EVALUACION DEL MEDIO LIBRE DE SUERO EN LA PRODUCCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ior-T3

Lourdes Bouzó[1], Pablo Vitón[1], Volker Jäguer[2], Francisco González[1], Néstor J. Salvo[1], Ivonne Alvarez[1]

[1]*Centro de Inmunología Molecular. Apartado postal 16 040. Ciudad de La Habana, C.P. 11 600. Cuba.*
[2]*Gesellschaft für Biotechnologische Forschung GmbH. Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig, FRG.*

Recibido en enero de 1994. Aprobado en octubre de 1994.

Key words: Serum-free medium, monoclonal antibody, kinetics, aminoacid analysis.

SUMMARY

Serum-free medium adaptation of hybridoma secreting ior-T3 monoclonal antibody was done. Different metabolic variables were monitored through cultures and compared with a control culture. Metabolic behaviour of this hybridoma in serum-free medium was different with respect to control medium, and it was observed a slight decrease on total viable cells as also on monoclonal antibody production.

RESUMEN

El hidridoma productor del anticuerpo monoclonal ior-T3 fue adaptado a crecer en medio libre de suero. Durante los cultivos se monitorearon diferentes variables metabólicas comparando posteriormente estos resultados con un control al 10% de suero. El comportamiento metabólico de este hibridoma en el medio libre de suero fue diferente al mostrado en el medio de cultivo control. Se observó, al mismo tiempo, una ligera disminución respecto a la cantidad total de células alcanzadas, así como a la producción de anticuerpos monoclonales.

INTRODUCCION

La propagación *in vitro* de líneas de hibridomas constituye una fuente inagotable de AcMs (Köhler y Milstein, 1975); sin embargo, el aislamiento de éstos a partir del sobrenadante de cultivo es complejo por el hecho de que las concentraciones que se obtienen son muy bajas. Por otra parte, es conocido que la mayoría de los cultivos celulares requieren la presencia de suero en el medio para su crecimiento y éste contiene una mezcla de componentes no definidos, que dificultan y encarecen el proceso productivo.

Sato y Hayashi, en 1976, comenzaron a desarrollar métodos para reemplazar el suero en el medio de cultivo, para lo cual se apoyaron en la idea de que una de las funciones más importantes del suero es la de proveer un conjunto de factores y hormonas que son estimulantes para el crecimiento celular. A partir de este momento se comenzaron a desarrollar diferentes formulaciones de medios que han abierto un camino cualitativamente superior en la tecnología de producción de AcMs (Kawamoto *et al.*, 1986; Glassy *et al.*, 1987 Murakami *et al.* 1982; Merten y Litwin, 1991).

Es necesario tener en cuenta que cada línea celular requiere una combinación específica y única de factores estimulantes (Bottenstein *et al*, 1979; Barnes y Sato, 1980). La ausencia del suero en los medios representa un importante avance en la tecnología de cultivo de hibridomas y producción de AcMs, debido a que el empleo de medios químicamente definidos contribuye al abaratamiento de los procesos productivos y aumenta la confiabilidad de los productos empleados con fines terapéuticos.

MATERIALES Y METODOS

Cepa y medios de cultivo

En el estudio se empleó el hibridoma murino secretor de un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el complejo antigénico CD3 presente en la membrana plasmática de los linfocitos T. Este hibridoma proviene de la fusión de células de mieloma (P3/X63.Ag8.653) y linfocitos B del bazo de ratones Balb/c inmunizados con linfocitos T previamente purificados.

El medio libre de suero (MLS) utilizado contiene como medio basal la mezcla ISCOVE'S-DMEN/HAM'S-F12 en proporción 1:1 suplementado con insulina (10 mg/L), transferrina humana (10 mg/L) etanolamina (1.2 µL/L), glutamina (292 mg/L) y Albumax (10 mg/L) (Jäger *et al.*, 1988).

Las células empleadas como control positivo fueron crecidas en un medio convencional que contiene como medio base RPMI-1640 suplementado con piruvato de sodio (100 mg/L), glutamina (292 mg/L), bicarbonato de sodio (2 500 mg/L) y suero fetal (10 %). Todos los reactivos empleados provinieron de la firma Gibco (Europa).

