

CONCLUSIONES

Los IFNs tipo I son importantes componentes de la defensa natural contra infecciones microbiológicas, cáncer y otras enfermedades. Especialmente, el hIFN- β 1 es utilizado en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Su eficiente producción requiere la expresión de esta proteína en un sistema celular apropiado. En general, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* tiene muchas ventajas, pero en este caso la proteína obtenida, denominada rhIFN- β 1b, posee una metionina inicial, una serina en lugar de cisteína en la posición 17, es no glicosilada, posee mayor sensibilidad a la desnaturalización térmica y tiende a agregarse, características que la hacen altamente inmunogénica. Contrariamente, la proteína producida en células CHO, denominada rhIFN- β 1a, resulta estructuralmente indistinguible del hIFN- β 1a en su secuencia primaria y contenido de carbohidratos, y en condiciones fisiológicas se encuentra en forma monomérica. Los ensayos de actividad biológica *in vitro* han mostrado que el rhIFN- β 1a es por lo menos 10 veces más potente que el rhIFN- β 1b, infiriéndose que la mayor potencia *in vivo* del rhIFN- β 1a se debería al efecto estabilizador de los carbohidratos sobre la estructura proteica.

Los objetivos generales de este Plan de Tesis titulado “Desarrollo de una tecnología de producción de interferón β recombinante humano en células eucariontes” fueron los siguientes:

1. Desarrollo de métodos de *screening*, cuantificación y valoración de rhIFN- β 1.
2. Obtención de plásmidos de expresión para eucariontes conteniendo el gen del hIFN- β 1. Utilización de vectores con diferentes regiones reguladoras.
3. Optimización de las condiciones de transfección.
4. Obtención de clones celulares estables productores de rhIFN- β 1a mediante la transfección de diferentes líneas celulares.
5. Caracterización de la producción de rhIFN- β 1a expresado por las distintas líneas celulares obtenidas.
6. Optimización de las condiciones y procedimientos de cultivo para lograr la máxima producción.

1. Métodos de *screening*, cuantificación y valoración de rhIFN- β 1

Antes de realizar cualquier manipulación genética sobre las células de mamíferos para que expresen el rhIFN- β 1a, fue necesario establecer métodos simples, rápidos y confiables para la determinación de la citoquina. Para tal fin se obtuvo inicialmente rhIFN- β 1b puro para ser utilizado en la producción de Ab policlonales y MAb, que posteriormente fueron usados en el desarrollo de métodos inmunoquímicos.

Se plantearon diferentes diseños de ELISAs, empleando varias combinaciones de Igs de ratón purificadas a partir de la ascitis 2C12 y suero de conejo o las Igs de conejo purificadas en su forma biotinilada o sin biotinilar.

Se seleccionó el ELISA de competición empleando Igs de conejo y el MAb, debido a que permite determinar la concentración de rhIFN- β 1 en muestras complejas con sensibilidad y especificidad adecuadas, presentando este ensayo el menor límite de detección (0,01 μ g/ml) al compararlo con los otros dos (0,30 y 0,08 μ g/ml, para los ELISA *sandwich* empleando Igs de conejo, o un MAb y el suero de conejo policlonal, respectivamente).

Para todos los ELISA desarrollados, se observó que los diferentes medios diluyentes no interfirieron en la interacción entre el rhIFN- β 1 y los Abs, pero sí afectan la disponibilidad de la proteína recombinante en la solución. Sin embargo, el ELISA de competición seleccionado permite la cuantificación de rhIFN- β 1 presente en los sobrenadantes de cultivo, debido a que se encontró que al emplear como diluyente medio A suplementado con 5% V/V SFB para preparar la dilución inicial de la curva y luego realizar las posteriores diluciones en la solución diluyente de ELISA, se obtiene una curva paralela en la mayoría de las diluciones, a la curva obtenida al realizar todas las diluciones en este último diluyente.

