



Producción con base en células CHO de una proteína modelo secretada usando el nuevo BIOSTAT® A



Aplicación
Nota

#07

#08

#09

#10

#11

Nicole Imseng*, Christian Löffelholz*,
Regine Eibl*, Dieter Eibl*,
Sönke Rosemann**,
Karl-Heinz Scheibenbogen**

* Universidad de Zúrich de Ciencias
Aplicadas (ZHAW), Waedenswil, Suiza

** Sartorius Stedim Biotech GmbH,
August-Spindler-Str. 11,
37079 Goettingen, Alemania

Introducción

Con BIOSTAT® A, Sartorius ha introducido un nuevo biorreactor de nivel básico para un fácil control del cultivo celular y de la fermentación microbiana. El nuevo diseño compacto y una interfaz de manejo intuitivo permiten que incluso los usuarios sin experiencia logren un rápido progreso. Todas las líneas de gas se controlan automáticamente y de forma continua con un control constante y estricto de pH y DO. Los ajustes manuales de medidores de flujo de gas ya no son necesarios para cumplir con la demanda de DO. La selección de los modos de funcionamiento preconfigurados permite el uso de cualquier uno de los vidrios UniVessel® o el UniVessel® de uso individual. El uso de dispositivos de control móviles modernos y de funcionamiento de varias unidades en paralelo asegura la máxima comodidad y el mejor uso posible de la zona de trabajo. Esta nota de aplicación evalúa un proceso de cultivo de células de mamíferos representativa realizada con un BIOSTAT® A y confirma los parámetros de rendimiento comparables a otros sistemas para bancos de pruebas como BIOSTAT® B.

En este trabajo describimos un protocolo para la producción con base en células CHO del modelo de proteína fosfatasa alcalina secretada (SEAP), con uso de un recipiente de vidrio de 2 litros. El modelo de proteína SEAP se produce por células en suspensión CHO XM 111-10 (Colección de cultivos de Suiza) que crecen y producen en medio de cultivo mínimo definido químicamente.

En la Universidad de Zúrich de Ciencias Aplicadas (ZHAW) se realizan, periódicamente, experimentos de crecimiento celular y producción de proteínas con este modelo de línea celular (establecida originalmente por el grupo del Prof. Dr. Martin Fussenegger, ETHZ). En este contexto, diferentes tipos de biorreactores y escalas ya han demostrado su idoneidad para esta aplicación de cultivo celular. El procedimiento sugerido comprende una fase de crecimiento celular y producción de proteína con cambio de temperatura, que también es el caso típico de los procesos de producción de proteínas industrial.

Era nuestro objetivo lograr resultados similares a los obtenidos previamente en los sistemas BIOSTAT® B en la primera (no optimizada) ejecución. Estamos encaminados a una densidad de células viables de $> 6 \times 10^6$ células y actividad de proteína de > 8 unidades/ml. Además hemos querido demostrar que los valores de $k_L a$ de 10/ pudieron ser localizados en impulsor de velocidades en el extremo por debajo de 1 m/s.

1. Equipos y materiales

- BIOSTAT® A
(Sartorius Stedim Biotech GmbH)
- UniVessel® 2 l, de vidrio, pared única, dos impulsores de segmento de 3 palas (ángulo = 30°) montado a una distancia de 70 mm y micro rociador de porosidad 20 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH)
- Sensor de pH (Endress Et Hauser)
- Sensor de oxígeno (Endress Et Hauser)
- Medios ChoMaster® HP-1/HP-5
(Tecnologías de cultivo celular GmbH)
- Línea celular CHO XM 111-10
(Colección de Cultivos de Suiza, n.º 837)
- Cedex HiRes (Roche Diagnostics)
- Analizador Bioprofile 100 ml
(NovaBiomedical)
- Matracas de agitación de 1.000 ml
(Corning)
- Incubadora de agitación (Infors HT)



2. Programa y métodos

Por lo general, la cultura de mantenimiento de células suspensión CHO XM 111-10 se realiza en frascos T (75 cm²) con uso de medio ChoMaster[®] FMX-8. El inóculo para la producción en biorreactor agitado se prepara primero en (single use) matraces de agitación (1000 ml) con uso de medio ChoMaster[®] HP-1 con el fin de adaptar las células a la agitación.

