5.32	526.68	52.06
D41P1308	1200	0.843	1011.60	96	5.40	518.40	51.25
Promedio				97	5.47	512.86	60.17

S_{Nc}: sobrenadante concentrado



Las concentraciones de los purificados se mantuvieron entre 4.8 - 6.7 mg ml⁻¹, estas son superiores a las obtenidas por Miranda quien trabajó a una escala inferior, reportando concentraciones de 2.55 mg ml⁻¹ (1).

El estándar de la industria para el recobrado en pasos de captura de anticuerpos monoclonales en Proteína A varía entre 70 y 95 % (103). En este caso se obtiene un valor medio de 60.17 %. La diferencia entre el valor reportado en la literatura y los valores obtenidos en la captura del anti-CD4 puede estar dada por el método de cuantificación de IgG en el crudo de fermentación, mediante ELISA, que tiene una tendencia a subestimar los resultados; por lo tanto, los valores de recobrado obtenidos tomando esta técnica como referencia, pueden ser inferiores a los valores reales. Otros procesos de purificación de anticuerpos de la familia IgG refieren datos de recobrados entre 55.3 y 95 % para diferentes proteínas A (104; 55).

El sistema de calidad de LABEX tiene establecidos límites de aceptación para la molécula que se obtiene a partir de LAM los cuales se muestran en el **Anexo 7** (105).

Estos mismos criterios fueron los evaluados para los productos obtenidos en el nuevo proceso productivo. Para ello fueron enviadas muestras al laboratorio de control de la calidad del CIM, donde se realizaron: determinación de identidad por la técnica de electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reducida (SDS-PAGE), la prueba de pureza por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la actividad biológica por citometría de flujo, además de otras pruebas. Los resultados principales se muestran en la **tabla 6**.

Los purificados presentaron una pureza determinada por el método de electroforesis SDS-PAGE reducido con valores que oscilaron entre 53 y 58 kDa para la cadena pesada y 24 y 25 kDa para la cadena ligera; cumpliendo con el criterio de aceptación, donde establece que la cadena pesada debe estar cercana a 50 kDa y la cadena ligera aproximadamente en 25 kDa manifestando patrones electroforéticos que evidenciaban pureza e identidad de la molécula (**Anexo 8**).



Tabla 6. Resultados de las especificaciones de calidad del Anti-CD4 purificado a partir de sobrenadante de cultivo.

Lotes	Pureza por HPLC (%)	Identidad por electroforesis (kDa)	Actividad Biológica (%)
D41P1302	99.89	57.57 – 25.34	35.6
D41P1304	99.93	58.08 – 25.45	37.8
D41P1305	99.67	54.22 – 25.13	37.8
D41P1306	99.70	53.68 – 25.00	31.2
D41P1307	99.91	53.68 – 25.00	36.0
D41P1308	99.83	53.06 – 24.65	47.0
Promedio	99.82 ± 0.11	55.05 – 25.09	37.6 ± 5.21



La pureza también fue evaluada mediante la técnica de HPLC obteniéndose como resultado un promedio de 99.82 % (**Anexo 9**). La actividad biológica mostró valores que se encuentran entre 31 y 47 % de reconocimiento específico cumpliendo igualmente con los límites estipulados (Tabla 6). En la **tabla 7** se muestran los resultados de calidad para purificados obtenidos a partir de LAM y usando el proceso que se ha diseñado. Como se puede apreciar no hay diferencias entre las moléculas obtenidas entre ambos procesos. En el caso de la pureza los valores promedios están cercano al 99.8 % y la actividad biológica, a pesar de existir diferencias están en el rango reportado por la especificación (105). Por lo que se puede inferir que la introducción de la fermentación en biorreactor de ola, no modifica la estructura, identidad y actividad biológica de la molécula Anti-CD4.

Tabla 7. Resultados de las especificaciones de calidad del Anti-CD4 purificado a partir de líquido ascítico murino.

Lotes	Pureza HPLC (%)	Identidad por electroforesis (kDa)	Actividad Biológica (%)
02P1201	99.94	57.74 – 24.07	50.9
02P1202	99.43	55.07 –25.00	37.0
02P1203	99.95	57.24 –25.25	39.6
Promedio	99.77 ± 0.29	56.68 – 24.77	42.5 ± 7.5



4.6. VALORACIÓN ECONÓMICA DEL PROCESO PRODUCTIVO "IN VITRO".

Uno de los aspectos más importantes en el establecimiento de un proceso productivo independientemente de su naturaleza, es determinar el costo de producción. Este dato nos permite conocer la rentabilidad del proceso en sí, además de su viabilidad.

A continuación, se presenta el diagrama de flujo con la secuencia del proceso productivo propuesto a validar (**Figura 10**).

El nuevo proceso productivo introduce cambios principalmente en la etapa de obtención del Ingrediente Farmacéutico Activo (*up-stream*), manteniéndose invariable el resto de las operaciones a partir de la etapa de purificación. Por estas razones el análisis económico abarca el proceso de preparación de medios, obtención de inóculo, fermentación, clarificación y concentración.

Partiendo de un análisis de los datos históricos durante los años 2011 al 2013, de la producción de anti-CD4 purificado a partir de LAM, donde existió la mayor demanda para este producto llegando a 1 g al año. Sobre esta base se diseñó el proceso productivo y se realizó el cálculo económico.

Para obtener un gramo de producto es necesario partir de 50 l de sobrenadante de cultivo, rico en anticuerpo monoclonal Anti-CD4. En la corrida de fermentación, este resultado se obtiene a los 11 días de trabajo, con una masa total de 2 g, pero debido a las pérdidas por procesamiento, esta cantidad se reduce hasta 1,7 g al final del proceso de concentración.

A cada una de las etapas se le confeccionó la ficha de costo, donde se reportan los gastos directos en que se incurre directamente en las operaciones, definidos principalmente por los reactivos, materiales y la mano de obra de operación (**Anexo 10**).

En la **Fig. 11** se muestra el desglose de los gastos por operaciones, el cual tiene un valor total de \$ 1546,93 UM, donde el mayor por ciento está representado por la etapa de clarificación (32 %) y a continuación la de fermentación (28 %); definiéndose como los dos procesos críticos. Esto se debe a que los materiales que se utilizan, en su gran mayoría son filtros y bolsas, los cuales son importados y tienen un precio elevado, debido a su costo unitario y su fletaje. La tercera etapa en importancia es la preparación de medio de cultivo para la fermentación, con un 18 %, donde se utilizan materiales gastables y medio de cultivo, los cuales también son importados. Por tanto, es preciso, que estas tres etapas sean las de mayor eficiencia durante el proceso productivo, porque son las que tienen una mayor repercusión en el costo total de operación.