Otro método inmunoquímico desarrollado fue el *immunodot*, que resultó un ensayo óptimo para el *screening* de las células productoras, por cumplir los requisitos de rapidez y sencillez, con un rango de sensibilidad apropiado, entre 0,31 y 0,01 μ g/ml de rhIFN- β 1a presente en sobrenadantes de cultivo suplementado con hasta 5% V/V SFB.

En este trabajo de tesis, se utilizaron células WISH y el virus VSV para estimar la potencia de rhIFN- β 1a presente en los sobrenadantes de cultivo por comparación de la actividad inhibitoria del efecto citopático con respecto a un estándar.

Se empleó como estándar rhIFN- β 1b midiendo la actividad de un sobrenadante de cultivo en ensayos cuya duración fue de 24, 48 y 72 h, determinando en cada caso los CV inter e intra ensayo. Los valores obtenidos demostraron que no hay una gran variación en la reproducibilidad de los diferentes ensayos, por lo que se los consideró válidos a todos ellos. Se seleccionó el ensayo cuya duración es de 24 h, por permitir en forma rápida la obtención de una medida confiable de la potencia de las muestras.

El ensayo seleccionado presentó un rango de linealidad comprendido entre 1,5 y 12,0 UI/ml de rhIFN- β 1 y un límite de detección de 1,4 UI/ml, permitiendo evaluar la calidad de la molécula producida en diferentes condiciones.

2. Transfecciones de líneas celulares eucariotas

Se sabe que los niveles de expresión de genes heterólogos introducidos en células de mamíferos dependen de numerosos factores, entre ellos, el plásmido de expresión empleado y los elementos regulatorios presentes en el mismo. Por tal motivo

el gen de hIFN- β 1, amplificado por PCR a partir de ADN de sangre periférica, fue subclonado en diferentes plásmidos de expresión en células eucariotas, originando los vectores denominados pCI-IFN- β 1, pKG4-IFN- β 1, p91023-IFN- β 1, pcDNA-IFN- β 1 y pzc-IFN- β 1, los cuales poseen distintos promotores, *enhancers*, señales de poliA, genes para coamplificación génica y orígenes de replicación eucariota, entre otras regiones reguladoras.

Antes de realizar las transfecciones fue necesario estandarizar las condiciones de lipofección y selección de las células. Se optimizaron las condiciones de transfección utilizando un conjunto de lípidos catiónicos y un plásmido reportero (pCMV-SPORT- β -gal), encontrando eficiencias altas y similares, con los lípidos LipofectAMINE, LipofectAMINE Plus y LipofectAMINE 2000, en un rango de concentraciones de lípido y ADN para las células COS-7, BHK.21 y CHO.K1, mientras que para las células HEK-293 el mejor lípido resultó ser el DOTAP.

En general, se observó que las células CHO.K1 presentaron una mayor tendencia a incorporar los complejos lípidos-ADN, confirmándose el hecho de la existencia de variaciones en las eficiencias al combinar diferentes líneas celulares y lípidos.

En cuanto a los lípidos, se halló que las formulaciones con lípidos catiónicos multivalentes, como la de LipofectAMINE en todas sus variantes, presentaron mejores eficiencias de transfección que los lípidos catiónicos monovalentes, como lo son el Lipofectin, CellFECTIN, DMRIE-C y DOTAP.

Si se desea obtener una línea celular recombinante que exprese la proteína de interés, resulta imprescindible optimizar el método de selección. Con tal fin, se estudiaron las concentraciones mínimas necesarias de antibióticos para provocar la muerte de las células *wild type* en un determinado período de tiempo. De acuerdo con los resultados observados se decidió realizar presión de selección durante 15 días, con 400 μ g/ml para las células HEK-293, CHO.K1 y BHK.21, y 725 μ g/ml para las células NS0, en el caso del genotipo, y con 120, 200, 800 y 1.000 μ g/ml para las células NS0, HEK-293, CHO.K1 y BHK.21 respectivamente, en el caso de la zeocina.

Se efectuaron transfecciones transientes con las células COS-7 y los plásmidos pCI-IFN- β 1 y pKG4-IFN- β 1 con la posterior detección de la proteína recombinante en las fracciones intra-extracelulares. Se encontró rhIFN- β 1a sólo en la fracción del sobrenadante tomado a las 72 h para ambos plásmidos, permitiendo comprobar que la proteína recombinante es secretada al medio de cultivo.

