

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Métodos de *screening*, cuantificación y valoración de rhIFN- $\beta$ 1

Los ensayos comúnmente empleados para la detección de citoquinas pueden clasificarse en bioensayos e inmunoensayos. Los primeros brindan una medida precisa de la actividad biológica de la citoquina, mientras que los últimos son útiles en el reconocimiento e identificación de la molécula, independientemente de que ésta posea o no actividad. Los inmunoensayos son técnicamente sencillos, rápidos y de bajo costo si se los compara con los bioensayos. Sin embargo, a pesar de ser altamente específicos, los inmunoensayos presentan la gran desventaja de no poder brindar información acerca de la actividad biológica de la citoquina, y esto se debe a que leves cambios en la estructura de una molécula, en general, no alteran la capacidad de unión a un Ab, pero la actividad biológica de la misma puede verse seriamente afectada (Mire-Sluis y col., 1995; Mire-Sluis, 1999).

#### 1.1. Desarrollo de inmunoensayos

Se desarrollaron diferentes métodos inmunoquímicos que permiten la cuantificación y detección de la citoquina presente en los sobrenadantes de cultivo. Con tal objeto, inicialmente, se planteó la necesidad de obtener Ab policlonales y MAb.

##### 1.1.1. Preparación de rhIFN- $\beta$ 1b puro

En la Fig. 16 se muestra el cromatograma obtenido durante la purificación de una muestra comercial de rhIFN- $\beta$ 1b, utilizando una columna de Sephacryl S-200, que permitió obtener rhIFN- $\beta$ 1b puro en el volumen eluido entre los 48 y 58 ml.

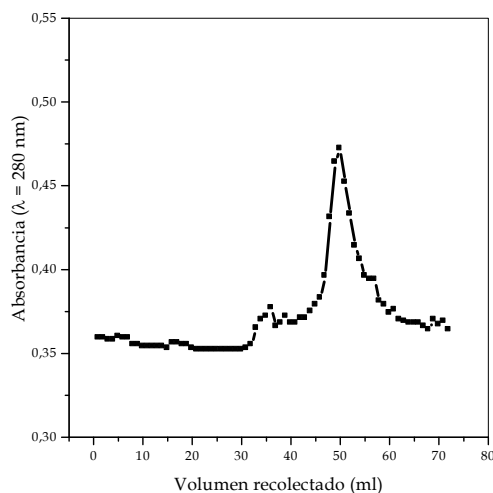


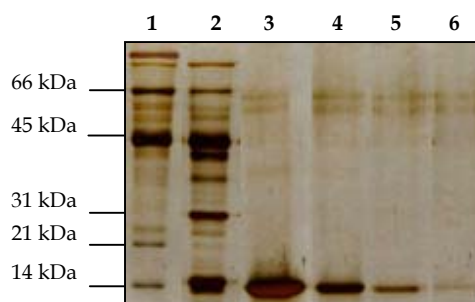
Fig. 16. Purificación de rhIFN- $\beta$ 1b a partir de una muestra comercial mediante cromatografía de exclusión molecular.

Las fracciones correspondientes al pico de elución fueron mezcladas, y se determinó el rendimiento de la purificación, que fue de un 50%, teniendo en cuenta que se obtuvieron 5,5 ml de una solución con 64 µg/ml de rhIFN-β1b, habiendo sembrado 1 ml de solución proteica con una concentración de 750 µg/ml, calculándose el rendimiento de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{masa de rhIFN-}\beta \text{ purificado}}{\text{masa de rhIFN-}\beta \text{ sembrado}} \times 100 \quad (15)$$

Posteriormente el producto obtenido fue concentrado 8 veces utilizando una unidad Amicon con una membrana de ultrafiltración de 10.000 Da de tamaño de poro (Millipore).

La cromatografía rindió una solución pura, como se puede observar en el gel de poliacrilamida en condiciones reductoras de la Fig. 17, con una concentración, medida por espectrofotometría, de 450 µg/ml de rhIFN-β1b. Esta solución se utilizó durante la inmunización de animales para la obtención de sueros e hibridomas con actividad anti-rhIFN-β1.



**Fig. 17. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras y posterior tinción argéntica.**

- 1: Patrón de alto PM.
- 2: Patrón de bajo PM.
- 3: *Pool* de elución concentrado 8 veces.
- 4: Siembra de 3 diluida 1/3.
- 5: Siembra de 4 diluida 1/3.
- 6: Siembra de 5 diluida 1/3.

### 1.1.2. Obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-rhIFN-β1

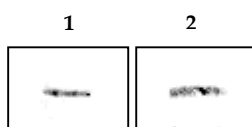
Inicialmente se realizaron 2 fusiones estándar entre células de linfocitos provenientes del bazo de ratones hembras BALB/c, previamente inmunizados de igual forma, y células NS0. De acuerdo con las producciones de MAb sólo se seleccionó una línea celular que se clonó por el método de dilución límite, obteniendo 12 clones de hibridomas productores de MAb específicos anti-rhIFN-β1.

Los objetivos principales del clonado son aislar clones que producen MAb con distinta especificidad y afinidad, y seleccionar aquellos híbridos que son estables con respecto a otros que pueden perder la capacidad de producir anticuerpos luego de

varios subcultivos. Como regla general es mejor clonar lo antes posible, dado que múltiples clones compiten en un mismo cultivo para crecer y esto, en conjunto con la segregación de cromosomas, atenta contra la estabilidad de expresión de la línea de hibridoma. Se prefiere trabajar con clones debido a que son homogéneos en cuanto a sus propiedades de crecimiento, niveles de expresión y calidad del producto (Hauser, 1997).

Se determinó la variedad isotípica de las cadenas pesadas de los MAb producidos por dichos clones, encontrando que todos ellos eran del tipo IgG1.

Además, todos los MAb presentaron igual capacidad de reconocimiento de la molécula de rhIFN- $\beta$ 1 en ensayos de *Western Blot*, en condiciones nativas o desnaturalizantes. En la Fig. 18 se muestran dos de las imágenes típicas que se encontraron al realizar estos ensayos.



**Fig. 18. Ensayo de *Western blot* utilizando sobrenadante de hibridomas productores de Mab con actividad anti-rhIFN- $\beta$ 1.**

Se analizó la capacidad de reconocimiento de la molécula de rhIFN- $\beta$ 1 en condiciones nativas (1) y desnaturalizantes (2) por parte de los diferentes MAb.

Dadas las características de crecimiento celular, se seleccionó el hibridoma denominado 2C12 para producir líquido ascítico a ser utilizado en posteriores determinaciones.

### 1.1.3. Producción de suero anti-rhIFN- $\beta$ 1 en conejos

Se inmunizaron 2 conejos con dosis de 20 y 40  $\mu$ g de rhIFN- $\beta$ 1b, respectivamente, realizando sangrías a distintos tiempos para determinar el título de los sueros.

El suero de conejo inmunizado con 40  $\mu$ g de Ag (conejo 2) presentó mayores títulos de anticuerpos específicos que el conejo inmunizado con 20  $\mu$ g de Ag. En la Tabla VI se muestran los resultados para el conejo 2. Se decidió entonces utilizar este suero para el posterior desarrollo de métodos inmunoquímicos de análisis.

**Tabla VI. Título de anticuerpos específicos en el suero del conejo inmunizado con 40  $\mu$ g de Ag.**

Sangría	Título de anticuerpos específicos
a los 36 días de la primera dosis	1/256.000
a los 41 días de la primera dosis	1/512.000
a los 45 días de la primera dosis	1/512.000
a los 51 días de la primera dosis	1/1.024.000

#### 1.1.4. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad a proteína A

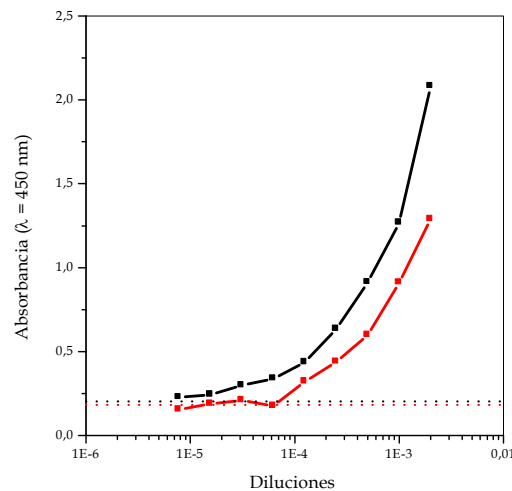
Luego de la obtención de Abs en los fluidos ascíticos de ratón o en el suero de conejo, la purificación de los mismos se llevó a cabo en un equipo FPLC, empleando una columna de Sepharose-Proteína A HiTrap.

En ambos casos, las fracciones correspondientes al pico de elución fueron mezcladas y dializadas contra solución de PBS. Las concentraciones de Igs presentes, medidas por lectura espectrofotométrica, fueron 0,200 mg/ml para las Igs de ratón y 1,242 mg/ml para las Igs de conejo.

Finalmente las Igs purificadas se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.1.5. Conjugación de inmunoglobulinas de conejo con biotina

El éxito de la reacción de conjugación de las Igs con biotina fue evaluado por la técnica de ELISA específico indirecto. Esta metodología permitió analizar la incorporación de la biotina a la estructura proteica y el grado de influencia que dicha reacción tiene a nivel del reconocimiento antigénico por parte de las Igs sometidas a conjugación. Como se observa en la Fig. 19, las Igs de conejo fueron conjugadas con biotina exitosamente, sin perder su capacidad de reconocimiento.



**Fig. 19. Evaluación de la eficiencia de biotinilación de las Igs anti-rhIFN- $\beta$ 1.**

La eficiencia de conjugación con biotina fue evaluada mediante la técnica de ELISA específico indirecto, por comparación de la respuesta de Igs purificadas (■) y de Igs biotiniladas (■).

Con líneas punteadas se indican los valores de los respectivos controles realizados sin Igs.

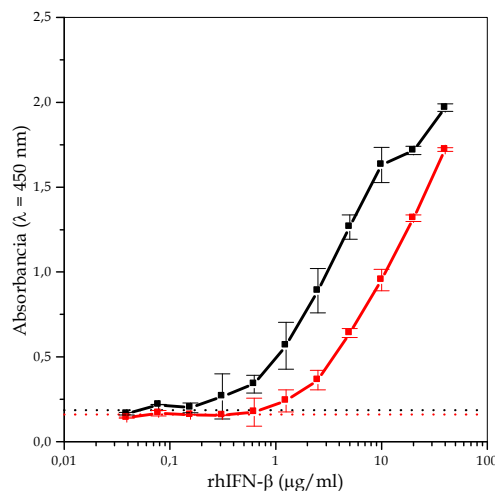
## 1.2. ELISAs

A pesar de que los inmunoensayos son altamente específicos, el desarrollo de una técnica de este tipo requiere de una cuidadosa puesta a punto y estandarización de las condiciones óptimas para la detección de la proteína en estudio.

### 1.2.1. ELISA *sandwich* empleando inmunoglobulinas de conejo

Este ensayo consistió en la captura de rhIFN- $\beta$ 1 por parte de Igs purificadas a partir de suero de conejo con actividad anti-IFN- $\beta$ 1, inmovilizadas sobre placas. Posteriormente el rhIFN- $\beta$ 1 fue reconocido por las Igs de conejo purificadas y biotiniladas. Éstas, a su vez, reaccionaron con streptavidina conjugada con una enzima, que catalizó la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

En la Fig. 20 se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas empleando como diluyentes 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS o medio A suplementado con 5% V/V SFB.



**Fig. 20. ELISA *sandwich* empleando Igs de conejo.**

Las curvas fueron realizadas utilizando Betaferon como estándar, diluido en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS (■) o en medio A suplementado con 5% V/V SFB (■).

Las curvas correspondientes al estándar y las muestras fueron procesadas por duplicado y los resultados se muestran como el valor promedio  $\pm$  SD. Con líneas punteadas se indican los valores de los respectivos controles realizados sin Ag.

Para analizar la influencia del medio de dilución de la citoquina, se realizaron cálculos de recuperación de la concentración de rhIFN- $\beta$ 1 diluido en medio A suplementado con 5% V/V SFB, utilizando la curva de la citoquina diluida en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS como estándar. Se calculó la recuperación, expresándola en forma porcentual (ecuación 16), como el cociente entre la concentración de citoquina calculada a partir de la interpolación (cci) en la curva correspondiente al medio A suplementado con 5% V/V SFB y la concentración de citoquina teórica agregada (cca) en ese punto.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{cci}{cca} \quad (16)$$

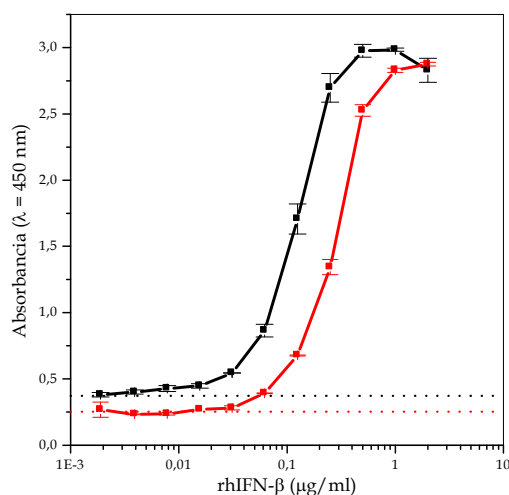
Durante este ensayo la cci fue de 11,63  $\mu\text{g/ml}$  y la cca de 40,00  $\mu\text{g/ml}$ , resultando la recuperación en el punto medio de la curva del estándar del 29%; es decir, que este inmunoensayo subestimaría la concentración de la proteína recombinante diluida en medio A suplementado con 5% V/V SFB.

La curva dosis-respuesta correspondiente a la citoquina diluida en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS mostró un rango de linealidad comprendido entre 10,00 y 0,62  $\mu\text{g/ml}$ , con un valor de correlación superior a 0,99. Este rango fue seleccionado como zona útil y de mayor sensibilidad para cuantificar el rhIFN- $\beta$ 1 presente en muestras desconocidas. Por otro lado, el límite de detección del ensayo, calculado a partir del promedio del control evaluado en ausencia de Ag más 3 SD fue de 0,30  $\mu\text{g/ml}$ .

### 1.2.2. ELISA *sandwich* empleando un anticuerpo monoclonal y un anti-suero policlonal

Este ensayo consistió en la captura de rhIFN- $\beta$ 1 por parte de Igs purificadas a partir de la ascitis 2C12 con actividad anti-IFN- $\beta$ 1 e inmovilizadas sobre placas. Posteriormente el rhIFN- $\beta$ 1 fue reconocido por Igs presentes en el suero de conejo 2 con actividad anti-IFN- $\beta$ 1. Éstas, a su vez reaccionaron con un segundo Ab conjugado con una enzima que catalizó la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

En la Fig. 21 se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas empleando como diluyentes 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS o medio A suplementado con 5% V/V SFB.



**Fig. 21. ELISA *sandwich* empleando un MAb y un anti-suero policlonal**

Las curvas fueron realizadas utilizando Betaferon como estándar, diluido en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS (■) o en medio A suplementado con 5% V/V SFB (■).

Las curvas correspondientes al estándar y las muestras fueron procesadas por duplicado y los resultados se muestran como el valor promedio  $\pm$  SD. Con líneas punteadas se indican los valores de los respectivos controles realizados sin Ag.

