



ADAPTACIÓN DEL HIBRIDOMA PRODUCTOR DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL anti-rhEPO A MEDIO LIBRE DE SUERO PARA SU PRODUCCIÓN *IN VITRO* A MAYOR ESCALA

Valentina Wandel-Petersen

Centro Biotecnológico del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Directora: Bürgi Fissolo, Ma. De los Milagros

Codirector: Oggero, Marcos Rafael

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Hibridoma, mAb, Medio libre de suero.

INTRODUCCIÓN

En nuestro laboratorio se desarrolla un proyecto consistente en la modificación de la molécula de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO), con el fin de mejorar sus propiedades como bioterapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El proceso de producción, purificación y análisis de las moléculas modificadas requiere el empleo de un anticuerpo monoclonal anti-rhEPO (mAb 2B2) para su aplicación en distintos procedimientos: cromatografía de inmunoafinidad, *western blot* y ELISA, para determinaciones cuali- y cuantitativas, respectivamente. Hasta el momento, dicho mAb, también desarrollado en nuestro laboratorio (Amadeo *et al.*, 2004), era producido *in vivo* en líquido ascítico, mediante el empleo de animales de experimentación, constituyendo la forma más rápida de obtener cantidades suficientes de anticuerpos para afrontar los estudios antes mencionados. Sin embargo, debido a las preocupaciones éticas, científicas y de seguridad inherentes al uso de animales hemos asumido, hace tiempo, el compromiso de disminuir el desarrollo de actividades relacionadas con los mismos. Por ello, decidimos para este proyecto, proveernos de mAbs de manera continua y en grandes cantidades prescindiendo del uso de animales y sus derivados. En tal sentido, se procedió a la adaptación del cultivo *in vitro* del hibridoma 2B2 a un medio libre del empleo de suero fetal bovino (SFB) para su producción a mayor escala.

OBJETIVOS

- Adaptación del hibridoma 2B2 al crecimiento en suspensión en medio de cultivo libre de SFB.
- Evaluación de los parámetros inherentes al cultivo celular.
- Monitorear la calidad del anticuerpo desde el punto de vista funcional.

Título del proyecto: "Glicoingeniería de eritropoyetina humana: generación de muteínas con superior actividad neuroprotectora y reducida acción eritropoyética"

Instrumento: CAID

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director/a: Bürgi Fissolo, María de los Milagros

METODOLOGÍA

El proceso de adaptación consistió en la reducción gradual de la concentración de SFB (Gibco, E.E.U.U.) en el medio de cultivo de los hibridomas DMEM (Gibco, EEUU), desde una condición inicial al 20% (V/V), hasta alcanzar una concentración de 1,25% (V/V) (Ozturk *et al.*, 1991). Una vez adaptados a esta última condición, se evaluaron dos protocolos de adaptación a un medio libre de SFB empleando una mezcla de medios comerciales (Merck, EEUU) suplementado con lípidos (Gibco, E.E.U.U.) (necesarios dada la condición auxótrofa de los hibridomas para los lípidos). El primero de ellos, correspondió a un protocolo de adaptación directa, consistente en el recambio completo del medio de cultivo conteniendo SFB por medio libre de suero. El otro protocolo, se correspondió con una adaptación secuencial, donde el recambio del medio se hizo de manera gradual, respetando las proporciones 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 de los siguientes reactivos: SFB 1,25% (V/V):medio libre de SFB.

El proceso de adaptación de los hibridomas fue monitoreado diariamente, cuantificando la densidad celular, la viabilidad y la producción acumulada de mAb-2B2, útiles para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) y muerte (ν_m), y la productividad (ρ) alcanzada en cada etapa de adaptación (Correa *et al.*, 2015). Además, se determinó la afinidad aparente del anticuerpo producido por los hibridomas en cada condición.