Cultivo celular

El cultivo en MLS de la cepa empleada en el experimento se realizó en un solo paso: las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfatos y se sembraron posteriormente en frascos de 25 y 75 cm^2 con una densidad inicial de $5x10^5$ cél./mL en medio libre de suero. Se realizaron pases seriados durante

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

aproximadamente un mes de cultivo. Los estudios cinéticos posteriores se llevaron a cabo por triplicado en cultivos por lotes empleando frascos agitados (spinners-flask, Techne Cambridge) de 250 mL a una densidad de $1x10^5$ cél/mL ($200x10^6$ de células totales).

Análisis de las muestras

Se realizaron tomas de muestras durante todo el tiempo de cultivo (cada 12 h). El crecimiento celular fue monitoreado por conteo de células viables con hemocitómetro, empleando el método de exclusión con tripán azul como colorante vital (Patterson, 1979), la viabilidad se mantuvo por encima del 90% hasta que se inició la fase de muerte celular. La suspensión del cultivo se centrifugó y el sobrenadante se distribuyó y congeló a -70°C para los análisis posteriores.

Las mediciones de glucosa y lactato se realizaron empleando un analizador automático (Model 2000, Yellow Spring Instruments). Las concentraciones de amonio se determinaron empleando un electrodo de amonio (Ingold Messtechnik Ag, Model 15 230 3000). La concentración de AcM se determinó por un sistema inmunoenzimático (ELISA) tipo **sandwich** (Hoover and Martin, 1990). Las concentraciones de aminoácidos se determinaron a través de un sistema HPLC (Kontron Instruments) por intercambio iónico, empleándose como método de derivatización y detección el orto-phtalaldehído (Büntemeyer, 1987).

Parámetros cinéticos y metabólicos

Para el cálculo de las velocidades específicas se utilizó la regresión lineal por mínimos cuadrados a partir de las ecuaciones diferenciales que rigen el comportamiento de las variables cinéticas:

$$Xv = \mu_{ap} \int Xv\, dt \quad (1)$$

$$Xt = \mu_{real} \int Xv\, dt \quad (2)$$

$$Xd = Kd \int Xv\, dt \quad (3)$$

$$Igs = q_{Igs} \int Xv\, dt \quad (4)$$

$$Gluc = q_{Gluc} \int Xv\, dt \quad (5)$$

$$Lact = q_{Lact} \int Xv\, dt \quad (6)$$

Donde μ_{ap} es la velocidad de crecimiento específico aparente referida a la variación de células vivas (Xv), μ_{real} es la velocidad de crecimiento específico real referida a la variación de células totales (Xt), Kd es la velocidad de muerte referida a la variación de las células muertas (Xd), q_{Igs} es la velocidad específica de producción de anticuerpos, q_{Gluc} es la velocidad específica de consumo de glucosa y q_{Lact} es la velocidad específica de producción de lactato. El cálculo de estos coeficientes se realizó en la fase de adaptación (LAG) y fase exponencial de crecimiento del cultivo, excepto la Kd, la cual se calculó en la fase de muerte celular.

RESULTADOS Y DISCUSION

El efecto de la composición del nuevo medio sobre el hibridoma analizado fue investigado mediante la utilización de cultivos por lotes (Batch) bajo condiciones específicas que fueron detalladas en el acápite anterior.

Las velocidades de crecimiento, producción y consumo específico están influidas considerablemente por la composición del medio, la cantidad y tipo de suero empleado (Graf y Schügerl, 1990). En este caso la comparación del comportamiento entre las velocidades específicas de crecimiento (tanto la aparente como la real) en ambos medios mostraron diferencias para la fase de adaptación, estos resultados se muestran en la tabla 1. En el caso del cultivo en MLS, esta fase fue más prolongada, alcanzando alrededor de 74 h como se observa en la figura 1a. En el caso del medio convencional, la duración fue de 49 h (figura 1b). Esta diferencia pudiera atribuirse a la ausencia en el primer caso, de factores estimulantes del crecimiento que se encuentran presentes en el suero, por lo que la duplicación celular depende únicamente de aquellos factores liberados por las propias células.

Tabla 1
Velocidades específicas de crecimiento en las diferentes fases del cultivo.

