

ÍNDICE

Abreviaturas y Símbolos	vii
Unidades	x
Introducción	
1. Visión general de la farmacología de los interferones	1
1.1. Clasificación de los interferones	1
1.2. Producción de interferón	2
1.3. Inductores de la síntesis de interferón	2
1.4. Estructura del hIFN- β 1	3
1.5. Mecanismos de acción	3
1.5.1. Receptores de interferón	3
1.5.2. Transducción de la señal	4
1.6. Efectos biológicos de los interferones	4
1.6.1. Efectos antivirales	5
1.6.2. Efectos antiproliferativos	6
1.6.3. Efectos inmunomoduladores	6
1.7. Efecto de rhIFN- β 1 sobre la inmunidad de la esclerosis múltiple	7
2. Desarrollo de un procedimiento biotecnológico	8
3. Expresión de proteínas recombinantes	11
3.1. <i>E. coli</i>	11
3.2. Levaduras	11
3.3. Hongos filamentosos	11
3.4. Células de insecto	12
3.5. Células de mamíferos	12
3.5.1. Ventajas	12
3.5.2. Líneas celulares huéspedes	13
4. Vectores de expresión para células eucariotas	14
5. Transfección de células eucariotas	15
6. Modos de selección de las células transfectadas	16
6.1. Selección dominante	17
6.1.1. Antibiótico tipo aminoglucósido	17
6.1.2. Antibiótico tipo <i>bleomycin/phleomycin</i>	18
6.2. Selección recesiva	18
6.2.1. Dihidrofolato reductasa	18
7. Factores que afectan la expresión de proteínas recombinantes	18
7.1. Estabilidad del ARNm	19
7.2. Condiciones de cultivo	20

INDICE

7.2.1.	Efecto del butirato de sodio	20
7.2.2.	Efecto del Zn ²⁺	21
	Objetivos y plan de tesis	23
Materiales y Métodos		
1.	Reactivos y soluciones	25
2.	Medios de cultivo	25
3.	Líneas celulares y cepas bacterianas	26
4.	Sistemas de cultivo de células	27
5.	Criopreservación de líneas celulares	27
6.	Criopreservación de cepas bacterianas	28
7.	Descongelamiento de líneas celulares	28
8.	Descongelamiento de cepas bacterianas	28
9.	Determinaciones analíticas de los cultivos	28
9.1.	Células totales y viables	28
9.2.	Análisis de glucosa y lactato	29
9.3.	Análisis de amonio	30
10.	Métodos de <i>screening</i> , cuantificación y valoración biológica de rhIFN-β1	30
10.1.	Preparación de rhIFN-β1b puro	30
10.2.	Producción de anticuerpos monoclonales anti-rhIFN-β1	31
10.2.1.	Obtención de hibridomas	31
10.2.2.	Determinación de las variedades isotípicas de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas murinas	32
10.2.3.	Producción <i>in vivo</i> de anticuerpos monoclonales anti-rhIFN-β1	33
10.2.4.	ELISA específico indirecto para la detección de anticuerpos anti-rhIFN-β1	33
10.3.	Producción de suero anti-rhIFN-β1 en conejos	33
10.3.1.	Obtención de suero policlonal	33
10.3.2.	Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad	34
10.3.3.	Conjugación de inmunoglobulinas de conejo con biotina	35
10.3.4.	Evaluación de la conjugación de inmunoglobulinas de conejo con biotina	35
10.4.	ELISAs	36
10.4.1.	ELISA <i>sandwich</i> empleando inmunoglobulinas de conejo	37
10.4.2.	ELISA <i>sandwich</i> empleando un anticuerpo monoclonal y un anti-suero policlonal	37
10.4.3.	ELISA de competición empleando inmunoglobulinas de conejo y un anticuerpo monoclonal	38
10.5.	<i>Immunodot</i>	39
10.6.	Valoración biológica <i>in vitro</i>	40

