



COMUNICACIÓN BREVE

## Nuevas formulaciones de medios de cultivo libres de suero para el incremento de la productividad de la línea celular recombinante Her-1

*New formulations of serum-free media to increase the productivity of the Her-1 recombinant cell line*

Julio L. Palacio Oliva<sup>1\*</sup> y Rafael A. Pérez Yanes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Inmunología Molecular

<sup>2</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

\* Autor para correspondencia:  
[julio@cim.sld.cu](mailto:julio@cim.sld.cu)

### RESUMEN

Se evaluaron cuatro nuevas formulaciones de medios de cultivos libres de suero basados en la mezcla: MB02/RPMI con combinaciones adicionales de glucosa e insulina, en estudios cinéticos en frascos agitados, con el objetivo de aumentar la productividad volumétrica de la línea celular recombinante Her-1. Las concentraciones de células viables máximas alcanzadas en las cuatro condiciones estuvieron entre  $4,6 - 5,3 \times 10^6$  células/ml a diferencia del control que fue de  $3,7 \times 10^6$  células/ml. En los medios de cultivo MRF03 y MRF04 la velocidad específica de producción y la productividad se incrementaron en más de 1,5 y 3 veces respectivamente, en comparación a los resultados obtenidos en el medio control (MB02/PFHMII).

**Palabras clave:** cultivo celular, DEC-Her1, HEK293

### ABSTRACT

Four new serum-free media based on the MB02/RPMI mixture with additional combinations of glucose and insulin were evaluated in kinetic studies in shaken flasks, with the aim to increase the volumetric productivity of the Her-1 recombinant cell line. The maximum viable cell concentrations in all conditions were between  $4,6 - 5,3 \times 10^6$  cells/ml unlike the control which was  $3,7 \times 10^6$  cells/ml. In the culture media MRF03 and MRF04, the specific production rate and productivity increased by more than 1,5 and 3 times respectively, compared to the results obtained in the control medium (MB02/PFHMII).

**Keywords:** cell culture, DEC-Her1, HEK293

Recibido: 2019-09-12

Aceptado: 2019-12-29

## INTRODUCCIÓN

El Centro de Inmunología Molecular (CIM) ha encaminado sus esfuerzos a desarrollar nuevos productos para el tratamiento del cáncer. Entre estos se encuentra la proteína recombinante correspondiente al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (DEC-HER1), usada en una formulación vacunal que se encuentra en fase de ensayos clínicos. Debido a los resultados satisfactorios obtenidos en la clínica (Caballero *et al.*, 2017) se ha incrementado el número de pacientes que usan esta nueva vacuna, lo que ha contribuido a un aumento en su demanda.

El gen que codifica para esta proteína fue insertado en el genoma de la línea celular HEK293, que proviene de células embrionarias de riñón humano (HEK, del inglés: Human Embryonic Kidney Cells) transformadas con ADN adenoviral tipo 5 (Graham *et al.*, 1977). El producto de esta transfección dio origen a la línea celular recombinante HER-1 (transfectoma HEK293/DEC-HER1), capaz de excretar DEC-HER1 al medio de cultivo (Sánchez y Fernández, 2007). La plataforma productiva para la obtención de esta proteína se basa en el cultivo en medio líquido de la línea celular Her-1 en bioreactores de tanque agitado en modo perfusión, con el empleo del medio de cultivo libre de suero MB02/PFHMII.

En la actualidad este proceso presenta baja productividad volumétrica. Hecho que impacta en los costos del proceso y dificulta la disponibilidad del producto para la clínica. En este sentido, en la industria de bioprocesos, el desarrollo de formulaciones de medios de cultivo específicos para cada línea celular recombinante ha permitido el incremento de la productividad en los procesos de fermentación, a través de un aumento en la velocidad específica de producción o de la integral de células viables (Zang *et al.*, 1995; Altamirano *et al.*, 2006; Liste-Calleja *et al.*, 2014). El objetivo en este trabajo es evaluar cuatro formulaciones de medios de cultivo libres de suero para el aumento de la productividad actual de la línea celular Her1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó la línea celular Her-1 (Transfectoma HEK293/DEC-HER1), que expresa la proteína correspondiente al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (DEC-HER1).

