

# Produção em Escala Laboratorial de Prolactina Humana em Células CHO Adaptadas para o Crescimento em Suspensão

Fernanda dos Santos Arthuso<sup>1</sup>, Miriam Fussae Suzuki<sup>1</sup>, Herbert Rodrigues Goulart<sup>1</sup>, José Maria Souza<sup>1</sup>, João Ezequiel Oliveira<sup>1</sup>, Renata Damiani<sup>1</sup>, Taís Lima Oliveira<sup>1</sup>, Marcos Vinícius 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 – 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 tem desenvolvido várias linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO) modificadas geneticamente e comprovadamente eficientes na expressão de proteínas heterólogas, dentre elas a prolactina humana (hPRL). No entanto, todas as nossas linhagens são cultivadas aderidas e dependentes da presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo para um crescimento eficiente. Nesse trabalho foi realizada a adaptação da nossa linhagem produtora de hPRL para o crescimento em suspensão e na ausência de SFB. As células em suspensão apresentam um grande interesse industrial-farmacêutico, tanto pela facilidade de cultivo e ampliação de escala, como pela produtividade volumétrica. Os estudos para adaptação dessas células foram realizados com base no protocolo descrito por Sinacore e colaboradores (2000). Desta forma foi realizada uma produção laboratorial de hPRL em frascos "spinner" por 30 dias consecutivos, assim com, a sua purificação e caracterização.*

**Palavras-chave:** hPRL, células CHO, crescimento em suspensão.

## INTRODUÇÃO

A hPRL, um hormônio proteico primariamente secretado pela glândula hipofisária anterior, é conhecida principalmente por estimular o desenvolvimento da glândula mamária e a lactação (Riddle *et al.*, 1933). Possui ação direta no controle do ciclo celular, na promoção da diferenciação e da apoptose (Walker, 2001 e 2007). Dados da literatura indicam o potencial uso clínico da hPRL após transplante de medula óssea, por estimular a hematopoiese e a recuperação imune, ou na reversão da mielossupressão induzida por azidotimidina ou por terapias mielo-ablativas (Woody *et al.*, 1999). Estudos indicam também sua potencial aplicação como agente imunoterápico nos casos de infecção por HIV e outras possíveis aplicações clínicas ainda estão em fase de estudo (Soares *et al.*, 2000 e 2006). Evidências como a secreção e a ação local da hPRL (efeito autócrino/parócrino) relacionam este hormônio com o desenvolvimento de câncer de mama e de próstata (Ginsburg e Vonderhaar, 1995; Reynolds *et al.*, 1997; Llovera *et al.*, 2000).

Células cultivadas em laboratório possuem diferentes exigências daquelas encontradas quando integradas a um organismo vivo. Estas exigências, fundamentais para a sobrevivência celular, também diferem de célula para célula, conforme a espécie animal que a originou, os tecidos de origem ou o grau de adaptação destas células em cultura. Basicamente, existem dois métodos para o cultivo de células: o que utiliza células que necessitam de um suporte para crescimento e o que utiliza células não aderentes, ou seja, que crescem em suspensão.

Como descrito por Sinacore e colaboradores (2000), algumas células têm a capacidade de se multiplicar em suspensão (não aderidas a suportes), proporcionando o estabelecimento de bioprocessos simplificados e de menor custo. Tipos celulares como as células CHO, utilizadas neste trabalho, originalmente dependem de adesão para seu crescimento, mas segundo Sinacore e colaboradores (2000), estas podem ser adaptadas ao crescimento em suspensão.

Células cultivadas em suspensão apresentam um grande interesse industrial-farmacêutico, tanto pela facilidade de cultivo e ampliação de escala, como pela produtividade volumétrica, podendo atingir densidades celulares superiores a  $4 \times 10^6$  células/mL. O cultivo em suspensão dessas células apresenta uma série de vantagens econômicas, especialmente a eliminação de reagentes de alto custo, como o SFB que apresenta uma composição variável entre os lotes.

