

## Evaluación de diferentes condiciones de cultivo del hibridoma IFI/B6/C5 para su propagación *in vitro* y la producción de anticuerpos monoclonales

M. E. PÉREZ, J. GAVILONDO-COWLEY y M. AGUILAR

Agrupación de Hibridomas y Modelos Animales, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en julio de 1988

### RESUMEN

Las cantidades y la pureza requeridas para los anticuerpos monoclonales (AcM), con vistas a satisfacer su demanda mundial, han conducido al desarrollo de las técnicas para la propagación masiva *in vitro* de los hibridomas, y su purificación a partir de los sobrenadantes de cultivo, como una alternativa ventajosa con respecto a su producción convencional en animales.

Como paso previo para abordar el cultivo masivo, nosotros hemos estudiado el crecimiento y producción de inmunoglobulinas del hibridoma IFI/B6/C5, secretor de AcM contra el IFN  $\alpha$  humano recombinante, bajo diferentes condiciones de cultivo y en distintas formulaciones de medio.

Se demostró que la combinación: 2% de suero bovino y 3% de sobrenadante de células endoteliales humanas (HECS), como aditivo al medio base RPMI1640 suplementado, es comparable, e incluso mejor, que el 10% de suero bovino, la mezcla insulina-transferrina-etanolamina-selenio (ITES), y 2% de suero bovino más ITES, tanto para el crecimiento estacionario, como en botellas *roller*, y la producción de inmunoglobulinas monoclonales. Por otra parte, se demostró que los cultivos *roller*, sometidos a un sistema de renovación parcial del medio, con reposición celular, permiten alcanzar densidades celulares superiores, y concentraciones mayores de inmunoglobulinas.

### ABSTRACT

The amounts and purities required for monoclonal antibodies (MAbs), so as to fulfill their world supply have led to the development of techniques for the massive propagation of hybridomas *in vitro*, and the purification from culture supernatants, as an advantageous alternative to the more conventional production from ascitis fluids in mice.

As a previous step for mass culture, we have studied the growth and production of immunoglobulins for the hybridoma IFI/B6/C5, secretor of MAbs against recombinant human alpha 2 interferon, under different culture conditions and various media formulations.

We demonstrated that the combination 2% bovine serum and 3% of human endothelial cell supernatant (HECS), as additives for the supplemented base medium RPMI1640, is comparable and even better than 10% bovine serum, the mixture insuline-transferrin-ethanolamine-selenium (ITES), and 2% bovine serum

plus ITES, both for stationary growth, the culture in "roller" bottles, and the overall production of monoclonal immunoglobulins. On the other hand, we demonstrated that "roller" cultures submitted to a system of partial renovation of medium, with cellular reposition, allow the achievement of higher cell densities, and immunoglobulin concentrations.

## INTRODUCCION

Los anticuerpos monoclonales (AcM; Kohler y Milstein, 1975) constituyen en la actualidad un elemento esencial para el desarrollo de la biomedicina y de otras ciencias biológicas. Desde el punto de vista práctico, los AcM son empleados, tanto en el laboratorio como en la industria, como reactivos analíticos y para la purificación de sustancias, así como para el diagnóstico y la detección de enfermedades infecciosas y crónicas del hombre. Recientemente, los AcM comienzan a emplearse también en el tratamiento de los tumores malignos, el control de las reacciones de rechazo de los trasplantes de tejidos y órganos, y en la terapéutica de enfermedades infecciosas (ver revisión en: Gavilondo, 1987).

Todo el impetuoso desarrollo provocado por la aparición y aplicación de estos biorreactivos, ha promovido el interés por su producción en cantidades y calidades suficientes como para satisfacer la demanda de su uso. A pesar de que durante muchos años esta producción ha estado vinculada esencialmente al empleo de animales de laboratorio, el crecimiento de la demanda mundial de estos reactivos para el diagnóstico masivo y la terapéutica obliga a producir centenares de gramos y kilogramos de AcM, cantidades difíciles de alcanzar rentablemente sobre la base de la manipulación de ratones.

Por otra parte, el proceso de purificación de AcM a gran escala también es complicado si se toma como base la ascitis tumoral, que contiene una gran cantidad de proteínas contaminantes.