	$\mu ap(h^{-1})$	r	$\mu real(h^{-1})$	r	$Kd(h^{-1})$	r
Fase de adaptación	0.035 (0.021)	0.956 (0.965)	0.035 (0.022)	0.958 (0.970)	-- (--)	-- (--)
Fase exponen-cial	0.028 (0.028)	0.976 (0.985)	0.029 (0.028)	0.980 (0.983)	-- (--)	-- (--)
Fase de muerte	-- (--)	-- (--)	-- (--)	-- (--)	0.029 (0.044)	0.946 (0.822)

Los valores entre paréntesis son los correspondientes al MLS y los otros se refieren al medio con suero

Respecto a las velocidades específicas de crecimiento para la fase exponencial, no se observó una gran diferencia entre ambos medios (figuras 1a y 1b). Se obtuvieron concentraciones celulares muy próximas a los 2×10^6 cél/mL lo que indica que una vez alcanzadas las condiciones óptimas para la proliferación sin existir limitación del sustrato energético, la velocidad de crecimiento no varía (Glacken *et al.*, 1987).

La fase de muerte celular está relacionada con el agotamiento de los nutrientes del medio, fundamentalmente la glutamina, lo cual ocasiona la acumulación de productos de desecho como resultado de reacciones de desaminación y transaminación; de aquí se deriva la formación de una considerable carga de amonio y cuerpos cetónicos responsables de la citotoxicidad en el medio y del envejecimiento del cultivo (Duval *et al.*, 1992). La velocidad de muerte celular del cultivo (Kd), se notó ligeramente incrementada en el medio libre de suero (tabla 1) lo

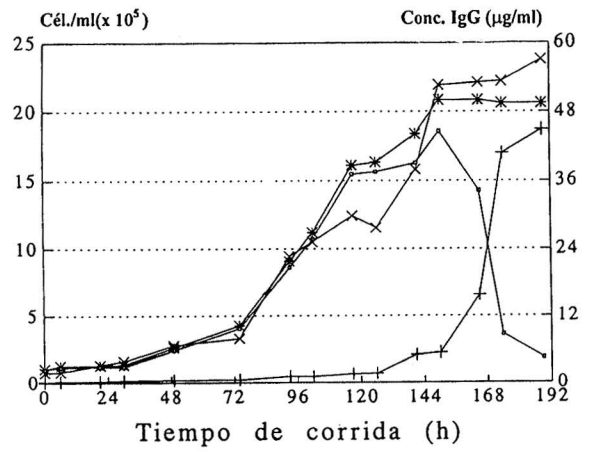

Fig. 1a. Curvas de crecimiento y producción en medio libre de suero. Xv (-•-), Xd (-+ -), Xt (-*-), Conc. IgG (-x-).

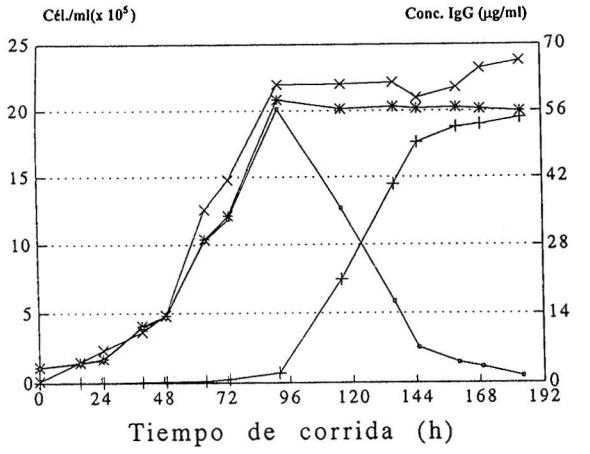

Fig. 1b. Curvas de crecimiento y producción en medio RPMI-1640 + 10% de suero. Xv (-•-), Xd (-+ -), Xt (-*-), Conc. IgG (-x-).

que puede atribuirse a la menor concentración de factores tales como citoquinas, hormonas e inhibidores de proteasas.

