ARTICULOS ORIGINALES CORTOS/ SHORT ORIGINAL PAPERS

OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ior-T3 EN BIOREACTORES DE FIBRA HUECA

Nestor J. Salvo, Adolfo Castillo, Alicia Fernández, Lourdes Bouzó, Katia Torres, Francisco González

Centro de Inmunología Molecular. 29 y F Vedado, Habana 10 400, Cuba.

Recibido en agosto de 1993. Aprobado en febrero de 1994

Key words: Monoclonal antibody, hollow fiber, hybridoma, optimization

SUMMARY

The influence of the secretory rate, the cellular density of inoculum and the length of runnings were tested during the growth phase in runnings for monoclonal antibodies production from the hybridoma cell line ior-T3 using hollow fiber reactors. A productivity increase was found for long time runnings and for high density inoculum. The secretory rate of the subclone had less influence. Parameters are defined for running characterization and the production system is explained in detail.

RESUMEN

Se evaluaron diferentes corridas en bioreactores de fibra hueca durante la etapa de proliferación celular para la cepa de hibridoma ior-T3; se estudió la influencia de tres factores principales: la productividad en cultivo estacionario, la densidad celular del inóculo empleado y la duración de las corridas. Se observó una tendencia creciente al aumento de la productividad por parte de esos factores y en ese mismo orden. Se definen indicadores para el seguimiento de las corridas y se explica en detalle el sistema para la fermentacion de estas células.

INTRODUCCION

La aplicación en ascenso en la biomedicina de los anticuerpos monoclonales (AcM), tanto con fines diagnósticos como terapéuticos, impone el escalado de la producción de estas biomoléculas. En la actualidad el sistema de producción *in vivo*, consistente en la inoculación en ratones de los hibridomas con el objetivo de inducir tumores ascíticos ricos en AcM, ha sido el método más comúnmente empleado. Sin embargo, esta vía de obtención es aplicable sólo hasta cierta escala, por encima de la cual se manifiestan de forma aguda varias de sus desventajas (Schönherr *et al.*, 1987), las cuales son, entre otras: Los hibridomas sólo crecen en animales histocompatibles o inmunosuprimidos. El aumento del número de animales conlleva al consiguiente aumento de los gastos de manutención y operación. El personal necesario para cubrir todas las actividades crece, aumentando así los gastos en salarios. Se produce un aumento en los costos de la purificación, por contener la ascitis un alto contenido proteico, donde se destaca la presencia de inmunoglobulinas inespecíficas. La posibilidad de contaminación con agentes patógenos de origen murino puede constituir un impedimento para la aplicación terapéutica de estas biomoléculas, o incrementar los costos de los procedimientos de control y validación del proceso.

Por estas razones, y partiendo de los conocimientos provenientes de la clásica fermentación microbiana, es que en varios pases se ha desarrollado la tecnología de fermentación de células superiores o producción *in vitro*, la cual elimina en gran medida las desventajas de la utilización de los animales, aunque el producto que se obtiene (sobrenadante) presenta concentraciones muy pequeñas de AcM, por lo que se hacen necesarios pasos posteriores de concentración.

Como una alternativa en el proceso *in vitro* de producción de AcM surgen los llamados bioreactores de fibra hueca. Estos equipos tienen menores requerimientos que los empleados en la fermentación con agitación (por lo general se pueden colocar sobre mesetas, necesitando solamente un suministro de CO_2 además de las líneas de medio de cultivo), poseen además la ventaja de que el producto final se obtiene con una alta concentración y pureza, lo cual reduce

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

drásticamente los costos de purificación (Schönherr *et al.*, 1987; Merten, 1987; Evans y Miller, 1988; Knight, 1989).

Entre las desventajas más significativas (Hischel y Gruenberg, 1987), los procesos fermentativos utilizando esta tecnología suelen ser largos, obteniéndose el primer gramo de AcM después de aproximadamente un mes de inoculado el sistema; ello trae como consecuencia un aumento de los riesgos de contaminación y/o de accidentes, así como la posibilidad de que la molécula sufra cambios en su estructura por la acción de proteasas en el medio (Erp *et al.*, 1991).

El balance de ventajas y desventajas suele ser diferente en cada cepa de hibridomas, por lo que el establecimiento de un proceso productivo requiere una optimización previa de condiciones.

