



MIGUEL GONZÁLEZ

Manager de Condalab

Alberto Carazo del Comité Editorial de Farmabiotec entrevista a José Miguel González Manager de Condalab el objetivo es analizar la importancia de los medios de cultivo en el sector biotecnológico y los factores a tener en cuenta en su selección.

“Los principales problemas a los que se enfrenta un laboratorio al trabajar con estos cultivos son la alta variabilidad, baja reproducibilidad, el riesgo de contaminación y la falta de automatización”

¿A qué se dedica Condalab?

Condalab fue fundada en 1960, hoy en día es uno de los principales fabricantes europeos de medios de cultivo para microbiología y biología molecular. Desde nuestra fábrica de Madrid exportamos a más de 130 países de todo el mundo.

La experiencia adquirida, tras más de 60 años en el mercado, nos ha convertido en especialistas en el campo de la microbiología, biología molecular y biología celular. Somos reconocidos por suministrar ingredientes clave como agares, peptonas y agarosas, entre otros productos.

Nuestro catálogo incluye soluciones que van desde los medios de cultivo microbiológicos, pasando por técnicas rápidas de detección de patógenos, a terapia génica, edición del genoma, NGS, CAR-T y una amplia gama de aplicaciones de biología molecular y celular.

¿Cuál es la importancia del medio de cultivo en el desarrollo de un medicamento biológico?

En el desarrollo de medicamentos biológicos se utilizan organismos vivos, o parte de ellos, para producir complejas moléculas. Estos medicamentos son similares o iguales a

los elementos que producen nuestro cuerpo: hormonas, anticuerpos, citocinas... Para su obtención se utiliza lo que se denomina **bioprocesos**.

Un bioproceso hace referencia a la metodología llevada a cabo para obtener un cambio físico, químico o un producto por medio de la actividad de microorganismos o células vivas aisladas. Dicho de otra forma, es el modo en que se debe utilizar a los seres vivos para transformarlos en **fábricas microscópicas**. Este proceso requiere partir de 2 elementos esenciales: las células y el medio. Las **células** son las encargadas de producir el fármaco, funcionando como factorías en miniatura, mientras que el **medio** otorga los nutrientes, suplementos y protección que estas precisan.

¿Qué células se utilizan para obtener estos fármacos?

Dependiendo de las necesidades se puede utilizar un tipo celular u otro, bacterias, levaduras, células de planta o de insecto... Sin embargo, la industria farmacéutica utiliza sobre todo **células de mamífero**.

Las células de mamífero presentan varios retos respecto a los microorganismos. Los mamíferos son seres pluricelulares, sus células no son independientes sino parte de un todo, además de presentar una mayor complejidad, tanto por su funcionalidad individual, como por su funcionamiento en conjunto. Esta complejidad es la responsable de que al llevarlas a un entorno aislado y fuera del organismo, *ex vivo*, den lugar a determinados inconvenientes relacionados con su capacidad de adaptación y el crecimiento *in vitro*. A pesar de estas potenciales complicaciones, las células de mamífero poseen una ventaja clave sobre las bacterias y levaduras: **las modificaciones postraduccionales**. Las proteínas sintetizadas por las células de origen mamífero, como es el caso de las células humanas, sufren modificaciones durante su biogénesis. Algunos de estos cambios pueden ser cortes de la secuencia, adición de glúcidos o fosforilaciones. Los microorganismos carecen de estas modificaciones, por lo que las proteínas recombinantes producidas serían inactivas en la mayoría de los casos. Para que estas moléculas sean funcionales en el ser humano se debe emplear una estrategia basada en el uso de células lo más similares posible a las de nuestra especie.

