

# Desarrollo de una estrategia de producción de rhEPO en un biorreactor de agitación

Beccaria, Alejandro; Etcheverrigaray, Marina; Kratje, Ricardo

Instituto de Tecnología Biológica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.  
Universidad Nacional del Litoral.  
Ciudad Universitaria. Paraje «El Pozo» -C.C. 242-  
(S3000ZAA) Santa Fe. Pcia. de Santa Fe. Argentina.  
TEL./FAX: +54 (0) 342 457 5214  
E-mail: rkratje@fbc.unl.edu.ar

**RESUMEN:** El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un proceso de cultivo en gran escala para la producción de eritropoyetina humana recombinante. Para ello, se realizaron ensayos preliminares en los que se determinó la fase de producción del clon productor, la estabilidad del mismo y la respuesta a la suplementación con suero fetal bovino.

Posteriormente, se diseñó una estrategia de producción en un biorreactor de agitación en escala piloto, que involucró la adaptación previa de las células al crecimiento en suspensión. Los resultados obtenidos permitieron establecer las concentraciones mínimas de suero compatibles con el mantenimiento de la viabilidad del cultivo, así como su dependencia con la velocidad de perfusión. Además, pudo demostrarse que el consumo de oxígeno es una medida útil en el monitoreo indirecto del estado del cultivo.

**Palabras claves:** Eritropoyetina Humana Recombinante - Biorreactor de Agitación - Cultivo en Suspensión.

**SUMMARY:** Development of a production strategy for rhEPO in a perfused stirred tank bioreactor. Alejandro Beccaria, Marina Etcheverrigaray and Ricardo Kratje. It was developed a pilot scale process for the production of human recombinant erythropoietin. Preliminary assays were carried out in order to determine the production phase of the producer clone, its stability and its response to supplementation with fetal calf serum.

The scaling up to a pilot scale perfused stirred tank bioreactor involved the development of a protocol for the adaptation of the cells to growth in suspension mode. The obtained results allowed the establishment of the minimal serum concentration that supports cell viability and its dependency with the perfusion rate. Moreover, it was demonstrated that the oxygen consumption rate turned out as a useful tool for the indirect estimation of the culture state.

**Key words:** Human Recombinant Erythropoietin - Stirred Tank Bioreactor - Suspension Culture

## Introducción

En los últimos años, sobre la base de los avances técnicos logrados en la metodología de cultivo de células de mamífero, se han desarrollado numerosos productos de uso terapéutico y diagnóstico. Las células animales constituyen el sistema huésped de elección para la expresión de moléculas cuya glicosilación, así como su estructura terciaria o cuaternaria, deben conservarse para manifestar una actividad biológica satisfactoria. Tal es el caso de eritropoyetina, hormona sintetizada y secretada fundamentalmente por células renales. Su función es la de intervenir en la eritropoyesis. Las células efectoras de esta hormona se encuentran principalmente en la médula ósea. A nivel molecular, ejerce su acción a través de un receptor expresado en la

superficie de células eritroides inmaduras, manteniendo su viabilidad, promoviendo su división e incrementando la síntesis de hemoglobina, llegando a un estadio de diferenciación morfológica (1). Si bien se ha estudiado la acción terapéutica de la administración exógena de la eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) en diferentes trastornos y patologías humanas, se aplica fundamentalmente en la anemia asociada a la insuficiencia renal crónica.

Químicamente es una sialoglicoproteína de 165 aminoácidos, siendo el peso molecular de la fracción proteica de 18,398 kDa y el de la hormona completa de 34-39 kDa (2). Ya que la fracción glicosídica es fundamental para la actividad biológica *in vivo*, la producción en cultivos de células animales es actualmente la única opción válida.

En este trabajo, se desarrolló un proceso de cultivo en gran escala para la producción de rHEPO. Desde una perspectiva biotecnológica, algunas de las variables claves involucradas en la optimización de un proceso productivo incluyen el establecimiento de la fase de producción y la estabilidad del clon productor. Su conocimiento permite determinar la elección del modo de cultivo adecuado (3).

El trabajo consistió, en una primera etapa, en determinar la fase de producción de células recombinantes productoras de eritropoyetina humana, la estabilidad del clon productor y la respuesta a la suplementación con suero fetal bovino (SFB). El uso excesivo de este suplemento encarece notablemente el medio de cultivo en particular, y el proceso de producción en general, ya que el mayor aporte de proteínas al cultivo dificulta posteriormente la etapa de purificación del producto recombinante (4).

Los resultados de estos ensayos se aplicaron, en una segunda etapa, en el diseño de una estrategia de producción en escala piloto en un biorreactor de agitación, previa adaptación de las células al crecimiento en suspensión.

## **Materiales y Métodos**

### ***Línea celular***

Se empleó un clon derivado de la línea celular BHK-21 (ATCC CCL C10), que se manipuló genéticamente para sintetizar eritropoyetina humana bajo el control del promotor del SV 40 (5).

### ***Medio de cultivo y reactivos químicos***

El medio de cultivo consistió de una mezcla 1:1 (V/V) de los medios D-MEM (Gibco B.R.L., EE.UU.) y Ham's F12 (Gibco B.R.L., EE.UU.), con el agregado de:  $\text{NaHCO}_3$  2,4 g.l<sup>-1</sup>, D(+)-glucosa anhidra 1,20 g.l<sup>-1</sup>, piruvato de sodio 0,11 g.l<sup>-1</sup>, glutamina 1,10 g.l<sup>-1</sup>, triptofano 0,03 g.l<sup>-1</sup>, ácido aspártico 0,04 g.l<sup>-1</sup> y serina 0,08 g.l<sup>-1</sup>. Las concentraciones de SFB (Bioser, Argentina) utilizadas se indican para cada ensayo. Además, se utilizó sulfato de genecín 400 mg.ml<sup>-1</sup> (Gibco B.R.L., EE.UU.) o sulfato de gentamicina 50 mg.ml<sup>-1</sup> (Parafarm, Argentina).

La disolución de todos los componentes se realizó empleando agua ultra pura (18,2 M $\Omega$ ) deprogenada. La esterilización se realizó por filtración (0,2  $\mu\text{m}$ ).

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica. Además, los suplementos de los medios de cultivo fueron aquellos reactivos con el certificado de origen de "testeados en cultivos celulares".

## ***Sistemas y condiciones de cultivo***

### ***Cultivo de células en adherencia***

Se emplearon frascos T (Nunc, EE.UU.) de 25 cm<sup>2</sup> de superficie. Para la fase de crecimiento celular se trabajó con 10 ml de medio de cultivo suplementado con 5% (V/V) de SFB. Para el mantenimiento de la monocapa se trabajó con 5 ml de medio de cultivo suplementado con 1% (V/V) de SFB. Las incubaciones se realizaron en estufa gaseada a 37°C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y saturada de humedad. Luego de la recolección de los sobrenadantes de cultivo se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 200 g durante 10 min. El sobrenadante obtenido se conservó en alícuotas a -20°C. Las células de la monocapa fueron desprendidas mediante los procedimientos de tripsinización convencionales(6).