Estas consideraciones han llevado al desarrollo de la tecnología para el cultivo masivo de hibridomas en biorreactores y la purificación de los AcM a partir de sobrenadantes, como una alternativa de menor costo y mayor productividad (anónimo, 1983; Hanisch y Larrick, 1985; Birch, 1985; Duff, 1985). Estos trabajos se complementan con aquellos relativos a la confección de medios para el cultivo de hibridomas, con un bajo contenido de suero o proteínas, que permitan la disminución de los gastos causados por el uso de los sueros en el medio de cultivo, y que ofrecen mejores condiciones de partida para la purificación de las inmunoglobulinas monoclonales (Murakami *et al.*, 1982; Cleveland *et al.*, 1983; Kawamoto *et al.*, 1986; Kóvar y Fráncz, 1986; Velz *et al.*, 1986; Sjogren-Jansson y Jeanson, 1985; Tharakan y Chau, 1986).

Uno de los aspectos primarios en la propagación de hibridomas en biorreactores, es diseñar medios y condiciones de cultivo donde se alcancen densidades celulares máximas aceptables para entrar en fase de producción; esta etapa se complementa con la estructuración de condiciones en las cuales la producción de inmunoglobulinas sea máxima, el cultivo se extienda lo más posible, y el costo y simplicidad del medio sean mínimos (Reuveny *et al.*, 1986).

Este artículo aborda precisamente estudios iniciales para la optimización de las características de crecimiento y producción de inmunoglobulinas monoclonales *in vitro* por el hibridoma IFI/B6/C5, secretor de anticuerpos monoclonales contra el IFN  $\alpha$ -2 humano recombinante, con vistas a su pase a condiciones de cultivo en biorreactores.

Se examinaron diferentes formulaciones de medio de cultivo, empleando suero bovino, factores estimuladores definidos y combinaciones de estos con sobrenadantes de cultivo de células endoteliales humanas, que contienen actividades estimuladoras de la proliferación de hibridomas. Los estudios se ejecutaron en condiciones de crecimiento estacionario y en botellas *roller*.

## MATERIALES Y METODOS

### Hibridoma

El hibridoma IFI/B6/C5 secretor del AcM CB.IFNA2.1 del tipo IgG1 reconoce el IFN  $\alpha$ -2 humano recombinante. Su generación ha sido descrita en detalles en otra publicación (Duarte *et al.*, 1987). Los experimentos reportados en este trabajo se ejecutaron con células provenientes de un mismo lote de congelación del Banco de trabajo de Laboratorio.

### Medio base para el cultivo

En nuestros ensayos se empleó como medio base la siguiente formulación: RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 15 mM HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 40  $\mu$ g/ml de gentamicina y 26 mM de bicarbonato de sodio. Este medio será referido desde ahora como SRPMI.

### Suero bovino

Se empleó un mismo lote de suero bovino, proveniente de animales que no ingirieron calostro, producido y distribuido por CubaVet, La Habana.

### Aditivos (ITES)

En algunos experimentos, el SRPMI fue suplementado con 35  $\mu$ g/ml de transferrina (T, Sigma), 5  $\mu$ g/ml de insulina (I, Sigma), 20  $\mu$ g/ml de etanolamina (E, Aldrich), 25 ng/ml de ácido selénico (S, Calbiochem), tal como fue recomendado por Murakami *et al.*, 1982.

### Sobrenadantes de células endoteliales humanas (CECS)

En estos estudios se empleó un mismo lote de HECS, suministrado por el Centro de Investigaciones Biológicas de La Habana. La preparación de este sobrenadante con actividad estimuladora de la proliferación de hibridomas (Astaldi *et al.*, 1980) se realiza esencialmente como ha sido descrito en otras publicaciones (Cabrera *et al.*, 1987).

### Condiciones de cultivo

El crecimiento celular y la producción de inmunoglobulinas (ver más adelante), se evaluaron en dos condiciones básicas de cultivo:

a) **Cultivo estacionario:** las células se sembraron en placas de 24 excavaciones Costar No. 3524, a una concentración inicial de 100 000 células/pozo, en 1 ml de diferentes formulaciones de medios de cultivo. Las incubaciones se realizaron a 37°C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> u 95% de aire, sin cambio de medio durante el proceso de propagación *in vitro*.

b) **Cultivo en suspensión:** las células se sembraron en frascos *roller* (Flow Labs) de vidrio, prerrecubiertos con Sigmacote (Sigma), a una concentración de 300 000 células/ml, en 200 ml de diferentes formulaciones de medio. Los frascos se incubaron a 37°C a 4 rpm, y en ocasiones se realizaron sustituciones diarias del 40% del medio metabolizado, con reposición celular.

