

## Optimización de estudios de escalado para procesos de producción de vacunas con células adherentes y microcarrier por medio de microbiorreactores



**Dr. Barney Zoro**

TAP Biosystems, Royston, Reino Unido

La tendencia al incremento en la producción de vacunas [1] viene determinada por la exigencia de crear vacunas profilácticas asequibles para su uso en mercados emergentes y nuevos tipos de vacunas terapéuticas que permitan tratar un abanico cada vez más amplio de enfermedades, incluyendo el cáncer. Estas motivaciones, unidas a la necesidad ya presente de producir con rapidez vacunas destinadas a la prevención de la gripe estacional y a la reacción frente a amenazas pandémicas, han llevado a investigar métodos de desarrollo rápido para optimizar la ampliación de escala en procesos de fabricación que cumplan las BPF actuales.

Las ventajas que ofrece el cultivo celular con respecto a la producción basada en huevos embrionados, como los menores tiempos de anticipación diagnóstica y la mayor flexibilidad del proceso, lo están convirtiendo en la opción preferida para la fabricación de numerosas vacunas [2].

Las líneas celulares usadas con mayor asiduidad en la producción de vacunas son Vero, epitelio de riñón canino Madin-Darby (MDCK), PER.C6 y células de insectos. Algunas de las líneas celulares utilizadas habitualmente, como Vero y MDCK, son adherentes, y su cultivo en suspensión no puede realizarse de manera adecuada en biorreactores [3]; por ello, en la actualidad tienen que propagarse a través de sistemas de botellas de cultivo rotatorias, en los cuales el control del proceso es limitado.

Este problema de productividad puede superarse mediante el anclaje de las células a un sustrato, como puede ser un microcarrier. Existe un gran interés en desarrollar vacunas mediante células adherentes y microcarrier, ya que permiten una buena propagación en biorreactores y proporcionan un mayor control del proceso, lo que a menudo favorece la producción de vacunas con un alto valor de anticuerpos en tiempos más breves [4, 5 y 6]. Además, los procesos que emplean microcarrier se consideran muy adecuados para la producción de vacunas de bajo coste a gran escala, con las que se pretende cubrir el notable incremento en la demanda derivado de los programas de vacunación masiva en países densamente poblados, como China e India.

Existe un problema técnico que evita una mayor adopción de cultivos con microcarrier en biorreactores, consistente en cómo simular con precisión las condiciones de estos para optimizar el crecimiento celular, la adherencia y la producción

de vacunas en cultivos de este tipo. Actualmente se emplean matraces de agitación y biorreactores de sobremesa para definir las condiciones óptimas de los medios, la alimentación y el bioprocesamiento [7]. Estos tipos de recipientes requieren una elevada cantidad de recursos y capital. Por otra parte, los productores de vacunas ven restringido el número de biorreactores de sobremesa que pueden utilizar en paralelo a causa de su escala, de los gastos asociados y de su limitado rendimiento. Lo habitual es que en recipientes de pequeño tamaño (2-10 l) solo puedan evaluar un pequeño número de parámetros. Por ello, el aumento finalmente alcanzable en la escala del proceso puede no resultar satisfactorio, lo cual afecta, por ejemplo, a los resultados de densidad celular y al valor de anticuerpos de la vacuna. Si fuese posible analizar un mayor número de parámetros en condiciones representativas del entorno del biorreactor, cabría la posibilidad de seleccionar el proceso óptimo de fabricación de las vacunas y ahorrar meses en los plazos de producción, además de reducir los costes de esta última.

La necesidad de llevar a cabo un importante número de experimentos de optimización de parámetros en las condiciones de los biorreactores de sobremesa ha llevado al desarrollo de tecnologías de cultivo de alto rendimiento en miniatura. El inconveniente que presentan muchos de estos métodos es su incapacidad para simular la agitación o el burbujeo de un biorreactor, de modo que la producción de microportadores uniformemente distribuidos y la realización del intercambio de medio pueden resultar problemáticos debido a la elevada tasa de sedimentación de los microcarrier.

