

# Influência de Meios de Cultivo Comerciais na Produção Laboratorial de Prolactina Humana Sintetizada por Células CHO Cultivadas em Suspensão

Fernanda dos Santos Arthuso<sup>1</sup>, Miriam Fussae Suzuki<sup>1</sup>, José Maria Souza<sup>1</sup>, João Ezequiel Oliveira<sup>1</sup>, Marcos Vinicius Nucci Capone<sup>1</sup>, Paolo Bartolini<sup>1</sup> e Carlos Roberto Jorge Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP – Centro de Biotecnologia  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Butantã - 05508-000 São Paulo – SP - E-mail: [crsoares@ipen.br](mailto:crsoares@ipen.br)

## RESUMO

*O Grupo de Hormônios do Centro de Biotecnologia do IPEN desenvolveu várias linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO) modificadas geneticamente e comprovadamente eficientes na expressão de proteínas heterólogas, dentre as quais a prolactina humana (hPRL) que também foi adaptada para o crescimento em suspensão. Nesse trabalho realizamos estudos comparativos entre diferentes meios de cultivo:  $\alpha$ -MEM; CHO-S-SFM II e Select CHO, utilizamos a linhagem CHO-hPRL cultivada em suspensão, em frascos "spinner". O meio  $\alpha$ -MEM teve um desempenho bem inferior, não conseguindo manter a produção por mais de quatro dias, o meio CHO-S-SFM II apresentou os melhores valores: produtividade volumétrica de 4,7 $\mu$ g/mL, produtividade específica de 2,3 $\mu$ g/10<sup>6</sup> céls/dia e concentração celular média após 24 horas de cada coleta de 2,0x10<sup>6</sup> céls/mL, contra 2,5 $\mu$ g/mL, 1,6 $\mu$ g/10<sup>6</sup> céls/dia e 1,5x10<sup>6</sup> céls/mL obtidos com o meio Select CHO, respectivamente. No entanto, com o meio Select CHO foi possível obter um produto com alto grau de pureza (>95%) já na primeira etapa de purificação.*

**Palavras-chave:** hPRL, CHO, crescimento em suspensão, Select CHO, CHO-S-SFM II.

## INTRODUÇÃO

As células CHO são as mais utilizadas para a síntese de biofármacos, especialmente para a obtenção de glicoproteínas terapêuticas de interesse farmacêutico (Ribela et al., 2006). O seu crescimento em suspensão apresenta um grande interesse industrial-farmacêutico, tanto pela facilidade de cultivo e ampliação de escala, como pela produtividade volumétrica, podendo atingir densidades celulares superiores a 4x10<sup>6</sup> células/mL, apresenta também outras vantagens econômicas, especialmente a eliminação de suplementos como o SFB, que além do alto custo, apresenta uma composição variável entre os lotes.

O nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma linhagem de células CHO modificada geneticamente capaz de sintetizar a prolactina humana (hPRL) (Soares et al., 2000). A hPRL, um hormônio proteico primariamente secretado pela glândula hipofisária anterior, é conhecida principalmente por estimular o desenvolvimento da glândula mamária e a lactação e possui importante aplicação diagnóstica (Morganti et al., 1998).

Após a adaptação dessa linhagem ao crescimento em suspensão e estabelecer um protocolo de produção em "spinner" com coletas diárias de meio, resolvemos utilizar esse modelo de produção para analisar a influência do meio de cultivo na produção da

hPRL. Utilizamos três meios de cultura: o  $\alpha$ -MEM, um meio de baixo custo e relativamente pobre, que se mostrou útil no cultivo dessa mesma linhagem aderida em placas; o meio CHO-S-SFM II, um meio comercial (*serum-free medium*) utilizado em cultivo de células CHO em suspensão e por fim o meio Select CHO, um outro meio comercial, porém livre de proteínas na sua composição.