### Determinación de concentración de inmunoglobulinas

Para la cuantificación de las inmunoglobulinas de ratón presentes en los sobrenadantes de cultivo se empleó un sistema ELISA tipo *sandwich*. Se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno (Dynatech) durante 18 h a 4°C, y en cámara húmeda, con 100  $\mu$ l/pozo de una solución conteniendo 10  $\mu$ g de IgG de carnero anti IgG de ratón (Sigma) / ml de tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6. Los pozos se bloquearon con 1% de leche descremada en SSTF, por 2 h a 37°C y se añadieron 100  $\mu$ l/pozo de las muestras a ensayar, procediéndose a su incubación 3 h a 37°C.

Después de lavados con SSTF-Tween 20 al 0,05%, las placas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l de IgG de carnero anti IgG de ratón (molécula completa), conjugada con peroxidasa (Sigma), en SSTF-leche 0,5%. La reacción se reveló con 100  $\mu$ l de ortofenilendiamina al 0,04% en tampón citrato pH 5,5 conteniendo 0,04% de una solución de peróxido de hidrógeno al 30%. La formación de color se detuvo con ácido sulfúrico 2,5 M y se procedió a determinar la absorbancia a 492 nm en un Multiskan Titertek.

En cada experimento se incluyó una curva estándar, con concentraciones conocidas de IgG de ratón (Sigma). Las concentraciones en los sobrenadantes se estimaron por interpolación, a partir de la media de tres muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los trabajos relativos a la optimización de los medios y condiciones para el cultivo masivo de hibridomas, están normalmente precedidos de estudios donde es preciso examinar simultáneamente muchas variables. Estos trabajos se pueden realizar en volúmenes tan pequeños como 100-1000  $\mu$ l en placas de cultivo de 96-24 pozos, para más tarde pasar a frascos *roller*, *spinner* y biorreactores de poco volumen (Posillo, 1986).

En nuestro trabajo comenzamos los experimentos en placas de 24 pozos, donde nos fue posible realizar todas las réplicas necesarias que permitieran ir acumulando los resultados necesarios para más tarde comenzar los ensayos en frascos *roller*, en un sistema de cultivo en suspensión.

El hibridoma IFI/B6/C5 alcanza densidades de hasta casi 700 000 células/ml a los tres días de cultivo estacionario, cuando el medio base se suplementa con 10% de suero bovino. En la figura 1 se observa cómo estos niveles de crecimiento no son igualados al sustituir el suero por otros aditivos tales como el ITES o el HECS. En este último caso, el comportamiento es muy semejante al experimentado cuando la concentración de suero bovino es insuficiente (solo 2%).