La glutamina en ambos medios muestra un comportamiento similar al consumirse totalmente en las primeras horas del cultivo, su desaparición en el medio ocurre antes de concluir la fase exponencial de crecimiento (figuras 2a y 2b); luego de agotada, los niveles de amonio se mantienen en el tiempo. La glutamina representa una de las mayores fuentes energéticas de la células, y es un cofactor esencial en la biosíntesis de nucleótidos; ella puede constituir un factor limitante en el crecimiento y la secreción de anticuerpos (Jenkins *et al.*, 1992).

La disminución de las concentraciones de glucosa en ambos medios de cultivo comenzó con la fase exponencial, luego de concluida, se mantienen dichos niveles apreciándose una estrecha relación entre esta disminución y la fracción de células viables (figuras 2a y 2b respecto a figuras 1a y 1b). Ello indica que la glucosa es empleada como una importante fuente energética en la duplicación celular. Se observó que la velocidad de consumo de glucosa para la fase exponencial en el MLS (q_{Gluc}= 166.66 µM/10⁹ cel.h) es superior a la calculada en el medio control (q_{Gluc}= 55.55 µM/10⁹ cel.h). Esto pudiera atribuirse a la necesidad de sintetizar determinados factores autocrinos necesarios para el crecimiento del cultivo (Jäguer, 1991).

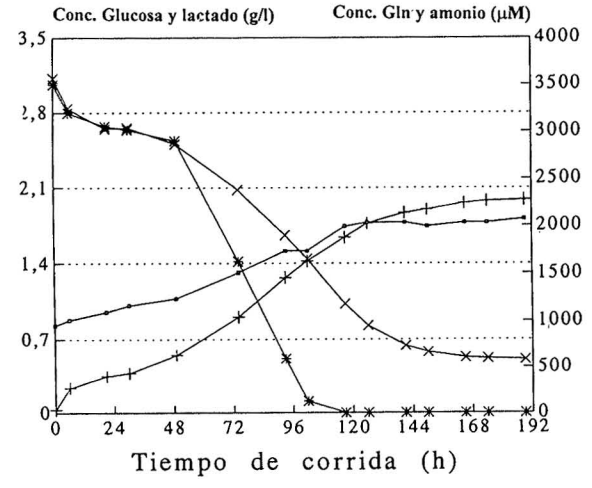

Fig. 2a. Comportamiento de las variables metabólicas fundamentales en medio libre de suero: glucosa (-x-), lactato (-+ -), glutamina (-*-) y amonio (-•-).

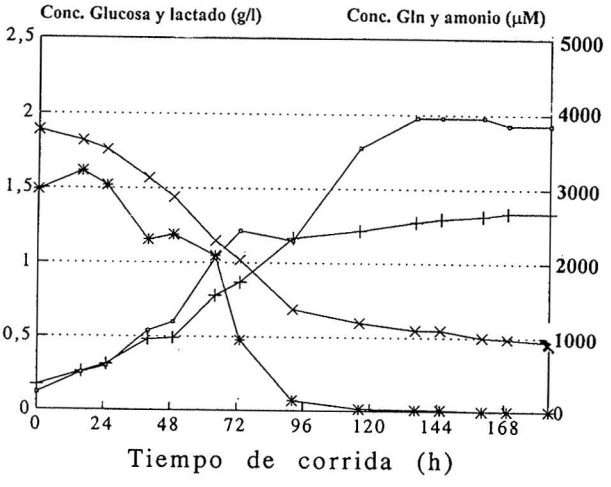

Fig. 2b. Comportamiento de las variables metabólicas fundamentales en medio RPMI-1640 + 10% de suero: glucosa (-x-), lactato (-+ -), glutamina (-*-) y amonio (-•-).

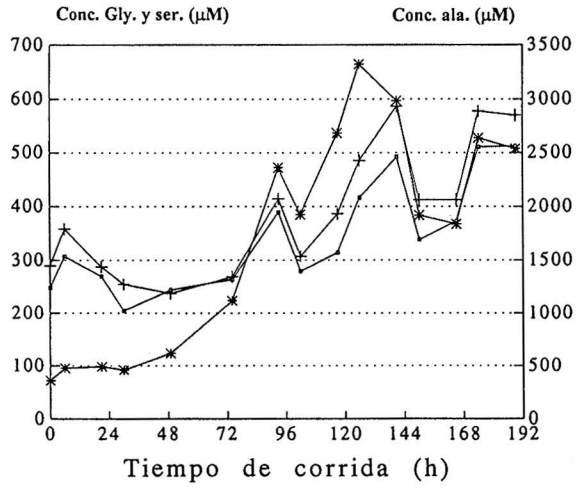

Fig. 3a. Concentración de los aminoácidos producidos en medio libre de suero. glicina (-•-), serina (-+ -) y alanina (-*-).