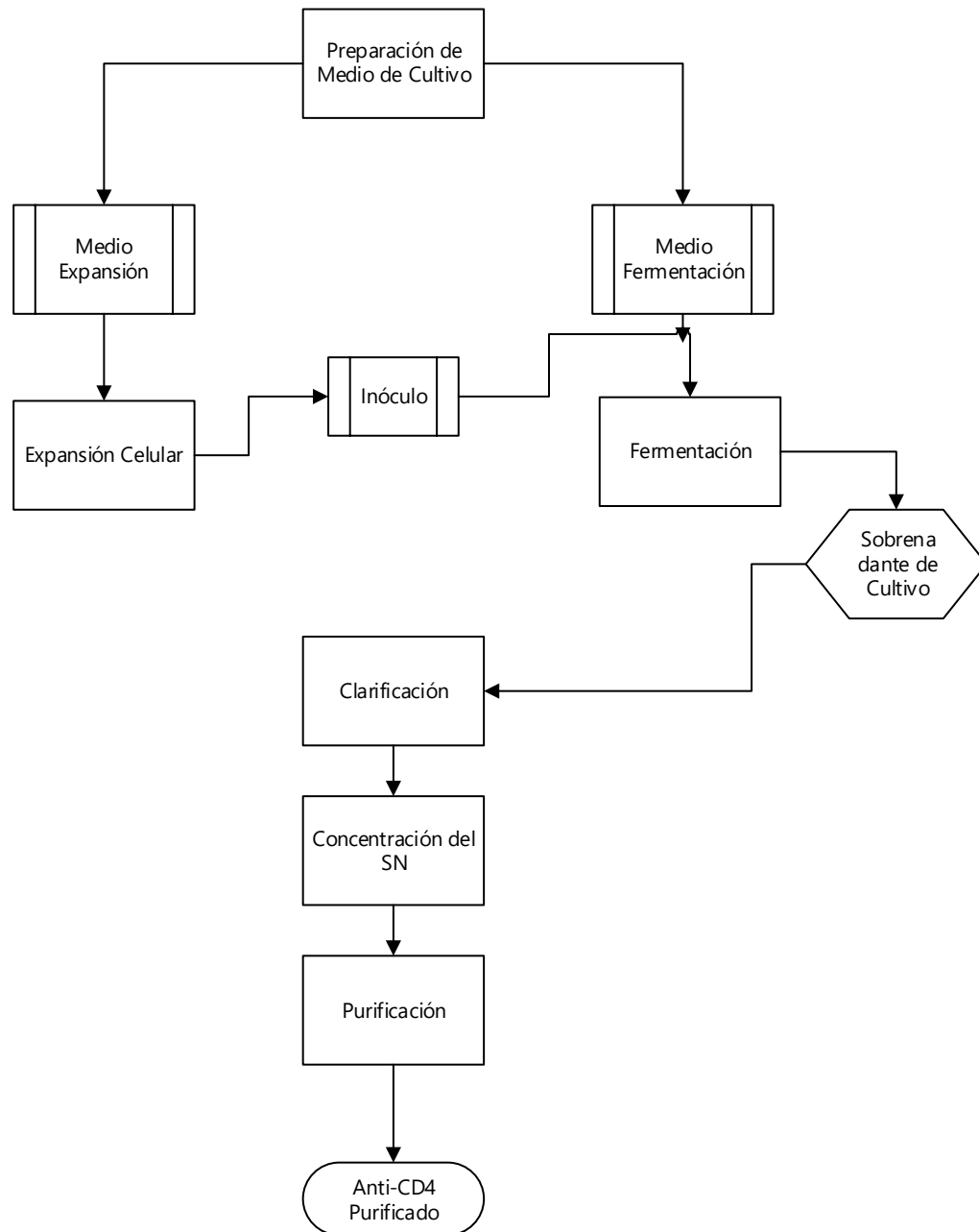


Figura 10. Diagrama de Flujo del Proceso productivo propuesto.

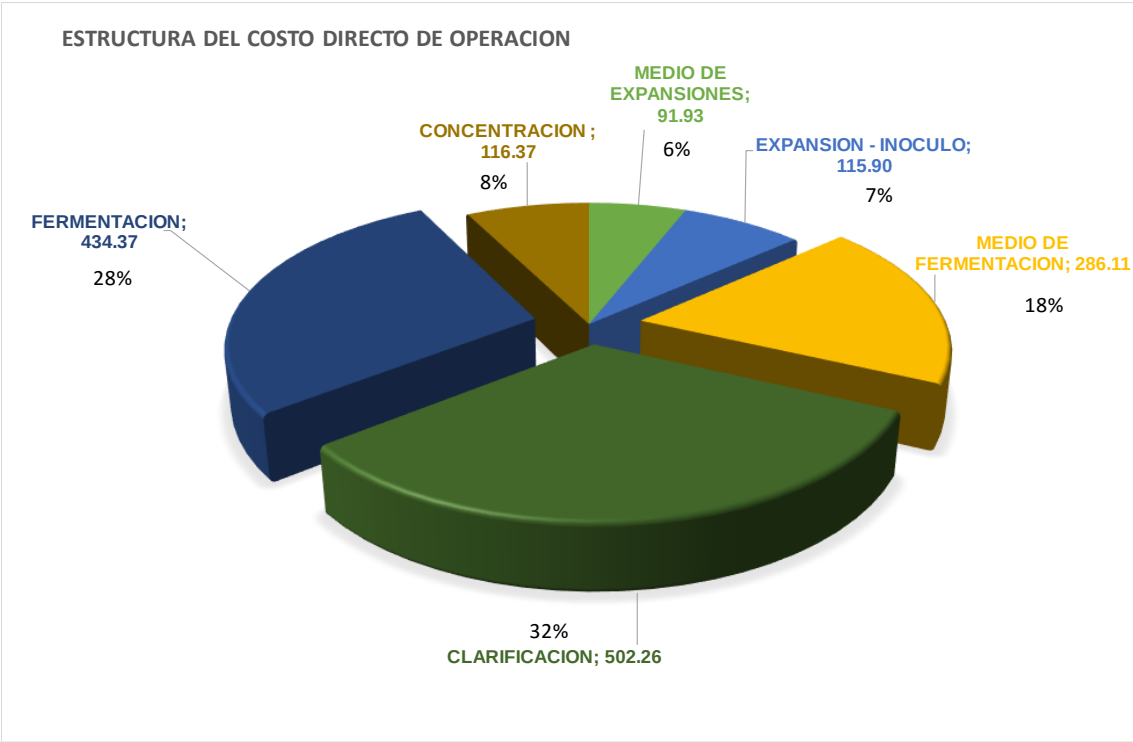


Figura 11. Estructura de los gastos directos de operación en la ficha de costos de procesos.



Para la producción de un litro de LAM anti-CD4, es necesario emplear 500 animales, en este volumen se obtiene igual cantidad de producto que en 50 l de sobrenadante, sin embargo, la adquisición de los Biomodelos se realiza en CENPALAB, centro que se encuentra ubicado en la Habana. Cada ratón tiene un precio de 27.48 CUP, los cuales deben ser trasladados en avión hasta Santiago de Cuba y una vez en el centro son sometidos a cuarentena, la cual dura de 7 – 10 días, después son liberados y pre inoculados, luego de un tiempo mínimo de espera de 7 días, se realiza la inoculación, la etapa de extracción comienza aproximadamente después de 15 días y puede demorar hasta 15 días más; con una ganancia de tiempo de alrededor de 30 días, si se emplea la fermentación en el biorreactor. Durante todo este periodo los mayores gastos son por mano de obra de operación y alimentación de los animales. No obstante, la productividad obtenida mediante este proceso “*in vivo*” es mayor, resultando alrededor de $0.03 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$

Si se realiza una comparación económica en moneda unitaria entre ambas plataformas productivas, solamente la adquisición de los Biomodelos tiene un costo de \$ 13 130,00 UM, valor que resulta superior a los \$ 1546 ,93 UM de la producción *in vitro*; por tanto, el empleo de fermentadores de ola para la obtención del anticuerpo monoclonal anti-CD4 resulta factible económicamente.

La tecnología *in vivo* tiene como principal desventaja la variabilidad entre lotes productivos, y las dificultades que se presentan en las etapas de clarificación-purificación, así como los aspectos éticos que involucran estos procedimientos. Muchas veces estos aspectos éticos determinan su comercialización en mercados donde existen fuertes regulaciones restrictivas a estos proceder, además de los controles sanitarios que se exigen por los Organismos Reguladores.

La tecnología *in vitro* elimina las dificultades anteriores, pero incrementa la dependencia de proveedores externos para mantener estable el proceso productivo. Esto último se puede mejorar a través de un sistema de logística bien establecido, que reduzca los riesgos asociados, donde el CIM tiene vasta experiencia y con evaluaciones de varios proveedores.

Como resultado de estas comparaciones, se pueden establecer procesos *in vivo* e *in vitro*, como alternativas para la obtención del anticuerpo monoclonal anti-CD4, permitiendo versatilidad en los procesos productivos, en relación con sus condiciones logísticas, regulaciones/requisitos a cumplir, la disponibilidad técnica a los procesos fermentativos que lo rigen y las demandas que se requieren cubrir del producto.



5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Conclusiones

- El estudio cinético del Hibridoma T4 anti-CD4 en medio PFHM-II y frascos Roller, se caracterizó por una $\mu_{\max} = 0.046 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, en un td menor de 16 h y viabilidad superior a 95%, con una productividad volumétrica de más de $120 \mu\text{g ml}^{-1}$ de anticuerpo a expensas de un bajo consumo de glucosa ($1.93 \cdot 10^{-12} \text{ g cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$).
- El Biorreactor de Ola propuesto es recomendable para la producción de IgG, eliminando la variabilidad entre lotes productivos, favoreciendo el proceso de separación-purificación y los aspectos bioéticos involucrados en los procesos "in vivo".
- Los parámetros de operación seleccionados para establecer el proceso de fermentación "in vitro" en la obtención del anti-CD4 fueron 20 l de volumen de trabajo y 17 rpm como agitación; resultando en un valor promedio de $X_v = 2.09 \pm 0.07 \cdot 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$, $\mu = 0.030 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$, los mejores valores de productividad con un promedio de $13.50 \pm 3.03 \cdot 10^{-7} \mu\text{g cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$, acumulándose IgG hasta llegar a una concentración de $74.67 \pm 4.16 \mu\text{g ml}^{-1}$.
- Se establece un proceso previo a la purificación de filtración tangencial con membrana y concentración utilizando cartuchos de fibras huecas (30 kDa), donde las pérdidas se logra concentrar más de 20 veces el sobrenadante y las pérdidas son inferiores al 10% de la masa total producida de anti-CD4. Bajo este proceso se mantiene el % de reconocimiento del AcM por encima del 47 %, resultando en el 60 % del costo total de operaciones. Se obtienen resultados similares en los purificados, independientemente de la procedencia de la materia prima.
- La fermentación "in vitro" resulta alrededor de ocho veces más económica en referencia a sus costos, aunque la productividad del proceso in vivo es tres veces mayor. Ambas proveen las cantidades para cubrir la demanda nacional actual (1 g), según los procedimientos establecidos en el LABEX, pero se han de tener en cuenta las debilidades que se le adjudican a cada proceso en cuestión para su elección.