O objetivo desse estudo foi analisar a influência de cada meio na produção laboratorial da hPRL, foram avaliados parâmetros como: produtividade volumétrica, produtividade específica, crescimento celular e pureza.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Linhagem celular** - Para a produção de hPRL, foi utilizada uma linhagem de células CHO, transfectadas com o vetor pEDdc-hPRL (Soares et al., 2000) adaptadas para o crescimento em suspensão na ausência de soro.

**Sistema de cultivo** - Criamos um *Seed Bank* de células CHO-hPRL adaptadas ao crescimento em suspensão, cada criotubo contendo  $12,5 \times 10^6$  células em 1 mL de meio. Realizamos os estudos de crescimento e expressão em frascos "spinner", com capacidade nominal de 250 mL, ressuspendendo o conteúdo de um criotubo em 50 mL de meio, portanto com uma concentração celular inicial de aproximadamente 250.000 céls/mL, incubada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e agitação de 80 RPM. Foram comparados 3 meios de cultura:  $\alpha$ -MEM (Gibco/Invitrogen), Select CHO (Becton Dickinson and Company) e CHO-S-SFM II (Gibco/Invitrogen). Quando atingido uma concentração celular superior a  $1 \times 10^6$  células/mL de meio iniciamos a produção laboratorial. O meio condicionado foi totalmente substituído após centrifugação e a concentração celular ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL. Esse procedimento foi repetido a cada 24 horas, durante todo o processo de produção, com coletas diárias de 50 mL. Foram separadas amostras de 1 mL de cada coleta para análises por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Soares et al., 2002), SDS-PAGE e Western Blotting.

**Purificação da proteína** - Foi realizada com base em protocolos de purificação protéica utilizando as técnicas cromatográficas: troca catiônica (SP-Sepharose FF) e exclusão molecular (Sephacryl S-100 HR) (Soares et al., 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 temos um exemplo de análise por RP-HPLC dos meios de cultura antes de serem utilizados. Observamos que apresentam perfil cromatográfico similar e que, na região próxima da eluição da hPRL, ocorrem picos largos de eluição que precisam ser considerados para uma quantificação mais exata da hPRL.

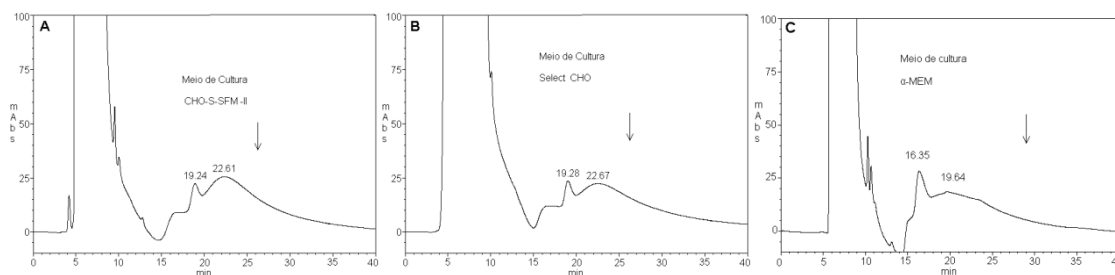
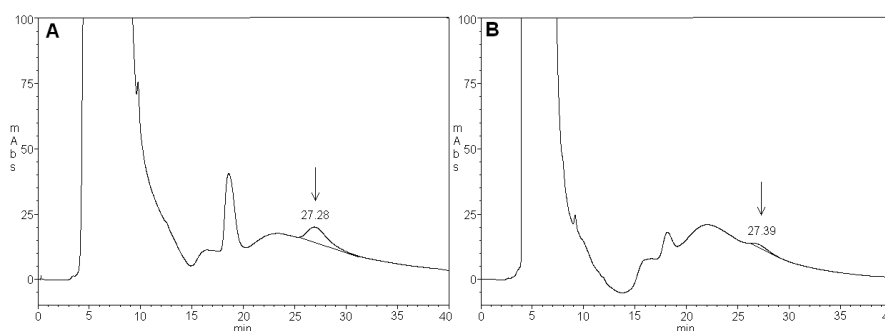