As células CHO são as mais utilizadas para a síntese de biofármacos, especialmente para a obtenção de glicoproteínas terapêuticas de interesse farmacêutico, como recentemente revisado pelo nosso grupo de pesquisa do Centro de Biotecnologia do IPEN (Ribela *et al.*, 2003). Essas células são consideradas geneticamente estáveis e relativamente seguras quanto à contaminação por agentes infecciosos e patogênicos.

Os objetivos deste trabalho foram: a) adaptação da linhagem celular produtora de hPRL para o crescimento em suspensão na ausência de SFB; b) estudar processos de produção por longos períodos (30 dias); c) realizar uma produção laboratorial a partir do cultivo em frascos "spinner" seguido de purificação e caracterização da hPRL.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Linhagem celular** - Para a produção de hPRL, foi utilizada uma linhagem de células CHO, dependentes de ancoragem, CHO-hPRL (Soares *et al.*, 2000).

**Adaptação ao crescimento em suspensão** - Inicialmente, as células CHO cultivadas aderidas em placas foram adaptadas ao crescimento em "serum free medium" substituindo-se gradualmente o meio original  $\alpha$ -MEM por CHO-SFM II (Invitrogen). Durante essa etapa o cultivo foi realizado na presença de 10% de soro fetal bovino (SFB). Duas passagens após a adaptação ao meio CHO-SFM-II, o SFB foi retirado gradualmente até sua completa eliminação. A seguir, as células foram ressuspensas utilizando-se tripsina e cultivadas em suspensão, em meio CHO-SFM II sem SFB, ainda em placas. Após obtenção de biomassa suficiente iniciou-se o cultivo em frasco "spinner": 50 mL de meio com  $\sim 200.000$  cél/mL e com agitação de 50 a 60 RPM, 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ . A concentração celular foi mantida entre  $2 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  céls/mL e quando o tempo de duplicação celular ficou próximo a 24h, como observado no cultivo tradicional, a adaptação ao crescimento em suspensão foi considerada concluída.

**Produção Laboratorial** - A partir das células CHO-hPRL adaptadas ao crescimento em suspensão foram realizados estudos de crescimento e expressão em frascos "spinner", utilizando o meio CHO-S-SFM II. Foram comparados dois processos: **1)** Crescimento em "spinner" com capacidade nominal de 250 mL com troca diária de 100% do meio de cultivo, por 30 dias consecutivos, mantendo o número de células entre  $1 \times 10^6$  e  $3 \times 10^6$  células/mL de meio (volume de trabalho: 50 mL, incubação a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  a 60 RPM); **2)** Crescimento em "spinner", nas mesmas condições de cultivo antes mencionado, porém com a troca diária de 50% do meio de cultivo de um volume de trabalho de 100 mL. Nessas condições o número de células se manteve entre  $0,4 \times 10^6$  e  $1,2 \times 10^6$  células/mL de meio. Foram separadas frações das coletas diárias para análises por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Soares, 2002), SDS-PAGE e Western Blotting.

**Purificação da proteína** - Foi realizada com base em protocolos de purificação protéica, já em uso no laboratório, seguindo técnicas cromatográficas convencionais (Soares *et al.*, 2006).

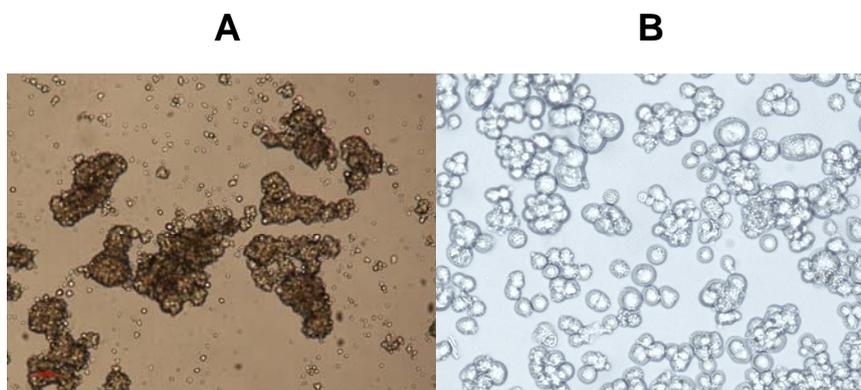
**Atividade biológica** - Foi determinada através de bioensaios de proliferação celular: um com células de linfoma de rato, Nb2 (Tanaka *et al.*, 1980), e outro com células de camundongo pro-B Ba/F<sub>3</sub>-LLP. Essa última linhagem foi transfectada com um plasmídeo que codifica o receptor de hPRL (Glezer *et al.*, 2006).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