2.1 Caracterización de Ingeniería

Se estudiaron antes las transferencia SEAP y la mezcla de la producción de oxígeno de BIOSTAT[®] A. Los valores $k_L a$ se determinaron utilizando el método de formación de gases de salida con base en las directrices DECHEMA [1]. Las mediciones se llevaron a cabo en una solución de NaCl 1% con volumen de trabajo máximo de 2 litros y una temperatura de 37 °C. Se investigaron la tasa de aireación de 0,03 vvm y una velocidad punta de entre 0,43 y 0,63 m/s. La concentración de oxígeno disuelto se midió con un sensor de Endress y Hauser (Oxymax COS22D) con un tiempo de respuesta de 15,5 s (Un 63% de la señal según directrices DECHEMA). Todas las investigaciones $k_L a$ se repitieron cinco veces para cada conjunto de condiciones de funcionamiento.

Se determinó el tiempo de mezclado con uso del método de decoloración (según directrices DECHEMA) en el máximo volumen de trabajo de 2 litros y una velocidad punta de entre 0,43 y 0,63 m/s [1]. Todas las investigaciones tiempo de mezclado se repitieron cinco veces para cada conjunto de condiciones de funcionamiento.

2.2 Programa

- Día 1: Establecimiento del cultivo del inóculo (densidad de siembra de $0,5 \times 10^6$ células viables/ml) en matraces de agitación (1000 ml) con suspensión de células CHO XM 111-10 caracterizadas por un crecimiento logarítmico y tiempos de duplicación ≤ 24 horas.
- Día 2: La alimentación del cultivo del inóculo con el medio de crecimiento ChoMaster[®] HP-1 (vea sección 2.4)
- Día 3: Alimentación del cultivo del inóculo con el medio de crecimiento ChoMaster[®] HP-1 (vea sección 2.4). Preparación del recipiente de cultivo UniVessel[®]:
- Calibración de pH y sensores DO
 - Gas de entrada y de salida conectado a filtros de gas de escape
 - Esterilización (121 °C/30 minutos)
 - Esterilidad y sensores de pruebas con adición de 1 litro de medio ChoMaster[®] HP-1 y empezar todos los lazos de control
- Día 4: The BIOSTAT[®] A 2 litros se inoculó con 0,8 litro de suspensión de células ($0,5 \times 10^6$ células viables/ml) con uso del medio de crecimiento ChoMaster HP-1

Día 5 & 6: Muestreo (vea sección 2.6), alimentación sucesiva de medio de crecimiento ChoMaster[®] (primera alimentación con 400 ml ChoMaster HP-1, alimentación posterior con 600 ml de medio de crecimiento ChoMaster HP-5) y aumento de la velocidad del agitador

Día 7: Muestreo e intercambio de soporte posterior (sustitución del medio de crecimiento por medio de producción)

Día 8: Muestreo, cambio de temperatura posterior inferior a 31 °C e incremento de la velocidad del agitador

Día 9-x: Muestreo y cese de la cultura después de que la viabilidad celular se redujo por debajo del 30%

2.3 Medios

Químicamente definido, se utilizó un medio mínimo ChoMaster[®] HP-1 para la producción de inóculo y el inicio del cultivo en el recipiente de vidrio UniVessel[®] conectado a BIOSTAT[®] A. El medio ChoMaster[®] HP-1 fue suplementado con 2,0 g/l de Pluronic F-68 y 2,5 mg/l de tetraciclina. La alimentación se realizó con medio de crecimiento ChoMaster[®] HP-5 (suplementado con Pluronic F-68 y tetraciclina). Las líneas celulares CHO XM 111-10 incluyen el sistema Tet-Off para la expresión controlada de SEAP. La secreción de SEAP fue inducida mediante el cambio de medio a medio de producción tetraciclina libre ChoMaster[®] de HP-5.