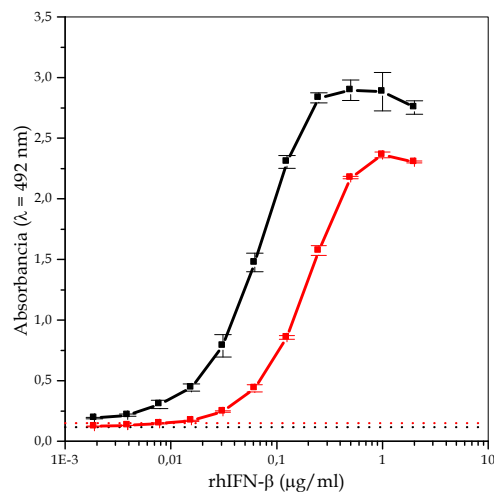
Se calculó la recuperación teniendo en cuenta que la cci fue de 0,75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y la cca de 2,00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La recuperación en el punto medio de la curva del estándar fue del 38%, es decir que este inmunoensayo, como el anterior, subestimaría la concentración de la proteína recombinante diluida en medio A suplementado con 5% V/V SFB.

La curva dosis-respuesta correspondiente a la citoquina diluida en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS mostró un rango de linealidad comprendido entre 0,25 y 0,06  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con un valor de correlación superior a 0,99. Este rango fue seleccionado como zona útil y de mayor sensibilidad para cuantificar el rhIFN- $\beta$ 1 presente en muestras desconocidas. Por otro lado, el límite de detección del ensayo fue de 0,04  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 1.2.3. ELISA de competición empleando inmunoglobulinas de conejo y un anticuerpo monoclonal

Este ensayo consistió en la competición por el rhIFN- $\beta$ 1 entre Igs purificadas a partir del suero de conejo 2 inmovilizadas sobre placas, e Igs purificadas a partir de la ascitis 2C12 presentes en forma soluble. Éstas últimas Igs reaccionaron con un segundo Ab conjugado con una enzima que catalizó la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

En la Fig. 22 se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas empleando como diluyentes 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS o medio A suplementado con 5% V/V SFB.



**Fig. 22. ELISA de competición empleando Igs de conejo y un MAb.**

Las curvas fueron realizadas utilizando Betaferon como estándar, diluido en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS (■) o en medio A suplementado con 5% V/V SFB (■).

Las curvas correspondientes al estándar y las muestras fueron procesadas por duplicado y los resultados se muestran como el valor promedio  $\pm$  SD. Con líneas punteadas se indican los valores de los respectivos controles realizados sin Ag.

Se calculó la recuperación teniendo en cuenta que la cci fue de 0,54  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y la cca de 2,00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La recuperación en el punto medio de la curva del estándar fue del

27%, es decir que, como los anteriores inmunoensayos, éste subestimaría la concentración de la proteína recombinante diluida en medio A suplementado con 5% V/V SFB. Este efecto puede atribuirse, en todos los casos, a la presencia en el medio de cultivo de proteínas que se unen a la citoquina, actuando como *carriers*, e interfiriendo con el inmunoensayo; además, debido a su relativamente alta hidrofobicidad, el IFN- $\beta$ 1 se adsorbe rápidamente a diferentes superficies, constituyendo un problema también para su producción, purificación y estandarización (Meager y Gaine-Das, 2005).

La curva dosis-respuesta correspondiente a la citoquina diluida en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS mostró un rango de linealidad comprendido entre 0,25 y 0,02  $\mu$ g/ml con un valor de correlación superior a 0,99. Este rango fue seleccionado como zona útil y de mayor sensibilidad para cuantificar el rhIFN- $\beta$ 1 presente en muestras desconocidas. Por otro lado, el límite de detección del ensayo fue de 0,01  $\mu$ g/ml.

En las Figs. 20, 21 y 22 se observa que los diferentes medios diluyentes no afectaron el paralelismo de las curvas.

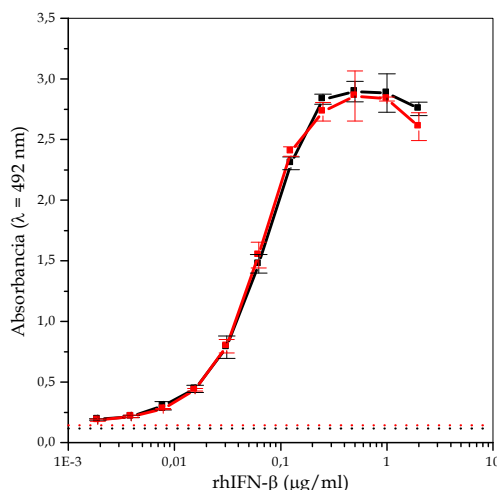
Se seleccionó el ELISA de competición empleando Igs de conejo y un MAb, debido a que permitiría determinar la concentración del Ag en muestras complejas con mayor sensibilidad (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis comparativo de los diferentes ELISAs desarrollados.

ELISA	Rango lineal ( $\mu$ g/ml)	Límite de detección ( $\mu$ g/ml)
<i>sandwich</i> empleando Igs de conejo	10,00-0,62	0,30
<i>sandwich</i> empleando un MAb y un anti-suero policlonal	0,25-0,06	0,04
competición empleando Igs de conejo y un MAb	0,25-0,02	0,01

Cuando se empleó como diluyente medio A suplementado con 5% V/V SFB para preparar la primera dilución de la curva y luego se realizaron las posteriores diluciones en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS, se observó paralelismo y superposición con la curva obtenida desde la primera dilución en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS (Fig. 23). Este hecho es muy importante teniendo en cuenta que las muestras a dosar están presentes en un medio diluyente con un entorno de componentes diferentes al del diluyente utilizado para la preparación del estándar. Por lo tanto, este ELISA es adecuado para la cuantificación de rhIFN- $\beta$ 1 en los sobrenadantes de cultivo.





**Fig. 23. ELISA de competición empleando Igs de conejo y un MAb.**

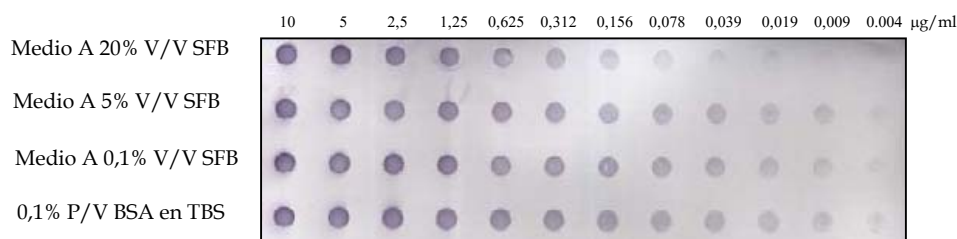
Las curvas fueron realizadas utilizando Betaferon como estándar, diluido inicialmente en 0,1% P/V BSA y 0,05% V/V Tween en PBS (■) o en medio A suplementado con 5% V/V SFB, y las posteriores diluciones en 0,1 % P/V BSA 0,05 % V/V Tween en PBS (■).

Las curvas correspondientes al estándar y las muestras fueron procesadas por duplicado y los resultados se muestran como el valor promedio ± SD. Con líneas punteadas se indican los valores de los respectivos controles realizados sin Ag.

### 1.3. *Immunodot*

En la Fig. 24 se muestra el *immunodot* desarrollado para semicuantificar rhIFN-β1.

La sensibilidad resultó dependiente de la solución en la cual se encuentra disuelta la citoquina. Cuando el disolvente es 0,1% P/V BSA en TBS o medio A suplementado con 0,1 o 5% V/V SFB, el método permite detectar entre 0,31 y 0,01 μg/ml de rhIFN-β1 sin importar el diluyente. En cambio, cuando el rhIFN-β1 está disuelto en medio A suplementado con 20% V/V SFB, el rango de detección se ubicó entre 2,50 y 0,04 μg/ml, disminuyendo la sensibilidad del método.



**Fig. 24. *Immunodot* para la detección de rhIFN-β1.**

El *immunodot* resulta un método óptimo para el *screening* de las células productoras, por cumplir los requisitos de rapidez, sencillez y de sensibilidad apropiada.

## 1.4. Desarrollo de un bioensayo

El ensayo de valoración de la actividad biológica antiviral de rhIFN- $\beta$ 1 está basado en la inducción de la respuesta celular en células humanas, que previenen o reducen el efecto citopático de una infección viral (Rubinstein y col., 1981).

En este caso, la potencia de rhIFN- $\beta$ 1a presente en los sobrenadantes de cultivo es estimada por comparación de la protección del efecto citopático ejercido por el rhIFN- $\beta$ 1a de la muestra con respecto a un estándar (Meager, 2002). Este efecto se determina a través del número de células que permanecen adheridas a la placa de cultivo al final del ensayo, debido a que captaron suficiente cantidad de rhIFN- $\beta$ 1a, lo que les permitió evitar ser lisadas por el virus. El número de células remanentes en cada cavidad se mide por la incorporación del colorante cristal violeta a las mismas, y esto es proporcional a la concentración de rhIFN- $\beta$ 1: a mayor concentración del mismo, menor efecto citopático por acción del virus y, por lo tanto, menor cantidad de células desprendidas y eliminadas en el sobrenadante, dando como resultado una mayor incorporación del colorante. Éste es luego disuelto por ácido acético y el color resultante es directamente proporcional al número de células presentes.

### 1.4.1. Optimización del ensayo de valoración biológica *in vitro*

Entre los factores que afectan la exactitud de una medición se encuentran la necesidad de trabajar con un estándar precalibrado como estándar interno, el paralelismo de las curvas dosis-respuesta del estándar y la muestra y otros parámetros relacionados con los denominados errores sistemáticos y aleatorios, responsables de una baja reproducibilidad o imprecisión de los ensayos. La evaluación de estos últimos parámetros estadísticos requiere del análisis de mediciones reiteradas de diferentes dosis del analito presente en la muestra, dentro del mismo ensayo (intra-ensayo) o en ensayos reproducidos en diferentes ocasiones (inter-ensayos).

Por lo tanto, la puesta a punto de un ensayo de cuantificación requiere necesariamente de la estimación de la precisión o reproducibilidad del ensayo, que se expresa usualmente mediante la medición de los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo o inter-ensayo.

Se optimizaron las condiciones del bioensayo empleando como estándar rhIFN- $\beta$ 1b (Betaferon), variando el tiempo del ensayo entre 24, 48 y 72 h. En cada caso se determinó los CV inter e intra ensayo. La muestra se procesó por triplicado dentro de cada ensayo reiterándose en tres ocasiones diferentes. El CV se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$CV(\%) = \frac{SD}{P} \times 100 \quad (17)$$

Donde CV representa el coeficiente de variación, SD representa la desviación estándar resultante de la determinación de la concentración de rhIFN- $\beta$ 1 evaluado por triplicado, y P el promedio de las mencionadas determinaciones. En el caso de determinar el CV intra-ensayo, SD y P representaron la desviación estándar y el

promedio de la cuantificación realizada por triplicado dentro del mismo ensayo. Al evaluar el CV inter-ensayo, SD y P representaron la desviación estándar y el promedio de las concentraciones calculadas a partir de las determinaciones realizadas en tres ocasiones diferentes.

En la Tabla VIII se resumen los CV intra e inter-ensayo del ensayo de valoración biológica *in vitro* para la determinación de la potencia de rhIFN- $\beta$ 1. Los valores de los CV intra-ensayo oscilaron entre un 5 y 22%, y los inter-ensayo entre un 19 y 30%, aproximadamente, demostrando que no hay una gran variación en la reproducibilidad de los diferentes ensayos.

**Tabla VIII. Reproducibilidad intra e interensayo de los ensayos de valoración biológica *in vitro* de rhIFN- $\beta$ 1.**

Duración del ensayo (h)	Reproducibilidad			
	Intra-ensayo CV (%)			Inter-ensayo CV (%)
24	14,5	18,7	9,1	18,8
48	14,2	20,0	22,5	29,7
72	4,8	6,4	5,7	24,7

Por lo expresado anteriormente, se consideró que todos los ensayos realizados eran válidos en cuanto a su reproducibilidad, seleccionando 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 obtenidas durante el trabajo de tesis.

#### **1.4.2. Valoración biológica *in vitro***

La optimización del ensayo de valoración biológica *in vitro* de rhIFN- $\beta$ 1 permitió seleccionar aquél cuya duración es de 24 h.

La Fig. 25 muestra la estimación de la potencia biológica de rhIFN- $\beta$ 1a presente en un sobrenadante de cultivo de células CHO.K1 productoras de la proteína recombinante. La determinación fue realizada por comparación con el estándar interno no glicosilado.

La validación del bioensayo se realizó mediante el análisis estadístico de la varianza o ANOVA, optimizado en nuestro laboratorio, el cual permite evaluar los parámetros de regresión, linealidad y paralelismo de las curvas correspondientes al estándar y a la muestra (Milano y col., 2001).

En primer lugar se comprobó que las varianzas fueran homogéneas mediante la prueba de cedasticidad.

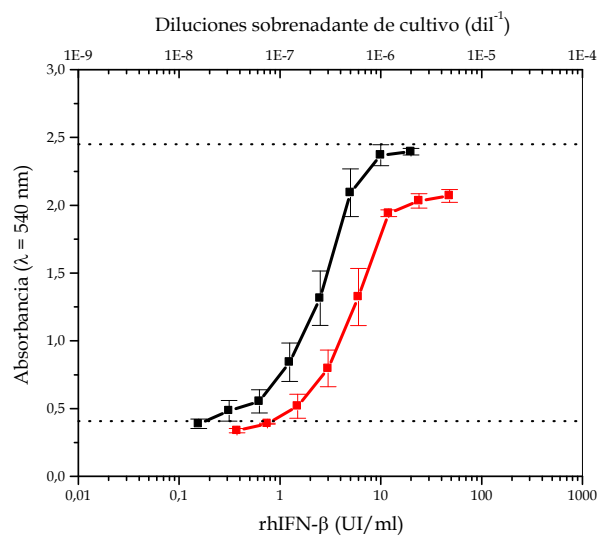
Luego se evaluó cada uno de los componentes de la varianza, comparando el valor F (prueba estadística de Fisher) obtenido para cada uno de ellos frente al valor F de tabla, correspondiente a una confianza del 99%. Así, se obtuvieron para los

parámetros paralelismo y linealidad valores de F inferiores al F de tabla, cumpliéndose de este modo ambas condiciones.

Para el parámetro regresión, el valor de F obtenido resultó mucho mayor que el F de tabla, confirmando la existencia de una regresión y posibilitando el cálculo de límites de confianza de la potencia lo suficientemente estrechos como para ser útiles.

Para el análisis de la varianza y la estimación de la potencia biológica se emplearon 5 puntos de cada curva ubicados en la región lineal. El rango de linealidad del estándar resultó comprendido entre 1,5 y 12,0 UI/ml, con un valor de correlación superior a 0,99.

El límite de detección del ensayo se estableció como la mínima concentración de rhIFN- $\beta$ 1 capaz de dar una respuesta superior al valor del promedio del control negativo más 3 SD. Dicho valor fue de 1,4 UI/ml.