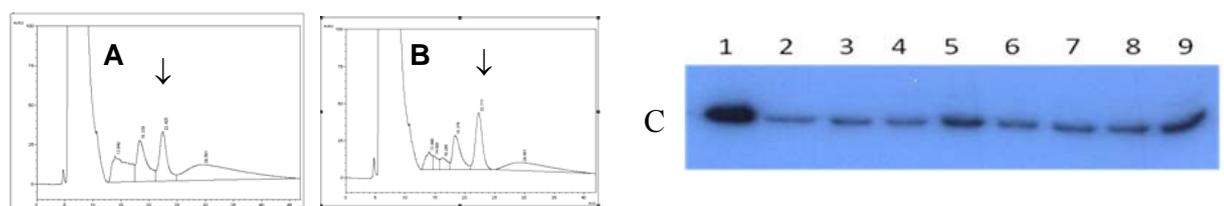
A linhagem CHO-hPRL, apresentou uma adaptação rápida e relativamente fácil. Células ainda aderidas e cultivadas em placas foram adaptadas com o meio "free serum" CHO-S-SFM II. Após a retirada gradual do SFB as células foram inicialmente cultivadas em suspensão, em placa de cultivo, portanto em condições estáticas. Essa estratégia original mostrou-se eficiente e após algumas passagens iniciou-se o cultivo em "spinner". Esse processo durou cerca de dois meses. As células apresentaram um crescimento otimizado com agitação entre 50 e 60 RPM, e os aglomerados de células, observados durante o cultivo em placas, praticamente foram eliminados (Figura I).

Realizamos dois experimentos de produção em paralelo, um com troca diária de 50% do meio de cultivo e o outro com 100%, durante 30 dias. Observamos que a produção de hPRL em ambos os experimentos se manteve constante na ordem de 5 µg/mL de meio de acordo com as análises por RP-HPLC e Western Blotting (Figura II).