Recomendaciones

- Estudiar otras estrategias en el proceso fermentativo para mejorar la productividad y alcanzar mayor competitividad con respecto al proceso *in vivo*.
- Evaluar la sustitución de materiales desechables en los procesos de clarificación-concentración, por sistemas reutilizables, reduciendo el costo asociado y el porcentaje de estas etapas en el costo total de la fermentación.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Miranda, Alejandro.** *Evaluación del Hibridoma t4 anti-CD4 para la producción in vitro del AcM IOR -T4.* Universidad de Oriente - LABEX. 2011. Tesis Maestría.
2. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of.* **Köhler G, Milstein C.** 1975, *Nature.*, págs. 256: 495-497.
3. *A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies.* **Shulman, M.** 276, 1975, *Nature*, págs. 269-270.
4. *Global Monoclonal Antibodies Market Review.* **Maggon, K.** 2008, World Top Ten mAbs.
5. *Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity.* **Mateo C, Moreno E, Amour K, Lombardero J, Harris W, Pérez R.** 1997, *Immunotechnology.*, págs. 3:71-81.
6. *Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos.* **García, A.** 5, s.l. : Elsevier , 2011, NEUROLOGÍA, Vol. 26.
7. **Martínez Díaz, Vicente.** Biotech Spain. [En línea] 11 de julio de 2013. [Citado el: 17 de enero de 2017.] <https://biotechspain.com/>.
8. *Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: A brief review application.* **Saleem M, Kamal M.** 2008, *African Journal of Biotechnology.*, págs. 7(8): 923-925.
9. *Established bioprocesses for producing antibodies as a basis for future planning.* **Farid, SS.** 2006, *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, págs. 101:1-42.
10. **DAKO.** *Monoclonal Mouse Anti-Human CD4/FITC, Clone MT310 Code F0766.* 2014. 124914-002.
11. *Growth of NSO cells in protein-free chemically defined medium.* **Gorfien S, Paul B, Walowitz J, Keem R, Biddle W, Jayme D.** 2000, *Biotechnol Prog.*, págs. 16(5): 682-687.
12. *Industrial implementation of in vitro production of monoclonal antibodies.* **Dewar V, Voet P, Denamur F, Smal J.** 2005, *ILAR Journal.*, págs. 46(3): 307-313.
13. *Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins.* **Swartz, JR.** 2001, *Curr. Opin. Biotechnol.*, págs. 12: 195-201.
14. *Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems.* **Graumann K, Premstaller A.** 2006, *Biotechnol J.*, págs. 1(2): 164-186.
15. *Natural antibodies as contaminants of hybridoma products.* **Gooi HC, Feizi T.** 2004, *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, págs. 106(2): 539-545.
16. *Estudio de los tumores sólidos desarrollados por los ratones durante la producción de anticuerpos monoclonales.* **Fuentes D, González RR, González BO, Negrín N.** 2003, *VacciMonitor.*, págs. 12(3): 11-14.
17. **Committee on Methods of producing monoclonal antibodies institute for laboratory animal research, National Research Council.** *Monoclonal Antibody Production.* National Academy Press. [En línea] 1999. <<http://www.nap.edu/catalog/9450.html>>.



18. **production., NHRMC. Guidelines for monoclonal antibody.** NHRMC. [En línea] 2008. <<http://www.ag.gov.au/cca>>..
19. *Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.* **Eagle, H.** 1995, Science., págs. 122: 501-504.
20. *Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations.* **Even MS, Sandusky CB, Barnard ND.** 2006, Trends Biotechnol., págs. 23(6): 105-108.
21. *Why do we still use serum in the production of biopharmaceuticals.* **Shah, G.** 1999, Dev. Biol. Stand., págs. 99: 17-22.
22. *Introduction to animal cell culture technology – past, present and future.* **Merten, O.** 2006, Cytotechnology., págs. 50(1-3): 1-7.
23. *Serum and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11.* **Schröder M, Matischak K, Friedl P.** 2004, J Biotechnol., págs. 108(3): 279-292.
24. *Molecular integrity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells in batch culture and in continuous-flow culture with integrated product recovery.* **Mohan SB, Chohan SR, Eade J, Lyddiatt A.** 1993, Biotechnol Bioeng., págs. 42(8): 974-986.
25. *The protective effect of serum against hydrodynamic damage of hybridoma cells in agitated and surface-aerated bioreactors.* **Kunas KT, Papoutsakis ET.** 1995, J Biotechnol., págs. 15: 57-70.
26. *Hydrodynamic stress: Death and cellular damage in agitated cultures.* **Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA.** 2006, Rev Latinoam Microbiol., págs. 48(3-4): 269-280.
27. *Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: Substrate and agitation effects.* **Legazpi L, Díaz J, Laca A, Díaz M.** 2005, Biochemical Engineering Journal., págs. 26(2-3): 122-130.
28. **Hernández, H.** *Microbiología Industrial. (1ª Ed.).* San José de Costa Rica. : EUNED, 2003.
29. *Antibody production. Advanced drugs delivery reviews.* **Birch JR, Racher AJ.** 2006, Advanced drugs delivery reviews, págs. 58:671-685.
30. https://es.wikipedia.org/wiki/Crecimiento_bacteriano#cite_note-7. [En línea] Enero de 2017. https://es.wikipedia.org/wiki/Crecimiento_bacteriano#cite_note-7.
31. **RM, Twyman.** *Gene transfer to animal cells. Advanced methods.* . 1era. s.l. : BIOS Scientific Publishers, 2005.
32. *Effect of temperature on hybridoma cell cycle and MAb production.* **Bloemkolk JW, Gray MR, Merchant F, Mosmann TR.** 1992, Biotechnol Bioeng., págs. 40(3): 427-31.
33. *Effects of lactate concentration on glucose and glutamine feeding in hybridoma cultivation.* **Omasa T, Higashiyama K, Shioya S, Suga K.** 1996, Journal of Fermentation and Bioengineering, págs. 18(4): 329-336.
34. *A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH.* **Miller WM, Blanch HW, Wilke CR.** 1988, Biotechnol Bioeng., págs. 32(8): 947-965.



35. *Hybridoma growth, metabolism, and product formation in HEPES-buffered medium: II. Effect of pH.* Schmid G, Blanch HW, Wilke CR. 1990, Biotechnology Letters., págs. 12(9): 633-638.
36. *Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells.* Mercille S, Massie B. 1994, Cytotechnology., págs. 15(1-3): 117-128.
37. *Cell death from bursting bubbles: Role of cell attachment to rising bubble in sparged reactors.* Meier SJ, Hatton TA, Wang DI. 1999, Biotechnol Bioeng., págs. 62(4): 468-478.
38. *Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage.* Papoutsakis, ET. 1991, Trends Biotechnol., págs. 9(9): 316-324.
39. *Oxygen transfer characterization and mammalian cell scale up. Oxygen transfer characterization and mammalian cell scale up.* Figueredo A, Ojito E. 1997, Congreso de Biotecnología Habana`97.
40. *A bioreactor system based on a novel oxygen transfer method.* Qian J, Li H, Hui M, Hui N, Joudi A, Rishton G, et al. 2008, Bioprocess International., págs. 6(6): 66-78.
41. *Animal cell damage in sparged bioreactor.* Chisti, Y. 18 , 2000, págs. 420-432.
42. *Single-use Bioreactors Have Reached the Big Time.* A, Cynthia Challener. 3, 2017, BioPharm International, Vol. 30, págs. 18-23.
43. *Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing.* Gronemeyer, Petra, Ditz, Reinhard y Strube, Jochen. 2014, Bioengineering , Vol. 1, págs. 188-212.
44. *Trends in Single-Use Bioreactors.* HERNANDEZ, RANDI. 2014, BioPharm International, págs. 20-23.
45. *Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores.* CÁRDENAS BELTRÁN, NATHALY. Colombia : s.n., 2013.
46. *Cultivo de Células Animales Sincronizadas en Biorreactores como un Nuevo Modo de Operación para Optimizar la Producción de Proteínas Recombinantes.* Mendoza, Elena. 2, Mexico : s.n., 2016, BioTecnología, Vol. 20, págs. 26-37.
47. *Cultivos semicontinuos como una herramienta para la caracterización celular del hibridoma murino 1E10.* Svieta Victores, Adolfo Castillo. 2008, Biotecnología Aplicada , Vol. 25, págs. 149-154.
48. *Industrial choices for protein production by large-scale cell culture.* Chu DL, Robinson DK. 2001, Curr Opin Biotechnol., págs. 12(2): 180-187.
49. *Figueredo, A. Evaluación de la tecnología de perfusión en biorreactores de tanque agitado como alternativa productiva para la obtención del anticuerpo hR3.* Habana, Cuba : Tesis de Maestría en Ciencias Biotecnológicas, 2003.
50. *Zorrilla, Katia. Análisis Económico del Impacto de la Tecnología Desechable en una Planta de Anticuerpos para la Terapia del Cáncer.* La Habana : s.n., 2008.
51. *Repeated batch fermentation for surfactin production with immobilized Bacillus subtilis BS-37: two-stage pH control and foam fractionation.* Gaobin, Yi, y otros. 2016, J Chem Technol Biotechnol.