### ***Cultivo de células en suspensión***

#### ***Cultivo de células en frascos spinner***

Se emplearon frascos *spinner* (Techne, Reino Unido) de 500 ml de volumen de trabajo.

Las incubaciones se realizaron en estufa gaseada a 37°C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y saturada de humedad. Diariamente se realizó una toma de muestra del cultivo, que se fraccionó en dos alícuotas. La primera alícuota se centrifugó a 6.800 g en microcentrífuga para tubos *ependorf* y se separó el sobrenadante del *pellet* celular. El sobrenadante se conservó a -20°C. El *pellet* celular se utilizó para la determinación de la concentración de células totales mediante la técnica de tinción de núcleos (7). En la segunda alícuota se determinó la proporción de células viables presentes en el cultivo. Para ello se empleó la técnica de exclusión del azul de tripán (8). La proporción de células viables obtenida se relacionó con la concentración de células totales con el fin de calcular la concentración de células viables.

### Cultivo de células en un biorreactor de escala piloto

Se empleó un biorreactor de 23,5 l de volumen máximo de trabajo (MBR Bio Reactor AG, Suiza), equipado con dos posibles sistemas de aireación: membrana hidrofóbica de polipropileno y burbujeadores. La aireación empleando la membrana hidrofóbica se efectúa en forma libre de burbujas por difusión del oxígeno a través de la pared de la

membrana. De esta manera se evita el efecto nocivo de las burbujas sobre la viabilidad celular(9). La aireación a través de los burbujeadores genera espuma; debiéndose en este caso suplementar el medio con antiespumante.

Los cultivos en el biorreactor se comenzaron en modo *batch* con las condiciones indicadas en la Tabla 1. Para la inoculación se utilizó un volumen adecuado de la suspensión de células en fase de crecimiento exponencial, provenientes de frascos *spinners*.

Tabla 1: Variables de operación del cultivo en el biorreactor

Variable operativa	Set-point
Temperatura del cultivo	37°C
pH inicial del cultivo	7
Tensión del oxígeno disuelto en el cultivo	40%
Caudal de aire/O <sub>2</sub>	0,5 l . min. <sup>-1</sup>
Velocidad de agitación	80 R.P.M.
Velocidad de giro del filtro rotatorio	60 R.P.M.

Durante el cultivo se midieron en forma continua las siguientes variables (mediciones *on-line*): temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, estado redox, velocidad de agitación y de rotación del filtro *spin-sieve*. Las primeras tres variables se regularon en forma automática, manteniéndose los valores prefijados (*set-point*). La temperatura del cultivo se midió mediante una sonda y su señal permitió regular la temperatura del agua contenida en el doble manto del biorreactor. El pH del cultivo se midió mediante un electrodo sensible (Ingold, Suiza), estando su señal acoplada a la regulación de la entrada de CO<sub>2</sub> al sistema de aireación. El sistema *buffer* del medio de cultivo empleado fue CO<sub>3</sub>H/CO<sub>2</sub>. Consecuentemente, la alcalinización ocasionada por el desplazamiento del CO<sub>2</sub> del medio debida a la aireación se compensó automáticamente mediante la inyección de CO<sub>2</sub>. La acidificación ocasionada por el metabolismo celular se balanceó mediante el ingreso de medio de cultivo fresco durante el cultivo continuo. La concentración de oxígeno disuelto en el cultivo se midió mediante

un electrodo específico (Ingold, Suiza) y se expresó como porcentaje de saturación del medio con aire. Su señal está acoplada a la apertura o cierre de la entrada de aire y/o oxígeno al sistema de aireación, siendo el caudal constante e igual a 0,5 l.min.<sup>-1</sup>. Por lo tanto, la concentración de oxígeno disuelto en el cultivo se mantuvo constante al compensarse automáticamente el consumo celular mediante la entrega automática de aire u oxígeno a través del sistema de aireación. La masa celular se mantuvo en suspensión mediante la agitación producida por una hélice tipo marina a 80 R.P.M. La perfusión de los cultivos se realizó empleando un filtro rotatorio (*spin-sieve*) equipado con una malla de acero inoxidable de 10 µm de tamaño de poro y ubicado en el interior del biorreactor. Este sistema permite la cosecha continua de medio libre de células, manteniéndose el volumen de trabajo del biorreactor mediante el agregado de igual volumen de medio fresco.

Los cultivos se suplementaron inicialmente con sulfato de gentamicina y 100 ppm de antiespumante

(Dow Corning, EE. UU.). Durante el cultivo, el agregado de solución de antiespumante se realizó en forma manual, tomando como referencia la altura de la espuma generada sobre la superficie del cultivo. La concentración de SFB se modificó durante el cultivo según se muestra en Resultados y Discusión.

Diariamente se determinó la velocidad de consumo de oxígeno del cultivo y se tomaron muestras en las que se determinó la concentración de células totales y viables. Los sobrenadantes libres de células se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A partir del recuento celular se determinó el momento apropiado para aumentar el volumen de los cultivos y comenzar la perfusión.

### Determinaciones analíticas

Las determinaciones analíticas que se describen a continuación se realizaron en alícuotas de los sobrenadantes, conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La concentración de glucosa se determinó empleando técnicas espectrofotométricas convencionales (Wiener Lab., Argentina; Laboratorios GT, Argentina). La técnica se adaptó a microescala, utilizando placas de microtitulación y efectuando las determinaciones en un lector de placas (Labsystems Multiskan MCC/340, Finlandia).

La concentración de lactato se determinó empleando una técnica UV de dosaje enzimático (Boehringer-Mannheim GmbH, Alemania).

El monitoreo del amonio en los sobrenadantes de cultivo se realizó mediante un *kit* comercial empleado para la determinación de urea (Wiener Lab., Argentina) adaptado para tal fin.