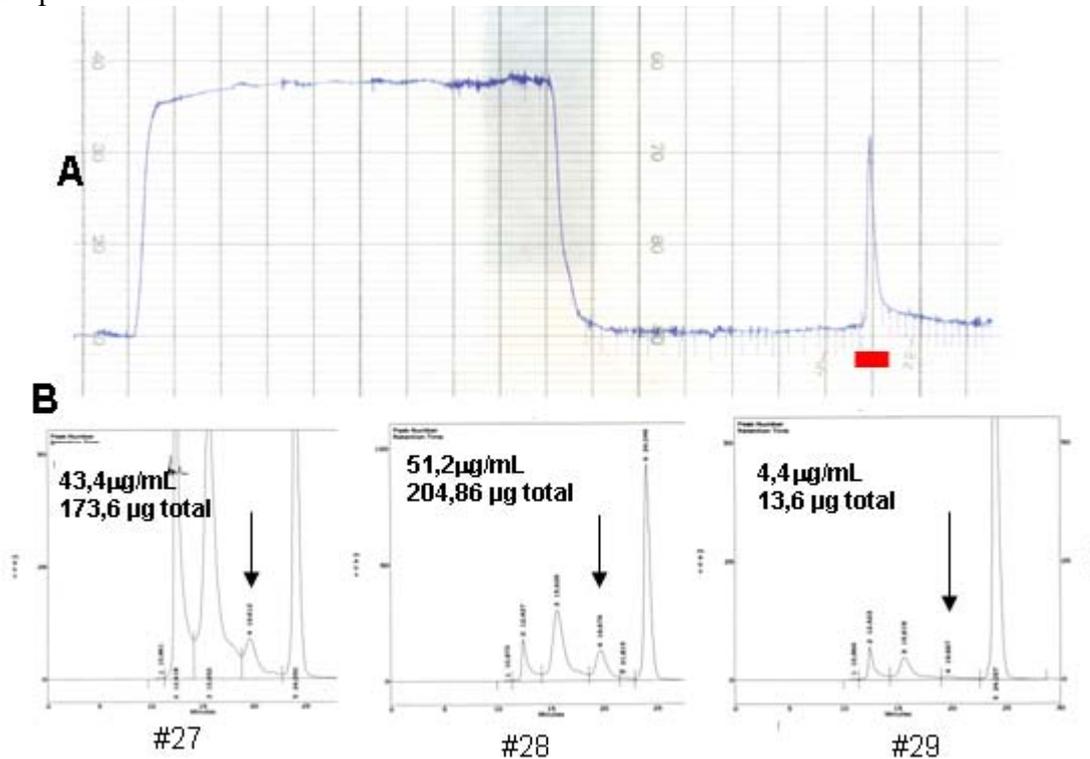
A purificação da hPRL ocorreu em duas etapas, o meio condicionado foi concentrado e a hPRL parcialmente purificada por uma cromatografia de troca catiônica (Figura III). A fração com melhor relação hPRL x pureza (#28) foi concentrada aproximadamente 8 vezes por centrifugação, utilizando sistema Millipore Amicon Ultra-4. Uma alíquota de 280 µL da amostra concentrada foi aplicada em cromatografia líquida de alto desempenho de exclusão molecular (HPSEC), utilizada desta vez como coluna preparativa (Figura IV). O pico de hPRL ( $T_R = 19,34$  min) foi coletado para caracterização físico-química por RP-HPLC e HPSEC (Figura V) e biológica, utilizando células cuja proliferação é dependente da hPRL (Figura VI).



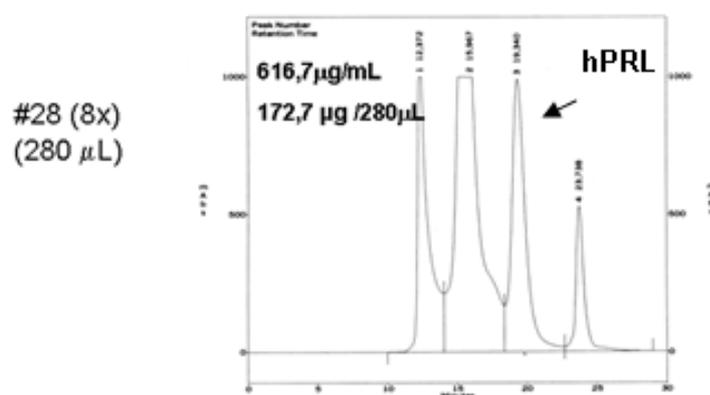
**Figura I:** Microscopia óptica de células CHO-hPRL cultivadas em suspensão (cultivo estático), com aumento de 100 x (A), e em "spinner" com agitação e utilização de "impeller", com aumento de 200 x (B).