52. Amersham Biosciences. *Handbooks. Affinity Chromatography Principles and Methods*. 2004. Vols. 18-1022-29.
53. Amersham Biosciences. *Antibody Purification Handbook*. 2002.
54. Novasep SAS. Novasep. <www.novasep.com>. [En línea] 2009. <www.novasep.com>..
55. *Comparing Protein A Resins for Monoclonal Antibody Purification*. Kobayashi, Shohei y Ueda, Yasufumi. 2013, BioPharm INTERNATIONAL.
56. Sofer G, Chirica LC. Downstream processing: Improving productivity in downstream processing. BioPharm International. <http://biopharminternational.com>. [En línea] 2006. [http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/Article/Downstream-Processing-Improving-Productivity-in Do/ ArticleStandard/Article /detail/ 390956](http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/Article/Downstream-Processing-Improving-Productivity-in-Do/ArticleStandard/Article/detail/390956)>..
57. Jagschies G, Gronberg A, Bjorkman T, Lacki KM, Johansson HJ. Economical Evaluation of Downstream Processing Options for Monoclonal Antibody. BioPharm International. <<http://www.biopharminternational.com>>. [En línea] 2006. <<http://www.biopharminternational.com>>..
58. *Preparative chromatography of biomolecules*. Jungbauer, A. 1993, Vol. 639, págs. 3-16.
59. *An overview of affinity chromatography*. Wilchek M, Chaiken I. 2006, Methods Mol.Biol, págs. 147: 1-6.
60. Chon JH, Zarbis-Papastoitsis G. Advances in the production and downstream processing of antibodies. *Animal Cell Culture*. Baltimore,Ireland, USA : Baltimore, USA, 2015, Vol. 9.
61. Griffiths, B. Scaling-up of animal cell cultures. [aut. libro] R. Freshney. *Animal Cell Culture*. 1986.
62. *Influence of solid-phase antigen in competition enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) on calculated antigen-antibody dissociation constants*. Seligman, S.J. 168, 1994, J. Immunol. Methods , págs. 101-110.
63. *Documeto de Calidad. Procedimiento Normalizado de Operación. O5 PNO.009 Diálisis*. 2015. Edición: 02.
64. *Procedimiento Normalizado de Operacion. H10PNO.004. Medicion de Inmunoglobulina G Humana por el metodo de ELISA* . s.l. : CIM, 2006.
65. Centro de Inmunologia Molecular . *PNO G10-0009 Inmunofluorescencia por Citometría de Flujo*. 2014.
66. *Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer*. Modjtahedi, H. Ali S, Essapen S. s.l. : Br Med Bul, 2012, Vol. 104, págs. 41–59.
67. Ecker DM, Ransohoff TC. Mammalian cell culture capacity for biopharmaceutical manufacturing. *Mammalian cell cultures for biologics manufacturing, Mammalian cell culture capacity for biopharmaceutical manufacturing*. Berlin/Heidelberg : Springer, 2014.



68. Toledano, Marlene. *Conjugación de marcadores linfocitarios monoclonales para citometría de flujo*. UO. Stgo de Cuba : s.n., 2005. Tesis de maestría.
69. *Equipment design considerations for large scale cell culture*. Marks, David M. 42, 2003, Cytotechnology, págs. 21-33.
70. Portner, R. Bioreactor for mamalian cell. [ed.] Mohamed Al-Rubeai. *Animal Cell*. s.l. : Springer, 2015, 4, págs. 89-136.
71. *Pluronic Enhances the Robustness and Reduces the Cell Attachment of Mammalian Cells*. Tharmalingam, T., Ghebeh, H. y Wuerz, T. 2008, Mol Biotechnol, Vol. 39, págs. 167-177.
72. Sánchez González, Katia. *Efecto del Acetato de Sodio sobre la producción del Anticuerpo Monoclonal nimotuzumab por la línea celular NSO/H7*. Universidad de la Habana- CIM. 2016. Tesis de Maestría.
73. Henry, Olivier. *Kinetics study of hybridoma growth and antibody production*. University of British Columbia. Canadá : s.n., 2000. Tesis de Maestría.
74. *Simpler Noninstrumented Batch and Semicontinuous Cultures Provide Mammalian Cell Kinetic Data Comparable to Continuous and Perfusion Cultures*. Henry, Olivier, Kwok, Ezra y Piret, James M. 2008, Biotechnol. Prog., Vol. 24, págs. 921-931.
75. *Relation between hybridoma growth and monoclonal antibody production*. Hayter, P.M., Kirkby, N. F. y Spier, R. E. 1992, Enzyme Microb. Technol., Vol. 14, págs. 454-461.
76. *Descriptive parameter evaluation in mammalian cell culture*. Dutton, Roshni L., Scharer, Jenö M. y Moo-Young, Murray. 26, 1998, Cytotechnology, págs. 139-152.
77. *EL USO DE BIORREACTORES DESECHABLES EN LA INDUSTRIA BIOFARMACÉUTICA Y SUS*. TRUJILLO-ROLDÁN, MAURICIO A. y VALDEZ-CRUZ, NORMA A. 158, 2009, Dyna, Vol. 76, pág. 280.
78. *HRMAS 1H-NMR measured changes of the metabolite profile as mesenchymal stem cells differentiate to targeted fat cells in vitro: implications for non-invasive monitoring of stem cell differentiation in vivo*. Shi C, Wang X, Wu S, Zhu Y, Chung LW, Mao HJ. 2008, Tissue Eng Regen Med, págs. 482-490.
79. APPLIKON BIOTECHNOLOGY. *50L APPLIFLEX FOR REUSABLE PH & DO Z650005040*. 2015. DATA SHEET.
80. *Bioreactor-based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing*. Wendt, D, Jakob, M y Martin, I. 2005, Journal of Bioscience and Bioengineering , Vol. 5, págs. 489-494. .
81. *Cultivation of hybridoma cells in suspension using WAVE Bioreactor Systems 2/10 and 20/50*. General Electric. 2008.
82. *Repeated hybridoma batch culture with cell recycle*. Blasey, H.D. y Bernard, A.R. 1993, Cytotechnology, Vol. 13, págs. 51-53.



83. *Relationship between hibridoma growth and monoclonal antibody production*. Hayter, P. M. 1992, Enzyme Microb. Technol., Vol. 14.
84. *Cell culture processes for monoclonal antibody production*. Li, Feng, y otros. 5, 2010, Landes Bioscience, Vol. 2, págs. 466-477.
85. *Advances in the production and downstream processing of antibodies*. . Chon, J.H. y Zarbis-Papastoitsis, G. 28, 2011, New Biotechnol., págs. 458–463.
86. *Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins*. Shukla, A.A. y Thömmes, J. 2010, Trends Biotechnol., Vol. 28, págs. 253–261.
87. Inoculum Preparation. [aut. libro] Craig J.L. Gershater. *Comprehensive Biotechnology*. s.l. : Elsevier , 2011, págs. 151-164.
88. Griffiths, JB. Mammalian cell culture reactors, scale-up. [ed.] Flickinger MC. *Encyclopedia of industrial biotechnology bioprocess, bioseparation, and cell technology*. New York : s.n., 2010, págs. 1-13.
89. *Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production in Semicontinuous Culture*. M, Leno y Merten OW, Hache J. 1992, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 39, págs. 596-606.
90. Dorka, Penny. *Modelling Batch and Fed-batch Mammalian Cell Cultures for Optimizing MAb Productivity*. University of Waterloo. Canadá : s.n., 2007. Tesis de Maestria.
91. *Modelling hybridoma cell growth and metabolism a comparison of selected models and data*. Portner, R y T, Schafer. 1996, J Biotechnol , Vol. 49, págs. 119-35.
92. *The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production*. Al-Fageeh, M y M, Marchant R Carden. 2006, Biotechno Bioeng, Vol. 98, págs. 397-403 .
93. *Fluctuations in continuous mammalian cell bioreactor with retention*. Hu, WS. 2006, Biotechnol Prog, Vol. 8.
94. *Flow cytometry: basic principles and applications*. Adan, Aysun, y otros. 2016, Critical Reviews in Biotechnology.
95. LABEX. *Preparación, montaje e inoculación del fermentador APPLIKON de 50 L. O3 PNO.001*. 2014.
96. *Harvest and Recovery of Monoclonal Antibodies from Large-Scale Mammalian Cell Culture*. Abhinav A. Shukla, Jagannadha Rao Kandula. 5, 2008, BioPharm International, Vol. 21.
97. *Membrane processes in Biotechnology*. Charcosset, C. 2006, Biotechnology Advances, Vol. 24, págs. 482-492.
98. LABEX. *Concentración de Sobrenadante filtrado O3 INS.002*. 2013.
99. *Purification of antibodies by affinity chromatography*. Huse K, BÖ HJ, Scholz GH. 2002, J. Biochem. Biophys. Methods., págs. 51: 217-231.