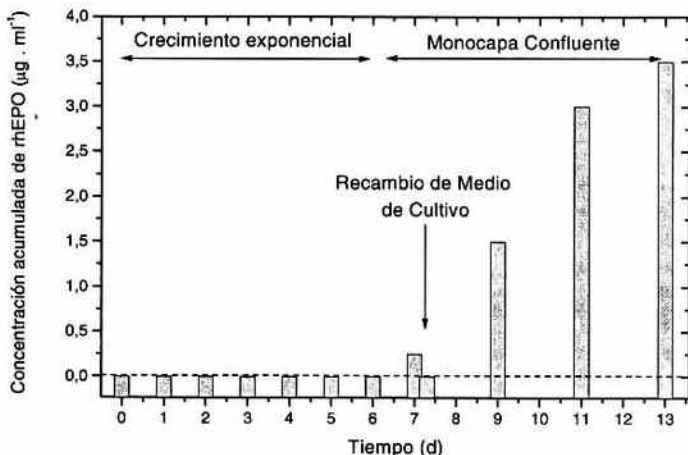
La concentración de rhEPO se determinó empleando un *immuno-dot* desarrollado en nuestro laboratorio(10).

### Resultados y Discusión

#### Determinación de la fase de producción y de la estabilidad del clon

En la Fig. 1 se muestra la concentración acumulada de rhEPO durante el cultivo. La producción no está asociada al crecimiento celular, ya que sólo se produce rhEPO en la fase estacionaria del cultivo. Luego del reemplazo del medio de cultivo, la producción de rhEPO estimada a partir de la pendiente de concentración de rhEPO acumulada en función del tiempo y el volumen de cultivo fue constante e igual a  $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$  (día 7 a 11). En el período final (día 11 a 13) la producción disminuye un 66%, siendo de  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ . Este fenómeno puede atribuirse a la inestabilidad del clon productor o al agotamiento de ciertos nutrientes del medio y/o acumulación de productos.

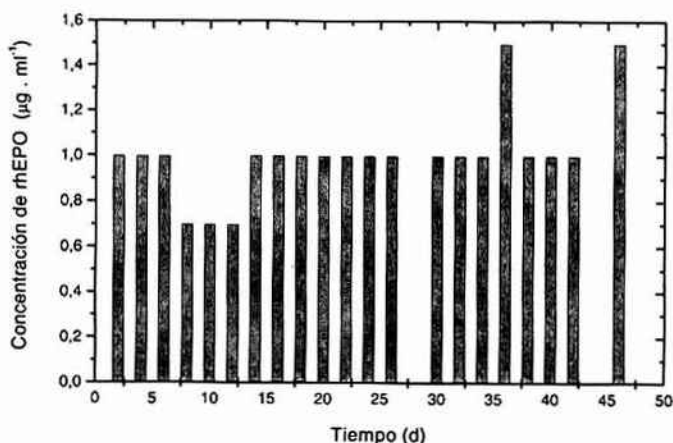
**Figura 1:** Correlación entre la producción de rhEPO y las fases del cultivo en adherencia. En el tiempo indicado con la flecha vertical, se reemplazó el volumen de 10 ml de sobrenadante por medio de cultivo fresco. La línea punteada indica el nivel cero de concentración de rhEPO.



Como se observa en la Fig. 2, la producción de la monocapa se mantiene con valores superiores a  $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  durante los 46 días del ensayo. Este resultado muestra la estabilidad del clon productor empleado, posibilitándose establecer procesos de producción operados en forma continua con recambio periódico de medio: cultivos en monocapa en sistemas múltiples como frascos *roller* y sistemas *multi-tray* o sistemas unitarios como biorreactores tipo *hollow fiber* con perfusión. En los cultivos estáticos,

la baja regeneración de la monocapa podría influir negativamente en la calidad del producto obtenido, ya que existen evidencias experimentales que indican una alteración de la calidad de los glúcidos presentes en la glicoproteína (11, 12, 13). Sin embargo, esta alteración no se manifestó en el contenido de ácido siálico de la rhEPO obtenida en cultivos adherentes de células CHO recombinantes realizados en sistemas *multi-tray* con recambios de medio cada 3,5 días durante 120 días (14).

**Figura 2:** Evaluación de la estabilidad del clon productor. El tiempo cero indica el tiempo en que el cultivo alcanza la confluencia y el comienzo de los recambios sucesivos cada dos días del volumen total de 10 ml de sobrenadante por medio de cultivo fresco. Las barras indican la concentración de rhEPO acumulada en el sobrenadante para cada recambio.



### Adaptación al crecimiento en suspensión

La adaptación al crecimiento en suspensión se inició con células provenientes de un cultivo en frasco T en fase exponencial. Se inocularon frascos *spinner*, empleando 200 ml de medio de cultivo suplementado con 2% (V/V) de SFB. En el comienzo de la adaptación al crecimiento en suspensión, las células se aglutinaron y crecieron formando agregados, cuyo volumen fue incrementándose a medida que el cultivo progresaba. Se observó, además, que las células crecían en capas sobre las paredes del frasco *spinner* en contacto con el medio y en la interfase medio/aire del cultivo. La rhEPO se detectó recién cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria (datos no mostrados), en forma análoga al cultivo adherente en monocapa.

Los repiques sucesivos se realizaron en promedio cada 5 días, empleando la fracción de células suspendidas en el medio. La adaptación continuó en forma progresiva, observándose en el pasaje N° 29 una disminución de la relación agregados / células libres (menor al 22%) y una disminución del volumen máximo alcanzado por los agregados ( $\leq 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^3$ ).

Por otra parte, en los subcultivos sucesivos se disminuyó gradualmente la concentración de SFB en el medio, hasta alcanzar el valor final de 1% (V/V) en el pasaje N° 29 a los 5 meses de iniciada la adaptación a la suspensión.

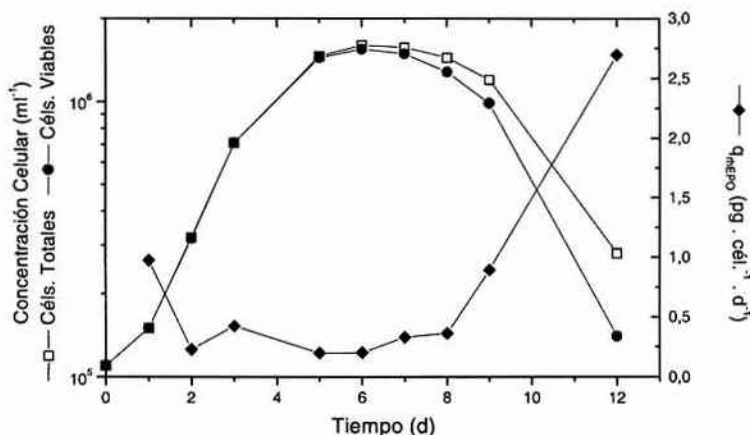
En la Fig. 3 se observa la curva de crecimiento en *batch* obtenida para el pasaje N° 29. El cultivo se inició con 200 ml de medio de cultivo suplementado con SFB 1% (V/V) en un frasco *spinner*. La producti-

vidad específica de rhEPO ( $q_{rhEPO}$ ) se estimó a partir de la siguiente ecuación:

$$q_{rhEPO} = \frac{\Delta C}{\sqrt{X_1 \cdot X_2} \cdot \Delta t} \quad (1)$$

donde  $\Delta C$  corresponde a la diferencia entre las concentraciones de rhEPO en el intervalo de tiempo ( $\Delta t$ ) y  $X$  representa la concentración de células viables para los extremos de ese intervalo. En el cálculo de  $q_{rhEPO}$  se emplea el promedio geométrico de la concentración celular porque representa la densidad celular en mitad del intervalo.