En el presente artículo se discute cómo el cultivo con microcarrier mediante un sistema automatizado de biorreacto-

res a microescala permite la distribución uniforme de dichos microcarrier y un anclaje y propagación celulares adecuados, constituyendo un método de desarrollo mejorado para la producción de vacunas con células dependientes de anclaje.

### TECNOLOGÍA DE MICROBIORREACTORES AGITADOS

Cuando surgió la necesidad de imitar el mezclado de los biorreactores, TAP Biosystems (que en la actualidad forma parte de Sartorius) introdujo el sistema de microbiorreactores avanzado (ambr). Hoy en día, este sistema de microbiorreactores agitados y con burbujeo es una tecnología de uso asentado en la mejora de la producción de anticuerpos terapéuticos con cultivos de células derivadas de ovario de hámster chino (CHO, del inglés Chinese hamster ovary) [8]. Ello se debe a que el sistema ambr simula las características de los biorreactores de sobremesa, ofreciendo un mayor control del entorno y, por tanto, un rendimiento del cultivo más representativo que los matraces de agitación, y habiendo demostrado, además, ser una excelente herramienta para el desarrollo de procesos de alto rendimiento [8].

### DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROCARRIER

Un elemento clave en el éxito del sistema ambr como simulador potencial para la producción de vacunas mediante el uso de microcarrier es que los contenidos de los diferentes biorreactores desechables son agitados de manera individual por un impulsor interno, de modo que los científicos pueden comenzar a experimentar con muestras uniformes de microcarrier distribuidas automáticamente en los recipientes de los microbiorreactores utilizados para el cultivo celular, desde una «solución de partida» correctamente mezclada. Además, el sistema de pipeteo automatizado de ambr permite el intercambio de medio sin interrumpir la agitación, gracias al método automatizado de «decantación en la punta de la pipeta» desarrollado por TAP, que consiste en pipetear una muestra de microcarrier del biorreactor ambr y permitir que estos se decanten durante un periodo de tiempo de hasta tres minutos. A continuación, los microcarrier decantados se dispensan en el biorreactor y el medio utilizado se descarta (Figura 1). Este método permite alcanzar un 20% de intercambio de medio entre 24 biorreactores ambr en un periodo aproximado de cuatro horas, a cualquier hora del día o de la noche y sin intervención manual alguna. También puede emplearse el procedimiento convencional, en el que el usuario detiene la agitación, permite la decantación de los microportadores y retira y sustituye el medio (utilizando en este caso el sistema de pipeteo automatizado).

Para demostrar que el sistema ambr proporciona una adición uniforme de microcarrier a múltiples recipientes ambr, se llenó uno de los biorreactores ambr de cada estación de trabajo con una suspensión de partida (40 g/l) de microcarrier Cytodex® 1 (GE Healthcare) y se agitó a 300 r.p.m. La estación de trabajo se ajustó de modo que dispense

ciertas cantidades (2 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l y 6 g/l) del microcarrier contenido en el biorreactor con la suspensión de partida a los otros recipientes de la estación de cultivo. Se midió la uniformidad de la dispensación en 6 réplicas del biorreactor ambr. Los resultados (Figura 2) mostraron que el peso de los microcarrier dispensados correspondía a un CV < 1 % de la cantidad programada. Esto indica que el sistema ambr puede dispensar de manera fiable y consistente microcarrier procedentes de dos recipientes «de partida» a otros 22 biorreactores para la fase de cultivo celular.

### ANCLAJE Y CULTIVO DE CÉLULAS

Para demostrar que el sistema ambr es capaz de soportar el anclaje y la propagación de células en microcarrier, se añadieron microcarrier Cytodex 1 y células Vero (ATCC® CL-160™) a biorreactores ambr, hasta alcanzar los 2 g/l de microportadores y  $1,5 \times 10^5$  células/ml en un volumen para siembra de 6 ml. Se escogió la línea celular Vero por tratarse de células adherentes utilizadas habitualmente en la producción de muchas vacunas profilácticas. Se llenaron los biorreactores con 15 ml para el cultivo, y se pusieron en agitación a baja velocidad continua o intermitente durante 16 horas, con el objetivo de permitir el anclaje y la repartición iniciales de las células. Se tomaron muestras de microcarrier cada 24 horas, y se observó al microscopio