## Medios de cultivo

Medio control: MB02/PFHMII (1:1) (Merck, Alemania /Hyclone, Estados Unidos)

Medio basal: RPMI 1640 (Sigma, Estados Unidos) suplementado con 10mM Glutamina (Sigma, E.E.U.U), 3 g/L Cell Boost 5 (Hyclone, Estados Unidos) y 5 mg/L Insulina (Sigma, Estados Unidos).

El medio de cultivo basal se mezcló en proporción 1:1 con el medio de cultivo MB02 (Merck, Alemania) suplementado con 3 g/L de Cell Boost 5 (Hyclone, Estados Unidos). A partir de la mezcla se prepararon cuatro nuevas formulaciones de medio, donde se añadieron diferentes concentraciones de glucosa e insulina (Tabla1).

**Tabla1:** Medios de cultivo evaluados

**Table1:** Evaluated culture media

Medios de cultivos	MB02/RPMI 1640 (1:1) suplementado con 5mM Glutamina, 3g/L Cell Boost 5, 5mg/L Insulina	
	Glucosa (g/L)	Insulina (mg/L)
<b>MRF01</b>	2	2,5
<b>MRF02</b>	0	2,5
<b>MRF03</b>	2	0
<b>MRF04</b>	0	0

## Cultivo celular

Las células se expandieron inicialmente en frascos de cultivos agitados en los medios de cultivo: control o MRF04. Para cada condición se tomaron  $32 \times 10^6$  células y se centrifugaron a 231g y 4 °C, durante 5 min, en tubos de 50mL estériles y apirogénicos (CELLSTART Tube, Greiner bio-one, Alemania). La concentración inicial de células viables para el estudio cinético en cultivo discontinuo fue de  $0,4 \times 10^6$  células/mL y el volumen inicial de medio empleado fue de 40mL. Frascos T de 175 cm<sup>2</sup> con las condiciones iniciales de concentración de células viables y volumen de medio empleado fueron incubados a 37 °C, bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y con agitación a 90 rpm. Se tomó diariamente 1ml de muestra por cada frasco, a los cuales se les determinó la concentración de células viables y la viabilidad celular por conteo en cámara de Neubauer, usando como método de exclusión la tinción con el Azul de Tripano. Las muestras evaluadas se centrifugaron a 231g y 4 °C, durante 5 min. Los sobrenadantes se almacenaron en viales a -40 °C para la posterior cuantificación de DEC-HER1 por el método inmunoenzimático (ELISA).

### Cuantificación de DEC-HER1 por ELISA

Las placas (High binding, Costar, EUA) se recubrieron con el anticuerpo monoclonal hr3 (CIM) a 5 µg/mL en una solución tamponada de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH=9,6) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Se aplicaron 50 µL por pozo del sobrenadante de los diferentes medios de cultivo previamente diluidos (dilución 1: 250 a 1: 500) en la solución de ensayo: PBS al 0,05% de Tween 20 (Sigma, EUA) y 1% de BSA (Sigma, EUA) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Como primer conjugado se utilizó un anticuerpo de detección biotinilado anti DEC-RFCE humano (R&D Systems, EUA), diluido 1/2500 en la solución de ensayo y se incubó 1 h a 37 °C. Como segundo conjugado se utilizó la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (R&D Systems, EUA), diluido 1/2000 en la solución de ensayo y se incubó 1 h a 37 °C. La reacción se desarrolló con la adición de la solución sustrato (1:1) de peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina (R&D Systems, EUA) y se detuvo con una solución de ácido sulfúrico 10%. Las lecturas de densidad óptica se realizaron en un equipo lector de placas (Organon Técnica Microwell System, Austria) a 450nm de longitud de onda. La cuantificación se realizó extrapolando los puntos en una curva obtenida con un patrón de DEC-Her-1, con un rango de concentraciones de 0 a 500 ng/mL<sup>2</sup>. Al final de cada incubación a 37 °C por 1 hora, se lavaron las placas con la solución PBS al 0.05% de Tween 20 (Sigma, EUA).