Figura 3: Adaptación del crecimiento del clon productor en suspensión en el pasaje N° 29.



La máxima densidad celular alcanzada fue de  $1,6 \cdot 10^6$  cél.  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> (viabilidad 97%). El perfil de productividad específica de rhEPO presenta dos máximos, uno al comienzo del cultivo y el otro durante la fase de muerte. Además, durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, la productividad es inferior y se mantiene constante en  $0,26 \pm 0,09$  pg.cél.<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> ( $n = 6$ ). Este resultado se diferencia del alcanzado en cultivos adherentes y primeros pasajes de adaptación a la suspensión en los que la producción es nula durante la fase exponencial de crecimiento. Este aumento de productividad coincide con lo informado por Kratje y Wagner (15) para interleuquina-2 humana recombinante, para la cual la producción de los cultivos en suspensión es significativamente superior que en los cultivos realizados con células adheridas a diferentes soportes. Además, resultados análogos referidos al incremento de 5,7 veces en la velocidad específica celular de producción de

interferón- $\gamma$ , fueron informados por Perry y Wang (16), cuando se compararon cultivos realizados en forma adherente y en suspensión.

#### Efecto de la concentración de SFB sobre el crecimiento celular y la producción de rhEPO

En la Fig. 4 se muestra la relación entre el rendimiento celular ( $\Delta X_t$ ) y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) con la concentración de SFB, cuando ésta se incrementa desde 0,1 hasta 1% (V/V). El rendimiento celular se definió y estimó como la diferencia entre la concentración de células viables del inóculo y la máxima concentración de células viables alcanzada en la fase estacionaria. La velocidad específica de crecimiento celular, corresponde a la fase de crecimiento exponencial y se estimó a partir de la pendiente de la recta de regresión del gráfico de concentración de células viables (expresada en escala logarítmica) en función del tiempo de cultivo. El

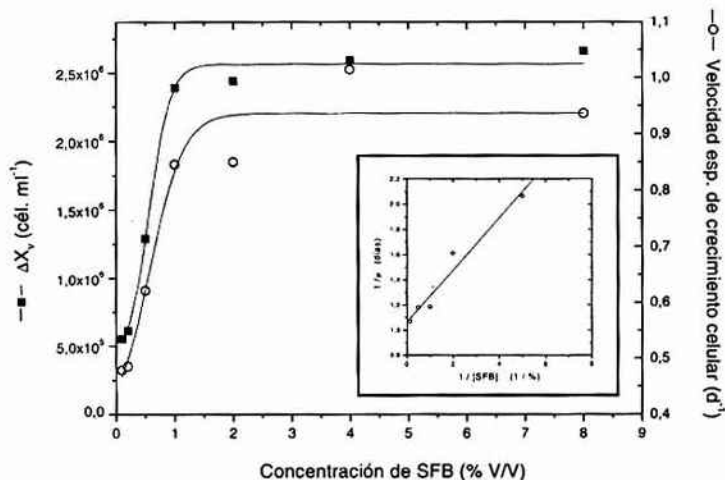
parámetro  $\mu$  se relaciona con el tiempo de duplicación celular ( $t_d$ ) según la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Como se observa en la Fig. 4, la relación existente es directamente proporcional. Para concentraciones de SFB superiores al 1% (V/V), ambos parámetros se mantuvieron constantes y no se evidenciaron efectos inhibitorios sobre el medio de cultivo. Estos resultados indicarían que el SFB se comporta como un nutriente limitante de tipo estequiométrico y cinético. La limitación se evidencia cuando se emplean concentraciones de suero inferiores a aquélla a la que previamente el clon había sido adaptado para su crecimiento. Un fenómeno similar de limitación cinética fue observado por Moreira et al. (17) para el cultivo de células

BHK-21 recombinantes. En ese caso, las células habían sido adaptadas al crecimiento en medios suplementados con 5% (V/V) de SFB, coincidiendo que la velocidad específica de crecimiento celular también fuera máxima a partir de ese valor de concentración de suero. Estos resultados sugieren que podría tratarse de un fenómeno común de adaptación a una determinada concentración de un sustrato (SFB). Este fenómeno podría explicarse a través del modelo de *receptor constitutivo*, que se fundamenta en un *principio de economía celular*. En esta hipótesis, en cada célula se encontraría presente una determinada concentración de un "receptor específico" para un posible factor de crecimiento presente en el suero. El complejo efector/receptor vehicularía un mensaje que intervendría en el proceso mitótico.

Figura 4: Cultivos *batch* en suspensión en 7 frascos *spinner* con medio suplementado con diferentes concentraciones de SFB.



La dependencia del parámetro  $\mu$  con la concentración de SFB se correlaciona con el modelo descrito por Monod (18). Este modelo, desarrollado en 1949 para cultivos microbianos que crecen con sustrato limitante, es análogo a aquél establecido por Michaelis y Menten y Briggs-Haldane para cinética enzimática y puede representarse mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_{SFB}}{k_s + C_{SFB}} \quad (3)$$

donde  $\mu_{m\acute{a}x}$  representa la máxima velocidad específica de crecimiento capaz de alcanzar el cultivo,  $C_{SFB}$  corresponde a la concentración del sustrato limitante y  $k_s$ , una constante característica de cada tipo celular y de las condiciones experimentales.

De la recta de regresión lineal obtenida a partir del gráfico de las dobles inversas realizado con las velocidades específicas de crecimiento celular de cada cultivo y sus respectivas concentraciones de SFB (Fig. 4, gráfico insertado), se obtuvieron los valores de  $\mu_{m\acute{a}x} = 0,94 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$  y de  $k_s = 0,20 \pm 0,02 \text{ \% (V/V)}$  ( $n = 5$ ). Para las células BHK-21 recombinantes productoras de fosfatasa alcalina cultivadas en medio con SFB al 5% (V/V), Moreira et al. (17) informaron un valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  de  $0,91 \text{ días}^{-1}$ . Valores similares de este parámetro fueron también obtenidos en cultivos de hibridomas a diferentes concentraciones de SFB (19, 20, 21).