MATERIALES Y METODOS

Hibridoma

Todas las corridas se realizaron con diferentes subclones (Tabla 1) provenientes de reclonajes de la cepa de hibridoma ior-T3 secretora de un AcM que reconoce el complejo antigénico CD3 presente en la membrana plasmática de los linfocitos T.

Medio de cultivo

Todas las células se cultivaron y expandieron con medio de crecimiento consistente en RPMI-1640 (Northumbria Biologicals, Ltd.) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 18 mM de HEPES (Sigma), 26 mM de bicarbonato de sodio, 5×10^{-2} mM de 2-mercaptoetanol (Merck) y 10% de suero fetal bovino (Northumbria Biologicals Ltd.). Para las corridas en los bioreactores de fibra hueca, el medio de cultivo empleado varió en dependencia de su circulación por los espacios intra capilares (IC) o extra capilares (EC). En ambos casos se empleó el mismo medio de crecimiento anteriormente descrito, aunque con algunas modificaciones tales como: en el IC no se empleó ningún suplemento sérico ni de HEPES aunque se suplementó adicionalmente con 13.9 mM de glucosa, 100 µg/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina (Sigma). En el caso del EC, la única modificación con respecto al medio de crecimiento original consistió en la eliminación del HEPES.

Sistemas de cultivo

Luego de la descongelación previa a cada una de las corridas, las células se expandieron en frascos de cultivo estacionario de 75 y 150 cm^2 (Saniglass, Flow) a 37°C, hasta que finalmente se procedió al cultivo en suspensión en frascos de agitación (spinner-flask, Tecnomara). Para la preparación de los inóculos, se procedió a la centrifugación durante 10 min, del sobrenadante obtenido de los frascos de agitación a 1000 rpm, resuspendiéndose el precipitado celular en 50 ó 100 mL de medio EC en dependencia del número de células a inocular. Los inóculos tuvieron una viabilidad superior al 90% en todos los casos, la cual fue determinó, así como el número de células, por medio de un hemocitómetro, utilizando el método de exclusión por tinción con tripán azul.

Los bioreactores empleados fueron del modelo Acusyst-R (Endotronics). Este sistema tiene como característica fundamental el uso de cartuchos de fibras huecas (semejantes a los de hemodiálisis) con una abertura de poro tal que sólo las moléculas cuyo peso molecular sea inferior a 10 000 Da puedan difundir a través de sus paredes. Las células son inoculadas en el EC de las fibras, donde se reproducen secretando la proteína de interés. Por el IC de las fibras se hace circular el medio con el oxígeno y nutrientes necesarios para el cultivo, los cuales difunden a través de los poros de las fibras hacia el EC, produciéndose un gradiente de presión que genera una difusión en sentido inverso la cual posibilita la evacuación de los desechos metabólicos de las células al torrente del IC. La dirección del flujo por el IC cambia cada cierto período de tiempo para optimizar así las condiciones del cultivo dentro del cartucho (Endotronics Inc. 1989; Piret y Cooney, 1990). Todos los componentes de alto peso molecular (entre ellos, los anticuerpos secretados) quedan atrapados en el EC de donde son cosechados en forma controlada, permitiendo esto la obtención de un producto altamente concentrado y de gran pureza (Handa-Corrigan *et al.*, 1992). Para garantizar altas densidades celulares, este equipo posee tres bombas peristálticas (figura 1) la bomba de entrada-salida de medio del IC conectada al reservorio (A); la bomba de entrada de medio-cosecha conectada al EC (B); y la bomba de circulación (C), que posibilita la recirculación del medio del reservorio a través del cartucho. Para regular la dirección del flujo por el IC se utilizan cuatro válvulas direccionales, y para la regulación del pH y oxigenación del medio se usa una bomba de chorro.

El sistema de control del equipo permite monitorear los siguientes parámetros: flujos de entrada y salida de medio al reservorio y al espacio EC, temperatura en el cartucho de fibra hueca, flujo de suministro de CO_2 y aire para el control del pH y oxigenación, así como el tiempo del ciclo del flujo de circulación del medio de entrada al espacio IC.

