



Produção de uma proteína modelo secretada baseada em células CHO usando o novo BIOSTAT® A



#07

Nota de
aplicação

#08

#09

#10

#11

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

* Universidade de Zurich de Ciências
Aplicadas (ZHAW), Waedenswil, Suíça

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

Introdução

Com o BIOSTAT® A, Sartorius introduziu um novo biorreator de nível de entrada para facilitar o controle de cultura celular e fermentação microbiana. O novo projeto compacto e interface de operação intuitiva permite até mesmo a usuários inexperientes alcançarem um rápido progresso. Todas as linhas de gás são controladas automaticamente e continuamente para um controle estável e preciso de pH e DO. Ajustes manuais de medidores de fluxo de gás não são mais necessários para acompanhar a demanda de DO. A seleção de modos de operação pré-configurados permite o uso tanto do UniVessel® Glass quanto do UniVessel® Single-Use. Utilizando modernos dispositivos de controle móvel e executando várias unidades em paralelo garante-se a máxima comodidade e a melhor utilização da área de trabalho. Essa nota de aplicação avalia um processo de cultivo de células de mamíferos conduzido com um BIOSTAT® A e confirma os parâmetros de desempenho comparáveis a outros sistemas de bancada como os BIOSTAT® B's.

Nesse artigo descrevemos um protocolo de produção baseada em células CHO da proteína modelo fosfatase alcalina secretada (SEAP) utilizando um recipiente de vidro de 2 L. A proteína modelo SEAP é produzida por células CHO XM 111-10 em suspensão (Coleção de Culturas da Suíça) que crescem e produzem em meios de cultura quimicamente definidos.

Na Universidade de Ciências Aplicadas de Zurique (ZHAW), o crescimento celular e os experimentos de produção de proteínas com esse modelo de linha celular (originalmente estabelecido pelo grupo do Prof. Dr. Martin Fussenegger, ETHZ) são realizados regularmente. Nesse contexto, muitos tipos de biorreatores e escalas diferentes já provaram a sua adequação para essa aplicação de cultura celular. O procedimento sugerido compreende um crescimento celular e fase de produção de proteínas com mudança da temperatura, o que também é tipicamente o caso para processos de produção industrial de proteínas.

Foi nosso objetivo alcançar resultados semelhantes aos obtidos anteriormente em sistemas BIOSTAT® B nas primeiras execuções (não-otimizada). Objetivamos uma densidade celular viável de $> 6 \times 10^6$ células e uma atividade proteica de > 8 unidades/mL. Além disso queríamos demonstrar que valores de $k_L a$ de 10/h poderiam ser alcançados a velocidades periféricas do impulsor abaixo de 1 m/s.

1. Equipamento e Material

- BIOSTAT® A
(Sartorius Stedim Biotech GmbH)
- UniVessel® 2 L, vidro, parede simples, dois impulsores de segmento de 3-lâminas (ângulo = 30°) montados a uma distância de 70 mm e microaspersor com porosidade de 20 μ m
(Sartorius Stedim Biotech GmbH)
- Sensor de pH (Endress Et Hauser)
- Sensor de OD (Endress Et Hauser)
- Meio ChoMaster® HP-1/HP-5
(Cell Culture Technologies GmbH)
- Linha celular CHO XM 111-10
(Coleção de Cultura da Suíça, No. 837)
- Cedex HiRes (Roche Diagnostics)
- Analisador Bioprofile100 plus
(Nova Biomedical)
- Frascos de agitação de 1000 mL (Corning)
- Incubadora com agitação (Infors HT)



2. Cronograma e métodos

Normalmente, a manutenção da cultura de células CHO XM 111-10 em suspensão é realizada em frascos T (75 cm²) utilizando meio ChoMaster[®] FMX-8. O inóculo para a produção em biorreator agitado é preparado primeiro em frascos de agitação (single-use) (1000mL) utilizando meio ChoMaster[®] HP-1, a fim de adaptar as células a agitação.

