



CULTIVO DE HIBRIDOMAS EN EL CELLMAKER: EJEMPLO PRÁCTICO DE LA **PRODUCCIÓN** **DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Los anticuerpos son proteínas del sistema inmunológico que identifican y neutralizan las proteínas o antígenos extraños. Presentan un alto nivel de especificidad y afinidad, dos características funcionales claves que permiten que los anticuerpos se utilicen como una herramienta integral en la investigación, el diagnóstico y de forma terapéutica. La inmunoterapia está adquiriendo un impulso excepcional en la comunidad científica, con un número récord de anticuerpos a los que se ha concedido la aprobación inicial en la Unión Europea y los Estados Unidos en 2018.

Cellexus International y **Jean-Christophe Bourdon**, University of Dundee

EN COMPARACIÓN CON LOS ANTICUERPOS POLICLONALES, los anticuerpos monoclonales (mAbs) suelen tener una mejor consistencia entre lotes y una menor reactividad de fondo, lo que les permite ser una herramienta útil para la investigación y las aplicaciones *in vivo*. Según un informe de 2017, se prevé que el mercado de anticuerpos monoclonales crezca de 403,7 millones de dólares en 2017 a 1.151,5 millones de dólares en 2022, lo que muestra el potencial de esta aplicación. La tecnología del hibridoma fue el primer método de producción de mAb que permitió la investigación científica *in vitro* y sigue siendo la plataforma principal y preferida para la funcionalización de mAb3.

Una de las formas más comunes y tradicionales de cultivar células de hibridoma es utilizando frascos almacenados en incubadoras. Prepararlos y mantenerlos puede ser un trabajo extensivo y, a menudo, se producen

resultados inconsistentes debido a los puntos calientes y fríos de las incubadoras, al alto riesgo de contaminación y al error humano, lo

que indica lo laborioso que es mantener el cultivo.

El Dr. Jean-Christophe Bourdon, jefe del laboratorio de isoformas p53 de la Universidad de Dundee, y su equipo han estado utilizando un sistema CellMaker Plus 8L para producir eficazmente una gama de anticuerpos p53 a partir de células de hibridoma murino. En este experimento, se realizaron cultivos por lotes tanto en el CellMaker como en frascos y se comparó la producción de dos diferentes anticuerpos monoclonales de ratón.



	Anticuerpos monoclonales de ratón	
	C-alpha	mAb421
Concentración de células madre	250,000 cel/ml	250,000 cel/ml
Volumen frasco	30 ml	30 ml
Volumen CellMaker	2 L	2,3 L
Duración de los lotes	7 días	4 días
Suero (FCS)	10%	10%
Medio usado	DMEM	DMEM

Tabla 1. Método del frasco.

PARA ESTE EXPERIMENTO, SE UTILIZARON DOS MÉTODOS de producción de dos anticuerpos monoclonales en paralelo: el método tradicional, utilizando un frasco (flash), y el sistema CellMaker. El método para cada experimento se detalla en la tabla 1.

BAJO UNA CAMPANA EXTRACTORA, SE PREPARARON FRASCOS y se almacenaron en una incubadora de 37°C. Se revisaron rutinariamente en cada paso del experimento para asegurar que no había contaminación.

SE USÓ UN SISTEMA CELLMAKER PLUS, que permite monitorear y controlar el pH y el oxígeno disuelto del medio. Bajo una campana extractora, la bolsa estéril del biorreactor Cellexus fue equipada con dos filtros PTFE 0.2µm y una sonda de pH autoclavada. La bolsa vacía se colocó en el soporte del CellMaker y las células, el medio y el suero se bombearon a la bolsa del biorreactor CellMaker a través de una bomba peristáltica y un tubo estéril. Para ambos experimentos, se fijaron en el software los parámetros descritos en la tabla 2.



Temperatura	37°C
Velocidad de flujo de aire	0.1 L/min
pH	7.4
Oxígeno disuelto	99%

Tabla 2.

La temperatura se controla mediante un sistema de calefacción Peltier integrado y se vigila mediante un termopar en el soporte en contacto con la bolsa. El pH se monitoriza mediante una sonda Hamilton y se controla

mediante la adición automática de CO₂ para acidificar el medio cuando resulta necesario. El valor relativo de oxígeno disuelto es monitorizado por un sensor de fluorescencia incorporado en la bolsa del biorreactor y controlado automáticamente por el software, introduciendo más aire según sea necesario.

EN ESTE EXPERIMENTO SE UTILIZÓ LA TÉCNICA DE PURIFICACIÓN de la proteína A/G para ambos métodos de producción. Esta puede ser sustituida por la cromatografía de afinidad peptídica o cualquier otra técnica de purificación preferida.

LOS RESULTADOS DEL TOTAL DE MAB PRODUCIDOS se detallan en la tabla 3. La cantidad de anticuerpos producidos del volumen total del CellMaker fue comparada con el volumen total que el Dr. Bourdon produciría típicamente en el experimento con frascos: 10 flasks de 30ml cada uno, lo que equivale a 300 ml (gráfico 1).

EN LOS RESULTADOS SE OBSERVA que el CellMaker aumenta la capacidad de producción comparado con los métodos tradicionales, aumentando el número de anticuerpos generados durante el mismo tiempo. En comparación con los métodos tradicionales el CellMaker presenta varias ventajas:

1. Reduce la carga de trabajo ya que su controlador permite seguir y mantener las condiciones ideales de cultivo.
 2. El equipo requiere de poco espacio y permite la producción de entre 2 y 8L en el mismo reactor, cantidades significativamente mayores a las que tradicionalmente se obtienen en un frasco.
 3. Al contar con un sistema de control, el equipo CellMaker permite obtener resultados reproducibles.
- En comparación con otros biorreactores, el CellMaker es único con la tecnología de aireación por flujo de aire (o gas) y biorreactores de un solo uso. Esta

Anticuerpos monoclonales	Método de producción	Volumen total producido	Concentración mAb/ml	Total mAb producido
C-alpha	Flask	300 ml	17.45 µg/ml	5,235 µg
	CellMaker	2000 ml	13.41 µg/ml	26,820 µg
mAb421	Flask	300 ml	16.67 µg/ml	5,001 µg
	CellMaker	2300 ml	11.67 µg/ml	26,841 µg

Tabla 3.