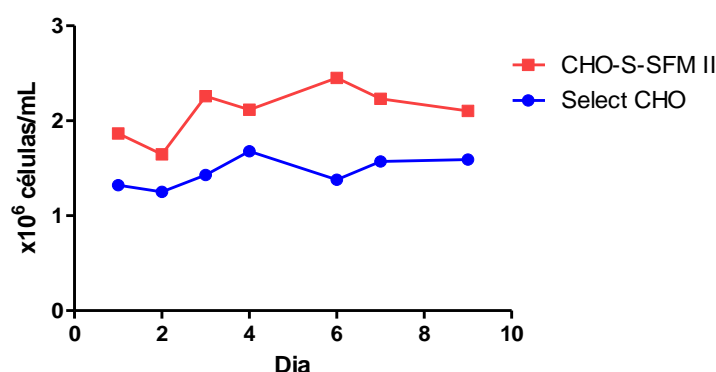
Figura 1: (A, B e C) Exemplo de análise por RP-HPLC dos meios de cultivo (500 $\mu$ L) Select CHO, CHO-S-SFM II e  $\alpha$ -MEM, respectivamente, antes de serem utilizados para o cultivo celular. A seta indica o tempo de retenção ( $t_r$ ) da hPRL de referência.

O meio de cultivo  $\alpha$ -MEM apresentou resultados insatisfatórios de produtividade e viabilidade celular (Fig. 2). A produtividade volumétrica caiu de 0,78  $\mu\text{g}$  hPRL/mL (segundo dia) para 0,14  $\mu\text{g}$  hPRL/mL (quarto dia). O cultivo utilizando esse meio durou apenas quatro dias.



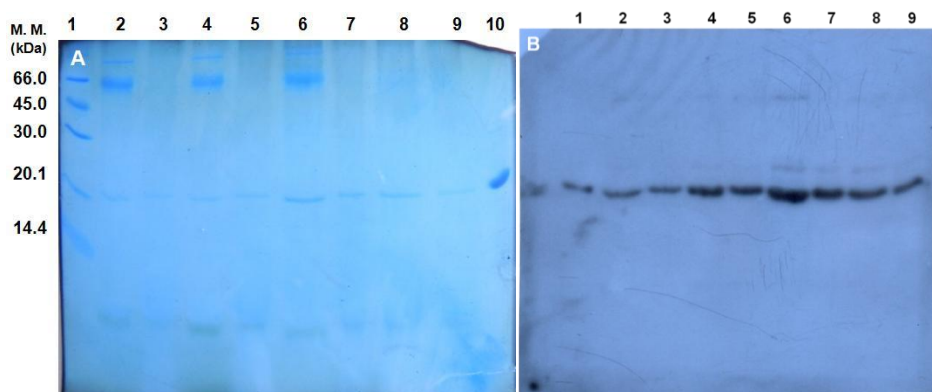
**FIGURA 2:** (A e B) Exemplos de análise por RP-HPLC de 500 $\mu\text{L}$  de meio de cultivo  $\alpha$ -MEM condicionado do segundo e quarto dia de produção, com  $0,94 \times 10^6$  e  $0,43 \times 10^6$  céls viáveis/mL, respectivamente. A seta indica a posição da hPRL.

A comparação do crescimento celular com os meios de cultivo Select CHO e CHO-S-SFM II é apresentada na Figura 3. O meio de cultivo CHO-S-SFM II foi o que apresentou melhor desempenho, aproximadamente 25% superior.



**Figura 3:** Comparação entre os crescimentos celulares utilizando o meio de cultivo CHO-S-SFM II e Select CHO. Após cada 24 h de cultivo, 50 mL (100%) do meio foi trocado e o número de células ajustado para  $1 \times 10^6$  céls/mL.