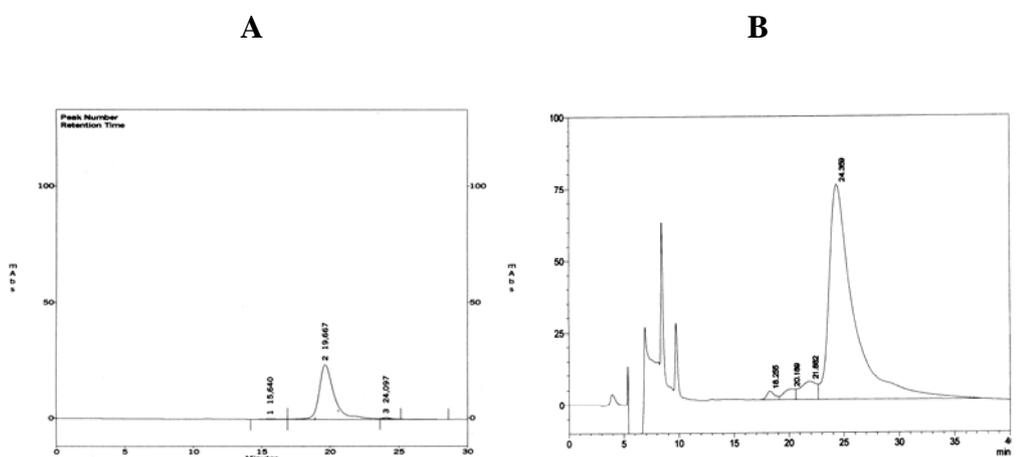
**Figura II:** A e B, exemplos de análise por RP-HPLC de meio de cultivo condicionado do experimento com troca de 50% e 100% de meio, respectivamente. As flechas indicam a posição da hPRL, de acordo com padrão de referência. C, Análise por Western Blotting (1) padrão de hPRL; (2 a 5) coletas relativas à troca de 50% do meio, após 1, 10, 20 e 30 dias, respectivamente; (6 a 9) coletas relativas à troca de 100% do meio, após 1, 10, 20 e 25 dias, respectivamente.



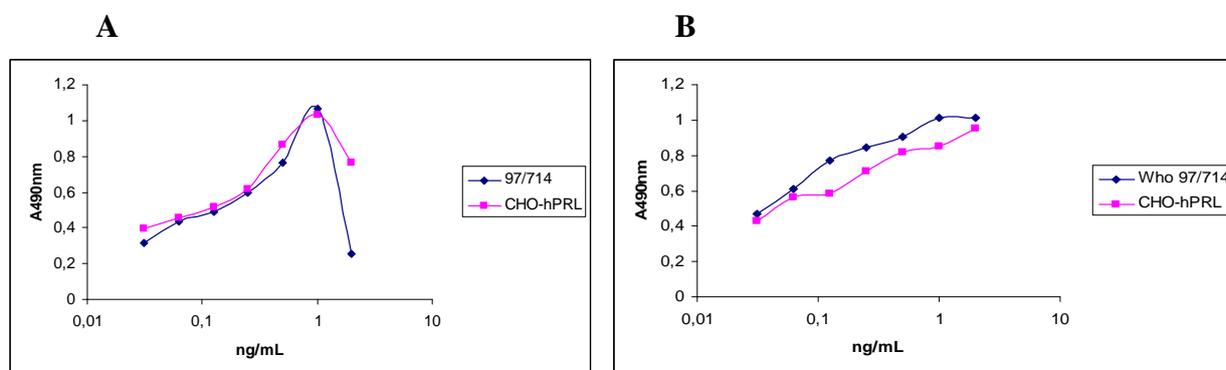
**Figura III:** A. Purificação por troca iônica em resina S-P Sepharose Fast Flow da hPRL presente no meio condicionado proveniente de cultivo em suspensão. B. Análise por HPSEC das diferentes frações do pico principal: #27, #28 e #29. As flechas indicam tempo de retenção ( $t_R$ ) do padrão de referência interno hPRL-IPEN, produzido a partir de *E. coli* e analisado nas mesmas condições.



**Figura IV:** HPSEC utilizada como coluna preparativa após a etapa de concentração da fração 28 (Figura II B) utilizando sistema Millipore Amicon Ultra-4. O pico correspondente à hPRL foi coletado e utilizado nos estudos de caracterização físico-química e biológica.



**Figura V:** Análise por HPSEC (A) e RP-HPLC (B) da hPRL purificada e obtida de células CHO em suspensão. A concentração de hPRL quantificada por HPSEC foi de 92,4  $\mu\text{g/mL}$  e por RP-HPLC de 84,6  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura VI:** Bioensaio *in vitro* baseado na proliferação de células Ba/F<sub>3</sub>-LLP (A) e Nb2 (B). Foram comparadas as curvas do padrão de hPRL recombinante (WHO 97/714) cuja potência é de  $57,2 \pm 11$  UI/mg, e a hPRL produzida e purificada por células CHO cultivadas em suspensão.