Figura 1. El proceso de «decantación en la punta de la pipeta»

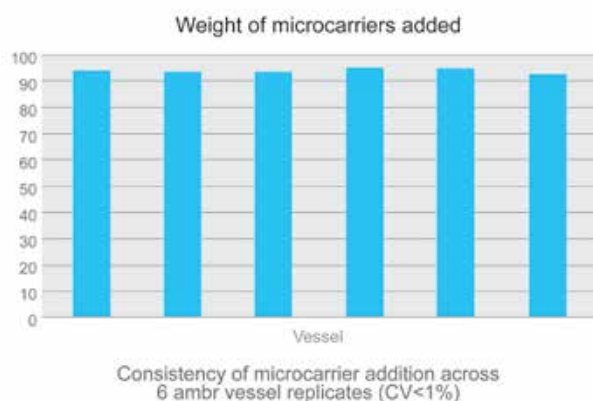
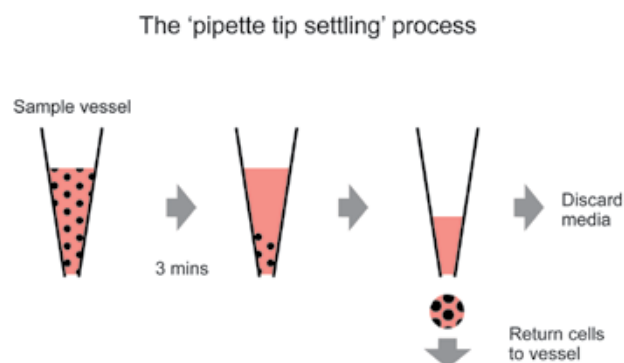
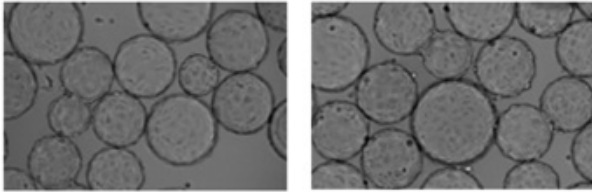


Figura 2. Consistencia de la adición de microcarrier en 6 réplicas del recipiente ambr.



**Figura 3.** Células Vero propagadas con microcarrier en biorreactores ambr.

Vero cells on Cytodex 1 microcarriers, day 4,  
in different ambr vessels



el crecimiento celular ocurrido en ellos. De acuerdo con los resultados, las células Vero lograron un buen anclaje con agitación continua o intermitente, crecieron de manera adecuada en los microcarrier y habían alcanzado la confluencia al cuarto día de cultivo (Figura 3).

Estos estudios muestran que el uso de las capacidades de agitación y el pipeteado automático únicos del sistema ambr permite una distribución automática homogénea en todos los biorreactores. Además, las células son capaces de anclarse y propagarse de manera adecuada. Con ello, los científicos pueden evaluar con rapidez, en paralelo y de modo simultáneo hasta 24 parámetros celulares específicos del cultivo, como la velocidad de agitación, la formulación de los medios o las estrategias de alimentación, determinando las condiciones óptimas para el anclaje celular, la tasa de crecimiento y el valor de anticuerpos de la vacuna, por ejemplo.

En resumen: la tecnología de microbiorreactores agitados y con burbujeo puede ser un buen método para el óptimo desarrollo del proceso de propagación de células en microcarrier para la producción de vacunas. La instalación y puesta en marcha de recipientes y matraces de agitación de sobremesa tiene elevados requerimientos manuales, mientras que el microbiorreactor ambr resulta más cómodo, y su manejo precisa mucho menos tiempo. Esto reduce la dependencia de los matraces de agitación y los biorreactores de sobremesa, permitiendo una mayor rapidez y eficiencia en el desarrollo del proceso de fabricación de vacunas, además de un incremento del número de parámetros que pueden evaluarse. La posibilidad de evaluar un número tan elevado de parámetros diferentes y desarrollar los procesos en semanas, en lugar de meses, puede ahorrar un tiempo valioso; por ello, el uso del sistema ambr podría suponer una importante contribución allí donde el menor precio de las vacunas o la respuesta rápida a situaciones inesperadas, como una amenaza pandémica, resultan críticos.