100. Rabell Velázquez, Grisel. *Obtención del anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína*. Universidad de Oriente - LABEX. 2014. Tesis Maestría .
101. *mAb Purification: Rethinking the Initial Capture Step*. De Palma, Angelo. 2, 2017, BioPharm International, Vol. 30.
102. LABEX. *Purificación de anticuerpos monoclonales O5 PNO.011*. 2016.
103. Amersham Bioscience. *Expanded Bed Adsorption Handbook. Principles and Methods*. . 2011. 18-1124-26.
104. Milián, Danuska Fernández. *Comparación entre columnas de adsorción en lecho empacado y columnas de adsorción en lecho expandido para el paso de captura del anticuerpo monoclonal hR3 en Streamline rProteína A*. CIM - ISPJAE. 2007. TESIS de Grado.
105. LABEX. *Anti-CD4 purificado a partir de Líquido*. 2016.
106. *A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies*. M., Shulman. 1978, Nature., págs. 276: 269-270.
107. Knol. <<http://knol.google.com/k/krishan-maggon/global-pharmaceutical-market->>. [En línea] 2010.
108. *Antibody Purification*. Handbook, Amersham Pharmacia Biotech, Edition AC,. 2004.

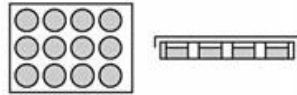


7. ANEXOS

Anexo 1. Tipos de Biorreactores.

a Static culture systems for smale scale

multi-well plates

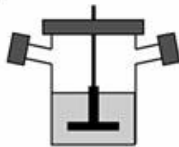


T-flask



b Dynamic culture systems for smale scale

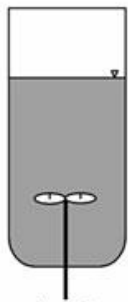
spinner



shake flask



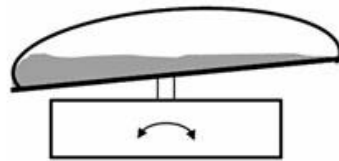
c Dynamic culture systems for suspension culture



stirred tank



air-lift-column



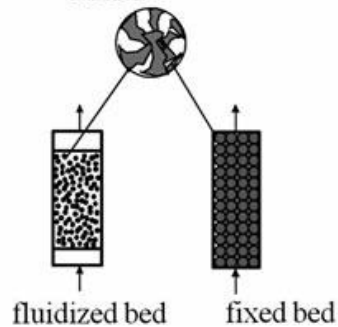
single-use wave-type



single-use stirred

d Dynamic culture systems for immobilized culture

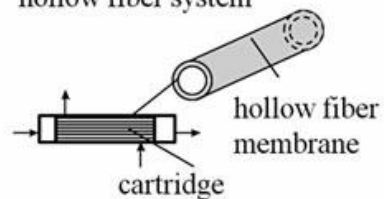
macroporous carrier



fluidized bed

fixed bed

hollow fiber system

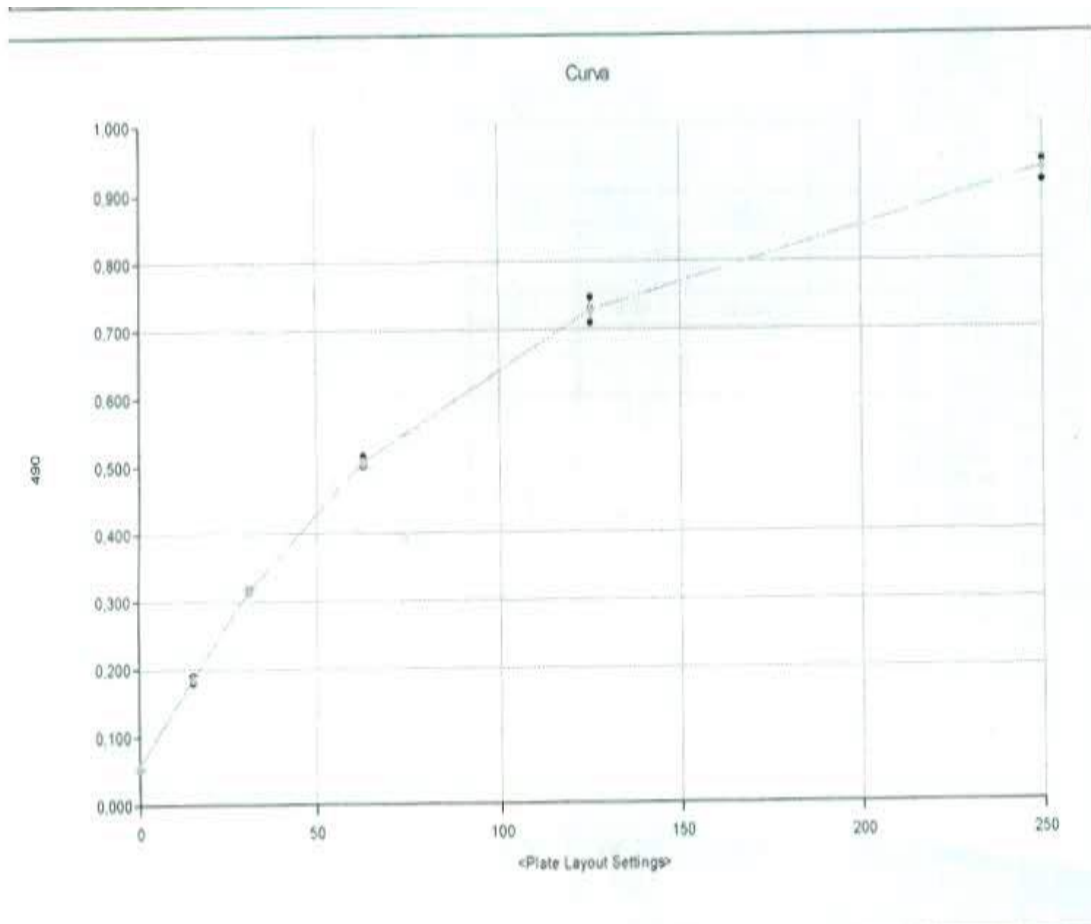


hollow fiber membrane

cartridge



Anexo 2. Curva patrón para determinación de la concentración de IgG por ELISA.





Anexo 3. Análisis estadístico para la determinación de los parámetros de operación: Volumen y agitación.

Análisis de Varianza para Xv - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Volumen	2,24501	2	1,12251	41,75	0,0000
B:Agitación	0,619756	1	0,619756	23,05	0,0004
INTERACCIONES					
AB	0,200344	2	0,100172	3,73	0,0551
RESIDUOS	0,322667	12	0,0268889		
TOTAL (CORREGIDO)	3,38778	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Xv por Volumen

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Volumen	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
25	6	0,911667	0,0669439	X
15	6	1,335	0,0669439	X
20	6	1,77667	0,0669439	X

Contraste	Sig.	Diferencia
15 - 20	*	-0,441667
15 - 25	*	0,423333
20 - 25	*	0,865

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Xv por Agitación

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Agitación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
25	9	1,15556	0,0546594	X
17	9	1,52667	0,0546594	X

Contraste	Sig.	Diferencia
17 - 25	*	0,371111

* indica una diferencia significativa.



Análisis de Varianza para μ - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Volumen	0,0000781078	2	0,0000390539	4,79	0,0296
B:Agitación	0,0000533889	1	0,0000533889	6,55	0,0251
INTERACCIONES					
AB	0,000140181	2	0,0000700906	8,59	0,0048
RESIDUOS	0,00009786	12	0,000008155		
TOTAL (CORREGIDO)	0,000369538	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para μ por Volumen

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Volumen	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
15	6	0,0254667	0,00116583	X
25	6	0,0264167	0,00116583	X
20	6	0,0302833	0,00116583	X

Contraste	Sig.	Diferencia
15 - 20	*	-0,00481667
15 - 25		-0,00095
20 - 25	*	0,00386667

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para μ por Agitación

Método: 95,0 porcentaje Duncan

Agitación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
25	9	0,0256667	0,000951899	X
17	9	0,0291111	0,000951899	X

Contraste	Sig.	Diferencia
17 - 25	*	0,00344444

* indica una diferencia significativa.