INDICE

10.7.	Electroforesis	43
10.7.1.	Electroforesis en geles de agarosa	43
10.7.2.	Electroforesis en geles de bajo punto de fusión	43
10.7.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y <i>Western blot</i> para el análisis de proteínas	44
11.	Construcción de vectores de expresión eucariota	45
11.1.	Digestiones enzimáticas	45
11.2.	Ligaciones de ADN	45
11.3.	Subclonado del gen de hIFN- β 1 en diferentes vectores	46
11.3.1.	Obtención de la región codificante de hIFN- β 1	46
11.3.2.	Construcción de vectores con la secuencia <i>wild type</i> del gen de hIFN- β 1	46
11.3.2.1.	Vector pGEM-T Easy-IFN- β 1	46
11.3.2.2.	Vector pCIneo-IFN- β 1	47
11.3.2.3.	Vector pKG4-IFN- β 1	48
11.3.2.4.	Vector pcDNA-IFN- β 1	49
11.3.2.5.	Vector p91023-IFN- β 1	49
11.3.2.6.	Vector pzc-IFN- β 1	50
11.4.	Amplificación de ADN plasmídico	51
11.4.1.	Preparación de bacterias competentes	51
11.4.2.	Transformación bacteriana	51
11.4.3.	Extracción plasmídica	51
12.	Transfecciones de líneas celulares eucariotas	52
12.1.	Protocolo general para optimizar las condiciones de lipofección	52
12.2.	Obtención de líneas celulares recombinantes	53
12.3.	Selección de las células transfectadas	55
12.4.	Coamplificación del gen dhfr	56
13.	Clonado de las líneas celulares productoras de rhIFN- β 1a	56
13.1.	Clonado con anillos	57
13.2.	Clonado por dilución límite	57
14.	Comparación de la producción de formas glicosiladas y no glicosiladas de rhIFN- β 1a por diferentes líneas celulares	57
15.	Optimización de las condiciones y procedimientos de cultivo de los clones recombinantes obtenidos	58
15.1.	Adaptación a diferentes condiciones de cultivo	58
15.1.1.	Estudio del crecimiento, metabolismo celular y producción de rhIFN- β 1a en clones celulares establemente transfectados	58
15.2.	Efecto del butirato de sodio	58
15.2.1.	Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 en medio A o SMIF-6 ante la presencia de butirato de sodio	58

INDICE

15.2.2.	Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en medio A suplementado con diferentes concentraciones de suero fetal bovino y butirato de sodio	59
15.3.	Efecto del ZnSO ₄	59
15.3.1.	Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de diferentes concentraciones de ZnSO ₄	60
15.3.2.	Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 para distintos tiempos de recolección de sobrenadantes	60
15.4.	Efecto conjunto del butirato de sodio y del ZnSO ₄	60
15.4.1.	Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de butirato de sodio y diferentes concentraciones de ZnSO ₄	60
15.5.	Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5. Experiencias de pulsos y descansos	61
15.5.1.	Pulsos en presencia de butirato de sodio	61
15.5.2.	Variaciones de la duración de los pulsos y de la concentración de suero fetal bovino durante los descansos	61
15.5.3.	Variación de la duración de los pulsos y presencia de ZnSO ₄ durante los descansos. Evaluación de la adición de glicerol	62
15.5.4.	Presencia de rhEPO durante las experiencias de pulsos y descansos en condiciones óptimas	63

Resultados y Discusión

1.	Métodos de <i>screening</i> , cuantificación y valoración de rhIFN- β 1	65
1.1.	Desarrollo de inmunoensayos	65
1.1.1.	Preparación de rhIFN- β 1b puro	65
1.1.2.	Obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-rhIFN- β 1	66
1.1.3.	Producción de suero anti-rhIFN- β 1 en conejos	67
1.1.4.	Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad a proteína A	68
1.1.5.	Conjugación de inmunoglobulinas de conejo con biotina	68
1.2.	ELISAs	68
1.2.1.	ELISA <i>sandwich</i> empleando inmunoglobulinas de conejo	69
1.2.2.	ELISA <i>sandwich</i> empleando un anticuerpo monoclonal y un anti-suero policlonal	70
1.2.3.	ELISA de competición empleando inmunoglobulinas de conejo y un anticuerpo monoclonal	71
1.3.	<i>Inmunodot</i>	73
1.4.	Desarrollo de un bioensayo	74
1.4.1.	Optimización del ensayo de valoración biológica <i>in vitro</i>	74
1.4.2.	Valoración biológica <i>in vitro</i>	75

