



COSECHA CELULAR SIN CENTRIFUGACIÓN

La industria biofarmacéutica utiliza cada vez más sistemas de expresión de células de mamíferos para suministrar anticuerpos monoclonales y otras proteínas terapéuticas. Los volúmenes pueden variar desde unos pocos mL en fase de I+D hasta miles de litros en producción, con densidades celulares de hasta 15 millones de células/mL.

Departamento técnico-comercial de Gesfilter

A ESTAS ALTAS DENSIDADES, LA CLARIFICACIÓN DEL CULTIVO CELULAR para su posterior procesamiento requiere infraestructuras por equipamiento y consumibles con un elevado coste. Nos encontramos ante un enorme reto, e incluso más aún a escala de laboratorio, ya que los científicos que participan en la selección de la línea celular, desarrollo de medios de cultivo, estrategias de nutrición y optimización del proceso necesitan procesar un gran número de cultivos celulares provenientes de múltiples biorreactores.

La centrifugación o el uso de pequeños dispositivos de filtración de profundidad para la clarificación primaria seguida de una filtración esterilizante de 0,2 µm para la clarificación secundaria es un proceso lento y complicado. Mostramos en este artículo el funcionamiento de unos innovadores filtros de laboratorio con una amplia superficie filtrante que trabajan al vacío. Proporcionan así una alternativa rápida y fácil para el procesamiento paralelo de múltiples cultivos celulares.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de expresión celular de mamíferos proporcionan proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales extracelulares de alto valor. La escala de estos sistemas puede variar desde unos pocos mL en micro-biorreactores/agitadores a unos pocos litros en pequeños biorreactores, hasta alcanzar miles de litros

en grandes biorreactores. Las células de mamíferos son recolectadas y procesadas para obtener la proteína purificada de interés. El cultivo celular contiene células enteras, restos de células muertas y un amplio abanico de proteínas resultantes de la actividad celular. Las células

enteras y los restos celulares (fragmentos de células, orgánulos celulares, coloides, lípidos) deben ser eliminados antes de la purificación de proteínas aguas abajo (downstream). Esto protege las etapas costosas y altamente sensibles del proceso downstream tales como diafiltración, ultrafiltración y cromatografía de proteínas.

La clarificación de los cultivos celulares implica una clarificación primaria para eliminar células enteras y restos de células grandes, seguida de una clarificación secundaria para eliminar las partículas más finas que pueden bloquear los costosos sistemas de cromatografía.

CLARIFICACIÓN DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS EN EL LABORATORIO: ESCENARIO ACTUAL Y PROBLEMAS

La clarificación a escala de laboratorio de los cultivos celulares es cada vez más difícil ya que las técnicas de clarificación estándar tales como centrifugación, filtración de flujo tangencial (TFF) y la filtración de profundidad no son fácilmente adaptables a pequeños/micro biorreactores, que requieren el procesamiento múltiple de pequeños volúmenes de cultivos celulares, normalmente entre 50



'La centrifugación es un proceso lento y complicado'

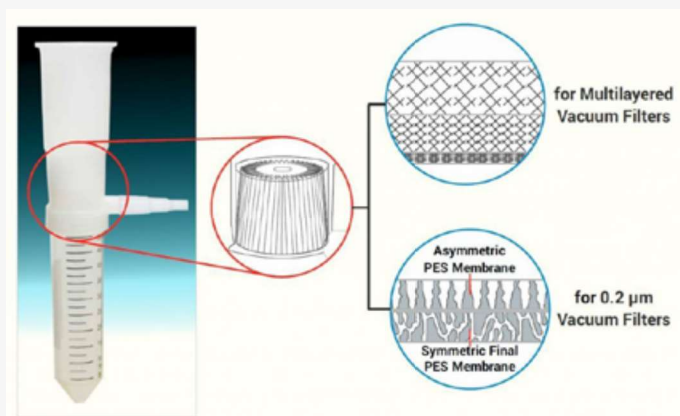


Figura 1.