2.1 Caracterização da engenharia

Primeiramente a transferência de oxigênio e a mistura da produção SEAP no BIOSTAT[®] A foram estudados. Valores de $k_L a$ foram determinados utilizando um método de gassing-out baseado nas orientações DECHEMA [1]. As medições foram efetuadas em uma solução de NaCl a 1% no volume máximo de trabalho de 2 L e uma temperatura de 37°C. A taxa de aeração de 0,03 w/m e uma velocidade periférica entre 0,43 e 0,63 m/s foram investigadas. A concentração de oxigênio dissolvido foi medida com um sensor Endress e Hauser (Oxymax COS22D) com um tempo de resposta de 15,5 s (63% do sinal de acordo com as orientações DECHEMA). Todas as investigações de $k_L a$ foram repetidas cinco vezes para cada conjunto de condições de operação.

O tempo de mistura foi determinado utilizando o método de descoloração (conforme as orientações DECHEMA) com o volume máximo de trabalho de 2 L e uma velocidade periférica entre 0,43 e 0,63 m/s [1]. Todas as investigações de tempo de mistura foram repetidas cinco vezes para cada conjunto de condições de operação.

2.2 Cronograma

- Dia 1: Estabelecimento de uma cultura de inóculo (densidade de semente de $0,5 \times 10^6$ células viáveis/mL) em frascos de agitação (1000 mL) com células CHO XM 111-10 em suspensão caracterizadas por crescimento logarítmico e tempos de duplicação ≤ 24 horas.
- Dia 2: Alimentação da cultura de inóculo com meio de crescimento ChoMaster[®] HP-1 (ver seção 2.4)
- Dia 3: Alimentação da cultura de inóculo com meio de crescimento ChoMaster[®] HP-1 (ver seção 2.4)
Preparação do recipiente de cultura do UniVessel[®]:
– Calibração do(s) sensor(es) de pH e OD
– Gás de entrada conectado e filtros de gás de exaustão de saída
– Esterilização (121°C/30 minutos)
– Testes de esterilidade e sensores por adição de 1L de meio ChoMaster[®] HP-1 e inicialização de todos os loops de controle
- Dia 4: O BIOSTAT[®] A 2L foi inoculado com 0,8 L de suspensão celular ($0,5 \times 10^6$ células viáveis/mL) usando meio de crescimento ChoMaster HP-1.

Dia 5 & 6: Amostragem (ver seção 2.6), alimentação sucessiva do meio de crescimento ChoMaster[®] (primeira alimentação com 400 mL de ChoMaster HP-1, alimentação subsequente com 600 mL de meio de crescimento ChoMaster HP-5) e aumento da velocidade de agitação.

Dia 7: Amostragem e subsequente troca de meio (substituição do meio de crescimento por meio de produção).

Dia 8: Amostragem, subsequente diminuição da temperatura para 31°C e aumento da velocidade de agitação.

Dia 9-x: Amostragem e cessação da cultura após a viabilidade celular cair abaixo de 30%.

2.3 Meios

Meio mínimo ChoMaster[®] HP-1 quimicamente definido foi utilizado para a produção do inóculo e o início do cultivo no recipiente de vidro UniVessel[®] conectado ao BIOSTAT[®] A. O meio ChoMaster[®] HP-1 foi suplementado com 2,0 g/L de Pluronic F-68 e 2,5 mg/L de tetraciclina. A alimentação foi realizada com meio de crescimento ChoMaster[®] HP-5 (suplementado com Pluronic F-68 e tetraciclina). Linhas celulares CHO XM 111-10 abrangem o sistema Tet-Off para a expressão controlada de SEAP. A secreção de SEAP foi induzida pela troca de meio para meio de produção ChoMaster[®] HP-5 livre de tetraciclina.

2.4 Preparação do Inóculo

Frascos de agitação single-use de 1000 mL foram utilizados para a produção do inóculo. A propagação celular nos frascos de agitação inicia-se com uma densidade de células viáveis de $0,5 \times 10^6$ células/mL em 100 mL de suspensão (utilizando ChoMaster[®] HP-1). As células são incubadas em uma incubadora com agitação a 37°C com uma frequência de agitação de 120 rpm, amplitude de 25 mm, umidade relativa de 70% relH e um teor de CO₂ de 7,5%. Após 24 e 48 horas, 50 mL e 100 mL de ChoMaster[®] HP-1 são adicionados a fim de proporcionar às células glicose e diluir os metabólitos intoxicantes.