A comparação da produtividade volumétrica diária de hPRL foi avaliada diretamente no meio de cultura por SDS-PAGE e Western Blotting (Fig. 4A e B). Verificamos pelo SDS-PAGE que o meio Select CHO apresentou menos proteínas contaminantes com alta massa molecular, um fator importante que deve ser considerado quando se pensa na purificação das proteínas de interesse. Já pelo WB, verificamos que a produção utilizando o meio CHO-S-SFM II foi maior, o que pode em parte ser explicada pelo número de células que sempre foi superior com esse meio. A quantificação mais precisa da hPRL foi realizada por RP-HPLC, comparado-se as áreas correspondentes ao pico de eluição da hPRL do meio de cultura (500 $\mu\text{L}$ ) com a área do padrão de hPRL, cuja a concentração é conhecida. A produtividade específica média, calculada a partir de várias coletas, confirmou que a maior produtividade foi obtida com o meio CHO-S-SFM II, como pode ser observado na Tabela 1.



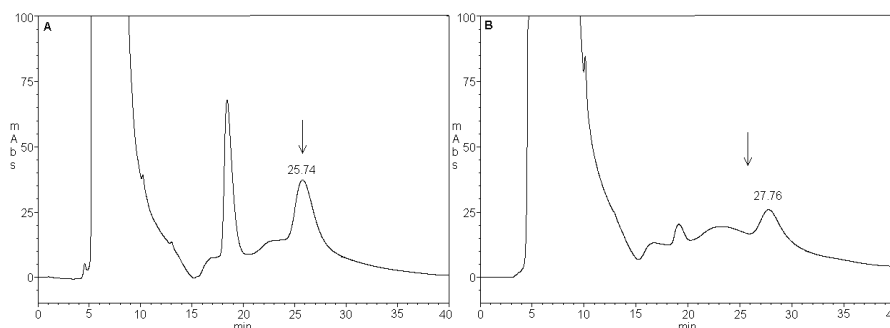
**FIGURA 4:** (A) Análise mediante SDS-PAGE, em condições não redutoras, de coletas de diferentes dias da produção, comparando o meio de cultivo CHO-S-SFM II com o Select CHO. (1) marcador de massa molecular (M.M.); (2, 4, 6) meio condicionado CHO-S-SFM II 2°, 5°, 10° dia, respectivamente; (3, 5, 7) meio condicionado Select CHO 2°, 5°, 10° dia, respectivamente; (8 e 9) meio condicionado Select CHO após 18 e 19 dias de cultivo; (10) padrão de hPRL. (B) Análise por W.B das mesmas amostras utilizadas no SDS-PAGE. (1) padrão de hPRL.

**TABELA 1:** Comparação entre os meios de cultivo CHO-S-SFM II e Select CHO

	CHO-S-SFM II		Select CHO	
	hPRL ± CV (%)	n	hPRL ± CV (%)	n
Produtividade volumétrica (µg/mL)	4,72 ± 20,55	3	2,53 ± 30,19	5
Produtividade específica (µg/x10 <sup>6</sup> céls/dia)	2,31 ± 4,54	3	1,62 ± 20,00	5
céls/mL após 24 h (x10 <sup>6</sup> céls/mL)	2,03 ± 12,84	10	1,54 ± 14,29	10

n= número de amostras (coletas em diferentes dias)

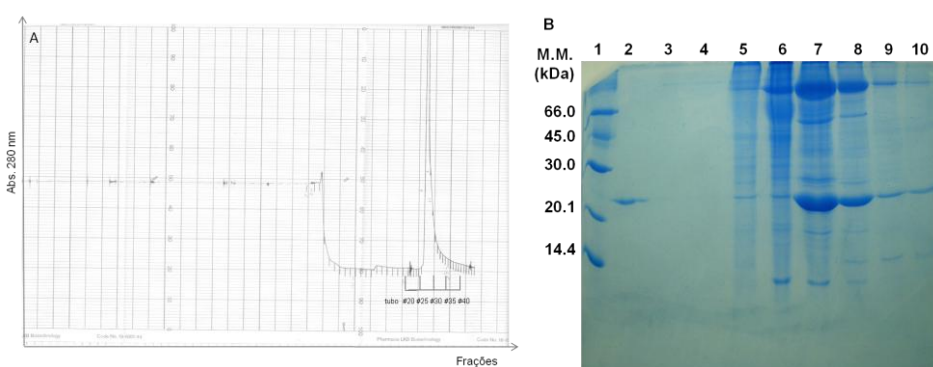
Na Figura 5 temos exemplos de análises por RP-HPLC de meio de cultivo condicionado coletado durante os dias do experimento, onde mais uma vez o meio CHO-S-SFM II apresentou melhor resultado, com produtividade volumétrica e específica maior.