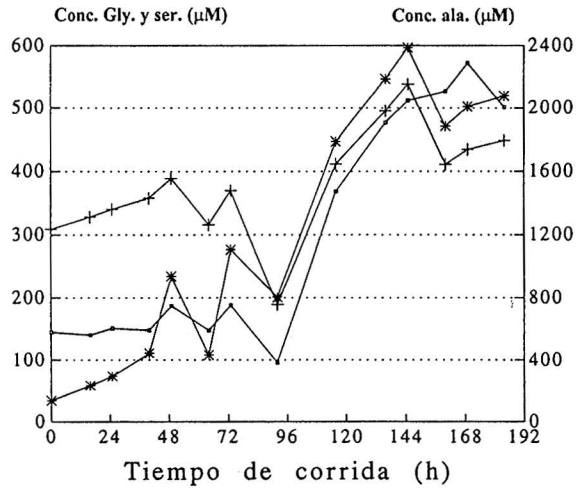

Fig. 3b. Concentración de los aminoácidos producidos en medio RPMI-1640 + 10% de suero glicina (-•-), serina (-+ -) y alanina (-*-).

Como resultado de la degradación de la glucosa se obtiene la formación de lactato en el medio, la velocidad de formación de lactato se corresponde con la velocidad de consumo de glucosa, es decir se observa un incremento de la velocidad de formación de lactato en la fase exponencial en el MLS (q_{Lac}= 188.88 µM/10^9 cel.h) con relación al medio control (q_{Lac}= 133.33 µM/10^9 cel.h).

Cuando se realiza un análisis de las velocidades de producción de anticuerpos, se muestra que en el MLS (q_{Igs}= 5x10^{-7} µg/cel. h) dicha velocidad es menor en relación al medio convencional (q_{Igs}= 7.88x10^{-7} µg/cel. h), esto puede ser atribuido a la composición del nuevo medio y la ausencia en él de factores estimulantes de la síntesis de AcM que se encuentran presentes en el suero. Por otra parte, debe tenerse en cuenta el incremento en el MLS de la actividad proteolítica, dada por la ausencia de inhibidores de proteasas aportados por el suero, y por el incremento de células muertas en el cultivo (Erp *et al.*, 1991).

La tendencia general de los aminoácidos extracelulares analizados se dividió en 3 grupos básicos según su comportamiento:

1- Aminoácidos producidos a lo largo del tiempo de cultivo (figuras 3a y 3b).

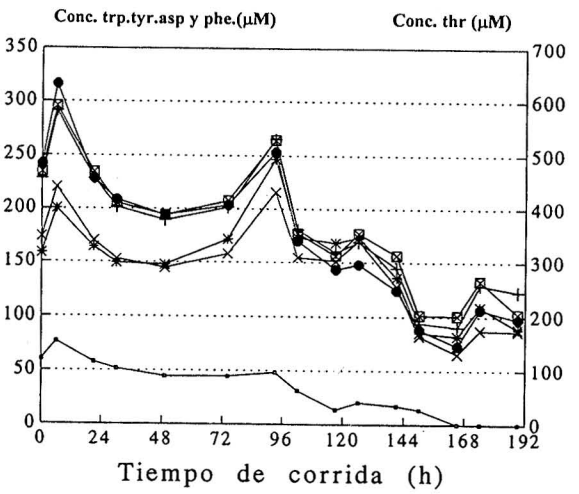

Fig. 4a. Concentración de los aminoácidos de bajo consumo en medio libre de suero. triptófano (-▪-), fenilalanina (-•-), tirosina (-+ -), aspartato (-x-), asparagina (-*-) y treonina (-▫-).