Três horas antes da inoculação, todas as células do inóculo foram reunidas e a mesma quantidade de meio fresco ChoMaster[®] HP-1 foi adicionada, sem agitação, para permitir a sedimentação das células. Após 3 horas, o sobrenadante foi removido e as células foram transferidas para o recipiente de vidro autoclavado.

2.5 Configuração para o cultivo

O sensor de pH foi calibrado através de uma calibração de dois pontos com tampão pH 4,01 e pH 7,00.

Antes da autoclavagem, o recipiente de vidro foi preenchido com 1 L de PBS e os sensores de pH e DO (ambos Endress e Hauser, Alemanha) foram inseridos. Após a esterilização do recipiente a 121 °C por 30 minutos, PBS foi substituído por 1000 mL de meio ChoMaster[®] HP-1 sobre um gabinete de segurança. Os contêineres com meio de crescimento e produção ChoMaster[®] HP-5 (FlexBoy[®] 3 L, Sartorius Stedim Biotech) foram conectados ao biorreator via LuerLock. Além disso, solução anti-espuma (Antifoam 3000 ppm, Sigma Aldrich) foi conectada ao recipiente de vidro através de um conector LuerLock. O recipiente de vidro foi transferido para a unidade de controle onde temperatura, agitação e condições de pH foram iniciadas e monitoradas para confirmação da retenção estéril de 24hr e operação livre de problemas dos sensores antes do início da cultura experimental.

2.6 Amostragem e análises

Diariamente uma amostra de 4 mL é retirada conectando uma seringa estéril de 10 mL através de um adaptador clave. O Controle em Processo foi realizado pelo contador celular CedexHiRes (densidade de células viáveis, viabilidade) e Analisador BioProfile 100Plus (concentração de metabólitos e substrato) uma vez ao dia (4 mL). Além disso, o valor de pH foi determinado de maneira offline por um medidor de pH (Mettler Toledo). A atividade de SEAP expressada foi medida pela reação enzimática para-nitrofenil fosfato para para-nitrofenil causando uma mudança de cor do sobrenadante preparado [2].

2.7 Condições de cultura

Volume de cultura inicial	0,8 L
Volume de cultura final	1,8 L
Velocidade de agitação	100 – 220 rpm (aumento gradual)
OD	30 % controlado por ar e fluxo de O ₂
pH	7,2
Temperatura	37°C (crescimento) 31°C (produção de proteína)
Taxa de aeração	max. 0,02 vvm (oxigênio de aspersão)
Densidade celular inicial	0,5 × 10 ⁶ células viáveis/mL
Tempo de cultivo	14 dias (3 dias de fase de crescimento e 11 dias de fase de produção)

3. Resultados

3.1 Caracterização da engenharia

A Figura 1 retrata o tempo de mistura obtido experimentalmente (θ_m) e o coeficiente de transferência de massa volumétrica ($k_L a$) para o BIOSTAT[®] A 2 L, que são representados como uma função da velocidade periférica (U_{Tip}). A turbulência aumenta a medida que a velocidade periférica aumenta, por conseguinte, isso leva diretamente a uma diminuição no tempo de mistura e aumenta o coeficiente de transferência de massa volumétrica. Embora aproximadamente 13 s são necessários para atingir 95% de homogeneização na velocidade periférica mais baixa (0,43 m/s), apenas 8s, aproximadamente, são necessários na velocidade periférica máxima utilizada (0,63 m/s). Além disso, um $k_L a$ mínimo de aproximadamente 8,5 1/h (0,43 m/s) e máximo de 11 1/h (0,63 m/s) foram determinados.

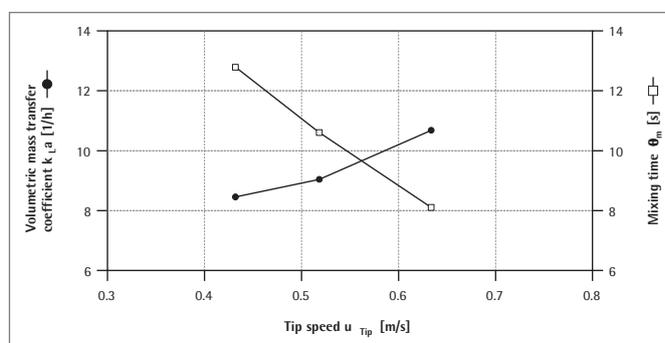


Figura 1: Coeficientes de transferência de massa volumétrica determinados e tempos de mistura no UniVessel[®] 2 L reutilizável controlado com BIOSTAT[®] A.