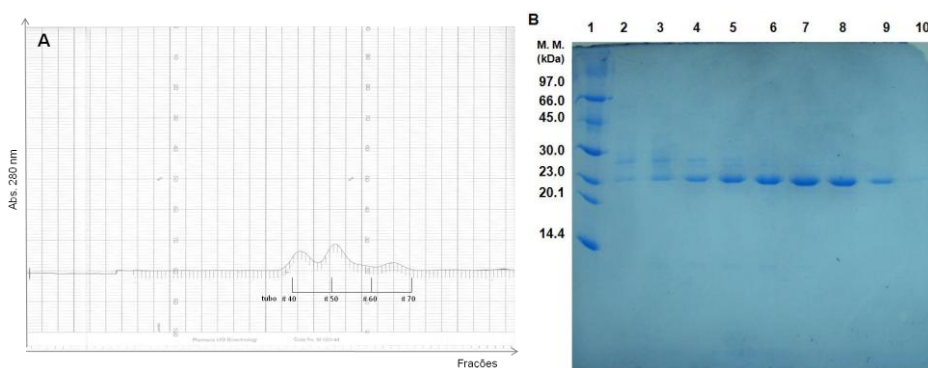
**FIGURA 5:** (A e B) Exemplos de análises por RP-HPLC de 500µL de meio de cultivo CHO-S-SFM II e Select CHO, respectivamente. As amostras correspondem ao quarto dia de coleta. As respectivas produções volumétricas de hPRL foram de 4,7µg/mL e 2,3µg/mL, com produtividades específicas de 2,22µg/10<sup>6</sup>cél/dia e 1,37µg/10<sup>6</sup>cél/dia. As setas indicam o t<sub>R</sub> correspondente à hPRL do padrão de referência (P35).

Na Figura 5, verificamos também que durante a análise por RP-HPLC do meio de cultivo condicionado Select CHO, a hPRL apresentou um tempo de retenção aproximadamente 2 minutos maior que o do padrão, provavelmente devido à influência dos componentes presentes nesse meio de cultivo, pois a análise por RP-HPLC da hPRL purificada a partir desse meio apresentou  $t_R$  idêntico ao do padrão.

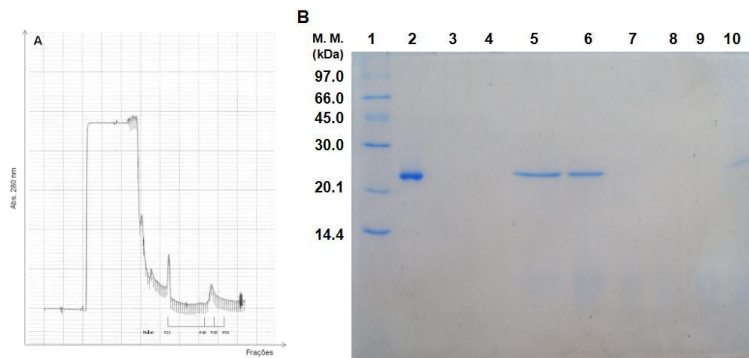
A purificação da hPRL a partir do meio de cultivo CHO-S-SFM II foi realizada em duas etapas. Na primeira foi utilizado uma coluna cromatográfica do tipo catiônica (SP-Sepharose Fast Flow) cujo perfil cromatográfico e o SDS-PAGE é apresentado na Figura 6, a fração correspondente a hPRL coletada da coluna SP-Sepharose Fast Flow por sua vez foi aplicada em uma coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 High Resolution e também analisada por SDS-PAGE (Fig. 7). Por outro lado, a purificação da hPRL a partir do meio de cultivo Select CHO necessitou apenas da primeira etapa, pois a proteína foi eluída praticamente pura, como podemos observar na Figura 8.