## CONCLUSÕES

O processo de adaptação das células CHO-hPRL em suspensão, realizando as primeiras etapas em placas de cultura foi eficiente, e com cerca de dois meses de cultivo as células estavam adaptadas para o início dos estudos de produção em "spinner". Os dois processos de produção laboratorial com troca de 50 e 100% do meio de cultivo foram igualmente eficientes, demonstrando que apenas com a troca de 50% do meio, não ocorreu comprometimento no crescimento celular e da expressão de hPRL. Esse fato é importante pois esse processo caracterizado por uma simples e prática reposição de 50% do meio é mais

fácil de ser aplicado em biorreatores, que operam com volumes bem maiores, minimizando os riscos de contaminação e mantendo uma produtividade diária constante e industrialmente interessante, como os ~5µg hPRL/mL de meio apresentados durante os 30 dias de estudo.

Os níveis de produção nos dois processos foram parecidos. Níveis mais altos obtidos com a troca de 100% do meio foram observados quando a concentração celular foi superior a  $3 \times 10^6$  células/mL, indicando uma relação direta do aumento de produtividade em consequência do aumento da concentração celular.

A análise da hPRL purificada por técnicas físico-químicas (RP-HPLC, HPSEC, SDS-PAGE e Western Blotting), e a análise da atividade biológica, demonstraram que o processo de produção em suspensão não alterou as características do produto final em comparação com os padrões de hPRL de referência interno e da WHO (WHO 97/714).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ginsburg, E. e Vonderhaar, B. K. (1995), Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Research*, v. 55, p. 2591-2595.
- Glezer, A.; Soares, C. R.; Vieira, J. G.; Giannella-Neto, D.; Ribela, M. T.; Goffin, V. e Bronstein, M. D. (2006), Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 91, p. 1048-1055.
- Llovera, M.; Pichard, C.; Bernichtein, S.; Jeay, S.; Touraine, P.; Kelly, P. A. e Goggin, V. (2000), Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*, v. 19, p. 4695-4705.
- Reynolds, C.; Montone, K. T.; Powell, C. M.; Tomaszewski, J. E. e Clevenger, C. (1997), Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinology*, v. 138, p. 5555-5560.
- Ribela, M. T. C. P.; Gout, P. W. e Bartolini, P. (2003), Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 285-316.
- Riddle, O.; Bates R. W. e Dykshorn, S. W. (1933), The preparation, identification and assay of prolactin – a hormone of the anterior pituitary. *American Journal of Physiology*, v. 105, p. 191-216.
- Sinacore, M. S.; Drapeu, D. e Adamson, S. R. (2000), Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Molecular Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 249-257.
- Soares, C. R. J.; Camargo, I. M. C.; Morganti, L.; Gimbo, E.; Oliveira, J. E.; Legoux, R.; Ferrara, P. e 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.
- Soares, C. R. J.; Glezer, A.; Okazaki, K.; Ueda, E. K.; Heller, S. R.; Walker, A. M.; Goffin, V. e Bartolini, P. (2006), Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Protein Expression and Purification*, v. 48, n. 2, p. 182-194.
- Soares, C. R. J.; Morganti, L.; Miloux, B.; Lupker, J. H.; Ferrara, P. e Bartolini, P. (2000), High level synthesis of human prolactin in Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 32, p. 127-135.
- Tanaka, T.; Shiu, R. P. C.; Gout, P. W.; Beer, C. T.; Noble, R. L. e Friesen, H. G. (1980), A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 51, n. 5, p. 1058-63.
- Walker, A. M. (2007), S179D prolactin: antagonistic agony! *Molecular and Cellular Endocrinology*, 276:1-9.
- Walker, A. M. (2001), Unmodified and phosphorylated prolactin and gamma delta T cell development and function. *Lupus*, v. 10, n. 10, p. 735-741.
- Woody, M. A.; Welniak, L. A.; Richards, S.; Taub, D. D.; Tian, Z.; Sun, R.; Longo, D. L. e Murphy, W. J. (1999), Use of neuroendocrine hormone to promote reconstitution after bone marrow transplantation. *Neuroimmunomodulation*, v. 6, p. 69-80.