3.2 Crescimento baseado em células CHO e produção de SEAP

Um bom crescimento celular foi obtido durante a fase de crescimento e no início da fase de produção. Começando com uma densidade celular inicial de $0,4 \times 10^6$ células/mL, a densidade celular viável máxima de $7,09 \times 10^6$ células/mL foi obtida ~144 horas após a inoculação. A taxa média de crescimento específico durante a fase de crescimento foi $0,037 \pm 0,013$ correspondente ao tempo de duplicação de $20,4 \pm 6,1$ horas.

A formação de produto foi aumentada após a indução da expressão de SEAP. Atividade final e máxima de SEAP foi $17,0 \pm 0,13$ U/mL. Os substratos (glicose e glutamina) diminuíram à medida que a densidade de células viáveis aumentou. A glicose foi completamente consumida após ~168 horas de cultivo. Em contraste, a glutamina foi esgotada dentro de 24 horas após a inoculação, cada alimentação ou troca de meio.

Ambos os metabólitos, lactato e amônia, acumulados como glicose e glutamina foram consumidos. A acumulação de amônia aumentou depois da troca de meio e atingiu uma concentração máxima de 4,74 mmol/L.

Regulação negativa do pH baseada em CO₂ funcionou de forma excelente (parâmetro PID padrão) e o pH nunca excedeu o valor ajustado de pH de 7,2 por um longo tempo. Medições de pH online e offline corresponderam bem. Os ajustes na recalibração do pH só ocorreram quando a diferença entre as medições online e offline foram maiores do que 0,1. Durante todo o processo, o sensor de pH apenas precisou ser recalibrado três vezes indicando uma medição robusta e confiável da sonda de pH padrão.

O oxigênio dissolvido inicialmente caiu durante as primeiras 24 horas a 30% devido ao crescimento celular. Posteriormente, a OD flutuou em torno do ponto de ajuste de 30% nas ~264 horas restantes, indicando parâmetros PID não-otimizados. Em direção ao fim do experimento, a DO aumentou – indicando viabilidade celular e respiração celular diminuídas. A interrupção na DO após 72 horas foi causada pela desacoplamento do recipiente da unidade de controle e sedimentação sob fluxo laminar (troca de meio).

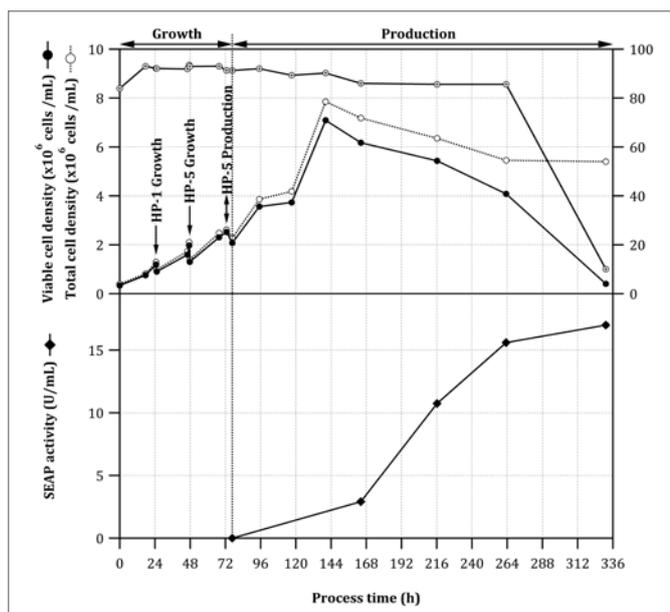


Figura 2: Perfis de densidade celular viável e total, viabilidade e atividade SEAP no UniVessel® 2 L reutilizável controlado com BIOSTAT® A.