En todas las corridas la temperatura fué mantenida en 37°C, el ciclo de recirculación de medio por el IC en 30 min y el pH fue estrechamente monitoreado (Checkmate, Ciba-Corning), manteniéndose su valor alrededor de 7.1. En todos los casos, el flujo de factores de crecimiento/cosecha fue cero durante los primeros 5-7 días, manteniéndose posteriormente en 3 mL/h durante el resto de la corrida. Los flujos de medio y circulación se incrementaron tomando como condición de optimización que la concentración de glucosa en el torrente de recirculación no fuera nunca inferior a 1.5 mg/mL (Handa-Corrigan *et al.*, 1990).

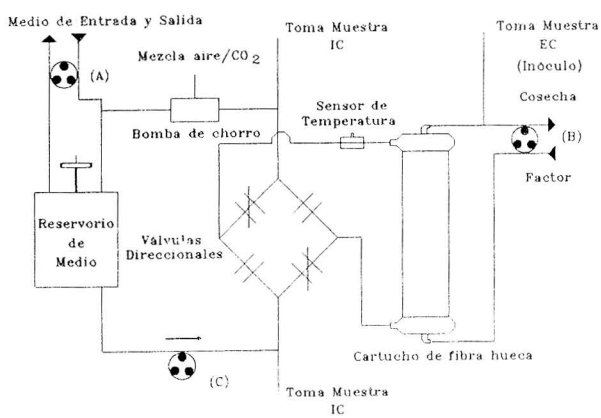

Fig.1: Diagrama esquemático del sistema Acusyst-R.

Análisis de las muestras

La concentración de AcM fué determinada por un sistema inmunoenzimático (ELISA) tipo *sandwich* que se inició con la adsorción de 10 μg/mL de inmunoglobulinas antiratón (obtenidas en carnero) en solución tampón carbonato-bicarbonato 0.1 M (pH 9.6). Posteriormente se procedió a la adición de las muestras, y de un segundo anticuerpo antiratón conjugado con fosfatasa alcalina. Finalmente se reveló la reacción mediante la adición del sustrato p-nitrofenilfosfato, leyéndose la absorbancia a 405 nm (Multiskan/Plus, Flow). La concentración de glucosa se midió a través de un juego de determinaciones cuantitativas (procedimiento No.510, Sigma) adaptado para ser leído a 450 nm utilizando placas de ELISA y el lector correspondiente (Multiskan/Plus, Flow).

Tabla 1
Datos característicos de las corridas realizadas

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5*
Productividad (μg/mL)	4.27	8.1	14.6	42	8.1
Inóculo (x 10E6 células)	224	2512	500	430	500
Duración (días)	20	20	20	20	20 (42)
Producto final (mg)	145.11	548.1	152.18	288.58	180.24 (1613.98)

* Los datos entre paréntesis corresponden al tiempo de duración de 42 días

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran los datos correspondientes a las cinco corridas experimentales para una duración de 20 días; además, en la corrida # 5 se reportan los valores obtenidos al prolongarla a 42 días (estos resultados aparecen enmarcados entre paréntesis).

Con el objetivo de analizar la influencia de la producción específica de anticuerpos en cultivo estacionario sobre la producción en estos bioreactores, se utilizaron diferentes subclones de la cepa ior-T3, cuyos niveles de secreción oscilaron entre 4.27 y 42 μg/mL. En la figura 2 se reflejan los valores de producto final obtenidos en el tiempo para las diferentes corridas realizadas. Su análisis evidencia un aumento en la cantidad de producto final para la corrida # 4, donde se empleó un subclon de alta producción en cultivo estacionario, al compararla con la corrida # 3, de similar concentración de inóculo y en la que se utilizó un clon de menor producción.

Sin embargo se evidenció que, aunque la relación entre las producciones en cultivo estacionario fue de aproximadamente 3, la producción final en el bioreactor se incrementó en sólo 2 veces (Tabla 2). Un efecto similar se observa en las corridas 4/5, donde la relación entre las producciones en cultivo estacionario es ligeramente mayor que 5.