### Análisis de datos

La integral del área bajo la curva de la concentración de células viables en el tiempo (ICV) fue determinada mediante la fórmula propuesta por Renard *et al.* (1988).

$$ICV = \sum_{k=1}^n \left( \frac{X_{v0} + X_{v1}}{2} \cdot (t_1 - t_0) \right)$$

La velocidad específica de producción (Qp) se determinó mediante un análisis de regresión lineal de la concentración de DEC-Her1 contra ICV. La media de Qp en el cultivo corresponde con la pendiente de la línea (Porter *et al.*, 2010).

La velocidad específica de crecimiento se calculó empleando la ecuación:

$$\mu = (\ln X_{v1} - \ln X_{v0}) \div (t_1 - t_0)$$

donde X<sub>v1</sub> = concentración de células viables en el quinto día de cultivo, X<sub>v0</sub> = concentración de células viables al comienzo del experimento, t<sub>1</sub> = tiempo transcurrido hasta el quinto día de cultivo (h) y t<sub>0</sub> es considerado cero.

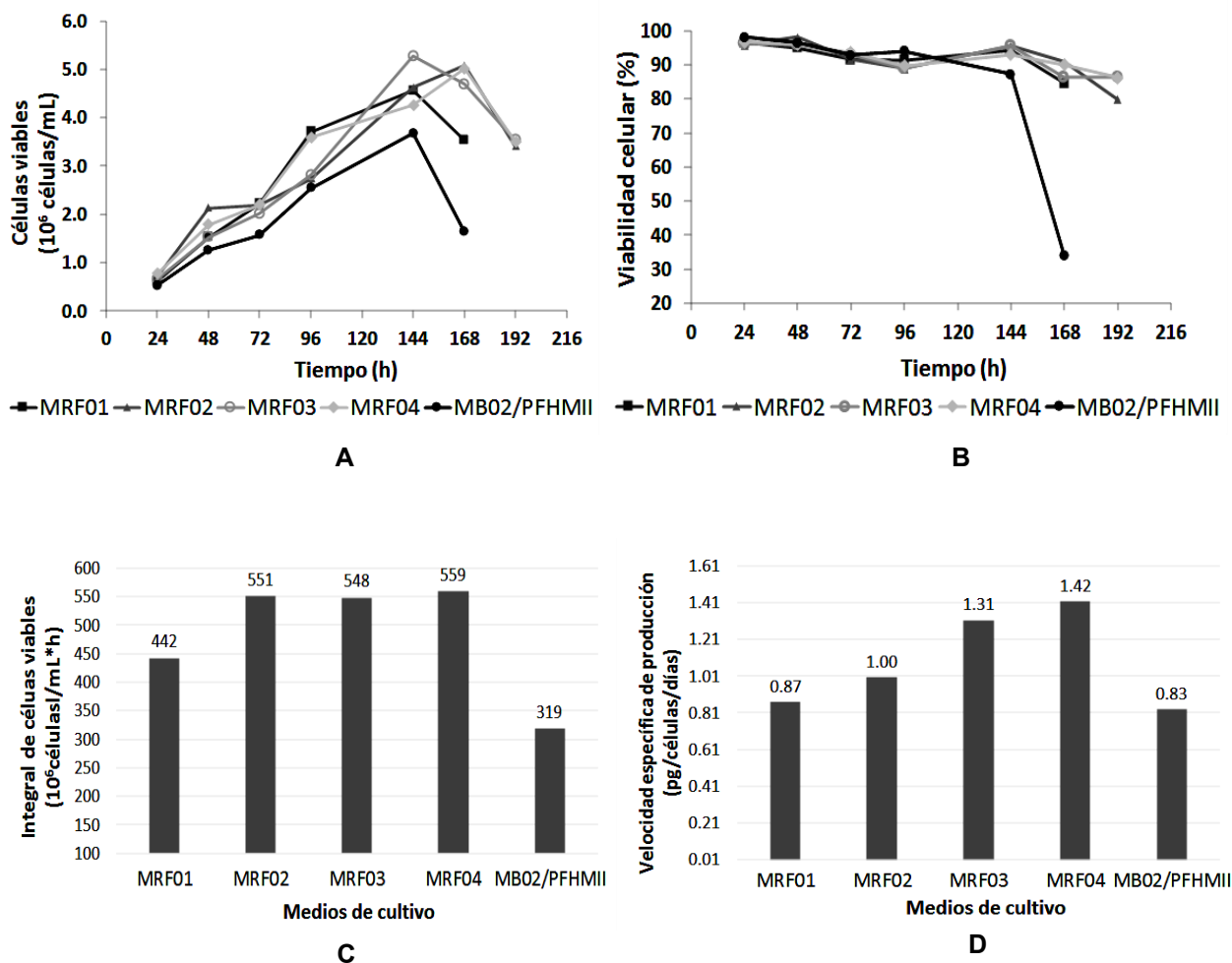
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio se evaluaron cuatro nuevas formulaciones de medios de cultivo libres de suero (MRF01, MRF02, MRF03, MRF04) y como control el medio MB02/PFHMII, en cultivos discontinuos, a escala de laboratorio. En las cuatro formulaciones evaluadas las concentraciones de células viables máximas alcanzadas a los 144 h de cultivo fueron superiores comparadas con la del control. En las condiciones MRF02, MRF03 y MRF04 se alcanzaron las mayores densidades celulares, entre 4,26 - 5,27 x10<sup>6</sup> células/mL a diferencia del control que fue de 3,67x10<sup>6</sup> células/mL (Fig. 1A).