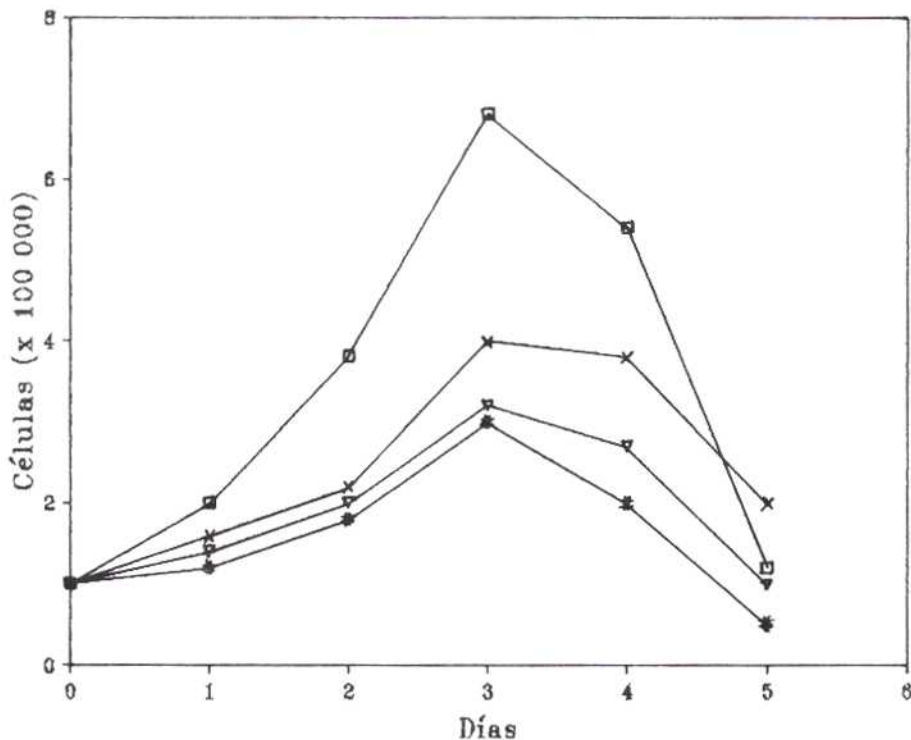


FIG. 1. Crecimiento del hibridoma IFI/B6/C5 en cultivo estacionario y diferentes formulaciones de medio: (□) 10% de suero bovino; (x) ITES; (▽) 1% de HECS; (#) 2% de suero bovino.

Nosotros no observamos alteración de la morfología cuando las células fueron cultivadas en ITES, que en presencia de suero crecen ligeramente adheridas, y en estas condiciones experimentan una tendencia al crecimiento en suspensión. En todos los casos las células

se mantuvieron en crecimiento exponencial hasta las 72 horas de haber comenzado el cultivo, para iniciarse la muerte celular a partir de este momento.

Aun cuando están por debajo del control, los mejores niveles de proliferación se obtienen con la mezcla ITES, que puede ser considerado como un medio químicamente definido. Si bien Murakami *et al.*, 1982, reportaron que el ITES podía llevar a un crecimiento comparable al obtenido con la adición de suero para varios hibridomas, en sus experimentos ellos emplearon un medio base mucho más rico, la mezcla 1:1 de medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (Dulbecco MEM) y la mezcla nutriente de Ham (F-12), que ahora es comercializado por varias casas productoras.

Si bien en otros ensayos (no presentados), nosotros hemos obtenido resultados comparables a los descritos por Murakami *et al.*, 1982, con la mezcla, en este caso decidimos evaluar el SRPMI por su costo inferior.

En los siguientes experimentos, también realizados en condiciones de cultivo estacionario, se evaluó la combinación de cantidades subóptimas de suero bovino (2%), ITES y 3% de HECS, con respecto a un 10% de suero bovino. En las figuras 2 y 3 se observa que las tres combinaciones poseen una buena eficacia, tanto para estimular la proliferación celular como para la producción de inmunoglobulinas.

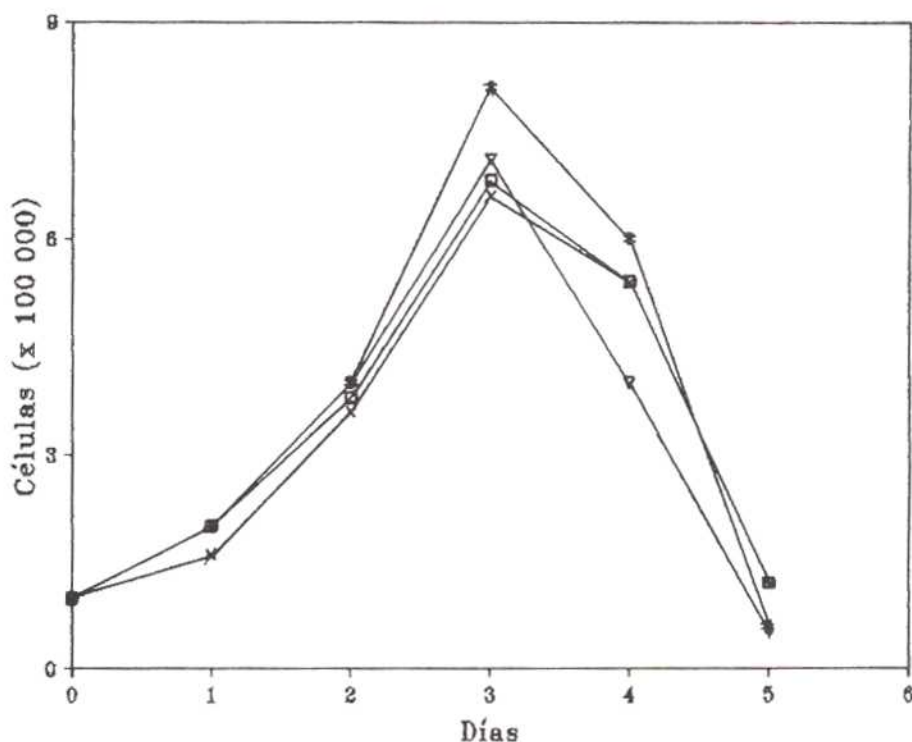


FIG. 2. Crecimiento del hibridoma IFI/B6/CS en cultivo estacionario y diferentes formulaciones de medio: (□) 10% de suero bovino, (x) 2% de suero bovino más 3% de HECS, (∇) 2% de suero bovino más ITES, (#) 3% de HECS más ITES.