**Fig. 25. Valoración de la actividad biológica *in vitro* de rhIFN- $\beta$ 1.**

La valoración de la actividad biológica de rhIFN- $\beta$ 1a, presente en el sobrenadante de cultivo de una línea celular CHO.K1 recombinante (■) fue realizada utilizando Betaferon como estándar (■).

Las curvas correspondientes al estándar y a la muestra fueron procesadas por triplicado y los resultados se muestran como el valor promedio  $\pm$  SD. Las líneas horizontales punteadas indican los valores promedio de los controles negativo y positivo del ensayo procesados por cuadruplicado.

## 2. Construcción de vectores de expresión eucariota

La estrategia más extendida para la producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico en células de mamíferos se basa en la obtención de líneas celulares que contengan integrado en su genoma y expresen de manera estable el gen de interés. El control de la expresión del gen foráneo se logra mediante el empleo de promotores celulares o virales fuertes. Estos promotores pueden ser empleados en diferentes líneas celulares con el objeto de lograr altos niveles de expresión. Sin embargo, su actividad transcripcional variará dependiendo de los niveles celulares de factores de

transcripción relevantes, de la estructura de la cromatina en el sitio donde se produce la integración, del número de copias del gen, de la eficiencia de traducción y de otros elementos regulatorios (Fussenegger y col., 1999; Park y col., 2000; Zhi-Li y col., 2001).

Considerando las razones expuestas anteriormente, se decidió estudiar la producción de proteína recombinante en diferentes líneas celulares que fueron transfectadas con el gen de hIFN- $\beta$ 1 subclonado en diferentes vectores de expresión para células eucariotas.

## 2.1. Subclonado del gen de hIFN- $\beta$ 1 en diferentes vectores

### 2.1.1. Optimización de las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para obtener la secuencia codificante del gen de hIFN- $\beta$ 1

Se purificó ADN genómico a partir de sangre periférica para ser utilizado como molde. Posteriormente, se optimizaron las condiciones de PCR para obtener el gen que codifica para hIFN- $\beta$ 1. Para esto se realizó un ensayo variando la cantidad de ADN molde, la concentración de MgCl<sub>2</sub> y la temperatura de hibridación, tal cual se resume en la Tabla IX. Los fragmentos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa (Fig. 26) para seleccionar la condición que permitiera la mayor amplificación del gen.

Tabla IX. Condiciones optimizadas para obtener por PCR el gen de hIFN- $\beta$ 1.

ADN molde (ng)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	T de hibridación (°C)
100	1,5	64,0
500	2,0	66,3
1.000	2,0	67,9

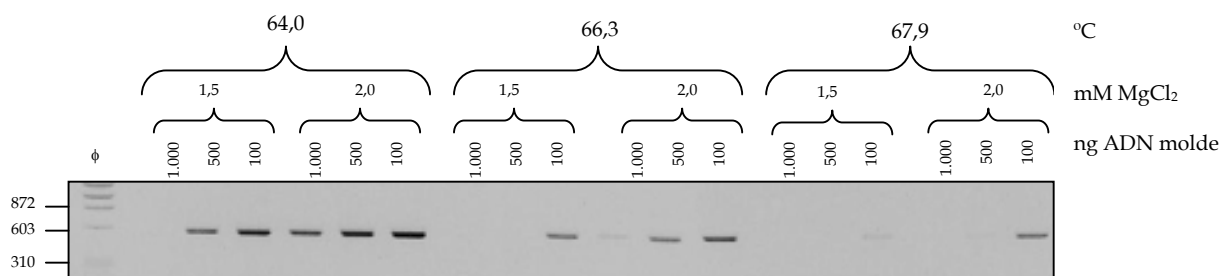


Fig. 26. Optimización de las condiciones de PCR para la obtención del gen de hIFN- $\beta$ 1. El análisis de los productos de PCR fue realizado en un gel de al agarosa 0,8% P/V.

En base a los resultados obtenidos, cada fragmento utilizado para la posterior construcción de los vectores de expresión se obtuvo mediante amplificación por PCR con 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 64 °C durante 30 seg y extensión a 72 °C durante 1 min. Las reacciones se llevaron a cabo agregando 100 ng de ADN molde y 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Estas condiciones permitieron la mayor amplificación del fragmento deseado.

## 2.1.2. Construcción de vectores con la secuencia *wild type* del gen de hIFN- $\beta$ 1

### 2.1.2.1. Vector pGEM-T Easy-IFN- $\beta$ 1

Después de obtener el gen de hIFN- $\beta$ 1 mediante la técnica de PCR y ligarlo en el plásmido pGEM-T Easy, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ F'Iq y se seleccionaron las colonias en placas con LB-agar, ampicilina y X-gal.

Se escogieron al azar colonias blancas recombinantes, verificándose luego la orientación del gen de hIFN- $\beta$ 1. Para esto se realizó la extracción del ADN plasmídico de las colonias, analizándolo mediante restricción con la enzima *Pst*I. Así, si el gen está orientado en la posición correcta, se observan una banda de gran tamaño y otra más pequeña, de alrededor de 400 pb. En cambio, si el gen está orientado en dirección opuesta, se observan una banda de gran tamaño y otra más pequeña, de alrededor de 200 pb. Con este criterio, se seleccionó el clon denominado pGEM-T Easy-IFN- $\beta$ 1 (Fig. 27).

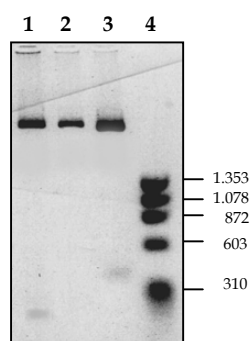


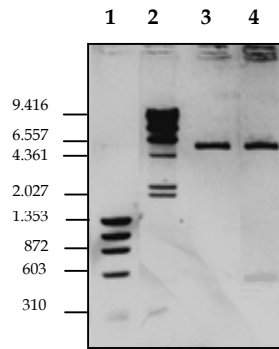
Fig. 27. Análisis de los plásmidos pGEM-T Easy recombinantes digeridos con *Pst*I, en un gel de agarosa al 0,8% P/V.

- 1: pGEM-T Easy con el gen de hIFN- $\beta$ 1 clonado en la orientación incorrecta.
- 2: pGEM-T Easy religado.
- 3: pGEM-T Easy con el gen de hIFN- $\beta$ 1 clonado en la orientación correcta.
- 4: Marcador de tamaño molecular  $\phi$  (pb).

### 2.1.2.2. Vector pCIneo-IFN- $\beta$ 1

A partir del vector pGEM-T Easy-IFN- $\beta$ 1 se extrajo, mediante digestión con la enzima de restricción *Eco*RI, el gen de hIFN- $\beta$ 1 para clonarlo en el plásmido de expresión eucariota pCIneo, previamente linealizado con la misma enzima y desfosforilado. Bacterias *E. coli* DH5F'Iq competentes fueron transformadas con la reacción de ligación y seleccionadas en placas con LB-agar y ampicilina.

Se escogieron al azar colonias y se realizó la purificación del ADN plasmídico, determinando los clones que poseían el inserto del gen de hIFN- $\beta$ 1 mediante restricción con *Eco*RI (Fig. 28).



**Fig. 28. Análisis de los plásmidos pCIneo recombinantes digeridos con *EcoRI*, en un gel de agarosa al 0,8 % P/V.**  
 1: Marcador de tamaño molecular  $\phi$  (pb).  
 2: Marcador de tamaño molecular  $\lambda$  (pb).  
 3: pCIneo religado.  
 4: pCIneo con el gen de hIFN- $\beta$ 1 clonado.

Posteriormente se realizó una transfección transiente de células CHO.K1 con los plásmidos recombinantes que contenían el gen de hIFN- $\beta$ 1. A partir del *screening* de los sobrenadantes de estos cultivos se seleccionó uno de los clones que contenía el gen orientado correctamente.

El secuenciamiento del clon elegido mostró que el fragmento de ADN clonado en el plásmido denominado pCIneo-IFN- $\beta$ 1 coincide con la secuencia del gen de hIFN- $\beta$ 1 presente en GenBank (Fig. 29), no posee mutaciones y está correctamente orientado, confirmando el resultado obtenido a partir de la transfección transiente.

1	ATGACCAAC AAGTGTCTCC TCCAAATTGC TCTCCTGTTG TGCTTCTCCA CTACAGCTCT TTCCATGAGC TACAACCTTGC TTGGATTCTCT ACAAGAAGC TACTGGTTG TTCACAGAGG AGGTTTAACG AGAGGACAAC ACGAAGAGGT GATGTCGAGA AAGGTAICTCG ATGTTGAACG AACCTAAGGA TGTTTCTTCC
100	AGCAATTTTC AGTGTCAAG GCTCCTGTGG CAATTGAATG GGAGGCTTGA ATACTGCCTC AAGGACAGGA TGAACCTTGA CATCCCTGAG GAGATTAAGC TCGTTAAAAG TCACAGTCTT CGAGGACACC GTTAACTTAC CCTCCGAAC TATGACGGAG TTCCTGTCCT ACTTGAAACT GTAGGGACTC CTCTAATTCC
200	AGCTGCAGCA GTTCCAGAAG GAGGACGCCG CATTGACCAT CTATGAGATG CTCCAGAACA TCTTTGCTAT TTTCAGACAA GATTCATCTA GCACTGGCTG TCGACGTCGT CAAGGTCTTC CTCCTGCCGC GTAAGTGGTA GATACTCTAC GAGGTCTTGT AGAAACGATA AAAGTCTGTT CTAAGTAGAT CGTGACCCGAC
300	GAATGAGACT ATTGTTGAGA ACCTCCTGGC TAATGTCTAT CATCAGATAA ACCATCTGAA GACAGTCTCG GAAGAAAAAC TGGAGAAAGA AGATTTCAAC CTTACTCTGA TAACAACCTCT TGGAGGACCG ATTACAGATA GTAGTCTATT TGGTAGACTT CTGTCAGGAC CTCTTTTTTG ACCTCTTTCT TCTAAAAGTG
400	AGGGGAAAAC TCATGAGCAG TCTGCACCTG AAAAGATATT ATGGGAGGAT TCTGCATTAC CTGAAGGCCA AGGAGTACAG TCACTGTGCC TGGACCATAG TCCCCTTTTG AGTACTCGTC AGACGTGGAC TTTTCTATAA TACCCTCCTA AGACGTAATG GACTTCCGGT TCCTCATGTC AGTGACACCG ACCTGGTATC
500	TCAGAGTGG AATCCTAAGG AACTTTTACT TCATTAACAG ACTTACAGGT TACCTCCGAA ACTGA AGTCTCACCT TTAGGATTCC TTGAAAATGA AGTAATTGTC TGAATGTCCA ATGGAGGCTT TGACT

**Fig. 29. Secuencia correspondiente al gen de hIFN- $\beta$ 1.**

### 2.1.2.3. Vector pKG4-IFN- $\beta$ 1

Para la construcción del vector pKG4-IFN- $\beta$ 1 y por un inconveniente de incompatibilidad entre los sitios de restricción presentes en su sitio múltiple de clonado y los sitios del vector pGEM-T Easy-IFN- $\beta$ 1, fue necesario realizar

previamente un subclonado en un vector intermedio, seleccionando para tal objetivo el vector pGEM-3Zf(+).

Se subclonó el gen de hIFN- $\beta$ 1, obtenido a partir del plásmido pGEM-T Easy-IFN- $\beta$ 1 por digestión con las enzimas de restricción *Sall* y *SphI*, en el plásmido pGEM-3Zf(+), digerido con las mismas enzimas. Bacterias *E. coli* DH5F'Iq competentes fueron transformadas con la reacción de ligación y seleccionadas en placas con LB-agar y ampicilina.

Se escogieron al azar colonias y se realizó la purificación del ADN plasmídico, determinando los clones que poseían el inserto del gen de hIFN- $\beta$ 1 por restricción con las mismas enzimas empleadas para su construcción.

Posteriormente se realizó la ligación del vector pKG4 digerido con las enzimas *HindIII* y *BamHI* y del gen de hIFN- $\beta$ 1 proveniente del plásmido pGEM-3Zf(+)-IFN- $\beta$ 1 seleccionado, extraído mediante corte de restricción con las mismas enzimas. Bacterias *E. coli* DH5F'Iq competentes fueron transformadas con la reacción de ligación y seleccionadas en placas con LB-agar y ampicilina.

Se escogieron al azar colonias y se realizó la purificación del ADN plasmídico, determinando los clones que poseían el inserto del gen de hIFN- $\beta$ 1 mediante la restricción con las enzimas *HindIII* y *BamHI* (Fig. 30)

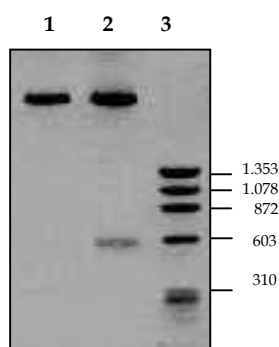


Fig. 30. Análisis de los plásmidos pKG4 recombinantes digeridos con *HindIII* y *BamHI*, en un gel de agarosa al 0,8 % P/V.

- 1: pKG4 religado.
- 2: pKG4 con el gen de hIFN- $\beta$ 1 clonado en posición correcta.
- 3: Marcador de tamaño molecular  $\phi$  (pb)

Se seleccionó uno de los clones que presentó el inserto del gen de hIFN- $\beta$ 1, considerando que debe encontrarse en la orientación correcta, ya que el clonado fue direccionado. El secuenciamiento mostró que el fragmento de ADN clonado en el plásmido denominado pKG4-IFN- $\beta$ 1 coincide con la secuencia del gen de hIFN- $\beta$ 1 presente en GenBank (Fig. 29) y no posee mutaciones, confirmándose además, que está correctamente orientado.

#### 2.1.2.4. Vector pcDNA-IFN- $\beta$ 1

El plásmido pcDNA-IFN- $\beta$ 1 fue cedido gentilmente por el Dr. Jorge Zorzópulos de la Fundación Pablo Cassará.

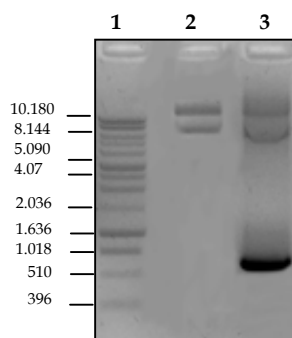


El secuenciamiento mostró que el fragmento de ADN clonado en el plásmido denominado pcDNA-IFN- $\beta$ 1 coincide con la secuencia del gen de hIFN- $\beta$ 1 presente en GenBank (Fig. 29) y no posee mutaciones, confirmándose además, que está correctamente orientado.

#### 2.1.2.5. Vector p91023-IFN- $\beta$ 1

El gen de hIFN- $\beta$ 1 se obtuvo mediante digestión del plásmido pCIneo-IFN- $\beta$ 1 con la enzima *EcoRI*, lo que permitió posteriormente el clonado en el plásmido de expresión p91023, linealizado con la misma enzima y desfosforilado. Bacterias *E. coli* DH5F'Iq competentes fueron transformadas con la reacción de ligación y fueron seleccionadas en placas con LB-agar y tetraciclina.