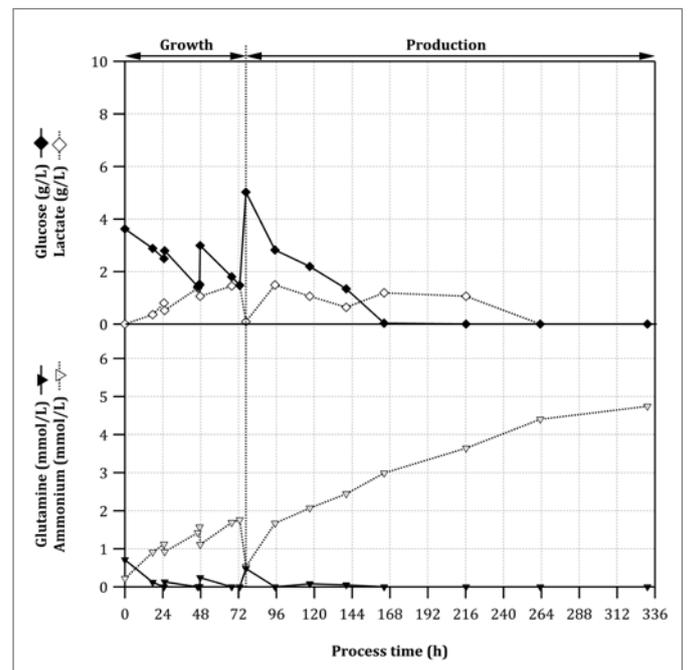


Figura 3: Perfis de substratos e metabólitos em um UniVessel® 2L reutilizável controlado com BIOSTAT® A.

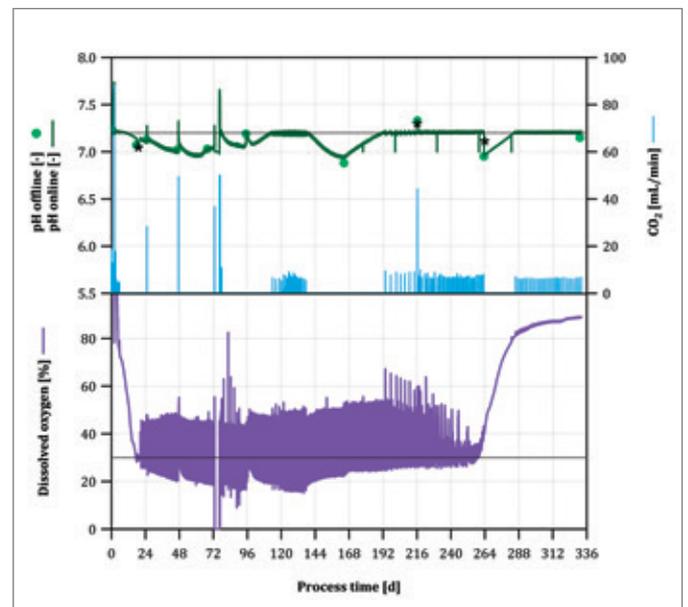


Figura 4: Perfis de medições de pH online e offline, taxa de fluxo de CO₂ e medição de oxigênio dissolvido no BIOSTAT® A. * = recalibração necessária.

4. Conclusão

O BIOSTAT® A é uma solução fácil de usar, confiável e autônoma para controle de cultivos de células de mamíferos. Foi mostrado que a transferência de oxigênio sendo necessária para atingir altas densidades celulares ($k_L a > 10/h$) já foi atingida a 220 rpm (velocidade periférica de 0,6 m/s). Devido à taxa de amostragem de dados curtos de um segundo, a análise dos valores de OD para determinação de $k_L a$ pode ser feita perfeitamente.

Em um experimento de cultura de células usando células CHO XM 111-10 em suspensão, dados em termos de viabilidade e de densidade celular viável com $7,1 \times 10^6$ células/mL são totalmente comparáveis com os de outros sistemas de cultivo. Além disso, a atividade SEAP obtida de 17,0 U/mL excedeu os valores esperados para recipientes de vidro agitados e confirma o excelente desempenho do BIOSTAT® A para processos de cultura celular de mamíferos. Esses resultados também puderam ser verificados em um segundo ensaio. O controle estável de temperatura, pH e OD já foi atingido com as configurações PID padrão. Otimizar os parâmetros de controle de PID, pH e OD levará a novas melhorias no processo.

O protocolo apresentado pode fornecer um modelo para o cultivo e produção de proteína utilizando outras linhas de células animais, tais como HEK- ou células de inseto em suspensão (Sf-9 ou High Five) usando o BIOSTAT® A.

5. Referências

- [1] Meusel, W., Löffelholz, C., Husemann, U., Dreher, D., Grell, 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