**FIGURA 6:** (A) Perfil cromatográfico obtido do meio condicionado aplicado na coluna SP-Sepharose Fast Flow, o pico correspondente à eluição da hPRL, entre os tubos #27 e #34 foi confirmado por SDS-PAGE. (B), (1) Marcador de massa molecular; (2) padrão interno de hPRL P35; (3) #25; (4) #26; (5) #27; (6) #28; (7) #29; (8) #30; (9) #32; (10) #34.



**FIGURA 7:** (A) Perfil cromatográfico obtido da fração coletada da coluna SP-Sepharose Fast Flow e aplicado na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 High Resolution. O pico principal, correspondente à eluição da hPRL, entre os tubos #60 e #70 foi confirmando por SDS-PAGE. (B), (1) Marcador de massa molecular e padrão interno de hPRL P35; (2) #60; (3) #61; (4) #62; (5) #63; (6) #64; (7) #65; (8) #67; (9) #69; (10) #71.



**FIGURA 8:** (A) Perfil cromatográfico obtido do meio condicionado aplicado na coluna com resina SP-Sepharose Fast Flow, o pico correspondente à eluição da hPRL foi confirmado por SDS-PAGE. (B), (1) Marcador de massa molecular; (2) padrão de referência interno de hPRL P35; (3) fração #41; (4) fração #42; (5) fração #43; (6) fração #44; (7) fração #45; (8) fração #46; (9) fração #47; (10) fração #21.

## CONCLUSÕES

O estudo comparativo entre os meios de cultura  $\alpha$ -MEM, Select-CHO e CHO-SFM II, mostrou que o meio  $\alpha$ -MEM, provavelmente por ser um meio deficiente em nutrientes, não foi capaz de manter o crescimento celular nos *spinners*, diferentemente do que ocorreu quando utilizado para produção em placas de cultura (Heller *et al.*, 2010; Rodrigues Goulart *et al.*, 2010) com expressões de 1 $\mu$ g de hPRL/mL de meio. O meio de cultivo Select CHO quando comparado ao meio CHO-S-SFM II, mostrou-se menos eficiente com relação ao crescimento celular e produtividade. Contudo, esse meio de cultivo apresentou uma grande vantagem, pois como possui menos proteínas na sua composição, apresentou um processo de purificação mais fácil, rápido e possivelmente com melhores rendimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Heller, S.R., Rodrigues Goulart, H., Arthuso, F.S., Oliveira, T.L., Bartolini, P., Soares, C.R., (2010), Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactin (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. *Journal of Biotechnology*, v.145, p.334-340.
- Morganti, L., Soares, C.R.J., Affonso, R., Gout, P.W., Bartolini, P., (1998), Synthesis and characterization of recombinant, authentic human prolactin secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.27, p.63-70.
- Ribela, M.T.C.P., Gout, P.W., Oliveira, J.E., Bartolini, P., (2006), HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. *Current Pharmaceutical Analysis*, v.2, p.103-126.
- Rodrigues Goulart, H., Arthuso F, S., Capone, M.V., de Oliveira, T.L., Bartolini, P., Soares, C.R., (2010), Enhancement of human prolactin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Soares, C.R., Morganti, L., Miloux, B., Lupker, J.H., Ferrara, P., Bartolini, P., (2000), High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.32, p.127-135.
- Soares, C.R., Camargo, I.M., Morganti, L., Gimbo, E., Oliveira, J.E., Legoux, R., Ferrara, P., Bartolini, P., (2002), Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. *Journal of Chromatography A*, v.955, p.229-236.