Se escogieron al azar colonias y se realizó la purificación del ADN plasmídico, determinando los clones que poseían el inserto del gen de hIFN- $\beta$ 1 mediante la técnica de PCR, utilizando un *primer* Fw que hibrida con una región perteneciente al plásmido y un *primer* Rv del gen de hIFN- $\beta$ 1. Se obtuvo entonces un fragmento de aproximadamente 600 pb sólo en el caso en el que el gen estaba clonado en la orientación correcta (Fig. 31).



**Fig. 31. Análisis de los los productos de PCR originados a partir de plásmidos p91023 recombinantes en un gel de agarosa al 0,8 % P/V.**

1: Marcador de tamaño molecular 1 Kb (pb)

2: p91023 religado.

3: p91023 con el gen de hIFN- $\beta$ 1 clonado en la orientación correcta.

El secuenciamiento mostró que el fragmento de ADN clonado en el plásmido denominado p91023-IFN- $\beta$ 1 coincide con la secuencia del gen de hIFN- $\beta$ 1 presente en GenBank (Fig. 29) y no posee mutaciones, confirmándose además, que está correctamente orientado.

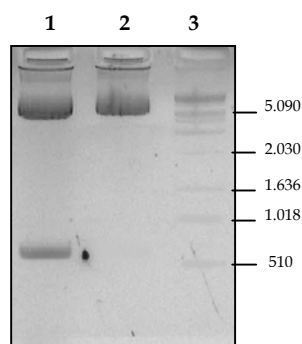
#### 2.1.2.6. Construcción del vector pzc-IFN- $\beta$ 1

Con el fin de obtener un plásmido que posea un promotor fuerte como es el del CMV junto a su secuencia *enhancer*, presentes en el vector pCIneo, y una cola de poliA

muy estable como la de BGH, presente en el vector pcDNA3.1(-), se construyó un nuevo vector híbrido denominado pzc-IFN- $\beta$ 1.

El gen de hIFN- $\beta$ 1 junto a la región promotora se obtuvieron mediante digestión del plásmido pCIneo-IFN- $\beta$ 1 con las enzimas *Bgl*III y *Kpn*I, lo que permitió posteriormente clonarlos en el plásmido de expresión pcDNA3.1(-) linealizado con las mismas enzimas. Bacterias *E. coli* DH5F'Iq competentes fueron transformadas con la reacción de ligación y fueron seleccionadas en placas con LB-agar y ampicilina.

Se escogieron al azar colonias y se realizó la purificación del ADN plasmídico, determinando los clones que poseían el inserto del gen de hIFN- $\beta$ 1 mediante su liberación por restricción con *Eco*RI (Fig. 32).



**Fig. 32. Análisis de los plásmidos pzc recombinantes digeridos con *Eco*RI, en un gel de agarosa al 0,8 % P/V.**

- 1: pzc con el gen de hIFN- $\beta$ 1 clonado en la orientación correcta.
- 2: pcDNA3.1(-).
- 3: Marcador de tamaño molecular 1 Kb(pb).

Se seleccionó uno de los clones que presentó el inserto del gen de hIFN- $\beta$ 1, considerando que se encuentra en la orientación correcta por haber realizado el clonado en forma direccionada. El secuenciamiento mostró que el fragmento de ADN clonado en el plásmido denominado pzc-IFN- $\beta$ 1 coincide con las secuencias del promotor y *enhancer* del CMV y del gen de hIFN- $\beta$ 1 presente en GenBank (Fig. 29) y no posee mutaciones, confirmándose además, que está correctamente orientado.

### 3. Transfecciones de líneas celulares eucariotas

La eficiencia de la transferencia del gen de interés así como también su expresión y estabilidad dependen de la línea celular. Así es que existen diferencias significativas en la expresión, ya sea transiente o estable, de una proteína clonada en el mismo plásmido transferido a diferentes líneas celulares. Aunque los elementos de regulación de la expresión en los plásmidos tienen un rol importante en la eficiencia de la expresión, las diferencias no pueden ser explicadas a este nivel. Se ha encontrado que ciertas líneas celulares permiten el empaquetamiento del ADN foráneo en una forma de cromatina favorable, mientras que otras inducen el empaquetamiento en una forma menos activa; por lo tanto, la actividad del sitio de integración cromosomal puede diferir en las diferentes líneas celulares (Hauser, 1997). Además, la forma más

común para la integración de los genes recombinantes en el genoma de las células huésped es por inserción al azar en el cromosoma. Desafortunadamente este proceso es muy ineficiente y el sitio de integración al cromosoma, el número de copias insertadas y los niveles de expresión no pueden ser predichos (Barnes y col., 2003).

Por tal motivo, se decidió realizar transfecciones con los plásmidos disponibles en diferentes líneas celulares, tratando de encontrar un clon productor de rhIFN- $\beta$ 1a en altos niveles.

### 3.1. Optimización de las condiciones de transfección

Durante la última década, una amplia variedad de métodos de transfección han sido desarrollados para introducir ADN foráneo dentro de células de mamífero. La estrategia a emplear depende del tipo celular, de las características de crecimiento y del uso posterior que se le dará a la célula manipulada genéticamente, entre otros factores (Schlokot y col., 1997).

Algunos de los problemas asociados con los métodos de transfección tradicionales, como la coprecipitación con CaPO<sub>4</sub>, DEAE-dextrano, polibreno y electroporación, incluyen baja eficiencia de introducción del ADN, pobre reproducibilidad y toxicidad celular. En cambio, la transfección mediada por lípidos catiónicos produce altas eficiencias en una gran variedad de células eucariotas y, además, es un método simple de realizar y asegura resultados consistentes y reproducibles.

Los liposomas se unen y condensan el ADN espontáneamente para formar complejos de elevada afinidad por las membranas celulares. La endocitosis de los complejos, seguida de la disrupción de la membrana lisosomal, pareciera ser uno de los mecanismos propuestos que explicaría la incorporación y liberación del ácido nucleico al medio intracelular (Fig. 33) (Chesnoy y Huang, 2000).

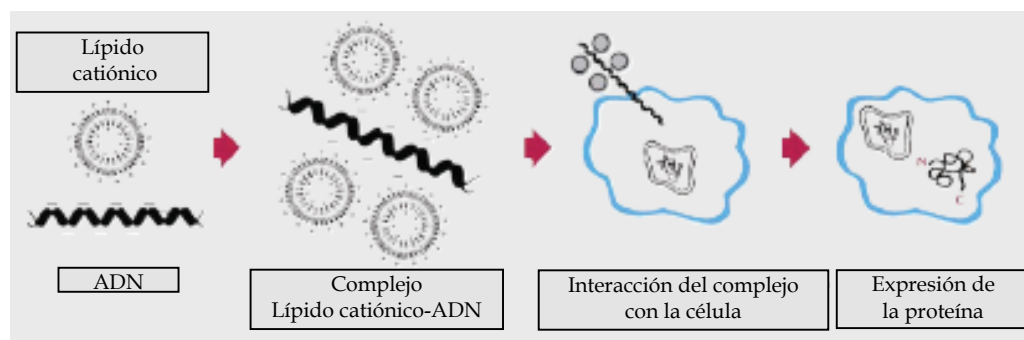
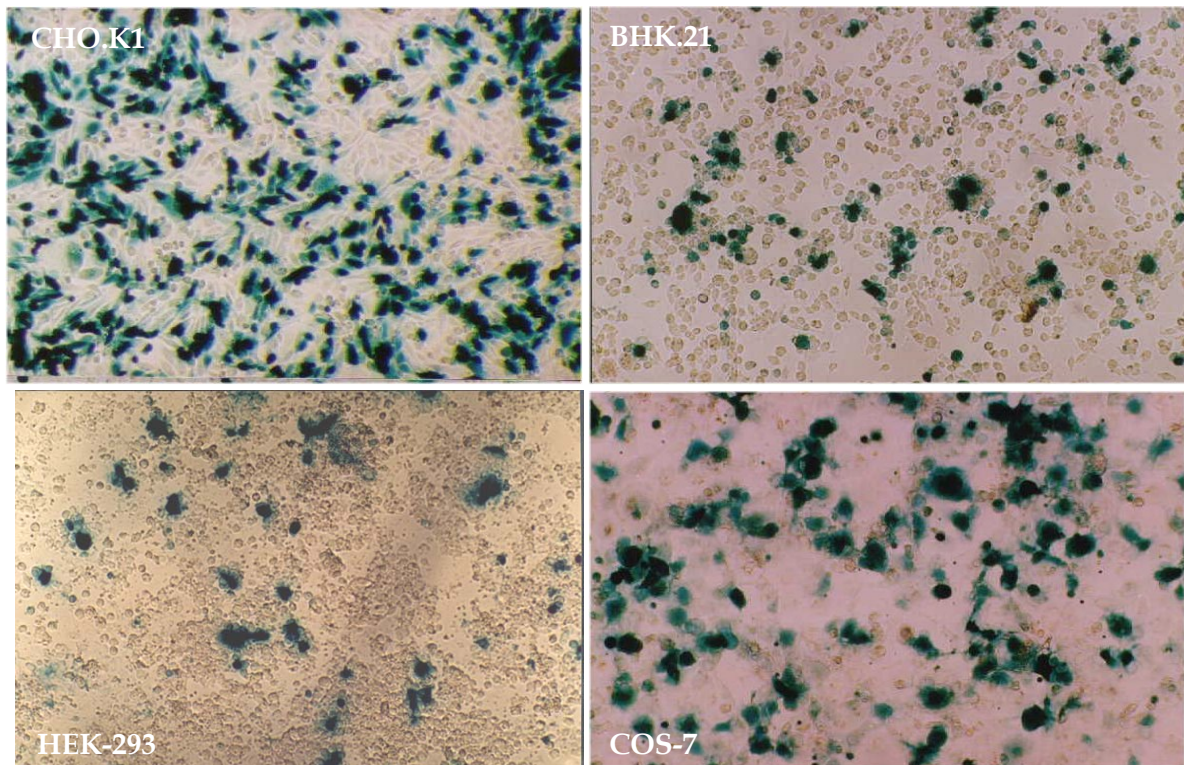


Fig. 33. Esquema representativo del mecanismo propuesto que explicaría la incorporación y liberación del ADN al interior celular.

Debido a que diferentes formulaciones, marcas y lotes de lípidos producen eficiencias de transfección disímiles en las células de mamífero, la elección del lípido apropiado para transfectar los distintos tipos celulares con el gen de interés constituyó un parámetro a optimizar.

Para ello, se determinó la concentración óptima de varios lípidos catiónicos -tales como Lipofectin, LipofectAMINE, LipofectAMINE Plus, LipofectAMINE 2000, CellFECTIN, DMRIE-C y DOTAP- al transfectar las líneas celulares CHO.K1, BHK.21, HEK-293 y COS-7, empleando el plásmido reportero pCMV-SPORT- $\beta$ -gal. Luego de 24 h post-transfección, se evaluó la eficiencia de transfección para cada lípido, mediante la coloración azul *in situ* de la actividad  $\beta$ -gal.

En la Fig. 34 se pueden observar algunas de las condiciones que permitieron obtener numerosas células transfectadas. Del análisis comparativo del conjunto de lípidos empleados concluimos que con los lípidos LipofectAMINE, LipofectAMINE Plus y LipofectAMINE 2000 se obtuvieron las eficiencias de transfección deseables en células COS-7, BHK.21 y CHO.K1, mientras que para las células HEK-293 el mejor lípido resultó ser el DOTAP. Se encontraron eficiencias altas y similares, con los lípidos detallados, en un rango de concentraciones de lípido y ADN que posteriormente se tuvieron en cuenta al realizar las distintas transfecciones que se describen en la Tabla XI, en la sección 3.3 (pág. 87).



**Fig. 34. Tinción *in situ* de  $\beta$ -gal: máxima eficiencia de transfección para cada línea celular.**

Las células CHO.K1, BHK.21 y COS-7 fueron transfectadas con LipofectAMINE (25  $\mu$ g/ml), y las células HEK-293 con DOTAP (17  $\mu$ g/ml), empleando el plásmido reportero pCMV-SPORT- $\beta$ -gal (4 y 6  $\mu$ g/ml para cada lípido, respectivamente).

Comparando las eficiencias de transfección entre las líneas celulares, se concluyó que las células CHO.K1 presentaron la mayor tasa de transfectabilidad para los diferentes lípidos. De esta manera se confirma, además, la existencia de las variaciones descritas en las eficiencias de transfección al combinar diferentes líneas celulares y lípidos (MacDonald y col. 1996).

Por otro lado, y para todas las líneas celulares, se observó que concentraciones crecientes del lípido en estudio también aumentaban la eficiencia de transfección, pero concomitantemente había un incremento en la muerte celular, existiendo entonces un compromiso entre viabilidad celular y eficiencia de transfección.

En general, en cuanto a los lípidos, se halló que las formulaciones con lípidos catiónicos multivalentes, como la LipofectAMINE (Hawley-Nelson y col., 1993) en todas sus variantes, presentaron mejores eficiencias de transfección que los lípidos catiónicos monovalentes, como lo son el Lipofectin (Felgner y col., 1987; Brigham y col., 1989; Zhu y col., 1993), CellFECTIN (Mizuarai y col., 2001), DMRIE-C (San y col., 1993; Felgner y col., 1994) y DOTAP (Leventis y Silvius, 1990; Hyde y col., 1993), estando estas observaciones en concordancia con lo encontrado por Behr y col. (1989) y Hawley-Nelson y col. (1993).

### **3.2. Métodos de selección de las células transfectadas**

Una vez realizado el proceso de transfección se obtienen dos poblaciones de células: las que incorporaron el plásmido (transfectantes) y las que no lo hicieron (*wild type*). En general los plásmidos empleados en transfecciones estables contienen además del gen de la proteína de interés, un gen que confiere alguna nueva resistencia a la célula donde es introducido.

Si se desea obtener una línea celular recombinante que exprese la proteína de interés, resulta imprescindible optimizar el método de selección de transfectantes antes de realizar el proceso de transfección en sí. Con tal fin, se estudiaron las concentraciones mínimas necesarias de los antibióticos a utilizar para provocar la muerte de 200.000 células no transfectadas en un período de 15 días, sometiénolas a concentraciones variables de cada antibiótico en un rango de trabajo adecuado.

#### **3.2.1. Selección de las células que expresan la enzima aminoglucósido 3' fosfotransferasa**

Las células que expresan la enzima APH son aquéllas que han sido transfectadas con los plásmidos pCIneo-IFN- $\beta$ 1 y pKG4-IFN- $\beta$ 1, los cuales contiene el gen de la aminoglucósido 3' fosfotransferasa. Para seleccionarlas se utilizó el antibiótico geneticín o G-418 Sulfato.

Se recomienda su uso en una concentración entre 100 y 800  $\mu$ g/ml, según el fabricante. Se utilizó en una concentración de 400  $\mu$ g/ml durante la selección de líneas celulares transformadas, con excepción de las células NS0 que se seleccionaron con 725  $\mu$ g/ml de antibiótico (Tabla X).

#### **3.2.2. Selección de las células que expresan la enzima zeocina**

Las células que expresan la enzima zeocina son aquéllas que han sido transfectadas con los plásmidos pcDNA-IFN- $\beta$ 1 y pzc-IFN- $\beta$ 1, los cuales contienen el gen *sh ble*. Para seleccionarlas se utiliza el antibiótico zeocina.

Se recomienda su uso en una concentración entre 50 y 1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , según el fabricante. Se lo utilizó en una concentración de 120, 200, 800 y 1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para las células NS0, HEK-293, CHO.K1 y BHK.21, respectivamente, durante la selección de células transformadas (Tabla X).