No se obtuvieron elevadas producciones de rhIFN- β 1a utilizando células COS-7 y el vector pKG4-IFN- β 1, a pesar de ser este par un buen sistema de producción para otras proteínas recombinantes por permitir la generación episomal de un alto número de copias del plásmido. Este hecho se adjudica a inconvenientes

intrínsecos encontrados por numerosos autores durante la producción de rhIFN- β 1a, más que a problemas en el sistema de expresión transiente seleccionado.

Con el fin de obtener líneas celulares estables productoras de rhIFN- β 1a se realizaron transfecciones en diferentes condiciones con los distintos plásmidos contruidos en células CHO.K1, CHO dhfr-, BHK.21, HEK-293 y NS0.

Las células HEK-293 expresan en forma constitutiva el gen E1a de adenovirus, considerándose la proteína E1a un potente transactivador del promotor CMV e inhibidor de otros promotores virales como el SV40. Si bien nosotros no encontramos que estas células transfectadas con los vectores pCI-IFN- β 1 y pcDNA-IFN- β 1, portadores del promotor CMV produzcan altos niveles de la proteína recombinante, sí observamos que producían más que aquéllas transfectadas con el plásmido pKG4-IFN-- β 1, que contiene el promotor SV40.

A pesar de haber realizado numerosas transfecciones, pocas fueron las líneas celulares recombinantes y los clones derivados de ellas elegidos como productores. Este resultado era esperable debido a que se sabe que durante el proceso de generación de líneas celulares estables, la mayoría de las células sucumben en el medio de selección, y en un porcentaje muy bajo se da la integración del ADN exógeno en los cromosomas de la célula huésped. Además, se ha encontrado que ciertas líneas celulares permiten el empaquetamiento de ADN foráneo en una forma de cromatina favorable, mientras que otras inducen el empaquetamiento en una forma menos activa, influyendo, por lo tanto, en la expresión de la actividad del sitio de integración cromosomal de las diferentes líneas celulares.

Se observó que todas las líneas celulares producen las formas glicosilada y sin glicosilar de rhIFN- β 1a, pero en diferentes proporciones. Las células CHO.K1, CHO dhfr-, NS0 y HEK-293 producen principalmente la forma glicosilada; las células BHK.21, en cambio, la forma no glicosilada.

Además, con las células CHO.K1 recombinantes se obtuvieron las más altas producciones.

Por estos motivos, se seleccionaron entonces los tres clones más productores de rhIFN- β 1a, denominados CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 para continuar con el trabajo de tesis.

Aunque los elementos de regulación de la expresión en los plásmidos tienen un rol importante en la eficiencia de la expresión, las diferencias en la producción de la proteína recombinante por parte de las diferentes líneas celulares, a pesar de haber utilizado los mismos vectores, no pueden ser explicadas a este nivel. La actividad transcripcional varía dependiendo de los niveles celulares de factores de transcripción relevantes, del número de copias del gen, de la eficiencia de traducción y de otros elementos regulatorios.

Sobre la base de los resultados alcanzados, concluimos que si bien no hay combinaciones universales de los pares célula huésped : vector de expresión, la línea

celular CHO.K1 y el plásmido pCI-IFN- β 1 resultaron ser los más productores de rhIFN- β 1a.

3. Coamplificación del gen dhfr

Se compararon las productividades de los clones seleccionados durante la obtención de la línea celular CHO p91023 y su posterior coamplificación génica con 500 nM MTX, encontrando una subpoblación de células que incrementaron la actividad DHFR, resistiendo a mayores cantidades del antibiótico en el medio de selección, y aumentaron hasta 6 veces la producción de rhIFN- β 1a. Durante la selección inicial, el nivel de expresión de la proteína recombinante se relacionaría con la posición de integración en el cromosoma. En contraste, después de la amplificación, existe una estrecha relación entre el número de copias del gen y el nivel de expresión. Por ese motivo se sugiere que se logró la coamplificación en el número de copias del gen de hIFN- β 1 en forma conjunta con el de dhfr.