Análisis de Varianza para Productividad específica - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Volumen	92.0048	2	46.0024	5.64	0.0187
B:Agitación	45.474	1	45.474	5.58	0.0359
INTERACCIONES					
AB	13.1035	2	6.55176	0.80	0.4703
RESIDUOS	97.7917	12	8.14931		
TOTAL (CORREGIDO)	248.374	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para qp por Volumen

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Volumen	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
15	6	5.465	1.16543	X
25	6	9.48167	1.16543	X
20	6	10.775	1.16543	X

Contraste	Sig.	Diferencia
15 - 20	*	-5.31
15 - 25	*	-4.01667
20 - 25		1.29333

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad por Agitación

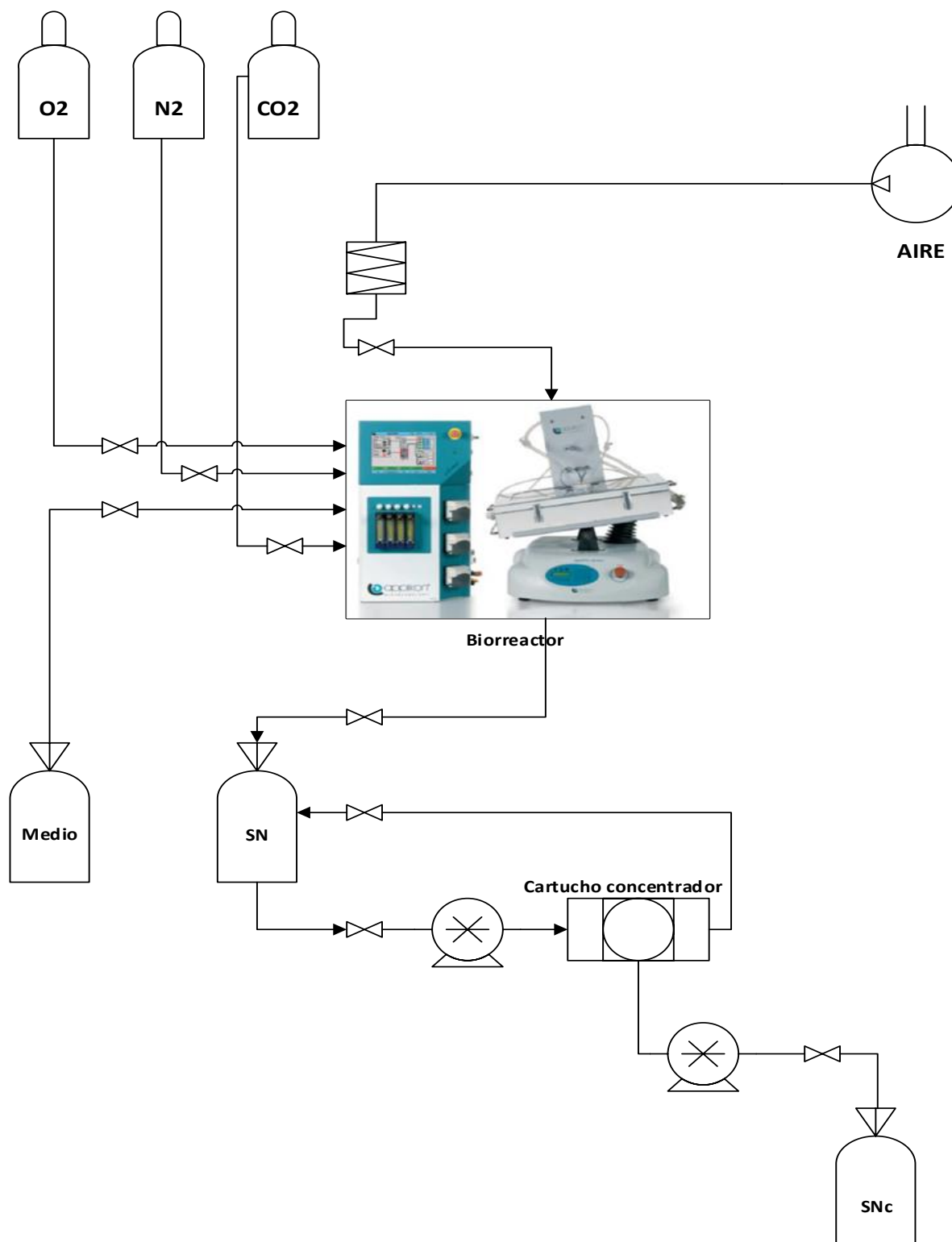
Método: 95.0 porcentaje Duncan

Agitación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
25	9	6.98444	0.951566	X
17	9	10.1633	0.951566	X

Contraste	Sig.	Diferencia
17 - 25	*	3.17889



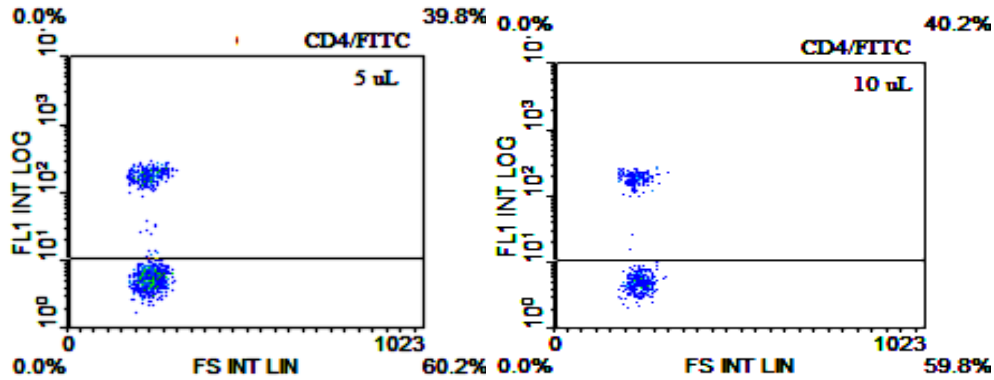
Anexo 4. Diagrama de Flujo Fermentación.



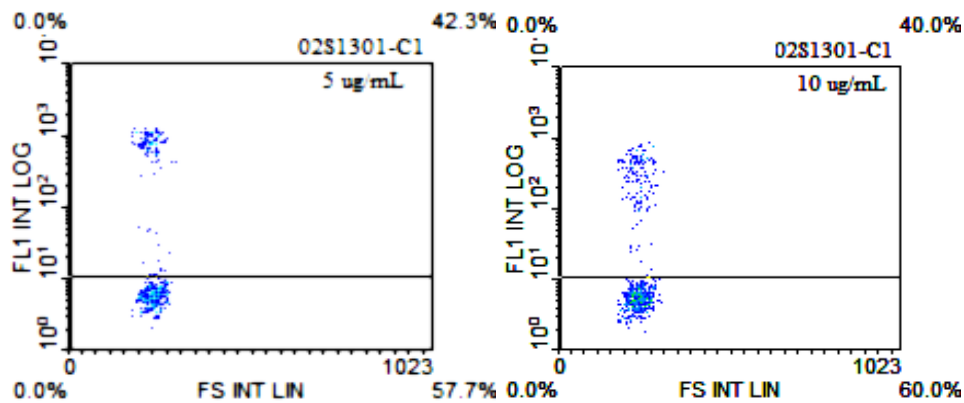


Anexo 5. Resultados de la Citotimetría de Flujo utilizando (A) patrones diluido de la DAKO y (B) Sobrenadante anti-CD4 (1:5, 1:10 v/v).

A)

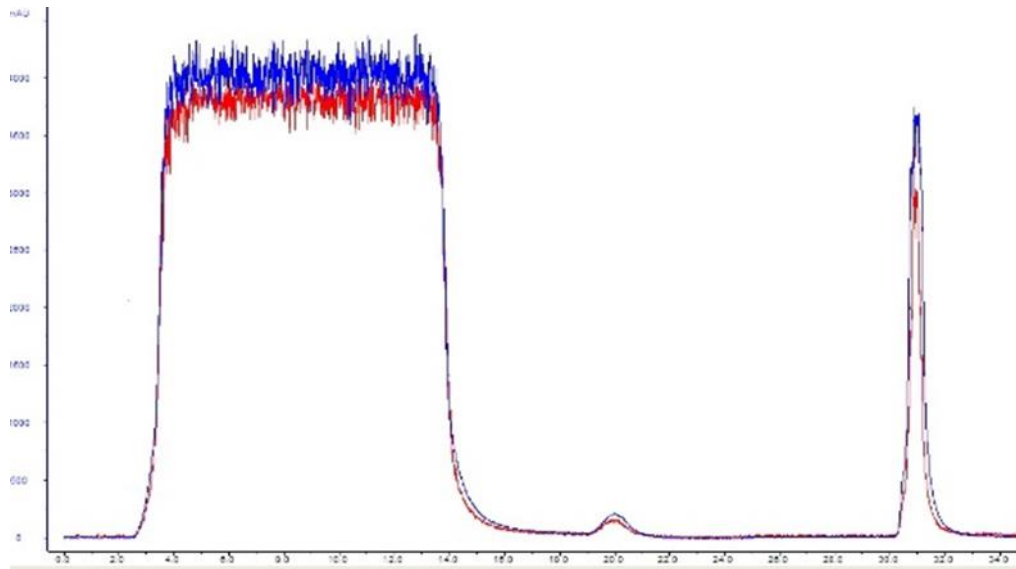


B)





Anexo 6. Perfil cromatográfico de la purificación por Afinidad del Anti-CD4.