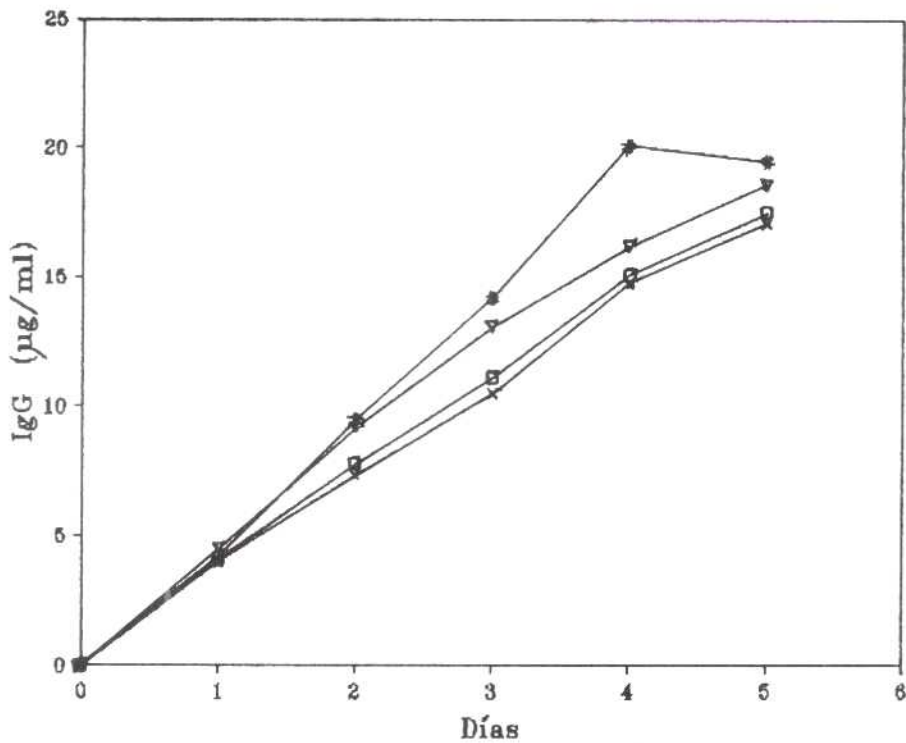


FIG. 3. Producción de anticuerpos monoclonales por el hibridoma IFI/B5/CS, en diferentes condiciones de cultivo estacionario: (□) 10% de suero bovino, (x) 2% de suero bovino más 3% de HECS, (▽) 2% de suero bovino más ITES, (#) 3% de HECS más ITES.

Estos resultados nos condujeron a escoger la combinación de 2% de suero bovino más 3% de HECS para el comienzo de los experimentos de cultivo en suspensión. Se evaluaron dos condiciones básicas de propagación: una en la que el cultivo se realizaba sin cambio de medio y la segunda con renovación parcial del mismo (40% diario con reposición de las células).

En trabajos recientes, varios autores (Duff, 1985; Posillo, 1985 y Reuveny, 1986), han demostrado que los esquemas de cultivo masivo con renovación parcial del medio o perfusión tienen ventajas sobre la producción en *batch*. Entre las ventajas está el incremento en las densidades celulares alcanzadas y el consecuente aumento de las inmunoglobulinas en los sobrenadantes, así como la posibilidad de una prolongación del tiempo productivo, todo lo cual contribuye a hacer el proceso más rentable.

En las figuras 4 y 5 se observan los resultados obtenidos por nosotros en botellas *roller*. En primer lugar, el comportamiento de las células fue semejante al observado en cultivo estacionario, en cuanto a la eficiencia de combinación de bajo suero y HECS, en sustitución de 10% de suero bovino. Esto se manifestó así en las dos condiciones de cultivo estudiadas. Por otro lado, es evidente la superioridad de los esquemas con renovación, donde las densidades celulares llegan hasta 1,5 millones/ml contra apenas 800 000 células / ml en el cultivo en *batch*. De igual forma, fueron muy superiores las concentraciones de inmunoglobulinas recuperadas en los sistemas donde hubo renovación parcial del medio, en los cuales se alcanzaron hasta 30 µg/ml.