Las farmacéuticas utilizan líneas celulares con cualidades que favorezcan la síntesis de proteínas; algunas de ellas son SP2/0, hibridomas, HEK, NS0, Vero... Pero la que destaca por encima del resto es la línea **CHO**. Obtenida en 1969 a partir de células de ovario de hámster chino, desde entonces han sido ampliamente usadas en investigación y la línea celular predilecta para la síntesis de fármacos biológicos. Su popularidad se fundamenta en múltiples cualidades: Presenta mayor resistencia a las alteraciones

de pH, osmolaridad y temperatura del entorno; cuenta con una elevada estabilidad genética, acumulando pocas alteraciones en su genoma tras múltiples divisiones; es uno de los tipos celulares con mayor rendimiento en cuanto a expresión de proteínas recombinantes; provoca menos problemas durante el escalado; y muestra una alta adaptabilidad a los medios animal-free.

¿Qué necesidades tienen este tipo de células?

Los cultivos celulares son un tipo de cultivo muy sensible, necesitan un **sustrato** donde mantenerse y **protegerse** del entorno, un constante aporte de **nutrientes**, así como de suplementos para su crecimiento y una forma de **eliminar los residuos** que generen. Todos estos requisitos se los satisface el medio de cultivo, una disolución acuosa con los nutrientes y factores necesarios para estimular el progreso y desarrollo de las células, *in vitro*, y la síntesis del producto de interés.

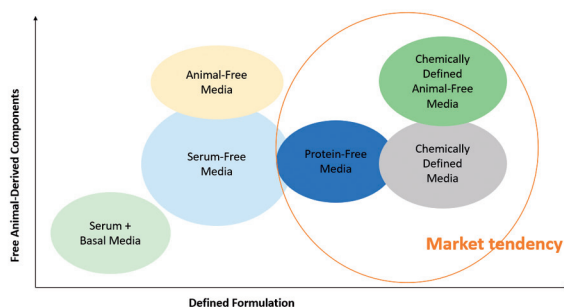
Los elementos constituyentes del medio de cultivo y primordiales para suplir las necesidades celulares son varios, pero son fácilmente categorizados según su composición y función. De los más conocidos es el sistema tampón, como el HEPES o bicarbonato sódico para regular el pH a niveles fisiológicos. Las sales inorgánicas, comprendidas por los iones de sodio, calcio y potasio, entre otros, resultan esenciales en la estabilización del potencial de membrana. Le siguen los aminoácidos, las unidades estructurales mínimas de las proteínas, de entre todas cabe destacar la L-glutamina, pues su inestabilidad química hace que se degrade en poco tiempo, por lo que se debe adicionar al medio justo antes de su aplicación. También están los carbohidratos, siendo la glucosa el más conocido. Las proteínas y péptidos, de especial relevancia en los medios para la síntesis de proteínas recombinantes. Después continúa con los ácidos grasos y lípidos, como el colesterol, requerido para la formación de estructuras y moléculas activas. Finalmente estarían las vitaminas, moléculas tanto orgánicas que las células no son capaces de sintetizar; y los elementos trazas, metales usados para mantener la funcionalidad de múltiples enzimas.

¿Cuáles son los medios celulares más usados?

El uso de un medio de cultivo u otro depende en gran medida del tipo celular empleado, así como del experimento, proyecto y/o producto de interés. Hay una gran variedad según su composición, aunque los valores más determinantes y definitorios suelen ser la variabilidad y la presencia de compuestos de origen animal.

Los medios basales clásicos son los más conocidos y los primeros en utilizarse. Existen diversas clases y variedades dentro de esta categoría, pero todos poseen un

Cultivos y mantenimiento celular



denominador común, la dependencia para su mantenimiento de FBS (Suero Fetal Bovino) para estimular el crecimiento celular, este suplemento fue utilizado por primera vez en 1958, y desde entonces ha sido el principal aditivo en los cultivos, mostrando su efectividad en la mayoría de las líneas celulares. Algunos de los medios más famosos son el DMEM, Ham's F-12, o el RPMI 1640. A continuación, están los medios libres de suero, su principal característica es que no requieren del FBS, sino que suelen estar hechos de extractos o hidrolizados de diversas fuentes. Una forma de clasificarlos es según la presencia o ausencia de proteínas enteras, y en caso de haber fragmentos, el tamaño máximo de estos. Finalmente están los medios químicamente definidos. Se tratan de medios sin suero con una composición exacta, sin utilizar fuentes que introduzcan variabilidad. Además, estos no suelen contener entre sus ingredientes componentes de origen animal, lo que supone una gran ventaja. Estos medios suelen ser específicos para cada línea celular, en ocasiones incluso para variantes en concreto, pero reducen significativamente la variabilidad entre lotes y facilitan la purificación del producto final.