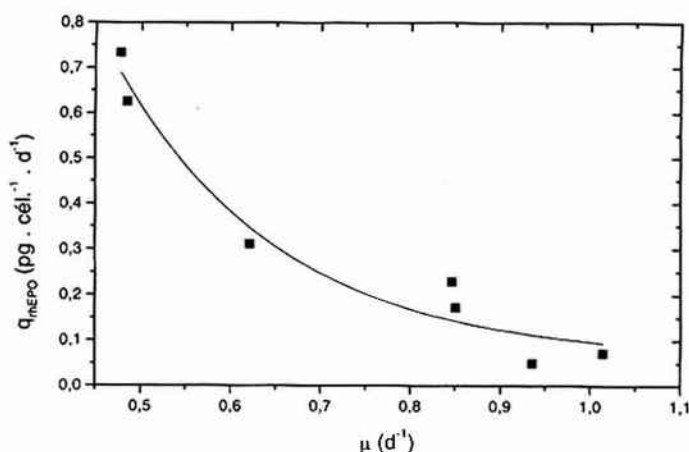
El conocimiento de la magnitud en que la concentración de SFB afecta la velocidad específica de crecimiento celular permite adecuar su concentra-

ción a los rendimientos celulares necesarios en el proceso de producción.

Como se observa en la Fig. 5, existe una relación inversa entre la velocidad específica de producción de rhEPO y la de crecimiento celular. Los valores máximos de  $q_{rhEPO}$  obtenidos en cada cultivo para el día 5, se corresponden con las fases estacionaria o de muerte celular, dependiendo de la concentración inicial de SFB en cada cultivo (datos no mostrados). Resultados análogos fueron informados para el cultivo de células recombinantes CHO-K1 productoras de insulina (22) y para el cultivo de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (19, 23, 24, 25, 26, 27, 28). Contrariamente, Hayter et al. (29) encontraron una relación directamente proporcional entre la velocidad específica celular de producción de interferón- $\gamma$  y la velocidad específica de crecimiento de células CHO-K1 recombinantes. Sin embargo, los autores no pudieron precisar esta asociación ya que a bajas tasas de dilución, la limitación de nutrientes o la acumulación de productos metabólicos pudieron ser los factores causantes de las menores productividades descriptas. En consecuencia, los resultados mostrados en la Fig. 5 no contradicen el modelo descrito por Suzuki y Ollis (28), quienes suponen que la productividad específica está bajo el control del ciclo celular, concluyendo que las células dejan de producir muchas proteínas durante la mitosis. A su vez, la duración del ciclo celular está determinada fundamentalmente por la duración de la fase  $G_1$ , ya que las fases S,  $G_2$  y M tienen duraciones relativamente constantes (30). De esta manera, células con  $\mu$  más pequeños utilizan proporcionalmente menos tiempo en la mitosis que aquéllas con mayores velocidades específicas de crecimiento y, por lo tanto, presentan mayores niveles de producción.



**Figura 5:** Relación inversa entre la velocidad específica celular de producción de rEPO ( $q_{rEPO}$ ) y la velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ) en cultivos en suspensión en frascos *spinner*.



#### Cultivo en biorreactor en escala piloto

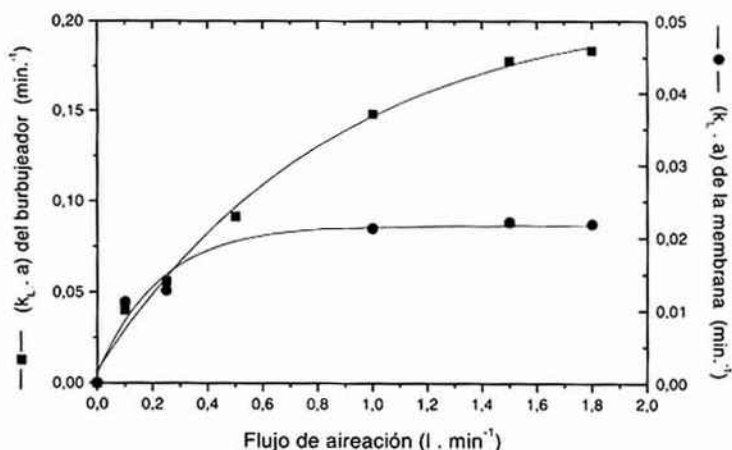
En la Fig. 6 se muestra la dependencia del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L \cdot a$ ) para cada sistema de aireación con los flujos de aireación. El parámetro  $k_L \cdot a$  se determinó empleando el método dinámico (31), a partir de la pendiente de la recta que resulta de graficar el  $\ln [(C^* - C_t) / (C^* - C_0)]$  en función del tiempo ( $t$ ), donde  $C^*$  corresponde a la concentración de saturación de oxígeno en el medio;  $C_t$  a la concentración de oxígeno en el tiempo  $t$  y  $C_0$  a la concentración inicial de oxígeno.

Para el máximo flujo de aireación ensayado ( $1,8 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ ), la capacidad de transferencia de oxígeno desde los burbujeadores es 8,4 veces mayor que la correspondiente a la membrana de polipropileno. Esta diferencia incide en igual proporción en el rendimiento celular. En efecto, se puede estimar la máxima concentración celular ( $X^{m\acute{a}x}$ ) que permite cada sistema de aireación, considerando al oxígeno como único sustrato limitante, mediante la siguiente ecuación:

$$X^{m\acute{a}x} = \frac{(k_L \cdot a)^{m\acute{a}x} \cdot (C^* - C)}{q_{O_2}} \quad (4)$$

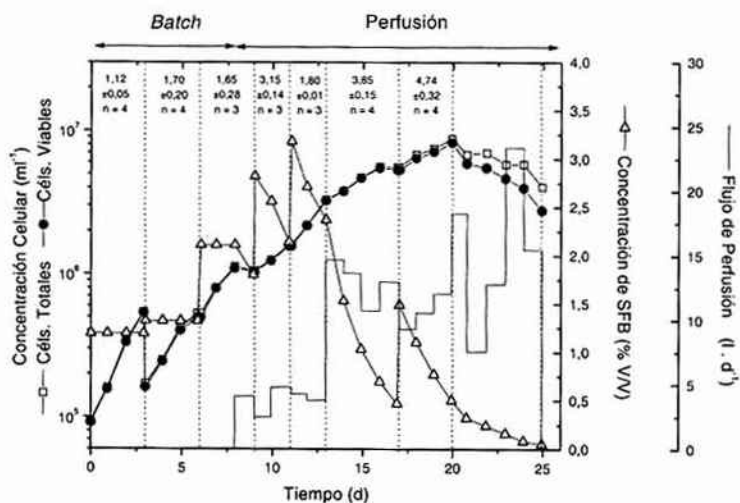
donde  $(k_L \cdot a)^{m\acute{a}x}$  corresponde al coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a un flujo de aireación de  $1,8 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $C^*$  corresponde a la concentración de saturación de oxígeno en el cultivo ( $6,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ );  $C$ , a la concentración de oxígeno prefijada durante el cultivo (ver Tabla 1) y  $q_{O_2}$ , a la velocidad específica celular de consumo de oxígeno. Este último parámetro depende de cada clon celular y de las condiciones del cultivo. El valor medio de  $q_{O_2}$  determinado experimentalmente fue  $2,88 \text{ pg} \cdot \text{cél.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (ver más adelante en la Fig. 9). De acuerdo con la ecuación (4), la máxima concentración celular posible cuando se emplea el sistema de burbujeadores es de  $7,8 \cdot 10^7 \text{ cél.} \cdot \text{ml}^{-1}$ , mientras que para el sistema de membrana hidrofóbica es de  $9,3 \cdot 10^6 \text{ cél.} \cdot \text{ml}^{-1}$ . En consecuencia, se eligió como sistema de aireación el ingreso de aire u oxígeno a través de los burbujeadores.