2.4 Preparo del inóculo

Matraces de agitación de single use de 1000 ml se usaron para la producción de inóculo. La propagación de células en los matraces de agitación se inicia con una densidad de células viables de $0,5 \times 10^6$ células/ml en 100 ml de suspensión (uso de ChoMaster[®] HP-1). Las células se incuban en una incubadora de agitación a 37 °C con una frecuencia de agitación de 120 rpm, amplitud de 25 mm, humedad relativa del 70% RELH y un nivel de CO₂ del 7,5%. Después de 24 y 48 horas, se agregan 50 ml y 100 ml de ChoMaster[®] HP-1 para proporcionar a las células glucosa y diluir los metabolitos intoxicantes.

Tres horas antes de la inoculación, se agruparon todas las células del inóculo y se añadió la misma cantidad de medio fresco ChoMaster[®] HP-1, sin agitación, para permitir la sedimentación de las células hacia abajo. Después de 3 horas, se retiró el sobrenadante y las células se transfieren al recipiente de vidrio sometido a autoclave.

2.5 Configuración para el cultivo

El sensor de pH se calibró mediante la realización de una calibración de dos puntos con tampón de pH 4,01 y tampón pH 7,00.

Antes de la esterilización en autoclave, el recipiente de vidrio se llenó con 1 litro de PBS y se insertó el pH y sensores DO (ambos Endress y Hauser, Alemania). Después de la esterilización del recipiente a 121 °C durante 30 minutos, el PBS se reemplazó con 1000 ml de medio ChoMaster® HP-1 bajo una campana de cabina de seguridad. Los contenedores de medios de crecimiento y producción ChoMaster® HP-5 (FlexBoy® 3 L, Sartorius Stedim Biotech) se conectaron a través del biorreactor LuerLock. Además, la solución antiespumante (3000 ppm Antiespumante, Sigma Aldrich) se conectó al recipiente de vidrio a través de un conector LuerLock. El recipiente de vidrio se transfirió a la unidad de control, donde se iniciaron y monitorearon para confirmación de las 24 horas de retención estéril y un funcionamiento sin problemas de los sensores antes de comenzar el cultivo experimental en condiciones de temperatura, agitación y pH.

2.6 Muestreo y análisis

Todos los días una muestra de 4 ml se toma mediante la conexión de una jeringa de 10 ml estéril a través de un adaptador de clave. El control, durante el proceso se realizó mediante un contador de células CedexHiRes (densidad de células viables, viabilidad) y Analizador BioPro 100Plus (concentración de metabolitos y sustrato) una vez al día (4 ml). Además, se determinó el valor pH fuera de línea por medidor de pH (Mettler Toledo). Actividad de la SEAP expresado se midió por reacción enzimática a para-nitrofenol fosfato de para-nitrofenol causando un cambio de color del preparado sobrenadante [2].

2.7 Condiciones de cultivo

Vol. inicial de cultivo	0,8 L
Vol. final de cultivo	1,8 L
Vel. de agitación	100 – 220 rpm (incremento escalonado)
DO	30 % controlado por flujo de aire y O ₂
pH	7.2
Temperatura	37 °C (crecimiento) 31 °C (producción de proteína)
Vel. aireación	máx. 0,02 vvm (oxígeno de burbujeo)
Densidad celular inicial	0,5 × 10 ⁶ células viable/ml
Tiempo de cultivo	14 días (3 días fase de crecimiento y 11 días de fase de producción)

3. Resultados

3.1 Caracterización de ingeniería

La Figura 1 representa el tiempo obtenido experimentalmente de mezcla (θ_m) y el coeficiente de transferencia de masa volumétrica (ELK) para el BIOSTAT® A 2 litros, que se representa como una función de la velocidad punta (U_{tip}). La turbulencia aumenta a medida que aumenta la velocidad de punta, por lo tanto, esto conduce directamente a una disminución en el tiempo de mezcla y aumenta el coeficiente de transferencia de masa volumétrica. Aunque se requieren aproximadamente 13 s para lograr la homogeneización al 95% a la velocidad de punta más baja (0,43 m/s), solo se requieren aproximadamente 8 s con la máxima velocidad de punta usada (0,63 m/s). Además, se determinaron un $k_L a$ mínimo de aproximadamente 8,5 1/h (0,43 m/s) y un máximo de 11 1/h (0,63 m/s).