Durante las primeras 96 horas de cultivo, se observó un comportamiento similar en la viabilidad celular de todas las condiciones evaluadas y el control (90%-94% de viabilidad). Luego en el medio control se evidenció una marcada disminución hasta un 30% a las 168 horas. Las nuevas formulaciones evaluadas por el contrario evidenciaron valores de viabilidad entre 85%- 90%, a este tiempo (Fig. 1B).

Las velocidades específicas de crecimiento fueron similares en todas las variantes ensayadas, en un rango entre 0,015-0,018 h<sup>-1</sup>. Sin embargo, para la integral de células viables los valores alcanzados fueron superiores y se obtuvieron los mejores resultados en los medios MRF02, MRF03 y MRF04 (Fig. 1C).

Las velocidades específicas de producción obtenidas en los medios MRF03 y MRF04 mostraron valores superiores en 1,5 y 1,7 veces respectivamente, comparados con el control, a diferencia de las demás condiciones (Fig. 1D).

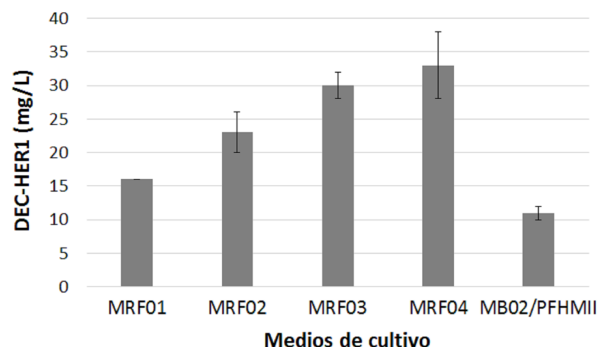


**Figura 1:** Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de la línea celular Her-1 cultivada en las diferentes formulaciones de medios de cultivo a 37°C, bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y con agitación a 90 rpm. (A) Concentración de células viables, (B) Viabilidad celular, (C) Integral de células viables y (D) Velocidad específica de producción.

**Figure 1:** Kinetic parameters of growth and production of the Her-1 cell line cultured in the different formulations of culture media at 37°C, under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and with agitation at 90 rpm. (A) Viable cells concentration, (B) Cell viability, (C) Integral of viable cells and (D) Specific production rate.

En cuanto a la concentración máxima de DEC-Her1 se observó que en todas las condiciones evaluadas se alcanzaron valores superiores con respecto al control, siendo más significativo los resultados al-

canzados en los medios de cultivo MRF03 y MRF04, que fueron 2,7 y 3 veces mayor en comparación al medio control (Fig. 2), respectivamente.



**Figura 2:** Concentración máxima de DEC-Her1 determinada por ELISA a las 192 horas de cultivo. Las barras de error indican la desviación estándar de los títulos obtenidos.