**Figura 6:** Dependencia del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L \cdot a$ ) con el flujo de aireación para cada sistema de aireación del biorreactor.



En la Fig. 7 se observan los resultados correspondientes al cultivo del clon productor en el biorreactor durante 25 días, con diferentes modos de operación: *batch* repetido y perfusión.

**Figura 7:** Cultivo del clon productor en el biorreactor: evaluación de la relación entre el contenido de SFB en el medio y la velocidad de perfusión.



Para cada intervalo indicado por las líneas de puntos verticales, se estimó el tiempo de duplicación celular ( $t_d$ ) y su desviación estándar [s.d. ( $t_d$ )] para el correspondiente número de datos ( $n$ ), indicándose los mismos en la parte superior de la figura. En cada muestra se estimó la concentración de SFB ( $C_{SFB}$ ) a partir de la concentración previamente agregada de SFB ( $C_{SFB}^0$ ) y la tasa de dilución ( $D$ ), suponiendo que el mismo no se consume durante el cultivo, según la siguiente ecuación:

$$C_{SFB} = C_{SFB}^0 \cdot e^{-D \cdot \Delta t} \quad (5)$$

donde  $D$  es la tasa de dilución del cultivo y corresponde al cociente entre el flujo de perfusión y el volumen de cultivo. A tiempo cero se inició el cultivo con un volumen de 10 l de suspensión celular con  $9,1 \cdot 10^4$  cél.  $\cdot$  ml $^{-1}$ , en medio suplementado con SFB 1,2%. A los 3 días se agregaron 13,5 l de medio de cultivo para completar el máximo volumen de trabajo del biorreactor. La perfusión se inició el día 8 con medio de cultivo sin SFB hasta el día 25, manteniéndose el volumen del cultivo en 23,5 l. A los 3, 6, 9, 11 y 17 días se suplementó el cultivo con cantidad suficiente de SFB hasta alcanzar las concentraciones finales indicadas.

Mediante el cultivo en *batch* la máxima densidad celular alcanzada fue de  $1,1 \cdot 10^6$  cél.  $\cdot$  ml $^{-1}$ , siendo el tiempo de duplicación promedio de  $1,49 \pm 0,32$  (n = 3).

Mediante la combinación adecuada de perfusión y el agregado de SFB se alcanzó una densidad máxima de  $8,2 \cdot 10^5$  cél.  $\cdot$  ml $^{-1}$ . En cada caso, e

independientemente de la velocidad de perfusión, el agregado de SFB estimuló inicialmente la proliferación celular. Para densidades superiores a  $3 \cdot 10^6$  cél.  $\cdot$  ml $^{-1}$ , elevadas velocidades de perfusión mantienen el crecimiento celular, aunque la concentración de SFB baje significativamente. Sin embargo, cuando la concentración de SFB es menor a 0,5% se detiene el crecimiento celular. En este caso, únicamente se revierte con la suplementación de suero, como se observa en la fase final del cultivo, en que la concentración celular disminuye aún perfundiendo un volumen de biorreactor por día. Cabe destacar, además, que la máxima densidad celular alcanzada en el biorreactor es aproximadamente 10 veces menor que la estimada mediante la ecuación (4), indicando que en las condiciones del ensayo, el oxígeno no fue limitante, y algún otro componente del medio debió comportarse como nutriente limitante o que la acumulación de algún metabolito limitó el crecimiento.

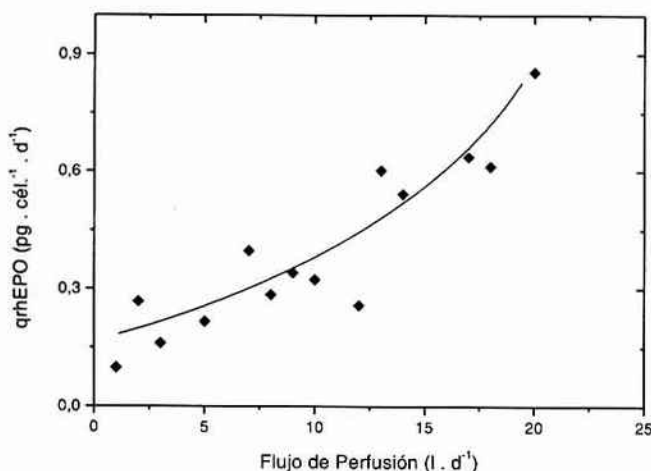
Con respecto a la producción de la proteína recombinante, en la Fig. 8 se muestra la relación entre  $q_{rhEPO}$  y el flujo de perfusión del cultivo.

El cálculo de  $q_{rhEPO}$  durante la perfusión del cultivo, se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$q_{rhEPO} = \frac{D [(C_0 - C_1) \cdot e^{-D \cdot \Delta t} - (C_0 - C_2)]}{(e^{-D \cdot \Delta t} - 1) \cdot \sqrt{X_1 \cdot X_2}} \quad (6)$$

donde  $D$  es la tasa de dilución,  $C_1$  y  $C_2$  representan las concentraciones de rhEPO en el intervalo de tiempo considerado ( $\Delta t$ ) y  $C_0$  la concentración de la misma en el medio de alimentación (en estos cultivos  $C_0 = 0$ ).

**Figura 8:** Relación entre la velocidad específica de producción de rhEPO ( $q_{rhEPO}$ ) y el flujo de perfusión del cultivo en el biorreactor de escala piloto.