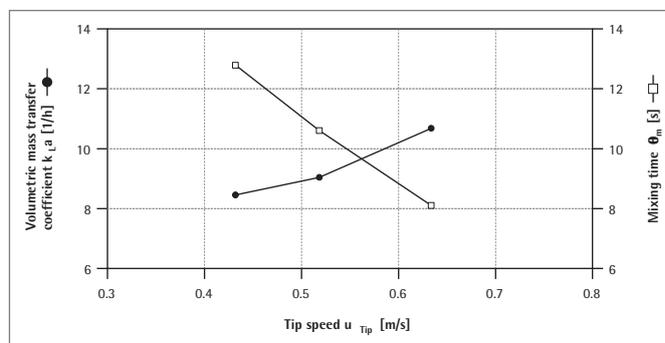


Figura 1: Coeficientes volumétricos de transferencia de masa determinada y tiempos de mezcla en el reutilizable UniVessel® 2L controlado con BIOSTAT® A.

3.2 Células CHO con base en crecimiento y producción SEAP

Se obtuvo un buen crecimiento celular durante la fase de crecimiento y al inicio de la fase de producción. Se inició con una densidad celular inicial de $0,4 \times 10^6$ células/ml, densidad máxima de células viables de $7,09 \times 10^6$ células/ml que se obtuvo ~144 horas después de la inoculación. La tasa media de crecimiento específico durante la fase de crecimiento fue de $0,037 \pm 0,013$ que corresponde a un tiempo de duplicación de $20,4 \pm 6,1$ horas.

La formación del producto se incrementó después de la inducción de la expresión SEAP. La actividad SEAP final y máxima fue de $17,0 \pm 0,13$ U/ml. Los sustratos (glucosa y glutamina) disminuyeron a medida que la densidad de células viables aumentaba. La glucosa se consume por completo después de ~168 horas de cultivo. En contraste, la glutamina se agotó dentro de las 24 horas después de la inoculación, cada alimentación o cambio de medio.

Ambos metabolitos, lactato y amonio, acumulados en forma de glucosa y glutamina fueron consumidos. La acumulación de amonio aumentó después de cambio de medio y alcanzó una concentración máxima de 4,74 mmol/l.

Una regulación baja base CO₂ de pH trabajó excelente (parámetro PID estándar) y el pH nunca excedió el punto de ajuste de pH de 7,2 durante un largo tiempo. Las mediciones de pH en línea y fuera de línea corresponden bien. Los ajustes de recalibración de pH solo tuvieron lugar cuando la diferencia entre las mediciones en línea y fuera de línea eran mayores que 0,1. Durante todo el proceso, el sensor de pH solo fue necesario para volver a calibrar tres veces indicando medición sólida y fiable de la sonda de pH estándar.

El oxígeno disuelto inicialmente se dejó caer durante las primeras 24 horas al 30% debido al crecimiento celular. Después, la DO fluctuó en torno al 30% para el resto de ~264 horas que indican parámetros no optimizados PID. Hacia el final del experimento el DO aumentó, que indica la disminución de la viabilidad celular y respiración celular. La ruptura de DO después de 72 horas fue causada por el desacoplamiento del recipiente de la unidad de control y el flujo laminar bajo de sedimentación (cambio de medio).