RESULTADOS

En todas las condiciones evaluadas se observó una fase de adaptación al nuevo medio de cultivo (fase *lag*) de aproximadamente 24 h. Los hibridomas adaptados a las condiciones de SFB 20% (V/V), 10% (V/V) y de medio libre de suero, presentaron una fase exponencial más breve, alcanzando el máximo de densidad celular a las 72 h de iniciado el cultivo. Las restantes condiciones alcanzaron su máximo celular a las 96 h de iniciado el cultivo. La viabilidad celular evidenció un comportamiento similar para todas las condiciones ensayadas. El análisis de la producción acumulada de mAb 2B2 permitió distinguir tres grupos: uno compuesto por las condiciones con mayor concentración de SFB (20%, 10% y 5%) y los hibridomas adaptados directamente al medio libre de SFB, los cuales alcanzaron una producción acumulada de aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$; un segundo grupo compuesto por los hibridomas adaptados a condiciones de cultivo con bajas concentraciones de SFB (2,5% y 1,25%), los cuales alcanzaron una producción acumulada menor (15-20 $\mu\text{g/mL}$); y el tercer grupo contempla al proceso de adaptación secuencial, el que por motivos que se desconocen, mostró una notable disminución en la producción de mAb 2B2 (menor de 5 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 1).

El procedimiento de adaptación, en general, condujo a una disminución en la velocidad de crecimiento de los hibridomas, lo que se tradujo en tiempos de duplicación que oscilaron entre 15 y 12 h para el cultivo en presencia de SFB 20% (V/V) y el de adaptación directa al crecimiento en medio libre de SFB, respectivamente. Del mismo modo, se observó un incremento en la velocidad de muerte en aquellos cultivos en presencia de bajas concentraciones de SFB, indicando que el mismo es un reactivo limitante para el sostenimiento de la viabilidad del cultivo. Contrariamente, la adaptación gradual ocasionó un descenso importante de dicha velocidad, o la llevó a un valor intermedio para el cultivo adaptado en forma directa al crecimiento en ausencia de SFB, indicando que el cambio de suero por dicho reactivo fue capaz de sostener la viabilidad del cultivo luego de alcanzar la fase de muerte del mismo. Asimismo, se visualizó una mayor productividad para el cultivo sometido a crecimiento con SFB 20% (V/V), la cual descendió en un 34% para el cultivo adaptado en forma directa al medio libre de SFB, en contraposición con un descenso del 97% para la adaptación gradual. Este último perdió la capacidad de expresar el mAb probablemente por un proceso de selección clonal durante su adaptación. Finalmente, no se observaron diferencias en las constantes de afinidad aparente de los mAbs provenientes de las distintas condiciones del cultivo, aunque no fue posible determinar la correspondiente al cultivo

adaptado en forma gradual, dadas las insignificantes concentraciones de mAb alcanzadas (Tabla 1).