Con todo lo anterior dicho y teniendo en cuenta la posición de la línea celular CHO, existe una gran variedad de medios específicos para estas células. Todo ello ha provocado que la tendencia actual del mercado se vea influenciada y se encamine hacia los **medios químicamente definidos**, debido a su baja variabilidad y la independencia de FBS y el empleo de ingredientes de origen animal.

¿Cuáles son los retos bajo tu punto de vista que afronta el sector a la hora de utilizar y desarrollar medios específicos para el cultivo de fármacos biológicos?

Los principales problemas a los que se enfrenta un laboratorio al trabajar con estos cultivos son la alta variabilidad, baja reproducibilidad, el riesgo de contaminación y la falta de automatización.

Los medios de cultivo afectan en la mayoría de estos puntos, y es por eso que a día de hoy la meta que está siguiendo la industria es **eliminar la dependencia del suero**

fetal bovino, ya que se trata de una fuente de alta variabilidad y posible entrada de agentes patógenos, especialmente priones, sin contar las cuestiones éticas y la aplicabilidad en clínica y extrapolación a futuros ensayos. Esto se traduce en el fomento del desarrollo de nuevos medios químicamente definidos. El desarrollo de estos medios supone un gran esfuerzo para las compañías, ya que exhiben una formulación exacta y han tenido que realizar múltiples pruebas, para cada uno de los ingredientes del medio para hallar las concentraciones idóneas, lo que supone una gran inversión económica y de tiempo.

Por otro lado, también está el problema de los **costes y rendimientos**, pues los bioprocesos son métodos de producción muy caros, sumando toda la investigación previa requerida hasta obtener la fórmula exacta del fármaco. Para paliar esto, se puede optar por el empleo de los denominados suplementos. Se tratan de añadidos al medio que otorgan un aporte adicional, permitiendo maximizar al límite la relación coste-producción. En este sentido, el uso de suplementos en los cultivos celulares aporta una mayor flexibilidad que con los medios, pues algunos también son formulaciones químicamente definidas. Esto no siempre es así, ya que en otros casos los suplementos consisten en proteínas purificadas, como la lactoalbúmina o factores de crecimiento, lípidos o incluso hidrolizados de proteínas, también llamadas peptonas y, que han sido ampliamente utilizadas en los bioprocesos con microorganismos. Los suplementos son capaces de otorgar diferentes cualidades, comúnmente son aportes nutricionales que promueven un aumento en la densidad celular y en la cantidad de proteínas generadas, otros impiden la formación de espuma por agitación durante el bioproceso, otros son capaces de indicar el pH, e incluso se encuentran suplementos capaces de promover la accesibilidad de los nutrientes en el medio, aumentando su disponibilidad.

Otro inconveniente es el almacenaje del medio. Usualmente los medios y suplementos se encuentran en estado líquido, esto supone un inconveniente debido al espacio que ocupan y las condiciones de refrigeración. Una opción es el uso del formato deshidratado, que permite reducir el volumen que ocupa, alarga la vida útil y se puede mantener a temperatura ambiente. Desafortunadamente no es posible pasar todos los medios al formato deshidratado, pero hoy en día existen varias opciones.

La automatización es una tarea pendiente en cuanto a la aplicación de los cultivos celulares, actualmente casi todo el trabajo se realiza de forma manual. Esto alarga los tiempos y aumenta las posibilidades de que se produzcan errores de manipulación, dando mayor variabilidad y reduciendo la reproducibilidad. Algunos de los motivos que frenan la automatización de los laboratorios es el precio de los equipos, el espacio que ocupan y la pérdida de flexibilidad.