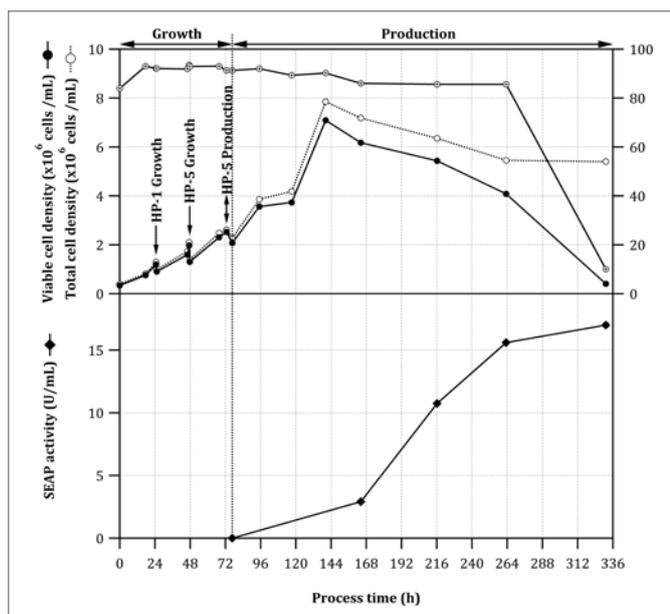


Figura 2: Perfiles de densidad celular viable y totales, viabilidad y actividad SEAP en el UniVessel® 2L reutilizable controlado con BIOSTAT® A.

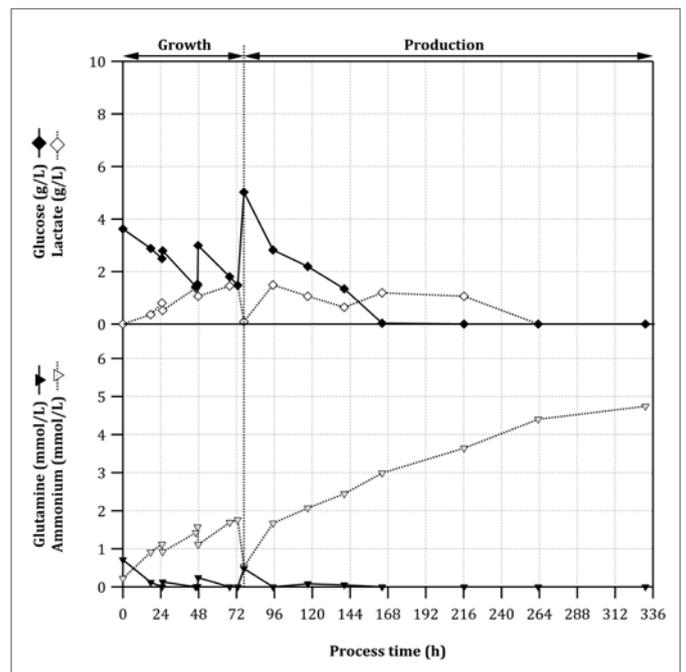


Figura 3: Perfiles de sustratos y metabolitos en el UniVessel® 2L reutilizable controlado con BIOSTAT® A.

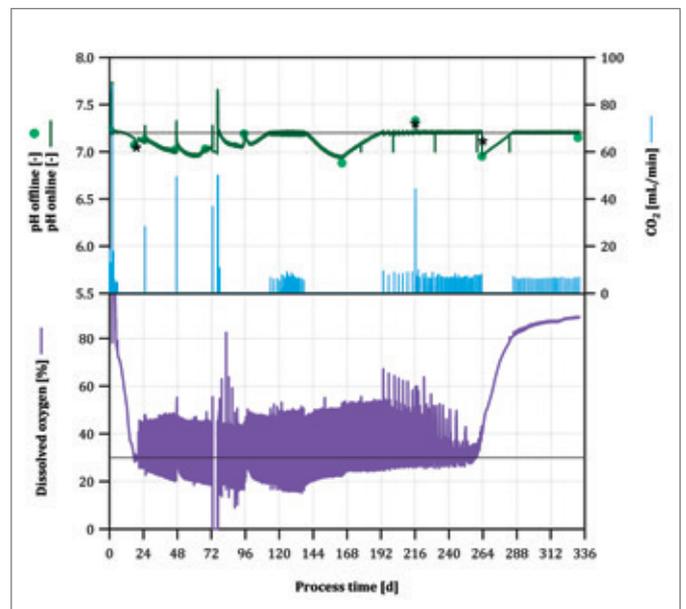


Figura 4: Perfiles de medición de pH en línea y fuera de línea, velocidad de flujo de CO₂ y la medición de oxígeno disuelto en el BIOSTAT® A.
* = recalibración requerida.