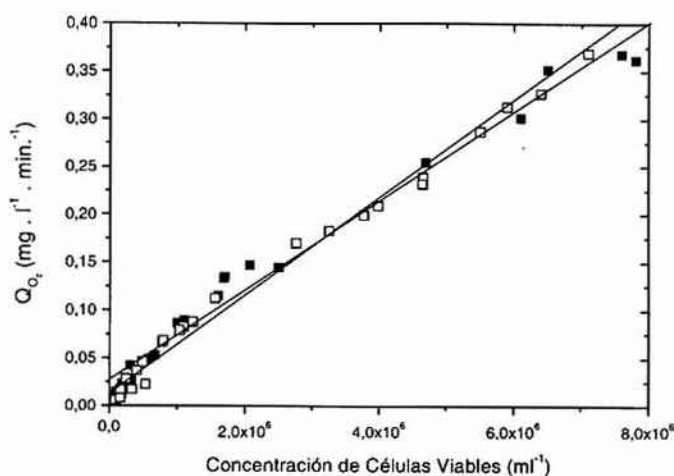
Se observa que al aumentar el flujo de perfusión se incrementa en forma exponencial la productividad de rhEPO. Para la mayor perfusión ensayada, la  $q_{rhEPO}$  resultó de  $0,85 \text{ pg} \cdot \text{cél.}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Teniendo en cuenta que la densidad celular es de  $8,2 \cdot 10^6 \text{ cél.} \cdot \text{ml}^{-1}$  y el volumen de trabajo del biorreactor es de  $23,5 \text{ l}$ , resulta una producción de  $164 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ . Con respecto a los indicadores del metabolismo celular, aplicando la ecuación (6) se estimaron las siguientes velocidades específicas celulares: de consumo de glucosa,  $1,9 \pm 0,8 \text{ pmol} \cdot \text{cél.}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  ( $n = 13$ ); de producción de lactato,  $2,0 \pm 0,6 \text{ pmol} \cdot \text{cél.}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  ( $n = 15$ ) y de producción de amonio,  $1,1 \pm 0,7 \text{ pmol} \cdot \text{cél.}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  ( $n = 17$ ). El conocimiento de estos parámetros, permitió adecuar la velocidad de perfusión del cultivo, con el fin de evitar que nutrientes como la glucosa se tornen limitantes (32) o que la acumulación de productos metabólicos como el lactato y el amonio alcancen niveles inhibitorios (33, 34).

El incremento de la productividad con el aumento del flujo de perfusión fue un fenómeno ya ob-

servado por Ray et al. (35) en cultivos de células CHO-K1 recombinantes productoras de una proteasa trombolítica y de hibridomas. Análogamente, Leelavatharamas et al. (36) encontraron un aumento en la velocidad específica celular de producción de interferón- $\gamma$  recombinante con el incremento del flujo de perfusión del cultivo de células CHO-K1 productoras. Como en el caso del clon celular empleado en este trabajo, también estas células CHO-K1 poseían una producción específica no asociada al crecimiento celular. Por otra parte, resultados experimentales obtenidos por Miller et al. (37) y Ramírez y Mutharasan (27) en cultivos de hibridomas, demostraron una relación inversa entre la tasa de dilución de los cultivos y la velocidad específica celular de producción de anticuerpos monoclonales. Este fenómeno se manifestó a pesar de que las correspondientes producciones específicas no se encontraban asociadas al crecimiento celular.

En la Fig. 9 se grafica la velocidad de consumo de oxígeno ( $Q_{O_2}$ ) en función de la concentración celular para dos cultivos independientes.

**Figura 9:** Relación entre la concentración celular y la velocidad de consumo de oxígeno ( $Q_{O_2}$ ) en el cultivo del biorreactor. Los símbolos rellenos corresponden a datos del cultivo mostrado en la Fig. 7 y los símbolos vacíos a otra experiencia análoga.



Como se observa en la figura, el consumo de oxígeno se incrementó en forma lineal con el aumento de la concentración celular. La pendiente de regresión lineal brinda el valor de la velocidad específica celular de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ), siendo  $2,82 \pm 0,09 \text{ pg} \cdot \text{cél.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $n = 25$ ) y  $2,94 \pm 0,06 \text{ pg} \cdot \text{cél.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $n = 26$ ), respectivamente.

Este resultado indica, además de la reproducibilidad de los valores, que la velocidad específica celular de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ) se mantuvo constante durante los cultivos. Una relación lineal entre la velocidad del consumo de oxígeno y la densidad celular fue observada por Graf y Schügerl (38) y por Yamada et al. (39) para diferentes líneas celulares. Los valores de la velocidad específica celular de consumo de oxígeno se corresponden con los informados por otros autores (33, 40).

De acuerdo con los resultados alcanzados, se eligió como estrategia de operación del biorreactor la perfusión de medio de cultivo suplementado con SFB en concentración mayor que 0,5% (V/V) para evitar la muerte celular, ajustándose la velocidad de recambio de medio de acuerdo con la densidad celular -estimada también por el consumo de oxígeno- hasta alcanzar el valor de un volumen de biorreactor por día.

## Conclusiones

La evaluación de los cultivos adherentes permitió establecer que la fase de producción del clon analizado no está asociada al crecimiento celular y que la productividad de los cultivos durante la fase estacionaria, con recambios periódicos de medio, se mantiene constante. Esta estrategia de producción puede aplicarse para el escalamiento mediante el uso de sistemas múltiples tipo multi-tray.

Por otro lado, la adaptación de las células al crecimiento en suspensión permitió aplicar una tecnología de cultivo más ventajosa en el escalamiento y en la operación del proceso de producción, como lo representa el cultivo en el biorreactor de agitación. En este sistema, la implementación del cultivo continuo con perfusión permitió alcanzar elevadas densidades celulares.

La cuantificación del efecto de la concentración del SFB sobre la velocidad específica de crecimiento celular, a través de un modelo cinético particular, posibilitó el empleo racional de este suplemento, ya que se puede acelerar la fase de crecimiento con concentraciones adecuadas de SFB y regular la viabilidad del cultivo en la fase estacionaria y de producción. Análogamente al cultivo adherente, se comprobó que el clon adaptado a la suspensión también presenta una relación inversa entre

la productividad específica de rhEPO y la velocidad específica de crecimiento. Como consecuencia, en las condiciones en las cuales el cultivo se encontró en la fase estacionaria, se observó un aumento de la producción de rhEPO. Además, se observó una proporcionalidad directa entre la productividad de rhEPO y el caudal de perfusión.

La medición de la velocidad de consumo de oxígeno es un método útil para el monitoreo indirecto de los cultivos. Su interés particular radica en su aplicación en procesos que emplean sistemas en los que el recuento celular directo no es factible, como p. ej. el cultivo de células en *microcarriers* porosos.

Finalmente, el conocimiento de las velocidades específicas de consumo de nutrientes, como glucosa y glutamina, y de producción de metabolitos como amonio y lactato, permite ajustar el flujo de perfusión, manteniendo una concentración óptima de nutrientes y con reducidos niveles de productos metabólicos tóxicos.