INDICE

2.	Construcción de vectores de expresión eucariota	76
2.1.	Subclonado del gen del hIFN- β 1 en diferentes vectores	77
2.1.1.	Optimización de las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para obtener la secuencia codificante del gen de hIFN- β 1	77
2.1.2.	Construcción de vectores con la secuencia <i>wild type</i> del gen de hIFN- β 1	78
2.1.2.1.	Vector pGEM-T Easy-IFN- β 1	78
2.1.2.2.	Vector pCIneo-IFN- β 1	78
2.1.2.3.	Vector pKG4-IFN- β 1	79
2.1.2.4.	Vector pcDNA-IFN- β 1	80
2.1.2.5.	Vector p91023-IFN- β 1	81
2.1.2.6.	Vector pzc-IFN- β 1	81
3.	Transfecciones de líneas celulares eucariotas	82
3.1.	Optimización de las condiciones de transfección	83
3.2.	Métodos de selección de las células transfectadas	85
3.2.1.	Selección de las células que expresan la enzima aminoglucósido 3' fosfotransferasa	85
3.2.2.	Selección de las células que expresan la enzima zeocina	85
3.3.	Obtención de líneas celulares recombinantes productoras de rhIFN- β 1a	86
3.4.	Obtención de clones celulares estables productores de rhIFN- β 1a	88
3.5.	Comparación de la producción de las formas glicosiladas y no glicosiladas de rhIFN- β 1a por diferentes líneas celulares	89
3.6.	Selección de los clones recombinantes más productores	90
4.	Coamplificación del gen dhfr	91
4.1.	Selección de células transfectadas en medio IMDM	91
4.2.	Coamplificación génica gradual en presencia de MTX	92
4.3.	Determinación de la máxima concentración de resistencia al MTX y coamplificación génica	93
4.4.	Análisis de los clones obtenidos en las diferentes etapas de la coamplificación génica	93
5.	Optimización de las condiciones y procedimientos de cultivo de los clones recombinantes obtenidos	96
5.1.	Adaptación a diferentes condiciones de cultivo	96
5.2.	Estudio del crecimiento, metabolismo celular y producción de rhIFN- β 1a en clones celulares establemente transfectados	98
5.3.	Efecto del butirato de sodio	102
5.3.1.	Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 en medio A o SMIF-6 ante la presencia de butirato de sodio	102

INDICE

5.3.2.	Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de diferentes concentraciones de suero fetal bovino y butirato de sodio	103
5.4.	Efecto del ZnSO ₄	107
5.4.1.	Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de diferentes concentraciones de ZnSO ₄	107
5.4.2.	Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 para distintos tiempos de recolección de sobrenadantes	109
5.5.	Efecto conjunto del butirato de sodio y del ZnSO ₄	110
5.5.1.	Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de butirato de sodio y diferentes concentraciones de ZnSO ₄	110
5.6.	Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5. Experiencias de pulsos y descansos	115
5.6.1.	Pulsos en presencia de butirato de sodio	116
5.6.2.	Variación de la duración de los pulsos y de la concentración de suero fetal bovino durante los descansos	117
5.6.3.	Variación de la duración de los pulsos y presencia de ZnSO ₄ durante los descansos. Evaluación de la adición de glicerol	121
5.6.4.	Presencia de rhEPO durante las experiencia de pulsos y descansos en condiciones óptimas	127
Conclusiones		
1.	Métodos de <i>screening</i> , cuantificación y valoración de rhIFN-β	131
2.	Transfecciones de líneas celulares eucariotas	132
3.	Coamplificación del gen dhfr	135
4.	Optimización de las condiciones y procedimientos de cultivo de los clones recombinantes obtenidos	135
4.1.	Adaptación y estudio del crecimiento, metabolismo celular y producción de rhIFN-β1a de clones en diferentes condiciones de cultivo	135
4.2.	Efecto del butirato de sodio	136
4.3.	Efecto del ZnSO ₄	136
4.4.	Efecto del butirato de sodio y del ZnSO ₄	136
4.5.	Experiencias de pulsos y descansos	137
Resumen		
	Resumen	139
	Summary	141
Bibliografía		
		143