4. Conclusión

El BIOSTAT® A es fácil de usar y proporciona una solución autónoma fiable para el control de los cultivos de células de mamíferos. Se pudo demostrar que requiere la transferencia de oxígeno para alcanzar altas densidades celulares ($ELK > 10/h$) se alcanzó ya a 220 rpm (velocidad punta 0,6 m/s). Debido a la corta frecuencia de muestreo de datos de un segundo, el análisis de los valores de DO para la determinación $k_L a$ podría hacerse perfectamente.

En un experimento de cultivo de células con uso de suspensión de células CHO XM 111-10, los datos en términos de viabilidad y densidad de células viables con $7,1 \times 10^6$ células/ml son totalmente comparables con otros sistemas de cultivos. Además, la actividad SEAP obtenida de 17,0 U/ml superó los valores esperados para los recipientes de agitación de vidrio y confirma el excelente desempeño de BIOSTAT® A para los procesos de cultivo de células de mamíferos. Estos resultados también podrían ser verificados en una segunda pasada. Un control estable de la temperatura, pH y DO ya se logró con los parámetros de PID estándar. La optimización de los parámetros de control de OD y pH PID llevará a nuevas mejoras en los procesos.

El protocolo presentado puede servir de modelo para el cultivo y la producción de proteínas que usan otras líneas de células animales tales como insectos o células en suspensión HEK-(Sf-9 o High Five) con uso de BIOSTAT® A.

5. Referencias

- [1] Meusel, W., Löffelholz, C., Husemann, U., Dreher, D., Greller, G., Kauling, J., Bauer, I., Eibl, D. (2015), Empfehlung zur verfahrenstechnischen Charakterisierung von Single-Use Bioreaktoren und Single-Use Mischsystemen mittels experimenteller Methoden, DECHEMA, in press.
- [2] Eibl, R., Löffelholz, C. and Eibl, D., Disposable Bioreactors for Inoculum Production and Protein Expression, in Animal Cell Biotechnology, R. Pörtner, Editor. 2014, Humana Press. p. 265-284.

Sales and Service Contacts

For further contacts, visit www.sartorius-stedim.com

Europe

Germany
Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen
Phone +49.551.308.0
Fax +49.551.308.3289

Sartorius Stedim Systems GmbH
Robert-Bosch-Strasse 5 – 7
34302 Guxhagen
Phone +49.5665.407.0
Fax +49.5665.407.2200

France
Sartorius Stedim FMT S.A.S.
ZI des Paluds
Avenue de Jouques – CS 91051
13781 Aubagne Cedex
Phone +33.442.845600
Fax +33.442.845619

Sartorius Stedim France SAS
ZI des Paluds
Avenue de Jouques – CS 71058
13781 Aubagne Cedex
Phone +33.442.845600
Fax +33.442.846545

Austria
Sartorius Stedim Austria GmbH
Modecenterstrasse 22
1030 Vienna
Phone +43.1.7965763.18
Fax +43.1.796576344

Belgium
Sartorius Stedim Belgium N.V.
Rue Colonel Bourg 105
1030 Bruxelles
Phone +32.2.756.06.80
Fax +32.2.756.06.81

Hungary
Sartorius Stedim Hungária Kft.
Kagyó u. 5
2092 Budakeszi
Phone +36.23.457.227
Fax +36.23.457.147

Italy
Sartorius Stedim Italy S.r.l.
Via dell'Antella, 76/A
50012 Antella-Bagno a Ripoli (FI)
Phone +39.055.63.40.41
Fax +39.055.63.40.526

Netherlands
Sartorius Stedim Netherlands B.V.
Phone +31.30.60.25.080
Fax +31.30.60.25.099
filtratie.nederland@sartorius-stedim.com

Poland
Sartorius Stedim Poland Sp. z o.o.
ul. Wrzesinska 70
62-025 Kostrzyn
Phone +48.61.647.38.40
Fax +48.61.879.25.04

Russian Federation
LLC "Sartorius Stedim RUS"
Uralskaya str. 4, Lit. B
199155 St. Petersburg
Phone +7.812.327.53.27
Fax +7.812.327.53.23

Spain
Sartorius Stedim Spain, S.A.U.
Avda. de la Industria, 32
Edificio PAYMA
28108 Alcobendas (Madrid)
Phone +34.913.586.098
Fax +34.913.589.623