### AMPLIACIÓN DE ESCALA EN PROCESOS RELACIONADOS CON VACUNAS

El sistema de microbiorreactores ambr tiene tres componentes: el biorreactor desechable (volumen de trabajo de entre 10 y 15 ml), la estación de trabajo y el software (Figura 1). Cada biorreactor es de un solo uso; por ello, y a diferencia de los recipientes de vidrio convencionales,

no han de limpiarse ni esterilizarse tras su utilización. Para mantener la esterilidad, la estación de trabajo ambr se aloja en una cabina de seguridad biológica, y la automatización del manejo de los líquidos facilita la instalación, la inoculación, la alimentación y la decantación en la punta de la pipeta de los cultivos, además del muestreo en recipientes como las placas de 24/96 pocillos y las copas ViCell. Estos protocolos operativos pueden configurarse para el control individual de hasta 24 o 48 recipientes con funcionamiento en paralelo. Cada biorreactor incorpora sensores individuales de OD y pH, facilitando el control por bucle cerrado de estos parámetros. La regulación automatizada del pH se logra mediante el burbujeo de CO<sub>2</sub> o la adición de álcali, mientras que el O<sub>2</sub> se administra en forma de burbujas siempre que sea necesario para mantener el punto de ajuste del OD. También se puede añadir a la estación de trabajo un módulo de análisis para la calibración del pH en la línea de producción, lo que permite un control más preciso del cultivo.

El sistema dispone de un software con el que el usuario puede configurar un protocolo de pasos que serán llevados a cabo por el ambr. Dicho protocolo define parámetros operativos como los puntos de ajuste del OD/pH, la velocidad del agitador y la temperatura. En caso de que sea necesario añadir, modificar o eliminar algún paso, los tiempos y detalles del protocolo pueden editarse en cualquier momento; incluso durante el desarrollo de un experimento. Durante la ejecución, se registran en tiempo real datos como los caudales de gas, los volúmenes y los valores de pH/OD, y el software permite también la importación de valores externos, como recuentos celulares, metabolitos y valores de anticuerpos de las vacunas. Los datos pueden representarse gráficamente en el software o exportarse para la producción de resultados gráficos o tabulares en hojas de cálculo.

### Referencias bibliográficas

- [1] Kresse H, Shah M. (2010) Strategic trends in the vaccine market. *Nat Rev Drug Discov.* 12:913-4.
- [2] Montomoli E, Khadang B, Piccirella S, Trombetta C, Mennitto E, Manini I, Stanzani V, Lapini G. (2012). Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production. *Expert Rev Vaccines.* 11(5):587-94
- [3] Genzel Y, Dietzsch C, Rapp E, Schwarzer J, Reichl U. (2010). MDCK and Vero cells for influenza virus vaccine production: a one-to-one comparison up to lab-scale bioreactor cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88(2):461-75.
- [4] Rourou S, Riahi N, Majoul S, Trabelsi K, Kallel H. (2013). Development of an in situ detachment protocol of Vero cells grown on Cytodex1 microcarriers under animal component-free conditions in stirred bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170(7):1724-37.
- [5] Trabelsi K, Majoul S, Rourou S, Kallel H. (2012). Development of a measles vaccine production process in MRC-5 cells grown on Cytodex1 microcarriers and in a stirred bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(3):1031-40.
- [6] Lohr V, Genzel Y, Behrendt I, Scharfenberg K, Reichl U. (2010). A new MDCK suspension line cultivated in a fully defined medium in stirred-tank and wave bioreactor. *Vaccine.* 31;28(38):6256-64.
- [7] Hundt B, Best C, Schlawin N, Kassner H, Genzel Y, Reichl U. (2007). Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave Bioreactor microcarrier culture in 1-10 L scale. *Vaccine.* 16;25(20):3987-95.
- [8] Hsu WT, Aulakh RP, Traul DL, Yuk IH. (2012). Advanced microscale bioreactor system: a representative scale-down model for bench-top bioreactors. *Cytotechnology* 64, (6), 667-78