## Bibliografía

- 1- Tilbrook, P. y Klinken, P. (1999) The erythropoietin receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **31**: 1001-1005.
- 2- Spivak, J. (1998) "Eritropoyetina humana recombinante" Masson (Barcelona). 39-66.
- 3- Merten, O. (1988) Batch production and growth kinetics of hybridomas. *Cytotechnology* **1**: 113-121.
- 4- Blasey, H. y Winzer, U. (1989) Low protein serum-free medium for antibody-production in stirred bioreactors. *Biotechnology Letters* **11**: 455-460.
- 5- Alvarez, M., Corley, E., Pesce, A., Zorzópulos, J. y Seigelchifer, M. (1995) "Expresión de eritropoyetina humana en células eucariontes". Jornadas Iberoamericanas Bioprocesos '95 (Santa Fe, Argentina).
- 6- Freshney, R. (1994) "Culture of animal cells. A manual of basic technique" Wiley-Liss, Inc. (New York). 369-404.
- 7- Manford, K. (1979) Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods in Enzymology* **58**: 141-152.
- 8- Cook, J. y Mitchell, J. (1989) Viability measurements in mammalian systems. *Analytical Biochemistry* **179**: 1-7.
- 9- Chattopadhyay, D., Garcia!Briones, M., Venkat, R., Chalmers, J. (1997) "Mammalian cell biotechnology in protein production" Walter de Gruyter & Co. (Berlín). 319-343.
- 10- Beccaria, A., Etcheverrigaray, M. y Kratje, R. (1995) Optimización de las condiciones de cultivo de células BHK-21 recombinantes para la producción de eritropoyetina humana. III Jornadas de Investigación del Grupo Montevideo (Salto, Uruguay-Concordia, Argentina).
- 11- Ackermann, M., Marx, U. y Jäger, V. (1995) Influence of Cell -and media- derived factors on the integrity of a human monoclonal antibody after secretion into serum!free cell culture supernatant. *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 97-106.
- 12- Gawlitzek, M., Villers, A., Verbert, A., Wagner, R. y Conradt, H. (1994) "Animal Cell Technology: Products of today, prospects for tomorrow". Butterworth!Heinemann Ltd. (Oxford). 649-651.
- 13- Gomez, D., Lindsay, C., Cottam, D., Nason, A. y Thorgeirsson, U. (1994) Expression and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in a Baculovirus-insect cell system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **203**: 237-243.
- 14- Pereira Bacci, D., Perotti, N., Etcheverrigaray, M., Kratje, R. (1999) Evaluation of rhEPO production in Nunc™ Cell Factories. *Advances in Modern Biotechnology* **5**: 41.
- 15- Kratje, R. y Wagner, R. (1992) Evaluation of production of recombinant human interleukin-2 in fluidized bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 233-242.
- 16- Perry, S. y Wang, D. (1989) Fiber bed reactor design for animal cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 1-9.
- 17- Moreira, J., Alves, P., Feliciano, A., Aunins, J. y Carrondo, M. (1995) Serum free and serum containing media for growth of suspended BHK aggregates in stirred vessels. *Enzyme and Microbial Technology* **17**: 437-444.
- 18- Aiba, S., Humphrey, A. y Millis, N. (1973) "Biochemical Engineering". Academic Press (New York). 92-127.
- 19- Dallili, M. y Ollis, D. (1989) Transient kinetics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in serum-limited cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 984-990.
- 20- Ozturk, S. y Palsson, B. (1991) Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 35-46.
- 21- Ramirez, O., Sureshkumar, G. y Mutharasan, R. (1990) Bovine colostrum or milk as serum substitute for the cultivation of a mouse hybridoma. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 882-889.
- 22- Lao, M., Toth, D., Danell, G. y Schalla, C. (1996) Degradative activities in a recombinant chinese hamster ovary cell culture. *Cytotechnology*, **22**: 43-52.
- 23- Birch, J., Thompson, P., Lambert, K. y Boraston, R. (1985) "Large scale mammalian cell culture" Accademic Press (Oxford). 1-18.
- 24- Glassy, M., Tharakan, J. y Chau, P. (1988) Serum!free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 1015-1028.
- 25- Mercille, S., Johnson, M., Lemieux, R. y Massie, B. (1994) Filtration-based perfusion of hybridoma cultures in protein-free

- medium: reduction of membrane fouling by medium supplementation with Dnase I. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 833-846.
- 26-** Miller, W., Blanch, H. y Wilke, C. (1988) A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 947-965.
- 27-** Ramirez, O. y Mutharasan, R. (1990) Cell cycle -and growth phase- dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 839-848.
- 28-** Suzuki, E. y Ollis, D. (1989) Cell cycle model for antibody production kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 1398-1402.
- 29-** Hayter, P., Curling, E., Gould, M., Baines, A., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P. y Bull, A. (1993) The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon- $\gamma$  production in glucose-limited chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1077-1085.
- 30-** De Robertis, E. y De Robertis, E. (h) (1982) "Biología Celular y Molecular" El Ateneo (Buenos Aires) 343-360.
- 31-** Stanbury, P. y Whitaker, A. (1984) Principles of fermentation technology. Pergamon Press (Oxford). 169-191.
- 32-** Konstantinov, K., Tsai, Y., Moles, D. y Matanguihan, R. (1996) Control of long-term perfusion chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat. *Biotechnol. Prog.* **12**: 100-109.
- 33-** Wagner, R. (1997) "Mammalian cell biotechnology in protein production" Walter de Gruyter (Berlin). 193-232.
- 34-** Schneider, M., Marison, I. y Stockar, U. (1996) The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.* **46**: 161-185.
- 35-** Ray, N., Tung, A., Runstadler, P. y Vournakis, J. (1991) "Production of biologicals from animal cells in culture" Butterworth-Heinemann Ltd. (Oxford). 502-512.
- 36-** Leelavatcharamas, V., Emery, A. y Al-Rubeai M. (1999) Use of cell cycle analysis to characterise growth and interferon- $\gamma$  production in perfusion culture of CHO cells. *Cytotechnology* **30**: 59-69.
- 37-** Miller, W., Wilke, C. y Blanch, H. (1988) Transient response of hybridoma cell to lactate and ammonia plus and step changes in continuous culture. *Bioprocess Eng.* **3**: 113-122.
- 38-** Graf, H. y Schügerl, K. (1991) Some aspects of hybridoma cell cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 165-175.
- 39-** Yamada, K., Furushou, S., Sugahara, T., Shirahata, S. y Murakami, H. (1990) Relationships between oxygen consumption rate and cellular activity of mammalian cells cultured in serum-free media. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 759-762.
- 40-** Lavery, M. y Nienow, A. (1987) Oxygen transfer in animal cell culture medium. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 368-373.