Switzerland
Sartorius Stedim Switzerland AG
Ringstrasse 24 a
8317 Tagelswangen
Phone +41.52.354.36.36
Fax +41.52.354.36.46

U.K.
Sartorius Stedim UK Ltd.
Longmead Business Centre
Blenheim Road, Epsom
Surrey KT19 9 QQ
Phone +44.1372.737159
Fax +44.1372.726171

Ukraine
LLS "Sartorius RUS"
Post Box 440 "B"
01001 Kiev, Ukraine
Phone +380.44.411.4918
Fax +380.50.623.3162

Americas

USA
Sartorius Stedim North America Inc.
5 Orville Drive, Suite 200
Bohemia, NY 11716
Toll-Free +1.800.368.7178
Fax +1.631.254.4253

Argentina
Sartorius Argentina S.A.
Int. A. Avalos 4251
B1605ECS Munro
Buenos Aires
Phone +54.11.4721.0505
Fax +54.11.4762.2333

Brazil
Sartorius do Brasil Ltda
Avenida Senador Vergueiro 2962
São Bernardo do Campo
CEP 09600-000 - SP- Brasil
Phone +55.11.4362.8900
Fax +55.11.4362.8901

Mexico
Sartorius de México, S.A. de C.V.
Libramiento Norte de Tepotzotlan s/n,
Colonia Barrio Tlacateco,
Municipio de Tepotzotlan,
Estado de México,
C.P. 54605
Phone +52.55.5562.1102
Fax +52.55.5562.2942
leadsmex@sartorius.com

Peru
Sartorius Peru S.A.C.
Av. Emilio Cavenecia 264 San Isidro
15073 Lima, Perú
Phone +51.1.441 0158
Fax +51.1.422 6100

Asia | Pacific

Australia
Sartorius Stedim Australia Pty. Ltd.
Unit 5, 7-11 Rodeo Drive
Dandenong South Vic 3175
Phone +61.3.8762.1800
Fax +61.3.8762.1828

China
Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.
No. 33 Yu'an Road
Airport Industrial Park Zone B
Shunyi District, Beijing 101300
Phone +86.10.80426516
Fax +86.10.80426580

Sartorius Stedim (Shanghai)
Trading Co., Ltd.
3rd Floor, North Wing, Tower 1
No. 4560 Jinke Road
Zhangjiang Hi-Tech Park
Pudong District
Shanghai 201210, P.R. China
Phone +86.21.6878.2300
Fax +86.21.6878.2882

Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.
Guangzhou Representative Office
Unit K, Building 23
Huihua Commerce & Trade Building
No. 80 Xianlie Middle Road
Guangzhou 510070
Phone +86.20.37618687 | 37618651
Fax +86.20.37619051

India
Sartorius Stedim India Pvt. Ltd.
#69/2-69/3, NH 48, Jakkasandra
Nelamangala Tq
562 123 Bangalore, India
Phone +91.80.4350.5250
Fax +91.80.4350.5253

Japan
Sartorius Stedim Japan K.K.
4th Fl., Daiwa Shinagawa North Bldg.
8-11, Kita-Shinagawa 1-chome
Shinagawa-ku, Tokyo, 140-0001 Japan
Phone +81.3.4331.4300
Fax +81.3.4331.4301

Malaysia
Sartorius Stedim Malaysia Sdn. Bhd.
Lot L3-E-3B, Enterprise 4
Technology Park Malaysia
Bukit Jalil
57000 Kuala Lumpur, Malaysia
Phone +60.3.8996.0622
Fax +60.3.8996.0755

Singapore
Sartorius Stedim Singapore Pte. Ltd.
1 Science Park Road,
The Capricorn, #05-08A,
Singapore Science Park II
Singapore 117528
Phone +65.6872.3966
Fax +65.6778.2494

South Korea
Sartorius Korea Biotech Co., Ltd.
8th Floor, Solid Space B/D,
PanGyoYeok-Ro 220, BunDang-Gu
SeongNam-Si, GyeongGi-Do, 463-400
Phone +82.31.622.5700
Fax +82.31.622.5799



▶ www.sartorius-stedim.com