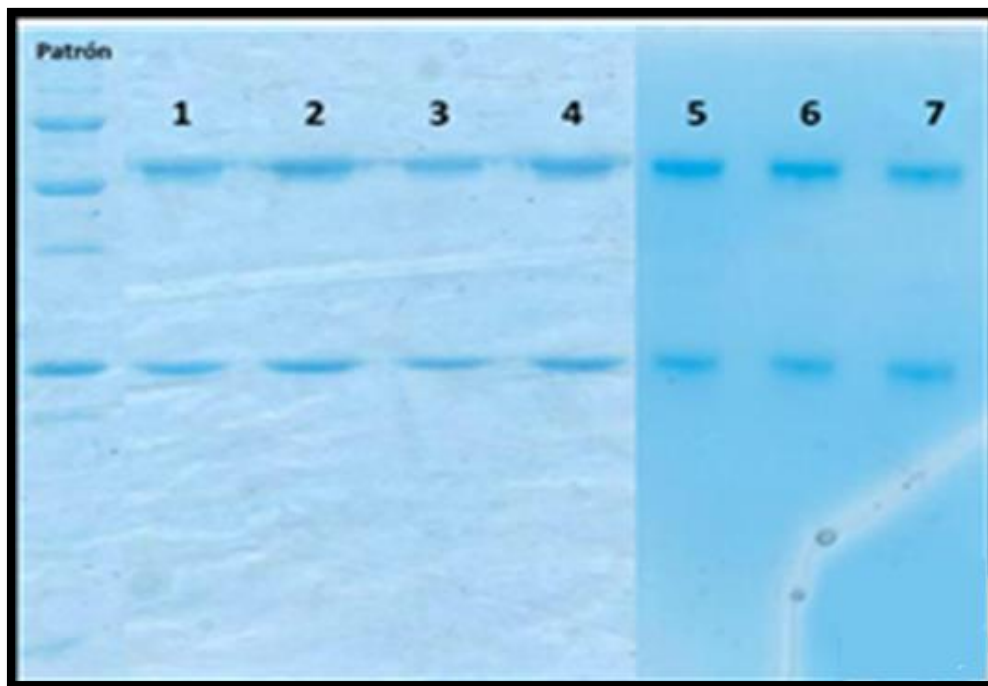


Anexo 7. Especificaciones de calidad del Anti-CD4 purificado a partir de Líquido Ascítico Murino.

Requisitos de Calidad	Métodos de Ensayo	Límites de Aceptación
Características organolépticas	Inspección Visual	Incoloro e inodoro y sin precipitado.
Concentración de Inmunoglobulinas	Espectrofotométrico (DO)	$\geq 0,5$ mg/mL
Actividad Biológica	IFI /Citometría de flujo O Inmunohistoquímica	Reconocimiento entre el 30 y 51 % de linfocitos en sangre periférica. O Reconocimiento en tejido linfóide normal: amígdala (marca área interfolicular y zona del manto). Timo (marca la zona de la corteza y la médula)
Pureza	HPLC	$\geq 95\%$ de monómeros + dímeros $\leq 7\%$ de dímeros
	Electroforesis Reducida	Una banda sobre los 50 kDa (cadena pesada) Una banda sobre los 25 kDa (cadena ligera)
	Electroforesis No reducida	Una sola banda a 150 KDa

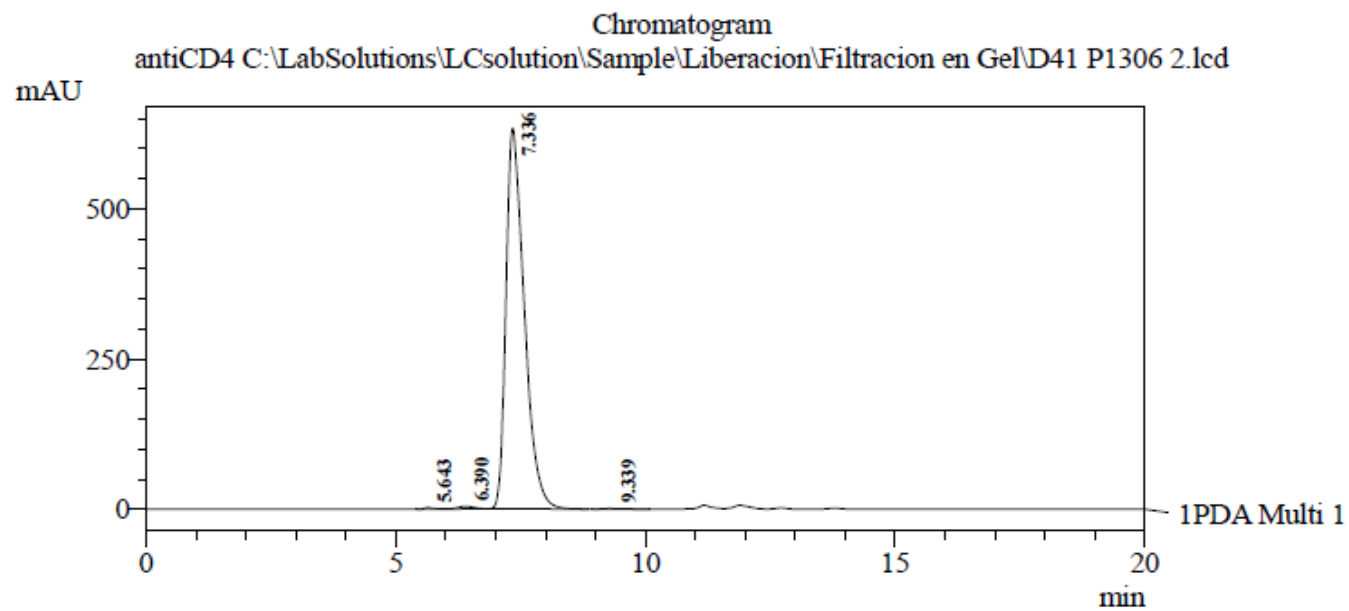


Anexo 8. Corrida electroforética SDS-PAGE del purificado a partir del sobrenadante de cultivo concentrado.



Leyenda: 1-D41P1301; 2-D41P1302; 3- D41P1303; 4- D41P1304; 5- D41P1305; 6- D41P1306; 7- D41P1307.

Anexo 9. Perfil de elución del HPLC y especificaciones de composición del purificado.



1 PDA Multi 1 / 280nm 1nm

PeakTable C:\LabSolutions\LCsolution\Sample\Liberacion\Filtracion en Gel\D41 P1306 2.lcd
PDA Ch1 280nm 1nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Width at 50% Height	Resolution	Tailing Factor (10%)
1	5.64	36945	0.23	0.175	0.000	0.000
2	6.39	94430	0.58	0.347	1.643	0.000
3	7.34	16150077	99.03	0.392	1.462	1.514
4	9.34	26418	0.16	0.281	3.353	1.224
Total		16307871	100.00			

Anexo 10. Fichas de Costo de los Procesos.

Ficha de costo medio de fermentación.

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		lor® anti-CD4humano-FITC		50	L	1	
Etapa		O1-Preparación de soluciones		Resultado	Medio PFHM-II	fermentacion	
Materias Primas y Materiales		U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
				CUC	MN	CUC	MN
							TOTAL
PFHM-II		g	765	0,150000	0,000000	114,750000	0,000000
Glucosa		g	100	0,038360	0,040300	3,836000	4,030000
Bicarbonato de Sodio		g	100	0,065200	0,000000	6,520000	0,000000
L-glutamina		g	1,5	0,650000	0,000000	0,975000	0,000000
Pluronic F-68		g	50	0,230000	0,000000	11,500000	0,000000
Agua Purificada		mL	50000	0,000000	0,000210	0,000000	10,500000
Alcohol 90°		mL	500	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Acido Clorhídrico		mL	100	0,062800	0,000000	6,280000	
Pipeta serológica de 10mL		U	1	0,330000	0,000000	0,330000	0,000000
Filtro Sartopore 2 MidiCaps		U	0	219,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Torunda		U	10	0,020224	0,000000	0,020244	0,000000
Guantes quirúrgicos		Par	2	0,156082	0,000000	0,312164	0,000000
Bolsa de 50L c/f		U	1	79,250000	0,000000	79,250000	
Tank liner 50L		U	1	0,589000	0,000000	0,589000	0,000000
						0,000000	0,000000
						0,000000	0,000000
						0,000000	0,000000
						0,000000	0,000000
TOTAL				300,523466	0,040510	224,362408	14,530000
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	3,0	0,00	17,20	17,20
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,71			0,00	3,02	3,02
TOTAL		2300,71		6,0	0,00	36,21	36,21
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado para Costo Indirecto				0,040	8,974496	2,029705	11,004201
Costo total de Resultado					233,336905	52,772319	286,109224
Costo unitario de Resultado					4,666738	1,055446	5,722184

Ficha de costo medio de expansión.