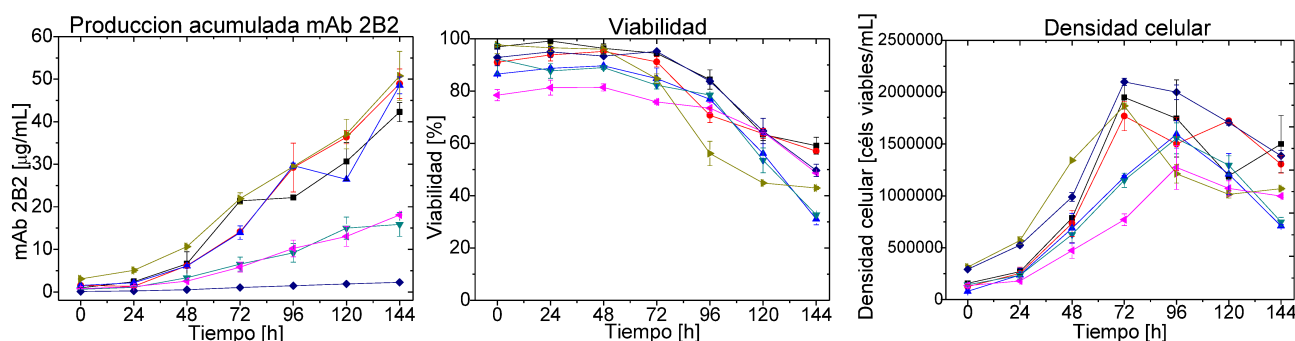


Figura 1. Cultivo del hibridoma 2B2 adaptado a las siguientes condiciones: Medio de cultivo conteniendo SFB: MC-SFB 20% (V/V) (—■—), MC-SFB 10% (V/V) (—●—), MC-SFB 5% (V/V) (—▲—), MC-SFB 2,5% (V/V) (—▼—), MC-SFB 1,25% (V/V) (—◆—), MC libre de SFB – Adaptación directa (—▶—), MC libre de SFB – Adaptación secuencial (—◆—).

Tabla 1. Parámetros específicos calculados durante el cultivo del hibridoma 2B2 en las distintas condiciones de adaptación junto con la afinidad aparente del anticuerpo producido.

Condición de cultivo del hibridoma 2B2	Velocidad específica de crecimiento (μ) [día ⁻¹]	Velocidad específica de muerte (ν_m) [día ⁻¹]	Productividad (ρ) [pg cel ⁻¹ día ⁻¹]	Afinidad aparente [M ⁻¹]
MC-SFB 20% (V/V)	1,44 ± 0,09	0,10 ± 0,01	12,12 ± 3,22	1,0×10 ⁹
MC-SFB 10% (V/V)	1,42 ± 0,16	0,14 ± 0,02	6,84 ± 0,85	9,8×10 ⁸
MC-SFB 5% (V/V)	1,20 ± 0,13	0,24 ± 0,11	9,12 ± 2,04	1,2×10 ⁸
MC-SFB 2,5% (V/V)	1,37 ± 0,08	0,31 ± 0,01	4,8 ± 2,72	7,1×10 ⁸
MC-SFB 1,25% (V/V)	1,22 ± 0,19	0,48 ± 0,02	6,24 ± 2,38	6,0×10 ⁸
MC libre de SFB – Adaptación directa	1,10 ± 0,05	0,29 ± 0,04	8,04 ± 1,87	5,6×10 ⁸
MC libre de SFB – Adaptación gradual	1,39 ± 0,06	0,05 ± 0,02	0,36 ± 0,17	No se logró determinar

CONCLUSIONES

Los procesos de adaptación de células de mamífero, particularmente el de hibridomas a un medio libre de SFB, muchas veces implican pérdidas en la expresión de la proteína de interés. Sin embargo, en este trabajo, el protocolo de adaptación directa permitió conservar una elevada productividad del mAb ($8,04 \text{ pg cel}^{-1} \text{ día}^{-1}$) con una constante de afinidad aparente adecuada para la preparación de matrices cromatográficas de inmunoafinidad ($5,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$). Al mismo tiempo, dicha adaptación permitió prescindir del uso de animales para la producción del reactivo y la disminución de los costos de producción del mismo al eliminar el SFB del medio de cultivo.

Como perspectiva, se pretende optimizar el medio de cultivo libre de SFB, evaluando las proporciones de sus componentes a través de un diseño de experimento (DOE). El objetivo será reducir los costos del mismo para adaptar el hibridoma a la nueva condición de cultivo y avanzar hacia el escalamiento de la producción del mAb mediante el cultivo del hibridoma en un biorreactor operado en modo perfusión.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

-Amadeo, I., Oggero, M., Zenclussen, M.L., Robles, L., Pereira, D., Kratje, R., Etcheverrigaray, M., 2004. *A single monoclonal antibody as probe to detect the entire set of native and partially unfolded rhEPO glycoforms.* Journal of immunological methods 293: 191-205.

-Correa, A.L., Senna J.M., Braga, A.P., 2015. *Effects of passage number on growth and productivity of hybridoma secreting MRSA anti-PBP2a monoclonal antibodies.* Cytotechnology 68: 419-427.

-Ozturk, S.S., Palsson, B.O., 1990. *Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media.* Biotechnology and Bioengineering 37: 35-46.