Por otra parte, con vistas a analizar el efecto de la concentración celular del inóculo sobre la cantidad de producto final obtenido, se emplearon diferentes densidades celulares que variaron entre 3 x 10^6 y 37 x 10^6 células/mL. En la figura 2 se observa que para la corrida # 2, en la cual se inoculó a alta densidad, se obtuvo un incremento en la cantidad de producto final en comparación con corridas realizadas con subclones de similares producciones en cultivo estacionario, pero con inóculos de menor densidad (corridas 1, 3 y 5). Sin embargo, puede apreciarse en la tabla 2 que, aunque la relación entre el número de células que conformaron los inóculos de las corridas 2/5 fue aproximadamente 5 veces mayor, se obtuvo solamente un aumento de alrededor de 3 veces en la cantidad de producto final. Este resultado se confirma al analizar las relaciones para las corridas 2/1 y 2/3.

Estos efectos se explican debido a que al definirse un flujo fijo de alimentación de factores de crecimiento/cosecha entre los días 5 y 7, pudieran manifestarse los siguientes fenómenos:

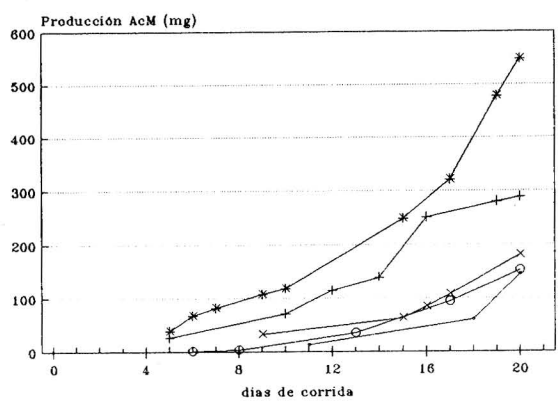

Fig. 2. Producción acumulativa de la corrida 1 (-• -), 2(-*-), 3(-o-), 4(-+ -) y 5(-x-) para 20 días.

Tabla 2
Relaciones existentes entre diferentes corridas

	Producción cultivo estac.	Inóculo	Producto final obtenido
2/1	1.90	11.21	3.78
4/1	9.84	1.92	1.90
5/1	1.90	2.23	1.24
2/3	0.55	5.02	3..60
2/5	1.00	5.02	3.04
4/3	2.88	0..86	1.90
4/5	5..19	0.86	1.60

a.Insuficiencia en el suministro de alguno de los factores presentes en el suero, necesarios no sólo para estimular la síntesis de biomasa (crecimiento celular), sino también para la síntesis de proteínas.

b. Alta concentración celular sin establecer desde el inicio el flujo de cosecha, lo que produce un aumento de la concentración de factores autocrinos (de alto peso molecular) que pudieran inhibir la secreción de inmunoglobulinas.

c.- Presencia de una fuerte actividad proteolítica, para las altas concentraciones celulares del inóculo debido a una insuficiencia de suero en el inicio de la corrida, ya que se ha demostrado que el suero juega un importante papel como inhibidor de proteasas (Erp *et al.*, 1991).

No obstante, el incremento en la velocidad de producción (figura 2) para las condiciones de alto inóculo, y también en el caso del subclon alto productor, evidencia que ambos factores juegan un papel importante para el establecimiento futuro de corridas con parámetros óptimos de operación. Otra variable estudiada fue la duración del proceso fermentativo, por lo cual se realizó una corrida en la que se usó un subclon mediano productor y una densidad celular intermedia del inóculo (Tabla 1, corrida 5) con el objetivo de eliminar el efecto del alto inóculo y de la alta productividad en cultivo estacionario. La duración de esta corrida se extendió aproximadamente al doble del tiempo empleado en las demás (figura 3); sin embargo, la cantidad de producto obtenido fue casi 9 veces mayor que la obtenida para 20 días de corrida, debido sin dudas, al incremento del número de células secretoras en el interior del cartucho. Esto indica que en el establecimiento de estrategias de optimización, sera muy deseable extender en lo posible la duración de las corridas. Profundizando en este último aspecto, se emplean una serie de indicadores (Tabla 3) que pudiesen fungir como funciones objetivo en futuros trabajos de optimización de estos procesos, los cuales son:

PIg: Producción promedio de anticuerpos por día de corrida (mg/d).

MIg: Cantidad de medio consumido por miligramo de anticuerpos producido (L/mg).