Tabla X. Determinación de la concentración óptima de antibiótico que permite la posterior selección de las células transfectadas.

Línea celular	Antibiótico	Concentración ( $\mu\text{g}$ activos/ml de medio)
NS0	Geneticín	725
HEK-293		400
CHO.K1		
BHK.21		
NS0	Zeocina	120
HEK-293		200
CHO.K1		800
BHK.21		1.000

### 3.3. Obtención de líneas celulares recombinantes productoras de rhIFN- $\beta$ 1a

Con el fin de obtener líneas celulares estables productoras de rhIFN- $\beta$ 1a, se realizaron transfecciones en diferentes condiciones con distintos plásmidos en células CHO.K1, CHO dhfr-, BHK.21, HEK-293, COS-7 y NS0.

Después de 15 días de presión de selección con el antibiótico correspondiente según el plásmido utilizado, las células resistentes fueron sometidas al procedimiento de clonado por anillos, excepto las células NS0 que al crecer en suspensión fueron clonadas por el método de dilución límite.

Posteriormente se realizó el *screening* de las células resistentes por *immunodot* y se seleccionaron las líneas celulares que produjeron entre 10 y 20 ng/ml de rhIFN- $\beta$ 1a, detalladas en la Tabla XI, conservándolas por criopreservación.

A pesar de haber realizado numerosas transfecciones, pocas fueron las líneas celulares recombinantes elegidas como productoras. Este resultado era esperable, debido a que se sabe que durante el proceso de obtención de líneas celulares estables, la mayoría de las células mueren en el medio de selección, y sólo en un porcentaje muy bajo se da la integración del ADN exógeno en los cromosomas de la célula huésped.

Tabla XI. Descripción de las transfecciones realizadas sobre diferentes líneas celulares con distintos plásmidos de expresión, variando las condiciones de lipofección.

Condición de transfección			Línea celular	
Lípido:ADN	Lípido	ADN	Transfectada	Obtenida
1:2	DOTAP 5,7 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 pcDNA-IFN-β1 10 µg/ml	HEK-293	pCI 3B4
1:1	LipofectAMINE 2000 6,3 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 4 µg/ml	CHO.K1	pCI 2C4, 2C5
			BHK.21	-
2:1	LipofectAMINE 2000 12 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 6 µg/ml	CHO.K1	pCI 5C4, 5C5, 5D1
			BHK.21	pCI 3D1, 3D4, 3D6
			COS-7	transiente
		p91023-IFN-β1 6 µg/ml	CHO dhfr	1A1
		p91023-IFN-β1 pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 pzc-IFN-β1 6 µg/ml	NS0	p91023 1A2, pCI 1, 4, 10, pKG4 4, 6, 9, pzc-IFN 1
3:1	DOTAP 17 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 6 µg/ml	HEK-293	pCI 2
5:1	LipofectAMINE 19 µg/ml y Plus 15 µl/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 4 µg/ml	CHO.K1	pCI 1B3
			BHK.21	-
6:1	LipofectAMINE 32,2 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 5,2 µg/ml	CHO.K1	pCI 1B1, 1B3, 2A5, 2A6, 2B2, pKG4 1B2, 1B4, 1A2
			BHK.21	pCI 1A2, 1D3, pKG4 1C4, 1C2
	LipofectAMINE 25 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 4 µg/ml	CHO.K1	pCI 2B1 pKG4 6D6
			BHK.21	pCI 6C2, 3A1, 3D3
	LipofectAMINE 16,6 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 2,6 µg/ml	CHO.K1	pCI 3B6 pKG4 1A2, 6D6
			BHK.21	pCI 2A3, 5C4, 5D4 pKG4 2C5, 5D5
	LipofectAMINE 16 µg/ml y Plus 20 µl/ml	pKG4-IFN-β1 4 µg/ml	COS-7	transiente
8:1	LipofectAMINE 16 µg/ml y Plus 20 µl/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 2 µg/ml	CHO.K1	pCI 1A1
10:1	LipofectAMINE 2000 55,5 µg/ml	pCIneo-IFN-β1 pKG4-IFN-β1 pcDNA-IFN-β1 5,2 µg/ml	CHO.K1	pcDNA 1D3
			BHK.21	-

Las relaciones Lípido:ADN indicadas son aproximadas.

Durante la realización de las transfecciones transientes con las células COS-7, se tomaron muestras de sobrenadantes a las 48 y 72 h postransfección, y paralelamente las células fueron lisadas, conservando la fracción intracelular soluble a -20 °C. Finalmente se efectuó la detección de rhIFN-β1a por el ensayo de *inmunodot*. Sólo se encontró una concentración detectable de proteína recombinante en la fracción del sobrenadante tomado a las 72 h para los plásmidos pCIneo-IFN-β1 y pKG4-IFN-β1. Este hecho permitió comprobar que la proteína recombinante es secretada al medio de cultivo.

El par células COS-7 y el plásmido pKG4 es un buen sistema de producción para proteínas recombinantes por permitir la generación episomal de un alto número de copias del plásmido. Este hecho se debe a que esta línea celular ha sido transformada de manera tal de expresar factores que permitan la replicación de ADNs que contengan el origen de replicación del virus SV40 (Sambrook y col., 1989) presente, por ejemplo, en el plásmido pKG4. Sin embargo, no se obtuvieron elevadas producciones de rhIFN- $\beta$ 1a utilizando células COS-7 y el plásmido pKG4-IFN- $\beta$ 1, lo cual puede adjudicarse a inconvenientes intrínsecos encontrados por numerosos autores durante la producción de rhIFN- $\beta$ 1a, más que a problemas en el sistema de expresión transiente seleccionado.

### 3.4. Obtención de clones celulares estables productores de rhIFN- $\beta$ 1a

Con el fin de obtener descendientes de una misma célula y, por lo tanto, genéticamente iguales, a partir de las líneas celulares transfectadas establemente que pueden presentar diferentes propiedades de crecimiento, niveles de expresión y calidad del producto, se realizó el clonado por dilución límite.

En la Tabla XII se resumen los datos de los clones que producen entre 20 y 60 ng/ml de rhIFN- $\beta$ 1a provenientes de las líneas celulares detalladas en la sección anterior. Las líneas celulares que no aparecen en esta Tabla no generaron clones productores de proteína recombinante en concentraciones detectables por los ensayos de *immunodot*.

Tabla XII. Clones productores de rhIFN- $\beta$ 1a derivados de las líneas celulares recombinantes.

Línea celular	Denominación	Clones productores
BHK pCI	2A3	1H11, 1C7, 2A10, 2C5
CHO pCI	1A1	1F5, 2G7
	1B3	1F8, 1F10, 2D11, 2F10
	2A5	1D5
	2A6	1D7, 1G5
	2C5	1B11, 2A6, 4A7, 4C5, 4E11
	3B6	1B6, 1F5, 2A4
CHO pKG4	1A2	1B5, 2E7
CHO pcDNA	1D3	2D5, 2G12
CHO dhfr p91023	1A1	1F1, 1H8, 2A3, 2E4
HEK pCI	3B4	2E9, 2F12



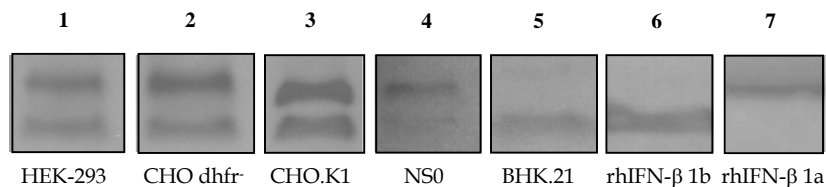
### 3.5. Comparación de la producción de las formas glicosiladas y no glicosiladas de rhIFN- $\beta$ 1a por diferentes líneas celulares

La glicosilación juega un rol importante en el metabolismo *in vivo*, en la estabilidad, en la secreción desde las células y en la solubilidad de rhIFN- $\beta$ 1a (Kagawa y col., 1988).

Es sabido que las moléculas de rhIFN- $\beta$ 1a producido en diferentes líneas celulares, si bien contienen igual secuencia de aminoácidos, poseen diferentes motivos de carbohidratos (Utsumi y col., 1989, Kagawa y col., 1988).

Con el fin de determinar si las líneas celulares recombinantes más productoras producen las mismas proporciones de formas glicosiladas y no glicosiladas de rhIFN- $\beta$ 1a, se compararon iguales alícuotas de sobrenadantes de cultivo utilizando la técnica de *Western blot*.

Se encontró que todas las líneas celulares producen las formas glicosiladas y sin glicosilar de rhIFN- $\beta$ 1a, pero en diferentes proporciones (Fig. 35). Las células CHO.K1, CHO dhfr, NS0 y HEK-293 producen principalmente la forma glicosilada, mientras que las células BHK.21 producen principalmente la forma no glicosilada.



**Fig. 35. Producción de rhIFN- $\beta$ 1a por las diferentes líneas celulares recombinantes.**

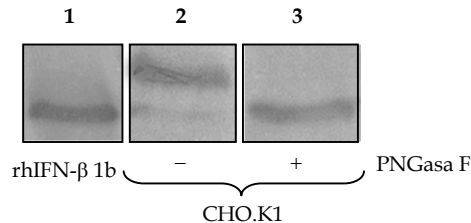
Fueron analizados por la técnica de *Western blot* sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares HEK-293, CHO dhfr, CHO.K1, NS0 y BHK.21 (líneas 1 a 5, respectivamente), y 22,5 ng de estándar no glicosilado (Betaferon) y glicosilado (Rebif, Serono, Suiza) (línea 6 y 7, respectivamente).

El hecho de que todas las células huéspedes produzcan tanto formas de la proteína glicosilada como sin glicosilar sugiere que puede estar ocurriendo lisis celular o que la velocidad de glicosilación post-traduccional es inferior a la velocidad de síntesis del péptido.

Se sabe que el IFN- $\beta$ 1a natural contiene oligosacáridos complejos tipo biantenarico con un *core* trimanosil no fucosilado y fucosilado y con el complejo Sia $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$  en su motivo de cadena exterior como principal componente (74%). Además, contiene pequeñas cantidades de oligosacáridos biantenaricos con repeticiones de unidades de *N*-acetilgalactosamina en los motivos de su cadena externa (8%), y hay incluidos oligosacáridos triantenaricos 2,4-ramificados (10%) y 2,6-ramificados (8%). Los oligosacáridos encontrados en las moléculas de rhIFN- $\beta$ 1a producido en células CHO.K1 son muy similares a los naturales, excepto por la ausencia de oligosacáridos triantenaricos 2,4-ramificados, el incremento de oligosacáridos triantenaricos 2,6-ramificados (27%), y la parcial participación de repeticiones de unidades *N*-acetilglucosamina en los motivos de las cadenas externas de oligosacáridos triantenaricos (Kagawa y col., 1988). Por otro lado, en general, las

proteínas recombinantes producidas en células de mamíferos disponibles en el mercado emplean a las células CHO.K1 como hospedadoras del ADN heterólogo.

Se trataron sobrenadantes de cultivo en presencia de PNGasa F realizando posteriormente un ensayo de *Western blot*, confirmando que las bandas observadas corresponden a las formas glicosiladas y no glicosiladas de rhIFN- $\beta$ 1a, y no a formas degradadas de la proteína (Fig. 36).



**Fig. 36. Ensayo con PNGasa F y análisis por *Western blot*.**  
Fueron analizados por la técnica de *Western blot* 22,5 ng de estándar no glicosilado (Betaferon) (línea 1), sobrenadantes de la línea celular recombinante CHO pCI 2A5 sin tratar (línea 2) y tratada con PNGasa F (línea 3).

Entonces, de acuerdo a estos resultados, las células CHO.K1 fueron elegidas para continuar con el trabajo propuesto, por producir el rhIFN- $\beta$ 1a apropiadamente glicosilado.

### 3.6. Selección de los clones recombinantes más productores

Existen diferencias en los niveles de producción de las proteínas recombinantes debido a numerosos factores. Uno de ellos es que el método más común de integración de genes recombinantes en el genoma de células de mamífero es por inserción al azar en los cromosomas, y desafortunadamente este proceso es muy ineficiente (1 en 10.000) y el sitio de inserción en el cromosoma, el número de copias insertado y, por ende, el nivel de expresión no pueden ser predichos. El hecho de que la localización cromosomal puede afectar la expresión de genes eucariotas es muy conocido. Así es que los genes al insertarse en diferentes áreas de la cromatina producen el efecto llamado de posición, aumentando la expresión si se localiza en regiones cercanas a promotores o *enhancers* endógenos, y disminuyendo si se inserta en áreas de heterocromatina. Las regiones de heterocromatina aparecen debido a la formación de áreas densamente empaquetadas de ADN y asociadas a proteínas; los genes presentes en estas regiones son en general considerados transcripcionalmente inactivos (Barnes y col., 2003).

Teniendo en cuenta, además, los resultados de la sección 3.5 y que los mayores niveles de rhIFN- $\beta$ 1a fueron detectados en los sobrenadantes de células CHO.K1, se efectuó la selección de los clones más productores dentro del panel de clones provenientes de esta línea celular transfectada con los distintos plásmidos.

Se realizó un ensayo en el que se partió para cada clon, de una monocapa celular en confluencia, cambiándole el medio por medio A suplementado con 5% V/V SFB fresco, retirando el sobrenadante a las 72 h y determinando la actividad biológica *in vitro* de rhIFN- $\beta$ 1a presente en el mismo.

Para continuar con el trabajo, se eligieron los 3 clones celulares estables más productores de rhIFN- $\beta$ 1a detallados en la Tabla XIII.

**Tabla XIII. Clones más productores de rhIFN- $\beta$ 1a.**

La actividad biológica *in vitro* de rhIFN- $\beta$ 1a fue determinada en los sobrenadantes de los diferentes clones derivados de la línea CHO.K1, 72 h post-confluencia.

Línea celular	Clon	Actividad biológica (UI/ml)
CHO pCI 2A5	1D5	5.200
CHO pCI 2A6	1D7	6.880
	1G5	5.710

#### 4. Coamplificación del gen dhfr

El gen de la DHFR es frecuentemente utilizado como un marcador de selección recesivo y de amplificación en células dhfr<sup>-</sup>.

Cuando las células son seleccionadas para crecer con concentraciones crecientes de MTX, la población que sobrevive contiene niveles aumentados de DHFR, como resultado de la amplificación de este gen. Este sistema es utilizado para coamplificar un gen heterólogo y así obtener un alto nivel de expresión, ya que la amplificación del gen dhfr iría acompañada de la concomitante amplificación de las regiones flanqueantes (Kaufman, 1991; Sambrook y col., 1989 a), donde ha de encontrarse el gen de interés.

##### 4.1. Selección de células transfectadas en medio IMDM

Las células CHO dhfr<sup>-</sup> son células mutantes que poseen una inactivación o remoción completa de los dos alelos que codifican para la enzima DHFR. El crecimiento de estas células depende de la suplementación, en el medio de cultivo, de componentes tales como la adenosina, la deoxiadenosina y la timidina (Wurm, 1997).