BIOPROCESS FLOW CHART



1.

The **upstream processing** includes the choice, design and preparation of the culture medium, raw material sterilization and inoculum preparation.

2.

The **bioreactor** includes the filling and transfer of the materials, agitation and aeration, heat transfer operations, foam and pH control.

3.

In the **downstream processing**, the required purity of the product must be defined. The first stage is usually **recovery**, which includes the separation of biomass from the fermentation broth. The following steps are **purification and product finish**.

Otro problema implícito es el nivel de **endotoxinas**. Por tanto, se debe asegurar que no se introducen endotoxinas durante el bioproceso, pues estas inhiben el crecimiento celular y pueden contaminar el producto final, lo que supone un potencial riesgo y peligro para el futuro paciente.

¿Tan importantes son las endotoxinas en los cultivos celulares?

Las endotoxinas son uno de los problemas a los que se enfrenta toda la industria farmacéutica, no solo el sector de los biológicos.

Se tratan de fragmentos de las bacterias Gram negativas, restos de los lipopolisacáridos que forman la pared bacteriana. Estos fragmentos pueden desencadenar una exacerbada respuesta inmune y dar lugar a lo que se conoce como **shock séptico**. Es por ello por lo que los productos sanitarios, especialmente aquellos que están relacionados con vías parenterales deben tener un exhaustivo control de endotoxinas. Una de las propiedades fisicoquímicas que las hace tan importantes y peligrosas es su termo estabilidad, por lo que **no se pueden eliminar** por procedimientos clásicos de esterilización como el autoclave.

A esto se suma el hecho de que, al trabajar con fármacos biológicos no solo afectan paciente final, sino que también interfiere con las células del cultivo. Las endotoxinas son capaces de inhibir el crecimiento de las células cultivadas, lo que repercute en gran medida en la síntesis de medicamentos, resultan en una pérdida de eficiencia y afectando al coste de la producción.

En resumen, debido al problema que suponen tanto al paciente como para el cultivo, así como la dificultad de su eliminación la mejor forma para evitar las endotoxinas es el empleo de medios y suplementos que garantice una baja concentración de ellas, evitando así la contaminación y el potencial riesgo.

¿A qué se debe el crecimiento del sector de medios de cultivo?

Las aplicaciones biofarmacéuticas de los medios de cultivo celular incluyen la fabricación de productos biológicos como vacunas, anticuerpos monoclonales y otras proteínas terapéuticas (anticoagulantes, enzimas, factores sanguíneos, hormonas, interferones, factores de crecimiento, interleucinas, proteínas de ingeniería y trombolíticos, entre otros). Todo ello, pone en valor la importancia de la variedad, calidad y contenido de los medios de cultivo y su extensión a la parte preclínica, así como a los primeros pasos en la investigación traslacional.

Una reflexión final en cuanto a los medios de cultivo empleado en el sector biotecnológico

Resumiría todo lo dicho en la siguiente idea: los fármacos biológicos son un nuevo tipo de medicamentos, obtenidos gracias al avance en los campos de la genética, medicina y biología molecular. Son producidos a través cultivos celulares, destacando el empleo de la línea CHO. En este contexto, se debe prestar especial atención a los medios químicamente definidos y suplementos que se usan, evitando y reduciendo el empleo de fuentes de origen animal y FBS, que suponen conflictos éticos, potenciales fuentes de contaminación, riesgos para el paciente, además de una deficiencia en el sistema de producción.

El abanico de posibilidades terapéuticas que abren estos medicamentos es sorprendente. Hemos pasado de usar moléculas simples como señuelos a los receptores celulares a trabajar al mismo nivel que nuestro organismo. Así, desde Condalab se insiste en la importancia de la elección de un medio de cultivo óptimo, como piedra angular en el trabajo rutinario dentro del sector biotecnológico.