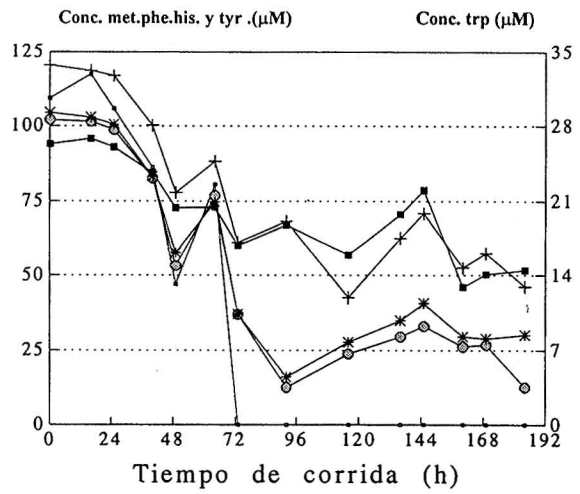

Fig.4b. Concentración de los aminoácidos de bajo consumo en medio RPMI-1640 + 10 % de suero. metionina (-*-), histidina (-o-), fenilalanina (-•-), tirosina (-+ -) y triptofano (-▪-).

2- Aminoácidos consumidos a bajas velocidades (figuras 4a y 4b).

3-Aminoacidos consumidos a altas velocidades (figuras 5a y 5b).

La aparición de grandes cantidades de alanina durante el cultivo ha sido reportada para muchos hibridomas como resultado de la transaminación del piruvato en glutamato (Hiller *et al*, 1991).

Las altas concentraciones alcanzadas en ambos tipos de medio son consecuencia directa del metabolismo de la glutamina que se encuentra a altos niveles (fundamentalmente en el medio libre de suero). Otro de los aminoácidos producidos es la glicina, que se forma a partir de la serina, cuya concentración inicial varia según el tipo de medio basal empleado.

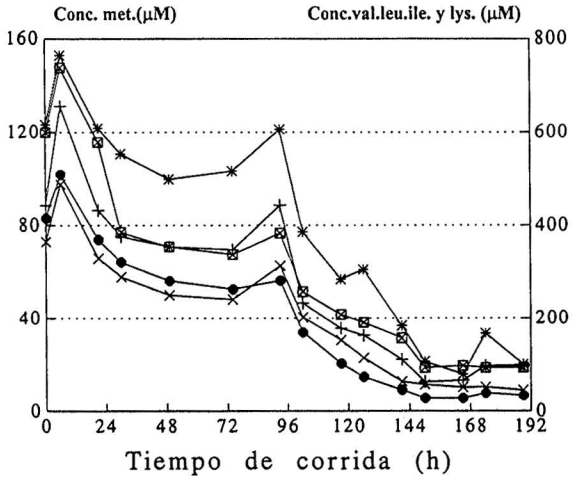

Fig.5a. Concentración de los aminoácidos de alto consumo en medio libre de suero. metionina (-*-), leucina (-o-), valina (-+ -), lisina (-□-) e isoleucina (-x-).

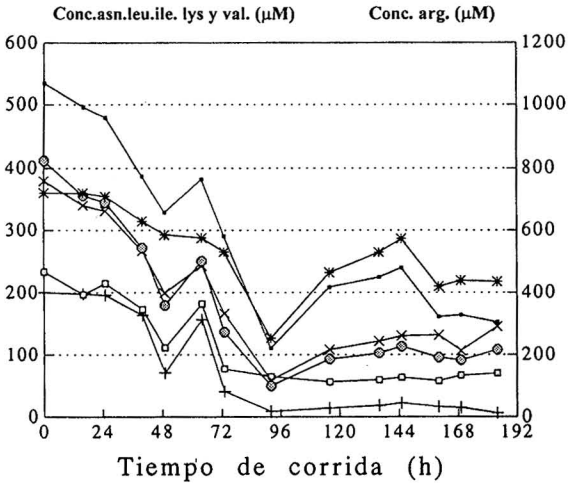

Fig. 5b. Concentración de los aminoácidos de alto consumo en medio RPMI-1640 + 10 % de suero. asparagina (-*-), arginina (-•-), leucina (-o-), lisina (-▪-), isoleucina (-x-) y valina (-+ -).