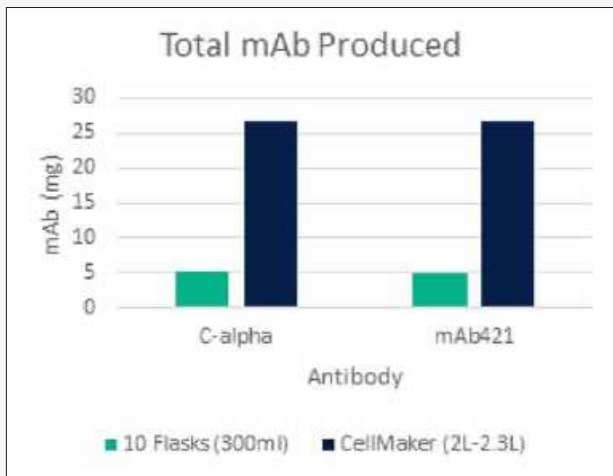


Gráfico 1.

tecnología está pensada para aumentar la eficiencia en el cultivo de células de mamíferos debido a su suave mezclado. Por el contrario, en los biorreactores clásicos donde la mezcla se realiza con paletas de agitación se corre el riesgo de romper las membranas celulares. El CellMaker, además, elimina la necesidad de esterilización y validación entre lotes, gracias a que las bolsas de reacción de un solo uso tienen certificado de esterilización y son desechadas tras su uso, reduciendo significativamente el riesgo de contaminación cruzada. Los paneles laterales transparentes del CellMaker también permiten mejor control visual que en los típicos sistemas de acero inoxidable.

PARA PODER REPRODUCIR LOS RESULTADOS del CellMaker serían necesarios 267 frascos y una significativa carga de trabajo, numerosas horas para preparar y cultivar. Además, cada uno de los frascos debe ser revisado durante la semana para asegurar que no hay contaminación. Este tipo de carga de trabajo y espacio de almacenamiento de la incubadora no es práctico.

En cambio, el CellMaker requeriría aproximadamente cinco minutos para prepararse, tres minutos para cosechar y sin necesidad de tiempo adicional para mantenerlo. Comprobar la contaminación era tan simple como mirar a través de los paneles frontales del biorreactor transparente.

Además, este reactor puede colocarse en una vitrina o mesa y no requiere espacio en una incubadora, ya que el sensor Peltier instalado en el recinto es una forma precisa y exacta de controlar la temperatura.

EL CELLMAKER MANTUVO LA TEMPERATURA Y EL PH CONSTANTES durante todo el experimento.

Comparado con el almacenamiento en incubadora que puede contaminarse fácilmente y tener puntos calientes y fríos, el CellMaker mantiene el contenido estéril y ofrece un ambiente mucho más estable para que las células crezcan y se dividan.

El cambio de color del medio debido a la producción de ácido láctico es una indicación visual de que el experimento necesita atención, ya que la producción de anticuerpos se está desacelerando. Esto ocurre cuando la acidez del medio disminuye y corre el riesgo de degradar la calidad del anticuerpo. Aunque esto se observó en los cultivos en frasco, en el sistema automático, el pH se corrigió automáticamente para mantenerlo entre valores de 7,3 y 7,5. De esta forma se evitó el cambio de color, lo que indica que las células permanecen en un metabolismo normal, permitiendo el crecimiento a largo plazo y la producción de anticuerpos sin aumentar el costo y la mano de obra. Manteniendo el pH en estos valores permite una mejor calidad de los anticuerpos.

EN LOS MÉTODOS CLÁSICOS es más difícil controlar el oxígeno disuelto, la acidez o el CO₂ en el cultivo celular, lo que complica mucho el cultivo de largo plazo y limita significativamente la producción de anticuerpos. La estabilidad y control del CellMaker permite trabajar con cultivos a largo plazo y grandes cantidades con unas condiciones reproducibles que permite obtener grandes volúmenes y anticuerpos de calidad.

Para la misma cantidad de tiempo, pero con menos carga de trabajo y mano de obra, el CellMaker proporcionó una solución para aumentar la producción de anticuerpos cinco veces, en comparación con la producción de frascos. Los futuros experimentos deberían probar cuánto tiempo se podría mantener el cultivo en el CellMaker antes de que los medios comiencen a acidificarse para evaluar el potencial de una producción de anticuerpos aún mayor. Estos resultados muestran que el CellMaker es una forma práctica de aumentar la producción de anticuerpos de manera más sencilla y fiable que con los métodos tradicionales en múltiples frascos ☺

Referencias

- Kaplon, H., & Reichert, J. M. (2018). Antibodies to watch in 2019. *MAbs*, 11(2), 219–238. doi: 10.1080/19420862.2018.1556465
- Zaroff, S., & Tan, G. (2019). Hybridoma technology: the preferred method for monoclonal antibody generation for in vivo applications. *BioTechniques*, 67(3), 90–92. doi: 10.2144/btn-2019-0054
- Kalia, R. (2017). Single Use Bioreactor Market Global Forecast to 2022. *Markets and Markets*, pp. 1–207.