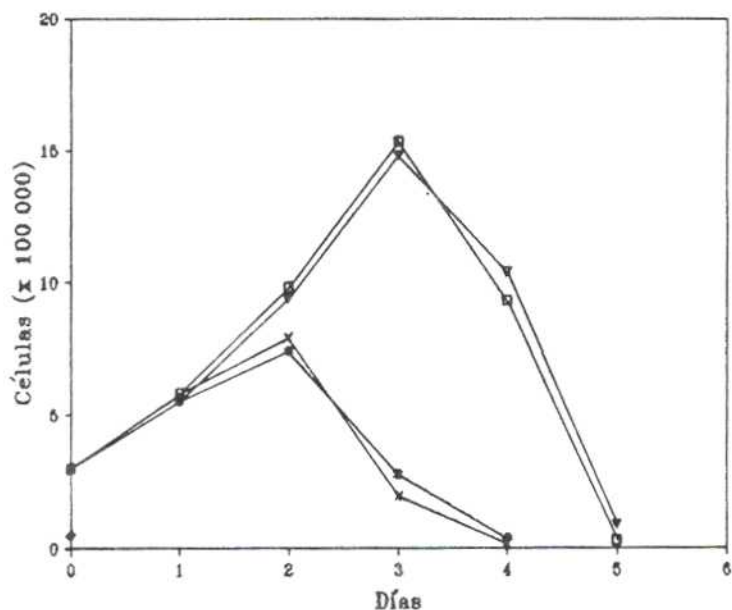


FIG. 4. Crecimiento del hibridoma IFI/B6/CS, en botellas *roller*, bajo diferentes condiciones de cultivo: (□) 10% de suero bovino, con sustitución del medio; (x) 10% de suero bovino, sin sustitución del medio; (∇) 2% de suero bovino más 3% de HECS, con sustitución del medio; (#) 2% de suero bovino más 3% de HECS, sin sustitución del medio.

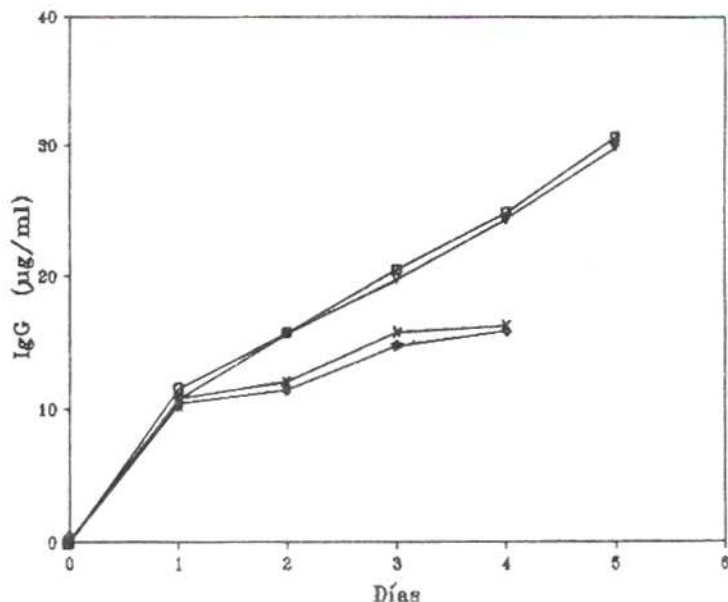


FIG. 5. Producción de anticuerpos monoclonales por el hibridoma IFI/B6/CS, en botellas *roller*: (□) 10% de suero bovino, con sustitución del medio; (x) 10% de suero bovino, sin sustitución del medio; (∇) 2% de suero bovino más 3% de HECS, con sustitución del medio; (#) 2% de suero bovino más 3% de HECS, sin sustitución del medio.