Las células que expresan la enzima DHFR son aquellas que han sido transfectadas con el plásmido p91023-IFN- $\beta$ 1, que contiene el gen dhfr. Para seleccionarlas se utilizó el medio de cultivo IMDM, el cual carece de glicina, hipoxantina y timidina. Las células que se consideraron resistentes fueron aquellas que sobrevivieron luego de 15 días de crecimiento en este medio de cultivo selectivo.

Posteriormente se realizó el clonado, por el método de dilución límite, de la línea celular obtenida, conservando los 4 clones considerados más productores,

denominados CHO p91023 1F1, 1H8, 2A3 y 2E4. Estos clones se utilizaron como referencia de aquéllos que se obtuvieron después de la coamplificación génica, para la comparación de sus productividades.

#### 4.2. Coamplificación génica gradual en presencia de MTX

Para la coamplificación génica el medio IMDM es suplementado con diferentes concentraciones de MTX, un análogo del tetrahidrofolato, el cual se une e inhibe la DHFR. A una dada concentración de MTX sólo las células con numerosas copias de DHFR, que inhiben su presencia, pueden sobrevivir. El incremento en la concentración DHFR ocurre por eventos de recombinación que llevan a un aumento en el número de copias del gen *dhfr*. Entonces, el aumento secuencial del MTX lleva a encontrar células resistentes que han amplificado el número de copias del gen *dhfr*; así, múltiples rondas de amplificación pueden ser realizadas, logrando cada vez mayores aumentos (Schlokot y col., 1997).

Se partió de la línea celular capaz de crecer en el medio IMDM y luego se la presionó con MTX para lograr la coamplificación génica, adaptándola gradualmente al crecimiento con concentraciones crecientes de MTX: 10, 100 y 500 nM, realizando la selección durante 15 días con cada una de las concentraciones de MTX. Las líneas celulares resistentes obtenidas durante cada ronda de amplificación, fueron criopreservadas.

Para cada dosis de MTX aplicada se pueden identificar subpoblaciones de células, las cuales han incrementado la actividad DHFR si se la compara con la generación anterior. En principio, la alta actividad DHFR en las células puede deberse a dos fenómenos: altos niveles de expresión desde uno o pocos plásmidos integrados en el genoma del huésped, o amplificación de plásmidos que expresan niveles relativamente bajos. El último fenómeno es bastante frecuente en células transformadas y el proceso de amplificación está asociado con la formación de marcadores cromosomales caracterizados por largas regiones homólogas que contienen el ADN transfectedo. Utilizando el procedimiento de incremento gradual de MTX, han sido desarrolladas numerosas líneas celulares que poseen cientos y miles de copias de las construcciones plasmídicas transfectedas, algunas de las cuales expresan la proteína deseada en niveles sorprendentemente altos (Wurm, 1997).

El bloqueo de la DHFR por parte del MTX produciría una disminución parcial o total del *pool* intracelular de adenosina y timidina. Los bajos niveles intracelulares de timidina podrían llevar a la incorporación errónea de uridina monofosfato en vez de timidina monofosfato durante la replicación del ADN. Esto dispararía la actividad reparadora del ADN que sería uno de los factores que contribuye a incrementar la actividad recombinogénica. Tal inducción de la plasticidad recombinogénica puede resultar en reordenamientos y, consecuentemente, en la amplificación debida a cambios cromosomales. De hecho, la aparición de *gaps* simple hebra en los cromosomas ha sido observada en células expuestas a MTX. Citogenéticamente estas estructuras han sido descriptas como sitios frágiles. Así, el agregado de MTX a los cultivos no sólo

mata las células con insuficiente actividad DHFR, sino que también aumenta los eventos de recombinación, que podrían contribuir a la amplificación (Wurm, 1997).

Posteriormente se realizó el clonado de las células adaptadas al crecimiento en presencia de 500 nM MTX, por el método de dilución límite, conservando los 4 clones considerados más productores, denominados CHO p91023 500 nM MTX 1C7, 2D2, 2E8 y 2F10, para compararlos con la progenie inicial y con clones obtenidos posteriormente.

#### **4.3. Determinación de la máxima concentración de resistencia al MTX y coamplificación génica**

Dependiendo del protocolo empleado, pueden incrementarse las concentraciones de MTX de 2 a 10 veces por ronda de amplificación, desde 10 nM hasta el rango de  $\mu$ M.

Para detectar la máxima concentración de antibiótico que resistían las células, se partió de la línea celular adaptada al crecimiento con 500 nM de MTX. Para ello se sembraron 100.000 células en medio IMDM suplementado con concentraciones crecientes de MTX en placas de 24 pozos. Se realizaron cambios de medio de cultivo cada 3 días y a los 15 días se determinó, por visualización de los diferentes pozos, la mínima cantidad del antibiótico que resultó deletéreo para las células. De esta manera, se determinó que la concentración buscada de MTX era de 350  $\mu$ M, sometiendo a las células a un proceso de amplificación con esta cantidad de antibiótico.

La línea celular resistente fue criopreservada. Posteriormente se realizó su clonado, por el método de dilución límite, conservando los 4 clones considerados más productores, denominados CHO p91023 350  $\mu$ M MTX B3, C3, D3 y E3, para compararlos con la progenie.

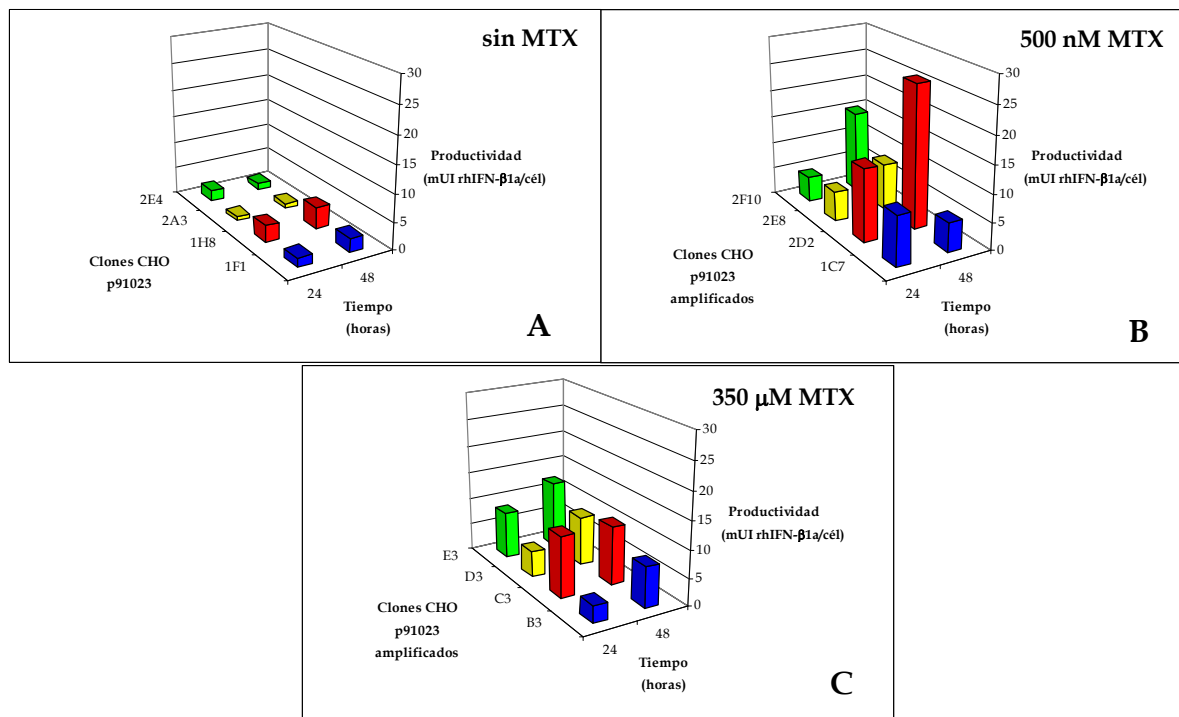
#### **4.4. Análisis de los clones obtenidos en las diferentes etapas de la coamplificación génica**

Se compararon las productividades de los clones seleccionados durante la obtención de las líneas celulares CHO p91023, CHO p91023 500 nM y CHO p91023 350  $\mu$ M MTX (Fig. 37). Para esta experiencia se partió de una monocapa celular de cada clon, realizando recambios del medio de cultivo por medio fresco cada 24 h, durante 2 días. En cada recambio se realizó el recuento de las células totales y viables y se tomó el sobrenadante, cuantificando la concentración de rhIFN- $\beta$ 1a, mediante ensayos de valoración biológica *in vitro*.

En general, las mayores productividades se encontraron durante el segundo recambio, 48 h después de haber llegado los cultivos a confluencia.

Si se comparan las máximas productividades de los clones sin amplificar con las de los clones coamplificados con 500 nM y 350  $\mu$ M MTX, se encontró un aumento de hasta 6 y 3 veces, respectivamente. Durante la selección inicial, el nivel de expresión de la proteína recombinante se relacionaría con la posición de integración en el cromosoma, por ejemplo, en sitios transcripcionalmente activos. En contraste, después

de la amplificación existe una estrecha relación entre el número de copias del gen y el nivel de expresión (Schlokot y col., 1997), por lo que se piensa que se logró la coamplificación en el número de copias del gen del hIFN- $\beta$ 1 en forma conjunta con el de dhfr.



**Fig. 37. Variaciones en las producciones de clones derivados de CHO p91023 sometidos o no a coamplificación génica en presencia de MTX.**

Se cuantificaron mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro* las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a presente en los sobrenadantes de recambios a las 24 y 48 h, determinando las productividades teniendo en cuenta el número de células viables presentes en cada recambio, para los clones CHO p91023 1F1 (■), 1H8 (■), 2A3 (■) y 2E4 (■) (panel A), CHO p91023 500 nM MTX 1C7 (■), 2D2 (■), 2E8 (■) y 2F10 (■) (panel B), y CHO p91023 350  $\mu$ M MTX B3 (■), C3 (■), D3 (■) y E3 (■) (panel C).

Teniendo en cuenta que la línea celular CHO p91023 350  $\mu$ 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. Esto puede deberse a que las células hayan adquirido alguna forma de resistencia al antibiótico, por ejemplo, a través de canales de exportación o a que, como regla general, la disminución de la producción es atribuida a pérdida cromosomal o pérdidas irreversibles, mutaciones o reordenamientos de genes asociados con la proteína recombinante, su regulación y síntesis (Barnes y col., 2001).

Se ha observado que la integración del plásmido está acompañada de la duplicación invertida del plásmido y regiones cromosomales adyacentes. Los fenotipos hiperamplificables escinden esta región generando ADN episomal, autorreplicante, que fluctúa rápidamente en su número de copias. Bajo condiciones selectivas durante la fase inicial de selección, subpoblaciones de células con alto número de copias episomales pueden ser seleccionadas. En células CHO, después de exposiciones

prolongadas al MTX, frecuentemente ocurre re inserción en el cromosoma, y los cromosomas doble diminutos, derivados de los episomas, usualmente no persisten (Wurm, 1997).

La plasticidad inherente de los genomas eucariotas, como la presión selectiva aplicada durante el cultivo continuo, puede afectar la estabilidad de las secuencias transfectadas e integradas.

Los clones recombinantes pueden variar con respecto a la estabilidad en el locus primario de integración o a la velocidad de transcripción. Como puede observarse en la Fig. 37, no todos los clones producen de igual manera, además hubo muchos clones que fueron descartados por producir bajísimas concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a, aún después de haber sido sometidos al proceso de coamplificación génica. Entonces, después de la coamplificación génica, muy pocos clones presentaron una expresión aumentada de rhIFN- $\beta$ 1a. Este hecho puede deberse a que el paso previo a la inserción del plásmido en el genoma del huésped es la linealización del ADN y durante este paso puede ocurrir la interrupción o delección del gen dhfr o del de hIFN- $\beta$ 1a, por lo que no ocurriría la transferencia de genes funcionales, resultando en la pérdida de esos clones durante el proceso de selección y coamplificación.

Las células CHO dhfr<sup>-</sup> poseen un cariotipo muy inestable debido a que reordenamientos en los cromosomas aparecen por traslocaciones y recombinación homóloga, especialmente en respuesta a procedimientos de amplificación. La región de incorporación de los transgenes en el genoma de células CHO es importante para la estabilidad. Los genes amplificados localizados en regiones extracromosomales son usualmente perdidos durante la mitosis, sin presión de selección. Sin embargo, estudios en células CHO dhfr<sup>-</sup> durante largos períodos de cultivo en ausencia de MTX han demostrando que los genes amplificados que se localizan cerca de regiones teloméricas son más estables que aquéllos que se encuentran en otras regiones del genoma. Se ha sugerido que es más efectivo un incremento gradual en el MTX que una rápida exposición, debido a que el primer procedimiento llevaría a un aumento del número de genes amplificados en las regiones teloméricas (Barnes y col., 2003).

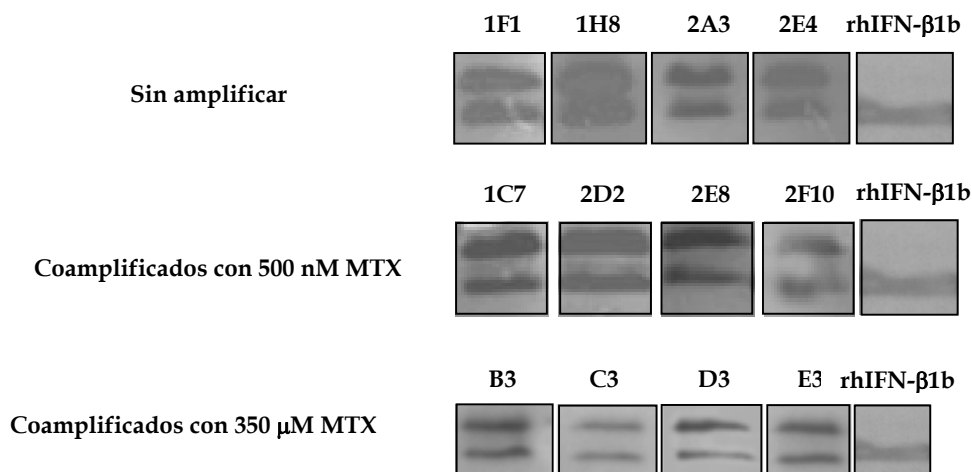
En nuestro caso, los clones han mantenido la producción durante varios meses, por lo que parecerían ser estables, obteniendo coamplificación génica durante el incremento gradual de MTX.

Otro factor a tener en cuenta es que el aumento de número de copias resulta en el concomitante aumento de la producción de la proteína recombinante, pero no indefinidamente. El número de copias del plásmido es afectado por el plásmido y las condiciones genéticas del huésped y por el cultivo.

Por otro lado, se encontró que los  $t_d$  de los clones celulares no sometidos a coamplificación génica resultaron de aproximadamente 1 día, en tanto que los clones sometidos a coamplificación con 500 nM y 350  $\mu$ M MTX, presentaron mayores  $t_d$ , cercanos a 1,5 y 2 días, respectivamente. Se ha ilustrado una relación inversa entre el crecimiento y la productividad de los clones productores. La explicación molecular sugiere que las células que crecen lentamente pasan más tiempo en la fase G1 del ciclo

celular y en este estadio hay una mayor traducción y secreción de proteínas (Barnes y col., 2001), además se ha observado que se produce un enlentecimiento del crecimiento celular en presencia de MTX.