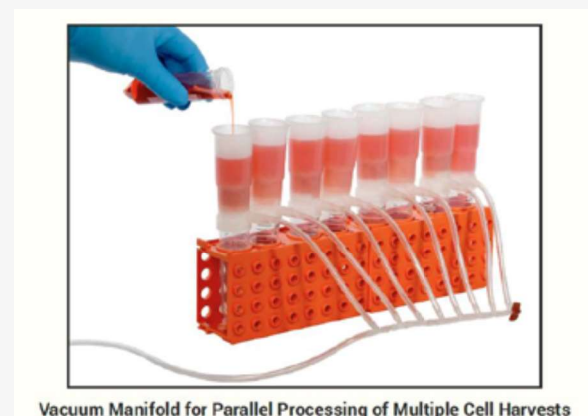


Figura 2.

mL y 1 L. La centrifugación puede dañar las sensibles células de mamífero y no sólo liberar proteínas intracelulares indeseables y ADN en el caldo de cultivo, sino también partículas submicrónicas difíciles de eliminar.

Los sistemas de Filtración de Flujo Tangencial requieren de un largo tiempo de preparación y son excesivamente caros para los volúmenes con los que se trabaja a escala de laboratorio. Por otra parte, los filtros de profundidad requieren la monitorización del diferencial de presión y a veces permiten el paso de restos celulares y otras partículas finas que tienden a colmatar los filtros de grado esterilizante 0,2 μm aguas abajo. Además, estos requieren enjuagarse antes del uso para eliminar los extractables inherentes en ellos debido a su matriz celulósica con coadyuvantes de filtración inorgánicos tales como tierra de diatomeas o perlita.

Además de las limitaciones anteriores, todos los pasos mencionados también requieren de clarificación secundaria downstream para retener los contaminantes más finos. Esto implica filtros de profundidad con alta eficiencia de retención en serie seguidos de una filtración final con una membrana, resultado, un proceso engorroso de varios pasos que incluye bombas, tubos, conexiones múltiples y recipientes de recolección, que requieren una gran cantidad de manipulación y un tiempo de proceso prolongado.

Estos problemas exigen un método más rápido, rentable y fiable para las clarificaciones primaria y secundaria en el laboratorio, especialmente de los cultivos celulares que van desde unos pocos mL hasta 1 L.

SOLUCIÓN

Se han desarrollado dispositivos de filtración al vacío multicapa, miniaturizados y altamente eficientes para el

procesamiento en paralelo de múltiples cultivos de células provenientes de microbiorreactores. Estos están diseñados para ofrecer clarificación primaria y secundaria de hasta 50 mL de cultivo de células de mamífero en cuestión de minutos. Estos dispositivos alojan un filtro de cartucho plisado de gran superficie filtrante integrado en el embudo que encaja en el cuello del tubo receptor para la clarificación de cultivos con alta densidad celular.

DISEÑO DEL ESTUDIO Y OBJETIVO

Para establecer la eficacia de los filtros de vacío de gran superficie y pequeño volumen para clarificación de cultivos celulares a escala de laboratorio.

1. Se realizaron estudios de clarificación de cultivos celulares con:
 - a. Dispositivos filtrantes:
 - Embudo mini recolector con 60 cm^2 de superficie filtrante efectiva (EFA), multicapa de gran superficie y pequeño volumen para filtración al vacío.
 - Mini filtros de vacío 0,2 μm con 100 cm^2 EFA para clarificación secundaria

Los dispositivos anteriores están validados para niveles de Endotoxina Bacteriana de <0.25 EU/mL sin cambios en pH y conductividad.

- b. Recolección de células CHO de alta densidad celular y baja viabilidad con el fin de garantizar un alto perfil de contaminación de células enteras, restos celulares, orgánulos, lípidos y coloides.
2. Los resultados se compararon con la centrifugación utilizada para la clarificación primaria, con respecto al tiempo de preparación, tiempo de proceso y concentración de proteína en el recolectado centrifugado/filtrado.

Clarification of 50 mL Cell Harvests from Multiple Micro-bioreactors

Cell	Cell Density	Cell Viability
CHO	6 X 10 ⁶ cells/mL	80 %

Comparison with Centrifugation

	Mini Vacuum Filtration Devices	Centrifugation
Setup time	3-5 minutes	10-15 minutes
Primary Clarification time	3 minutes	30 minutes
Secondary Clarification (0.2µm)	2 minutes	3 minutes
Total Time	10 minutes	48 minutes
Protein Titer after Clarification	120 µg/mL	110 µg/mL

Primary Clarification of CHO cell harvest with Harvester Mini Funnel

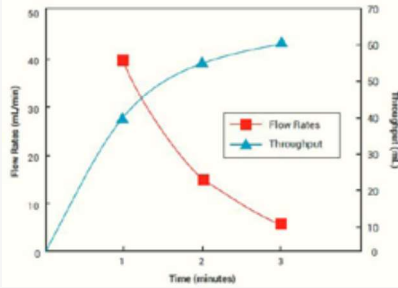


Figura 3.