En el caso de aminoácidos esenciales como leucina, valina, isoleucina y lisina, la tendencia de alto consumo está presente tanto para el MLS como para el medio suplementado. Se observa un consumo mayor de asparagina, aspartato y treonina en el MLS, mientras que la histidina, metionina y arginina se consumen a más velocidad en el medio suplementado con suero. Sólo se mostró un consumo total de dos aminoácidos: el triptófano, que puede ser resultado de las bajas concentraciones presentes en el medio inicial; y la glutamina, cuya importancia fue analizada anteriormente.

Finalmente, puede afirmarse que el hibridoma secretor del anticuerpo monoclonal ior-T3 es capaz de mantener velocidades de crecimiento y secreción cercanas a las alcanzadas cuando se utilizan requerimientos séricos normales, por lo que se hace factible el empleo de este medio libre de suero para la producción a gran escala de esta glicoproteína, facilitando de este modo los procesos de purificación y validación del producto.

REFERENCIAS

BARNES, D. and G. SATO (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* **102:255.**

BOTTENSTEIN, J.; I. HAYASHI; S. HUTCHINGS; H. MASUI; J. MATHER; D. B. MCCLURE; S. OHASA; A. RIZZINO; G. SATO; G. SERRERO; R. WOLFE and R. WU (1979). The growth of cells in serum-free hormone-supplemented medium. *Methods Enzimol.* **45:94.**

BÜNTEMEYER, H. (1987). Entwicklung eines perfusions systems zur kultivierung tierischer zeller in suspension. *Thesis*, University of Hannover, FRG.

DUVAL, D.; C. DEMANGEL; S. MIOSSEC and I. GEAHEL (1992). Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells. *Hybridoma.* 11.

ERP, R.V.; M. ADORF; A.P.G.V. SOMMEREN and T.C.J. GRIBNAU (1991). Monitoring of mAb production by hybridoma cells. Part II: Characterization and purification of acid proteases present in cell culture supernatant. *J. Biotechnol.* **20:249-262.**

GLACKEN, M.W.; E. ADEMA and A.J. SINSKEY (1987). Mathematical description of hybridoma culture kinetics: I. Initial metabolic rates. aa *Biotechnology and Bioengineering*, **32:491-506.**

GLASSY, C.; E. PETER and A. MIKHALEV (1987). Growth of human-human hybrydomas in serum-free media enhances antibody secretion. *in vitro* cellular and developmental biology **23**:745-749.

GRAF, H. and K. SCHÜGERL (1990). Some aspects of hybridoma cell cultivation . *Applied microbiol and Biotechnol.* **35**:165-175.

HILLER, G.W.; A.D. AESCHLIMANN; D.S. CLARK and H.W. BLANCH (1991). A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium. *Biotechnology and Bioengineering* **38**:733-741.

HOOVER, C.S. and R.L. MARTIN (1990). Antibody production and growth of mouse hybridoma cells in Nutridoma media supplements. *BioTechniques* **(8)1**:76-82.

JÄGUER, V., J. LEHMANN and P. FRIEDL (1988). Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors. *Cytotechnology* **1**:319-329.

JÄGUER V. (1991). Serum-free media suitable for upstream and downstream processing. *Production of biologicals from animal cells in culture.* **1**:155-165.

JENKINS, H.A., M. BUTLER and A.J. DICKSON (1992). Characterization of the importance of glutamine metabolism to hybridoma cell growth and productivity. *J. Biotechnol.* **23**:167-182.

KAWAMOTO T.; J. TOMOYUK; J. DENRY and 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 En zymology* **121**:266-275.

KÖHLER, G. and C. MILSTEIN (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* **256**:495.

MERTEN, O.W. and J. LITWIN (1991). Serum-free medium for fermentor cultures of hybridomas. *Cytotechnology* **5**:69-82.

MURAKAMI, H.; H. MASUI and G. SATO (1982). Growth of mouse plasmacytoma cells in serum free medium: A systematic procedure for replacement of serum with defined growth factors. *Anal. Biochem.* **114**:422.

PATTERSON, M.K. Jr. (1979). Measurement of growth and viability of cells in culture. En: *Methods of Enzimology* (eds.)W.B. Jacoby, I.H. Pastan, Academic Press, London **58**:141-152.

SATO, G.H. and I. HAYASHI (1976). Growth of hybridoma cells in serum-free medium: Ethanolamine is an essential component. *Nature* **259**:132.