Teniendo en cuenta que la línea celular CHO p91023 350 μ M MTX es derivada de la línea celular CHO p91023 500 nM MTX, no se observó un incremento en la producción, pero sí un aumento en la resistencia al MTX. Este hecho puede deberse a que las células hayan adquirido alguna forma de resistencia al antibiótico, por ejemplo a través de canales de exportación. Asimismo, la disminución de la producción puede ser atribuida a pérdida cromosomal o pérdidas irreversibles, mutaciones o reordenamientos de genes asociados con la proteína recombinante, su regulación y su síntesis. Es decir, que tanto la presión selectiva aplicada durante el cultivo continuo, como la plasticidad inherente de los genomas eucariotas, pueden afectar la estabilidad de las secuencias transfectadas e integradas.

4. Optimización de las condiciones y procedimientos de cultivo de los clones recombinantes obtenidos

4.1. Adaptación y estudio del crecimiento, metabolismo celular y producción de rhIFN- β 1a de clones en diferentes condiciones de cultivo

Durante la adaptación de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 al crecimiento con menores cantidades de SFB en el medio (0,1 y 1% V/V), de manera tal de disminuir los costos de producción y facilitar la posterior purificación de la proteína recombinante, se encontró que en general, las producciones de los tres clones decrecían en forma paralela con la disminución de la cantidad de SFB. Además, se observó que las células se despegaban y formaban grumos o no crecían en medio A suplementado con 1 o 0,1% V/V SFB, respectivamente.

El crecimiento, metabolismo y producción de rhIFN- β 1a de los clones en medio A suplementado con 1 y 5% V/V SFB fue similar para los tres clones evaluados. Sí pudo advertirse un mayor crecimiento, caracterizado por μ superiores y t_d menores,

y una elevada producción de proteína recombinante al aumentar la cantidad de SFB en el medio.

4.2. Efecto del butirato de sodio

Se evaluó el efecto del NaBu sobre la producción de rhIFN- β 1a de los clones en estudio. Se comprobó que el clon CHO pCI 2A5 1D5 aumentaba sustancialmente la producción ante la adición de NaBu.

Del análisis de cada clon se observó que los que más aumentaron su producción ante el agregado de NaBu fueron los clones CHO pCI 2A5 1D5 y 2A6 1D7, variando en menor medida la producción del clon CHO pCI 2A6 1G5. En consecuencia, para los clones analizados se encontró una diferencia de sensibilidad al tratamiento con NaBu y dependencia de diferentes combinaciones de SFB y NaBu.

Se consideraron óptimas las condiciones que aumentaron la cantidad de rhIFN- β 1a en los sobrenadantes de cultivo cuando la menor concentración de NaBu (para evitar la apoptosis) y de SFB (para disminuir los costos de producción y facilitar el posterior proceso de purificación) fueron adicionados al medio de cultivo, resultando incrementos de la producción:

- de hasta 5 veces, para el clon CHO pCI 2A6 1G5, en medio A suplementado con 0,1% V/V SFB y 5 mM NaBu.
- de hasta 6 veces, para los clones CHO pCI 2A5 1D5 y 2A6 1D7, en medio A suplementado con 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu y 0,1% V/V SFB y 1 mM NaBu, respectivamente.

Se advirtió que la concentración de células viables disminuyó abruptamente, observándose, además, un deterioro en la morfología de las células. Estos resultados pueden atribuirse a la presencia de NaBu, ya que se ha reportado que este compuesto produce modificaciones de la estructura de la cromatina y del ensamblaje del citoesqueleto, alteraciones en la morfología celular, velocidad de crecimiento, síntesis de ADN, modificación de actividades enzimáticas y diferente expresión de genes.