Mediante los ensayos de actividad biológica y *Western blot* (Fig. 38), se confirmó que la presencia de diferentes concentraciones de MTX no afecta la calidad de rhIFN- $\beta$ 1a producido.



**Fig. 38.** Análisis por *Western blot* de las moléculas de rhIFN- $\beta$ 1a producidas por los clones derivados de CHO p91023-IFN- $\beta$ 1a sometidos o no a coamplificación génica en presencia de MTX.

Fueron analizados los sobrenadantes tomados a las 48 h en los ensayos de productividad de los clones CHO p91023 1F1, 1H8, 2A3 y 2E4, CHO p91023 500 nM MTX 1C7, 2D2, 2E8 y 2F10, y CHO p91023 350  $\mu$ M MTX B3, C3, D3 y E3; y 22,5 ng de estándar no glicosilado (Betaferon).

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

### 5.1. Adaptación a diferentes condiciones de cultivo

Con el fin de adaptar los clones recombinantes más productores a condiciones de cultivo que permitan disminuir los costos de producción y facilitar la posterior purificación de la proteína recombinante, se evaluó la performance de los clones celulares productores CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en diferentes medios. Para ello, el medio de crecimiento inicial se reemplazó por medio A suplementado con SFB al 0,1, 1 o 5% V/V. Los cultivos se mantuvieron durante 1 mes con cambios del medio cada 72 h, realizando a la vez un *screening* de las producciones por la técnica de *immunodot*, y evaluando la morfología de las células durante cada recambio.

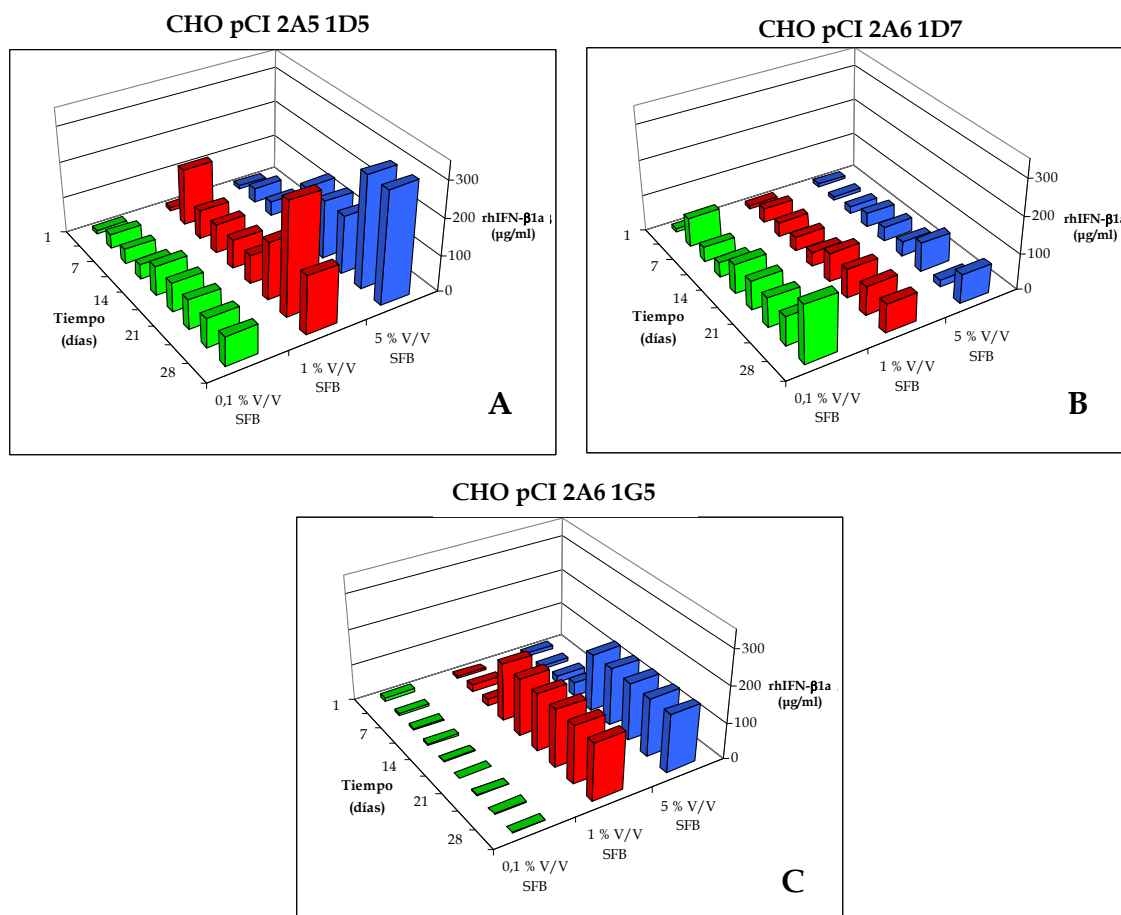
En general, todos los clones crecieron adecuadamente en medio A suplementado con 5% V/V SFB. Cuando los clones se encontraron en medio A suplementado con 1% V/V SFB, crecieron formando grumos celulares que tendieron a despegarse del fondo de la placa. No se pudo mantener el crecimiento de los clones en



medio A suplementado con 0,1% V/V SFB, debido a que las células se despegaron totalmente de la superficie y murieron.

Otra estrategia que permite adaptar las células al crecimiento con menor cantidad de SFB, consiste en ir bajando la concentración en los cultivos de manera progresiva, pero este sistema de adaptación tampoco permitió la progresión de los cultivos con tan bajas cantidades de SFB.

Como se observa en la Fig. 39, cada clon se comportó diferente en cuanto a la producción de rhIFN- $\beta$ 1a durante el ensayo.



**Fig. 39. Variaciones en las producciones de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 durante recambios con distintos medios de cultivo.**

Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a presente en los sobrenadantes tomados durante los recambios, efectuados cada 3 días, con medio A suplementado con 5 (■), 1 (■) y 0,1% V/V SFB (■).

El clon que presentó la mayor producción de proteína recombinante fue el CHO pCI 2A5 1D5 en medio A suplementado con 5% V/V SFB (Fig. 39, panel A). Este clon presentó niveles de producción similares durante los primeros cuatro recambios en los diferentes medios; después, las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a detectadas en los recambios realizados con medio A suplementado con 5% V/V SFB fueron superiores, de hasta 300 ng/ml aproximadamente, intermedias para los recambios con medio

suplementado con 1% V/V SFB, y permanecieron similares y aún más bajas para los recambios con medio A suplementado con 0,1% V/V SFB.

En tanto, el clon CHO pCI 2A6 1D7 mostró similares producciones en las tres condiciones ensayadas, no superando, en general, concentraciones de 100 ng/ml de rhIFN- $\beta$ 1a en todos los sobrenadantes analizados (Fig. 39, panel B).

Para el clon CHO pCI 2A6 1G5, las producciones fueron muy bajas y coincidentes en los tres primeros recambios, observándose posteriormente el mismo aumento, hasta 200 ng/ml de rhIFN- $\beta$ 1a, cuando los recambios se efectuaron con medios A suplementado con 1 o 5% V/V SFB, pero permanecieron bajas cuando el medio A estaba suplementado con 0,1% V/V SFB (Fig. 39, panel C).

## 5.2. Estudio del crecimiento, metabolismo celular y producción de rhIFN- $\beta$ 1a en clones celulares establemente transfectados

La cinética de crecimiento de distintas líneas celulares ha sido estudiada experimentalmente. Cada una tiene su cinética característica: velocidad de crecimiento, muerte y metabolismo, requerimientos nutricionales, sensibilidad frente a compuestos químicos y estrés fisiológico.

El metabolismo celular está influenciado por diversos factores: los niveles de nutrientes esenciales como azúcares, glutamina y otros aminoácidos, el O<sub>2</sub>, las vitaminas, la acumulación de metabolitos inhibidores, como amoníaco y lactato y las características fisicoquímicas del medio de cultivo, como el pH, la temperatura, la presión osmótica y la fuerza iónica. La velocidad de crecimiento celular y el metabolismo son funciones complejas de la concentración de los distintos componentes del medio (Goergen y col., 1997; Wagner, 1997).

Con el fin de realizar una caracterización de los clones productores CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 adaptados al crecimiento en el medio A suplementado con 1 o 5% V/V SFB, se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes, evaluando cada día el número de células totales y viables y determinando en los sobrenadantes las concentraciones de glucosa, lactato, amonio e rhIFN- $\beta$ 1a (Fig. 40; pág. 100).

Las curvas de crecimiento de las células eucariotas presentan diferentes fases. Unas horas después del subcultivo deviene un período de reposo o **fase lag**, que se continúa con un período de **crecimiento exponencial** o **fase log**. En los cultivos adherentes se produce inhibición por contacto al completarse la formación de la monocapa, mientras que en los cultivos en suspensión esta fase tiene lugar al estar en defecto algún nutriente. El crecimiento se detiene, durante la **fase estacionaria**, y posteriormente se detecta una **fase de muerte celular**.

Del análisis de los resultados mostrados en la Fig. 40 resulta que solamente presentaron fase *lag* y sólo durante los dos primeros días, los cultivos realizados en medio A suplementado con 5% V/V SFB. Se observó que los clones presentaron una fase de crecimiento exponencial aproximadamente hasta el sexto día, para los clones creciendo en medio suplementado con menos SFB, y hasta el séptimo día cuando se

encontraban con más SFB. Sólo permanecieron en fase estacionaria durante dos días los clones CHO pCI 2A5 1D5 y 2A6 1D7 en medio suplementado al 1 y 5% V/V SFB, respectivamente. Luego comenzó la fase de muerte celular para los tres clones, en ambas condiciones.

Si bien se observaron progresiones del cultivo similares al crecer con diferentes cantidades de SFB, las densidades celulares alcanzadas fueron superiores con mayor SFB; con la excepción del clon CHO pCI 2A6 1G5 que presentó curvas muy parecidas en ambos casos.

Se encontró que la viabilidad celular comenzó a disminuir a partir del octavo y noveno día de cultivo para los clones creciendo en medio con baja y alta concentración de SFB, respectivamente, en forma coincidente con el comienzo de la fase de muerte celular.

Teniendo en cuenta que  $x_0$  es la concentración inicial de células viables y  $x_v$  la concentración de células viables en el tiempo  $t$ , se calculó la constante específica de crecimiento celular  $\mu$  y el tiempo de duplicación  $t_d$ . Ambos parámetros metabólicos están definidos mediante las ecuaciones 18 y 19:

$$x_v = x_0 \times 10^{\mu t} \tag{18}$$

$$t_d = \frac{\log 2}{\mu} \tag{19}$$

En la Tabla XIV se resumen estos parámetros de crecimiento para cada clon en las diferentes condiciones de cultivo. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los valores calculados, existe una tendencia a que los clones crezcan más rápido cuando hay un mayor suplemento de SFB.

**Tabla XIV. Parámetros de crecimiento celular de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7, y 2A6 1G5.**

Se calcularon la  $\mu$  (velocidad específica de crecimiento) y el  $t_d$  (tiempo de duplicación) a partir de la gráfica de la concentración de células viables vs tiempo para cada uno de los clones creciendo en los diferentes medios de cultivo.

Clon CHO pCI	Suplemento de SFB del medio A (% V/V)	$\mu$ (días <sup>-1</sup> )	$t_d$ (días)
2A5 1D5	1	0,25 ± 0,15	1,20 ± 0,72
	5	0,32 ± 0,16	0,94 ± 0,47
2A6 1D7	1	0,19 ± 0,19	1,58 ± 1,58
	5	0,28 ± 0,24	1,07 ± 0,92
2A6 1G5	1	0,16 ± 0,09	1,88 ± 1,06
	5	0,27 ± 0,03	1,11 ± 0,12

La galactosa, la fructosa y principalmente la glucosa son las posibles fuentes de carbono usadas por las células de mamífero *in vitro*. La glucosa, especialmente, participa en los pasos de glicosilación.

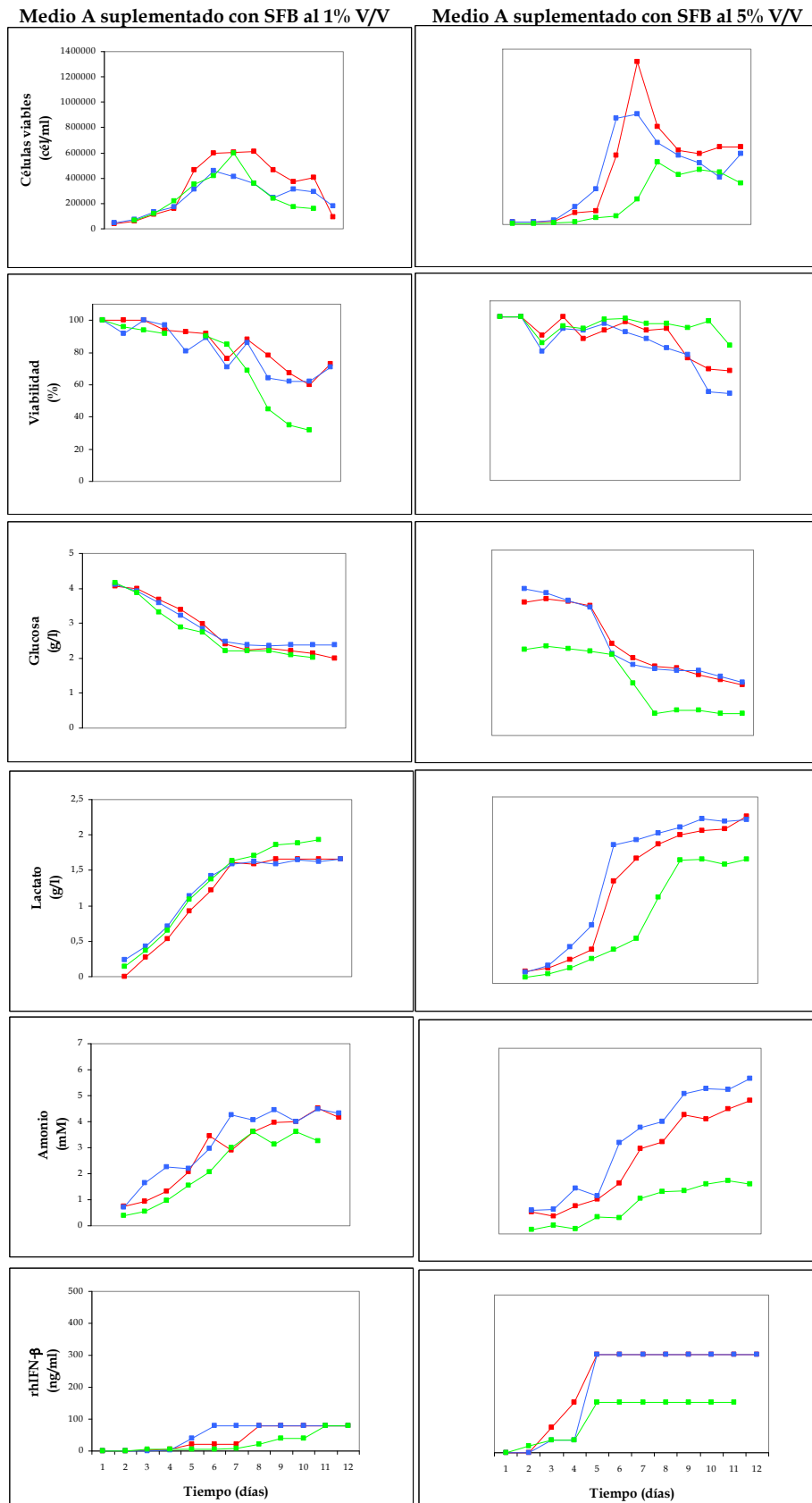


Fig. 40. Curvas de crecimiento de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7, y 2A6 1G5.