**Figure 2:** Maximum concentration of DEC-Her1 determined by ELISA at 192 hours of culture. The error bars indicate the standard deviation of the obtained titles.

El aumento de la productividad de aproximadamente tres veces respecto al control de los medios cultivo MRF03 y MRF04, se debe a que en ambos medios se evidenció un alargamiento de la fase exponencial de crecimiento celular y un aumento tanto en la integral de células viables como en la velocidad específica de producción con respecto al control (Fig. 1C y 1D).

Centrándonos en los valores de viabilidad celular a las 192 horas de cultivo (Fig. 1B) y velocidad específica de producción (Fig. 1D), se puede observar que estos eran mayores en los medios que contenían menor cantidad de insulina. La insulina aumenta el consumo de glucosa en células HEK-293 mediante un incremento en la expresión de GLUT-1 (Cipolletta *et al.*, 2009). Este aumento en el consumo de glucosa provoca que la misma sea metabolizada preferentemente por la vía glicolítica hacia piruvato y este es convertido en lactato, además de entrar al ciclo de Krebs por la acetilCoA. Altas concentraciones de lactato en el entorno celular pueden llegar a ser tóxicas, relacionándose con la inhibición del crecimiento celular y la expresión de proteínas (Cruz *et al.*, 1999; Liste-Calleja *et al.*, 2015; Martínez-Monge *et al.*, 2019).

Después de la evaluación de los diferentes medios de cultivos se propone la sustitución de la formulación MB02/PFHMI por el medio MRF04. La base de esta selección se basa en el incremento en la velocidad específica de producción, la integral de células viables y la concentración máxima de DEC-Her1

alcanzada en dicha formulación para estas condiciones experimentales. Además, al presentar menor cantidad de aditivos se reduce el costo de obtención de esta molécula.

## LITERATURA CITADA

- Altamirano, C., Illanes, A., Canessa, R., y Becerra, S. (2006). Specific nutrient supplementation of defined serum-free medium for the improvement of CHO cells growth and t-PA production. *J. Biotechnol.* 9(1), pp. 5-13.
- Caballero, I., Aira, L. E., Lavastida, A., Popa, X., *et al.* (2017). Safety and immunogenicity of a human epidermal growth factor receptor 1 (HER1)-based vaccine in prostate castration-resistant carcinoma patients: a dose-escalation phase I study trial. *Front. Pharmacol.* 8, 263.
- Cipolletta, E., Campanile, A., Santulli, G., S. *et al.* (2009). The G protein coupled receptor kinase 2 plays an essential role in beta-adrenergic receptor-induced insulin resistance. *Cardiovasc. Res.* 84(3), pp. 407-415.
- Cruz, H. J., Moreira, J. L. y Carrondo, M. J. (1999). Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnol. Bioeng.* 66(2), pp.104-113.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., *et al.* (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), pp. 59-72.
- Liste-Calleja, L., Lecina, M. y Cairó, J. J. (2014). HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms. *J. Biosci. Bioeng.* 117(4), pp. 471-477.
- Liste-Calleja, L., Lecina, M., Lopez-Repullo, *et al.* (2015) Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(23), pp. 9951-9960.
- Martínez-Monge, I., Albiol, J., Lecina, M., *et al.* (2019) Metabolic flux balance analysis during lactate and glucose concomitant consumption in HEK293 cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 116(2), pp. 388-404.
- Porter A, Dickson A. y Andrew A. (2010). Strategies for selecting recombinant CHO cell lines for cGMP manufacturing: realizing the potential in bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 26 (5) pp. 1446- 1454.
- Renard J. M., Spagnoli R., Mazier C. *et al.* (1988). Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems. *Biotechnol. Lett.* (10) pp. 91-96.
- Sánchez Ramírez, B., y Fernández Molina, L. E. (2007) Diseño y evaluación de un candidato vacunal basado en el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico antólogo para el tratamiento del cáncer (No. 616-006.6). e-libro, Corp.
- Zang, M., Trautmann, H., Gandor, C., Messi, F., *et al.* (1995). Production of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using a protein-free cell culture medium. *Biotechnol. J.* 13(4) pp. 389.