4.3. Efecto del ZnSO₄

La expresión de rhIFN- β 1a aumentó 2 veces en todos los clones con concentraciones de ZnSO₄ de 25 y 50 μ M. Para concentraciones de ZnSO₄ de 100 y 150 μ M el grado de estimulación dependió del clon celular. Así, el aumento osciló entre 4 y 8 veces, para cada concentración de sal, para los clones CHO pCI 2A5 1D5 y 2A6 1D7, siendo el incremento entre 2 y 4 veces para el clon CHO pCI 2A6 1G5.

4.4. Efecto del butirato de sodio y del ZnSO₄

Ante la presencia de ambos aditivos en las concentraciones óptimas para cada clon, el clon CHO pCI 2A5 1D5 mostró el mayor aumento de la producción cuando se agregó ZnSO₄ en una concentración entre 50 y 100 μ M. El clon CHO pCI 2A6 1D7 demostró una respuesta similar, pero con una menor producción de proteína

recombinante. En cambio, para el clon CHO pCI 2A6 1G5 sólo se evidenció un leve aumento de la producción ante el agregado de 50 μM de ZnSO_4 .

La presencia de 150 μM de ZnSO_4 no resultó favorable para ninguno de los clones, pudiendo atribuirse este hecho a un efecto deletéreo en el cultivo.

El clon CHO pCI 2A5 1D5 es el que más aumentó la producción ante el agregado de ambos aditivos, y la mejor condición resultó aquella en la que el medio es suplementado con 0,5% V/V SFB, 2 mM NaBu y 50 μM de ZnSO_4 .

4.5. Experiencias de pulsos y descansos

Si bien ante la adición de NaBu o ZnSO_4 se logró un aumento en la producción del clon CHO pCI 2A5 1D5, este incremento fue marcado sólo durante los primeros recambios de medio de cultivo.

Con el fin de prolongar la producción del clon en el tiempo, se realizaron experiencias de pulsos en condiciones que favorecen la producción pero que pudiesen ser deletéreas para las células, y descansos en condiciones que resulten favorables para el crecimiento y mantenimiento celular. Con tal objetivo, se agregaron diferentes aditivos a los cultivos (como NaBu, ZnSO_4 , SFB, glicerol y rhEPO) variando los tiempos de exposición al realizar los pulsos y descansos. Del análisis de las experiencias realizadas se arribó a las siguientes conclusiones:

- Se observó un aumento de las productividades en forma creciente de hasta 4, 5 y 7 veces, aproximadamente, ante el agregado de ZnSO_4 , NaBu y ambos aditivos, respectivamente, por lo menos hasta los 9 días de cultivo. En general, el incremento de las productividades fue superior durante los pulsos.
- La composición final del medio optimizado fue medio A suplementado con SFB al 0,5% V/V, NaBu 2 mM y ZnSO_4 50 mM durante los pulsos, y medio A suplementado con SFB al 1% V/V durante los descansos.
- No se encontraron diferencias en la concentración de rhIFN- β 1a presente en los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos realizados en ausencia y presencia de glicerol. Este hecho, y dado que el glicerol evita la formación de multímeros que no son detectados por los ensayos de cuantificación empleados, sugiere que en las condiciones de cultivo empleadas no ocurre la asociación de moléculas de rhIFN- β 1a.
- No se encontraron variaciones importantes en cuanto al número de células para las mismas condiciones ensayadas cuando los descansos se realizaron en presencia o ausencia de ZnSO_4 o rhEPO. Por lo tanto, estos aditivos no mostraron un efecto estimulador de la división celular ni supresor de la apoptosis en los sistemas de cultivo ensayados.
- Los cultivos se mantuvieron en buen estado y similares entre sí para cada pulso o descanso. A pesar de que en algunos casos la cantidad de células viables disminuyó, la viabilidad fue similar y con valores próximos al máximo para todas las condiciones.

- En todos los casos, por análisis de *Western blot*, se observaron las dos bandas correspondientes a las formas glicosiladas y sin glicosilar de rhIFN- β 1a. Este resultado sugiere que el agregado de los aditivos no modifica la estructura de la proteína recombinante.

Desde el punto de vista tecnológico, el trabajo de Tesis permitió establecer clones estables y condiciones de cultivo para la producción de niveles adecuados de rhIFN- β 1a.