0.2 µm Filtration after Primary Clarification with Harvester Mini Funnel

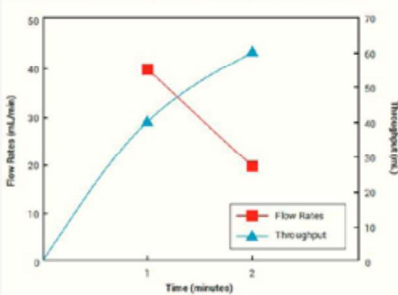


Figura 4.

Cell	Cell Density	Cell Viability	Filtered Volume
HEK	5.2 X 10 ⁶ cells/mL	90 %	1000 mL
CHO	6 X 10 ⁶ cells/mL	80 %	700 mL

Figura 5.

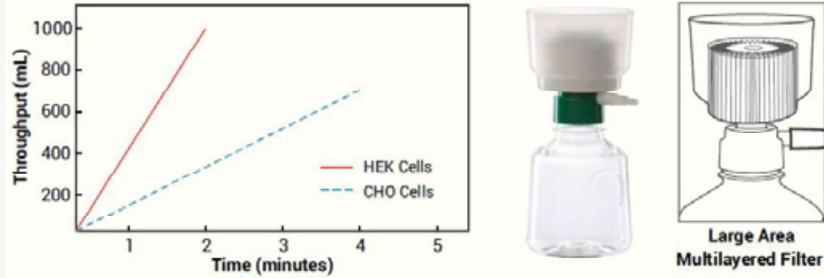


Figura 6.

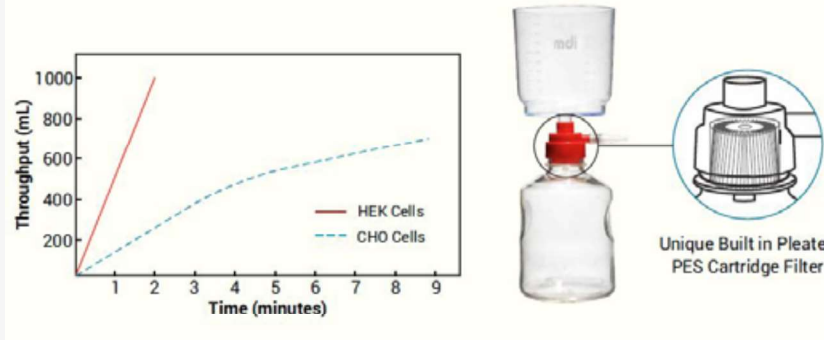


Figura 7.

- Se llevaron a cabo estudios a escala de hasta 1 L de cultivos celulares con dispositivos de filtración al vacío con mayor superficie filtrante.

RESULTADOS OBTENIDOS

CLARIFICACIÓN DE LA COSECHA DE CÉLULAS HASTA 1L

Se utilizaron filtros de vacío con una gran superficie filtrante efectiva para la clarificación de cultivos de células de riñón embrionario humano (HEK) y de ovario de hámster chino (CHO).

Los datos obtenidos se muestran en la figura 5.

El Cultivo celular HEK se filtró a través del *Harvester funnel* (400 cm² EFA) en 2 minutos y el de células de CHO en 4 minutos.

El filtrado del cultivo de células HEK fue bastante claro. Sin embargo, se observaron restos celulares en el cultivo de células CHO después de filtrar 600 ml.

Harvester Funnel: Clarificación primaria

Se filtraron 1000 mL del cultivo celular HEK (después de la clarificación primaria) con el dispositivo *AseptiVac KS 0.2 µm* en un tiempo de solo 2 minutos, y por otro lado se filtraron 700 mL de células de CHO en 9 minutos.

AseptiVac KS 0.2 µm: Clarificación secundaria

La diferencia en el tiempo de filtración se debió a las diferencias en la carga de contaminante de los dos cultivos celular. El cultivo de células HEK con mayor viabilidad celular (90%) tenía menos restos celulares en comparación con el cultivo de células CHO con un 80% de viabilidad celular.

CONCLUSIÓN

- Los mini dispositivos de filtración al vacío muestran una reducción importante en el tiempo de proceso sobre la centrifugación sin ningún impacto en la concentración de la proteína de interés.
- Se ha demostrado un fácil escalado de la clarificación sin centrifugación hasta llegar a 1 L de cultivo celular con los *Harvester Funnels* y *AseptiVac KS 0.2 µm*