Los estudios en ejecución actualmente en biorreactores, nos permitirán verificar finalmente si la formulación con 2% de suero bovino más 3% de HECS se muestra igualmente eficiente. Las ventajas de esta son innegables para la fase inicial de propagación antes del paso a producción, ya que constituyen una mezcla económica y con menos de 3% de concentración final de suero (el HECS se produce con 10-20% de suero humano), lo que simplificaría el aprovechamiento de estos primeros sobrenadantes para la purificación de los anticuerpos monoclonales. También se evalúan las ventajas de estos aditivos para la fase de producción, una vez alcanzadas las densidades máximas, en las condiciones de cultivo con renovación parcial o de perfusión constante.

## REFERENCIAS

- ANONIMO (1983). *Monoclonals by the million*. New Scientist, 28 July, p. 271.
- ASTALDI, G. C. (1980). "Use of human endothelial culture supernatant (HECS) as a growth factor for hybridoma", En: *Methods in Enzymology*. Vol. XCII. Pte, Eds. J. Langone, H. Vunakis pp. 39-46, Academic Press, New York.
- BIRCH, J. R.; R. BORASTON y L. WOOD (1985). *Bulk production of monoclonal antibody in fermenter*. Trends in Biotechnology 3: 1-5.
- CABRERA, L.; S. HERNANDEZ; A. VELANDIA y J. GAVILONDO (1987). *Características proliferativas de hibridomas B de ratón bajo diferentes condiciones de cultivo. Su relación con el tamizaje de factores de crecimiento específico*. Interferón y Biotecnología 4 (2): 129-142.
- CLEVELAND, W. I.; I. WOOD; F. B. ERLANGER (1983). *Routine largescale production of monoclonal antibody in protein-free culture medium*. J. Immunol. Methods. 56: 221-231.
- DUARTE, C.; M. E. FERNANDEZ DE COSSIO; G. SIERRA; E. PENTON; A. AGRAZ; G. FURRAZOLA; A. AGUILERA (1987). *Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón alfa 2 humano recombinante. Su empleo en la purificación y detección de antígenos*. Interferón y Biotecnología 4 (3): 221-232.
- DUFF, G. R. (1985). *Microencapsulation technology: a novel method for monoclonal antibody production*. Trends in Biotechnology. 3 (7): 1220-1225.
- FAMILLETTI, C. F. y J. E. FEDERICKS (1988). *Techniques for mammalian immobilization*. Biotechnology 6: 41-44.
- GAVILONDO, J. V. (1987). *Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales*. Interferón y Biotecnología 4 (1): 1-16.
- HANISCH, W.; J. W. LARRICK (1985). "Methods for large scale tissue culture", en: *Human hybridomas and monoclonal antibodies*. Plenum Press, pp. 458-465.
- KAWAMATO, T.; J. D. SATO; B. MCCLURE y G. H. SATO (1986). *Serum-free medium for the growth of NS-1 mouse myeloma cells and the isolation of NS-1 hybridomas*. Methods in Enzymology 121: 266-277.
- KOHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity*. Nature 256: 497-499.
- KOVAR, J. y F. FRANZ (1986). *Serum-free medium for hybridomas and parental myeloma cell cultivation*. Methods in Enzymology 121: 277-292.
- MURAKAMI, H.; H. MASUI; G. H. SATO; N. SUEOKA; T. P. CHOWY; T. KANO-SUEOKA (1982). *Growth of hybridoma cell in serum free medium. Ethanolamine is an essential component*. Proc. Natl. Sci. USA. 79: 1158-1162.
- POSILLO, G. E. (1986). *Microencapsulation technology for large-scale antibody production*. Biotechnology 4: 114-118.
- REUVENY, S.; D. VELEZ; J. D. MacMILLAN y L. MILLER (1986). *Factors affecting cells growth and monoclonal antibodies production in stirred reactors*. J. Immunol. Methods 86: 53-59.
- REUVENY, S. D.; D. VELEZ; L. MILLER y J. D. MacMILLAN (1986). *Comparison of cells propagation methods for their effects of monoclonal antibody yield in fermentors*. J. Immunol. Methods 86: 61-69.
- SJOGREN-JANSSON, E. y S. JEANSSON (1985). *Large-scale production of monoclonal antibodies in dialysis tubing*. J. Immunol. Methods 84: 359-364.
- THARAKAN, J. P. y P. C. CHAU (1986). *IgG productions kinetics in serum free media*. Biotechnology Letters 8: 529-534.
- VELEZ, D.; S. REUVENY; L. MILLER y J. D. MacMILLAN (1986). *Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium*. J. Immunol. Methods 86: 45-52.