SIg: Cantidad de suero consumido por milgramo de anticuerpos producido (mL/mg). Donde:

$$Plg = \frac{(Cantidad\ total\ de\ producto)}{(Días\ de\ Corrida)} \quad (1)$$

$$Mlg = \frac{(Cantidad\ total\ de\ medio\ usado)}{(Cantidad\ total\ de\ producto)} \quad (2)$$

$$Slg = \frac{(Cantidad\ total\ de\ suero\ usado)}{(Cantidad\ total\ de\ producto)} \quad (3)$$

Tabla 3
Indicadores para la optimización de las corridas

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5*
Plg(mg/d)	7.26	27.41	7.61	14.43	9.01 (38.43)
Mlg(L/mg)	0.36	0.17	0.18	0.17	0.2 (0.08)
Slg(mL/mg)	1.61	0.22	0.84	0.35	0.51 (0.19)

* entre paréntesis se especifican los valores obtenidos a los 42 días

Lógicamente, una corrida eficiente sera aquella en la cual se maximize en primera instancia la ecuación 1, minimizándose las ecuaciones 2 y 3. Finalmente, de todos los datos expuestos puede concluirse que para el establecimiento de corridas óptimas, lo más deseable sera el contar con inóculos de alta densidad utilizando subclones de alta capacidad secretora, alargando la duración de los procesos fermentativos por más de 40 días.

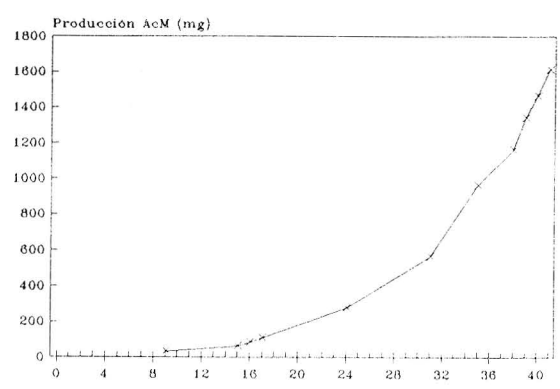

Fig. 3. Producción acumulativa de la corrida 5 para 44 días.

REFERENCIAS

ENDOTRONICS Inc. (1989). ACUSYST-R, Operations manual: Revision A. Minneapolis. USA.

ERP, R.V.; M. ADORF; A.P.G.V. SOMMEREN; O.T. SCHNHERR; and T.C.J. GRIBNAU (1991). Monitoring of mAb production by hybridoma cells. Part I: Long-term cultivation in hollow fibre bioreactors using serum-free medium. *J. Biotechnol.* **20**:235-248.

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.

EVANS, T.L. and R.A. MILLER, (1988). Large Scale Production of Murine Monoclonal Antibodies Using Hollow Fiber Bioreactors. Bio/Techniques **6(8)**:762-767.

HANDA-CORRIGAN, A.; S. NIKOLAY and S.E. SPIER (1990). Biochemical Control of Monoclonal Antibody Secretion in Hollow Fiber Bioreactors. In: *European Society for animal cell technology*, the 10th Meeting, ESACT.

HANDA-CORRIGAN, A.; S. NIKOLAY; D. JEFFERY; B. HEFFERNAN and A. YOUNG (1992). Controlling and predicting monoclonal antibody production in hollow fiber bioreactors. *Enzime Microb. Technol.* **14**:58-63.

HIRSCHEL, M.D. and M.L. GRUENBERG (1987). An automated hollow fiber system for the large scale manufacture of mammalian cell secreted product. In: *Large scale cell culture technology*, B.K. Lydersen (ed), Hanser publishers, MacMillan Publishing Company, New York, NY, p.p 113-144.

KNIGHT, P. (1989). Hollow Fiber Bioreactors for Mamalian Cell Culture. *Bio/Technology* **7**:459.

MERTEN, O. (1987). Concentrating mammalian cells. I. Large-scale animal cell culture. *Tibtech*. **5**:230-235.

PIRET, J.M. and C.L. COONEY (1990). Mammalian Cell and Protein Distributions in Ultrafiltration Hollow Fiber Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **36**:902-910.

SCHÖNHERR, O.T.; P.T.J.A. VANGELDER; P.J. VANHEES; A.M.J.M. VAN OS and H.W.M. ROELOFS (1987). A Hollow Fibre Dialisis System for the *in vitro* Production of Monoclonal Antibodies Replacing *in vivo* Production in Mice. *Develop. Biol. Standard.* **66**:211-220.