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		lor® anti-CD4humano-FITC		10	L	1	
Etapas		O1-Preparación de soluciones		Resultado	Medio PFHM-II	Expansión Celular	
Materias Primas y Materiales		U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE	
				CUC	MN	CUC	TOTAL
PFHM-II		g	153,3	0,150000	0,000000	22,995000	22,995000
Glucosa		g	20	0,038360	0,040300	0,767200	1,573200
Bicarbonato de Sodio		g	20	0,065200	0,000000	1,304000	1,304000
L-glutamina		g	0,3	0,650000	0,000000	0,195000	0,195000
Pluronic F-68		g	10	0,230000	0,000000	2,300000	2,300000
Agua Purificada		mL	10000	0,000000	0,000210	0,000000	2,100000
Alcohol 90°		mL	500	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Acido Clorhidrico		mL	20	0,062800		1,256000	
Pipeta serológica de 10mL		U	1	0,330000	0,000000	0,330000	0,330000
Sartobran 300		U	1	32,040000	0,000000	32,040000	32,040000
Torunda		U	10	0,002024	0,000000	0,020244	0,020244
Guantes quirúrgicos		Par	2	0,156082	0,000000	0,312164	0,312164
Roller		U	3	2,380000	0,000000	7,140000	7,140000
						0,000000	0,000000
						0,000000	0,000000
						0,000000	0,000000
TOTAL				36,104466	0,040510	68,659608	70,309608
SALARIO DIRECTO						IMPORTE	
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	1,0	0,00	5,73	5,73
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,50	5,33	1,0	0,00	5,33	5,33
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,71			0,00	1,01	1,01
TOTAL		2300,71		2,0	0,00	12,07	12,07
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
		Coeficiente Aplicado para Costo Indirecto		0,040	2,746384	0,599075	3,345459
		Costo total de Resultado			71,405993	15,575946	86,981939
		Costo unitario de Resultado			7,140599	1,557595	8,698194

Ficha de costo Inóculo.

FICHA DE COSTO	Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha	
Producto	ior® anti-CD4humano-FITC		4000	mL	10	26/10/2016	
Etapas	O1-Producción de Sobrenadante		Resultado	Inoculo de Anti-cd4			
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Medio PFHM-II	mL	4500	0,008900	0,000000	40,050000	0,000000	40,050000
Tripán Azul al 0,4% *3	mL	1,5	0,128392	0,000000	0,192588	0,000000	0,192588
Etanol 90°	mL	0	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Banco de trabajo anti CD4	criovial	1	3,142180	0,000000	3,142180	0,000000	3,142180
Placa de 24 pozos	U	1	0,050000	0,000000	0,050000	0,000000	0,050000
Frasco de cultivo de 25 cm2	U	1	0,443073	0,000000	0,443073	0,000000	0,443073
Frasco roller de 850cm2	U	8	2,380000	0,000000	19,040000	0,000000	19,040000
Pipeta serológica de 5 mL	U	14	0,300000	0,000000	4,200000	0,000000	4,200000
Pipeta serológica de 10 mL	U	16	0,330000	0,000000	5,280000	0,000000	5,280000
Pipeta serológica de 25 mL	U	1	0,087463	0,000000	0,087463	0,000000	0,087463
Pipeta serológica de 50 mL	U	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Tubo de centrifuga de 50 mL	U	1	2,531788	0,000000	2,531788	0,000000	2,531788
Tubo de centrifuga de 175 mL	U	24	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Vial de 1,5 mL	U	40	0,004716	0,000000	0,188640	0,000000	0,188640
Punta amarilla 200 µL	U	28	0,410475	0,000000	11,493297	0,000000	11,493297
Punta azul 1000 µL	U	3	0,028453	0,000000	0,085358	0,000000	0,085358
Torunda estéril	U	33	0,002024	0,000000	0,066807	0,000000	0,066807
Guantes quirúrgicos	Par	16	0,156082	0,000000	2,497312	0,000000	2,497312
TOTAL			10,003546	0,000000	89,348505	0,000000	89,348505
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	9,0	0,00	51,59	51,59
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,60	5,33	9,0	0,00	48,00	48,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,72			0,00	9,05	9,05
TOTAL		2300,82		18,0	0,00	108,64	108,64
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
	Coeficiente Aplicado			0,040	3,573940	4,345720	7,919660
	Costo total de Resultado				92,922445	112,988714	205,911159
	Costo unitario de Resultado				0,023231	0,028247	0,051478

Ficha de costo Fermentación.

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		lor® anti-CD4humano-FITC		50	L	10	26/10/2016
Etapas		Fermentacion		Resultado	SN Anti-cd4		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
Medio PFHM-II	L	50	5,720000	0,000000	286,000000	0,000000	286,000000
Tripán Azul al 0,4% *3	mL	1,5	0,128392	0,000000	0,192588	0,000000	0,192588
Etanol 90º	mL	0	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Pipeta serológica de 5 mL	U	15	0,300000	0,000000	4,500000	0,000000	4,500000
Tubo de centrifuga de 50 mL	U	1	2,531788	0,000000	2,531788	0,000000	2,531788
Vial de 1,5 mL	U	45	0,004716	0,000000	0,212220	0,000000	0,212220
Punta amarilla 200 µL	U	30	0,410475	0,000000	12,314247	0,000000	12,314247
Torunda estéril	U	40	0,002024	0,000000	0,080978	0,000000	0,080978
Guantes quirúrgicos	Par	30	0,156082	0,000000	4,682460	0,000000	4,682460
Bolsa de Fermentacion	U	1	227,250000	0,000000	227,250000	0,000000	227,250000
Inoculo	mL	4000	0,050000	0,000000	200,000000	0,000000	200,000000
TOTAL			236,553477	0,000000	737,764280	0,000000	737,764280
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	7,0	0,00	40,12	40,12
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,60	5,33	15,0	0,00	80,01	80,01
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,72			0,00	10,92	10,92
TOTAL		2300,82		22,0	0,00	131,05	131,05
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
					29,510571	5,241929	34,752500
Coeficiente Aplicado					0,040		
Costo total de Resultado					767,274851	136,290155	903,565006
Costo unitario de Resultado					15,345497	2,725803	18,071300

Ficha de costo clarificación del sobrenadante de cultivo.

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha
Producto		ior® anti-CD4humano-FITC		50	L	10	26/10/2016
Etapas		Filtracion		Resultado	SN Anti-cd4 Filtrado		
Materias Primas y Materiales	U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
			CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
SN Fermentacion	L	50	18,070000	0,000000	903,500000	0,000000	903,500000
Filtro Sartopore 2 MidiCaps 0,22µ	U	1	219,430000	0,000000	219,430000	0,000000	219,430000
Filtro Sartopore 2 MidiCaps 3µ	U	1	42,520000	0,000000	42,520000	0,000000	42,520000
Filtro Sartopore 2 MidiCaps 8µ	U	1	132,900000	0,000000	132,900000	0,000000	132,900000
Torunda estéril	U	4	0,002024	0,000000	0,008098	0,000000	0,008098
Guantes quirúrgicos	Par	2	0,156082	0,000000	0,312164	0,000000	0,312164
Bolsa de 50L	U	1	15,850000	0,000000	15,850000	0,000000	15,850000
TOTAL			428,928106	0,000000	1314,520262	0,000000	1314,520262
SALARIO DIRECTO		SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA					CUC	MN	TOTAL
Especialista III en IID (+0,9)		1092,50	5,73	3,0	0,00	17,20	17,20
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)		1016,60	5,33	3,0	0,00	16,00	16,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
			0,00		0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)		191,72			0,00	3,02	3,02
TOTAL		2300,82		6,0	0,00	36,21	36,21
					IMPORTE		
					CUC	MN	TOTAL
Coeficiente Aplicado				0,040	52,580810	1,448573	54,029384
Costo total de Resultado					1367,101072	37,662905	1404,763977
Costo unitario de Resultado					27,342021	0,753258	28,095280

Ficha de costo concentración del sobrenadante de cultivo.

FICHA DE COSTO		Departamento de Producción		Cantidad	U/M	Ficha #	Fecha	
Producto		ior® anti-CD4humano-FITC		50	L	10	26/10/2016	
Etapas		Concentrado		Resultado	SN Anti-cd4 Concentrado			
Materias Primas y Materiales		U M	Cantidad	PRECIO		IMPORTE		
				CUC	MN	CUC	MN	TOTAL
SN Filtrado		L	50	28,090000	0,000000	1404,500000	1404,500000	
Torunda estéril		U	4	0,002024	0,000000	0,008098	0,008098	
Guantes quirúrgicos		Par	2	0,156082	0,000000	0,312164	0,312164	
Cartucho de fibra hueca		U	1	10,000000	0,000000	10,000000	10,000000	
TOTAL				38,248106	0,000000	1414,820262	1414,820262	
SALARIO DIRECTO			SALARIO BÁSICO	TARIFA HORARIA	HORAS TRABAJ.	IMPORTE		
CATEGORIA OCUPACIONAL Y ESCALA						CUC	MN	TOTAL
Técnico Innovador de 1er nivel (+0,9)			1016,60	5,33	8,0	0,00	42,67	42,67
				0,00		0,00	0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00	0,00
				0,00		0,00	0,00	0,00
Vacaciones Acumuladas (9,09 %)			92,41			0,00	3,88	3,88
TOTAL			1109,01		8,0	0,00	46,55	46,55
						IMPORTE		
						CUC	MN	TOTAL
		Coeficiente Aplicado			0,040	56,592810	1,861925	58,454735
		Costo total de Resultado				1471,413072	48,410044	1519,823116
		Costo unitario de Resultado				29,428261	0,968201	30,396462