Se realizaron cultivos de los clones CHO pCI 2A5 1D5 (■), 2A6 1D7 (■) y 2A6 1G5 (■) en placas de 24 cavidades, sembradas inicialmente con 5.000 cél/ml en medio A suplementado con 1 y 5% V/V SFB, alternativamente. Cada día, durante 12 días, se hizo el recuento celular determinando el número de células viables y de células totales, a partir de las que se calculó la viabilidad celular, y se cosechó el sobrenadante del pocillo correspondiente, con el fin de evaluar algunos parámetros del cultivo (concentraciones de glucosa, lactato, amonio e rhIFN-β1a).

Las concentraciones de glucosa no disminuyeron a niveles tales que resulten limitantes, a pesar de haber llegado a valores próximos a 0,6 g/l para el clon CHO pCI 2A6 1G5 creciendo en medio suplementado con 5% V/V SFB. En consecuencia, la fase de muerte celular estaría dada por el agotamiento de algunos otros nutrientes del medio de cultivo o por la sensibilidad del cultivo a metabolitos celulares inhibidores, en ambos casos no monitoreados, y/o por el fenómeno descrito como inhibición por contacto entre las células.

En crecimiento continuo se demostró que la producción de lactato depende estrictamente del consumo de glucosa. La relación entre el lactato producido y la glucosa consumida puede ser distinta según la línea celular y las condiciones de cultivo. El lactato es secretado al medio por las células y, dependiendo de la concentración en la que se encuentre, pueden observarse distintos efectos (Tabla XV) (Goergen y col., 1997; Wagner, 1997)

**Tabla XV. Efectos producidos en el crecimiento y la producción celular dependiendo de la concentración de lactato secretado al medio.**

Lactato	Crecimiento celular	Producción
<i>menos de 20 mM</i>	no se afecta	no se afecta
<i>20-40 mM</i>	no se afecta	se inhibe
<i>más de 40-60 mM</i>	se inhibe levemente	se inhibe
<i>más de 60 mM</i>	se inhibe	se inhibe

Las células animales producen lactato en elevadas cantidades y lo secretan al medio de cultivo, disminuyendo su pH. Generalmente, concentraciones de aproximadamente 20 mM de lactato en el medio de cultivo no muestran efectos negativos.

Algunos recomiendan mantener la concentración de glucosa en niveles bajos para reducir la acumulación de ácido láctico y, simultáneamente, estimular la respiración (Goergen y col., 1997; Wagner, 1997).

Para los clones analizados se calculó que los valores máximos de lactato producido en las diferentes condiciones estuvieron entre 18 y 25 mM, por lo que no cabe esperar que el lactato influyera sobre el crecimiento celular y/o la producción de la proteína recombinante.

El aminoácido glutamina es la principal fuente de energía en cultivos continuos de células de mamífero *in vitro*, aportando del 30 al 98% de la energía total consumida. Probablemente la mayor parte de la glutamina sea oxidada aeróbicamente. Se ha demostrado que el 13% de la glutamina es metabolizada a lactato. La regulación del consumo de glucosa es dependiente del metabolismo energético de la glutamina; la disminución de los niveles de glucosa inducen un aumento en el uso de la glutamina. Por efecto de la glutaminasa, la glutamina es metabolizada a glutamato, liberando amonio; la reacción inversa es catalizada por la glutamato sintetasa, que utiliza amonio y ATP (Goergen y col., 1997; Wagner, 1997).

El amoníaco libre puede inhibir el crecimiento y la producción en los cultivos celulares. Estos generan amonio a partir de dos fuentes principales: la ciclación térmica de la glutamina y el metabolismo celular. En ambos casos la glutamina está involucrada. El amoníaco en los sobrenadantes de cultivo puede afectar el metabolismo celular de diferente forma según su concentración (Tabla XVI).

**Tabla XVI. Efectos producidos en el crecimiento y la producción celular dependiendo de la concentración de amoníaco secretado al medio.**

<b>Amoníaco</b>	<b>Crecimiento celular</b>	<b>Producción</b>
<i>menos de 2 mM</i>	no se afecta	no se afecta
<i>2-5 mM</i>	se inhibe	no se afecta
<i>más de 5 mM</i>	se inhibe	se inhibe

Para los clones estudiados se determinaron valores máximos de amonio producido en las diferentes condiciones, entre 2 y 5 mM, y para el clon CHO pCI 2A6 1D7 en medio suplementado con 5% V/V SFB los valores llegaron a casi 6 mM, a partir del octavo día de cultivo, en forma coincidente con el comienzo de la fase de muerte celular. Las concentraciones halladas de amonio podrían ser una de las razones de la inhibición del crecimiento celular.

Si se comparan las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a alcanzadas se puede observar una disminución de la producción al disminuir la concentración de SFB presente en el medio de cultivo. Además, en general se observó que los tres clones en ambos casos produjeron la proteína recombinante en la fase exponencial.

En resumen, no se encontraron características especiales para alguno de los clones en las diferentes condiciones de cultivo. Pero sí pudo advertirse un mayor crecimiento y una mayor producción al aumentar la cantidad de SFB en el medio, siendo este resultado lógico por la mayor disponibilidad de nutrientes.

### **5.3. Efecto del butirato de sodio**

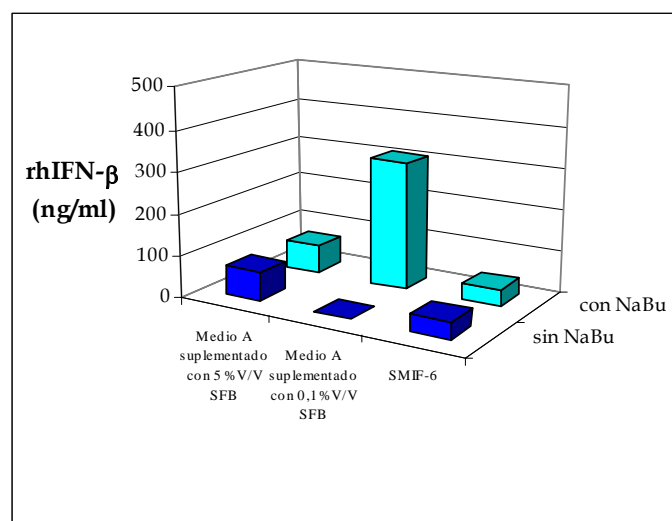
Una posible ruta para incrementar la productividad de los clones recombinantes es agregar NaBu al cultivo, dado que el butirato aumenta la biosíntesis de proteínas en diferentes líneas celulares. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el agregado de NaBu produce una inhibición del crecimiento celular e inducción de la apoptosis.

#### **5.3.1. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 en medio A o SMIF-6 ante la presencia de butirato de sodio**

Se evaluó la influencia de diferentes medios de cultivo y la presencia de NaBu en la producción del clon CHO pCI 2A5 1D5. Para ello, el medio de crecimiento inicial de los cultivos en monocapa se reemplazó por medio A suplementado con SFB al 0,1 o 5% V/V o medio SMIF-6 y en ausencia o presencia de 5 mM NaBu. Después de 72 h se

cuantificó la concentración de rhIFN- $\beta$ 1a para cada uno de los cultivos, utilizando la técnica de *immunodot*.

Como se muestra en la Fig. 41, no se observaron diferencias significativas en la producción de rhIFN- $\beta$ 1a tanto en los cultivos en medio A suplementado con 5% V/V SFB como en medio SMIF-6, independientemente de la presencia o no de NaBu. En cambio, se encontró un gran incremento de la productividad con el agregado de NaBu en el medio suplementado con 0,1% V/V SFB. Este resultado es relevante ya que se logró aumentar la producción de rhIFN- $\beta$ 1a en medio con bajas concentraciones de SFB, únicamente agregando NaBu. De esta forma, la proteína recombinante producida se deberá purificar a partir de un medio con menor contenido de otras proteínas.



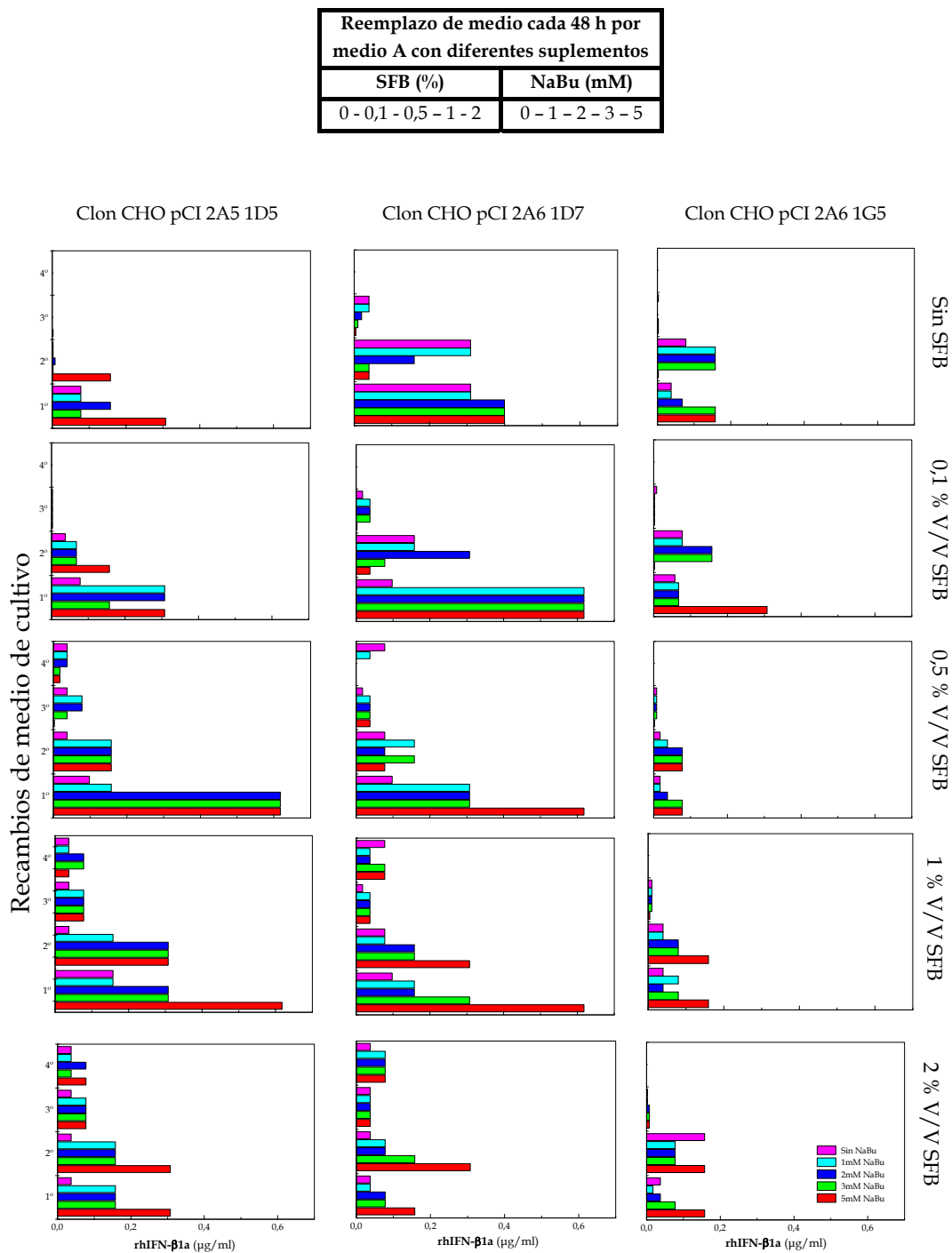
**Fig. 41. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 en diferentes condiciones de cultivo.** Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a presente en los sobrenadantes tomados 72 h post-confluencia, en medio A suplementado con 0,1 o 5% V/V SFB o medio SMIF-6, en ausencia (■) o en presencia de 5 mM NaBu (■) para cada medio.

### 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

Para determinar si la presencia de NaBu aumentaba la producción en los otros clones y, en el mismo ensayo, optimizar las condiciones de máxima producción de rhIFN- $\beta$ 1a, se diseñó un ensayo en el cual se realizaron combinaciones de diferentes concentraciones de SFB y NaBu.

Se partió de una monocapa de células de cada clon en medio A suplementado con 5% V/V SFB, reemplazando el medio de cada pozo por medio A suplementado con diferentes cantidades de SFB y NaBu. Cada 48 h y durante 8 días, se reemplazó el medio de cultivo por el correspondiente medio fresco, tomando el sobrenadante y

cuantificando la concentración de rhIFN- $\beta$ 1a utilizando la técnica de *immunodot* (Fig. 42).



**Fig. 42. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de diferentes concentraciones de SFB y NaBu.**

Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a presente en los sobrenadantes tomados cada 48 h, en medio A sin SFB o suplementado con 0,1, 0,5, 1 o 2% V/V SFB, en ausencia (■) o en presencia de 1 (■), 2 (■), 3 (■) o 5 mM NaBu (■), para cada clon.



Se ha demostrado que el tratamiento con NaBu altera el ciclo celular, disminuyendo la probabilidad de que las células puedan atravesar desde G1 a S y que el efecto es dependiente de la concentración de NaBu. A bajas concentraciones, algunas células continúan atravesando la fase G1 y el crecimiento celular continúa, por lo menos durante las primeras 24 h de exposición. Diferentes líneas celulares tienen distintos tiempos de duplicación y quizás diferente sensibilidad al NaBu. Por lo tanto, la concentración de NaBu puede alterar el período requerido para arrestar las células en fase G1 o puede inducir un indiscriminado arresto del ciclo celular (D'Anna y col., 1980).

Del análisis de los resultados mostrados en la Fig. 42 se desprende que los clones mostraron producciones dependientes de diferentes combinaciones de SFB y NaBu. Los clones 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.

Debido a que varias condiciones resultaron en un incremento equivalente de la producción (Tabla XVII), se consideraron óptimas las condiciones que aumentaron la cantidad de rhIFN- $\beta$ 1a en los sobrenadantes de cultivo empleando la menor concentración de NaBu, para evitar la apoptosis, y de SFB, para reducir los costos y facilitar el posterior proceso de purificación.

**Tabla XVII. Aumento en la producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de diferentes concentraciones de SFB y NaBu.**

A partir de los datos mostrados en la Fig. 42, se determinó el aumento de la producción durante el primer recambio de medio, para cada clon. Para lo cual, se realizó el cociente entre la producción en la condición analizada con respecto a la misma condición en ausencia de NaBu.

En color rojo se resaltan las condiciones consideradas óptimas para cada clon.

Clon CHO pCI	SFB (% V/V)	NaBu (mM)	Aumento de la producción (veces)
2A5 1D5	0,5	2, 3, 5	6
	1	5	
2A6 1D7	0,1	1, 2, 3, 5	6
	0,5	5	
	1	5	
2A6 1G5	0,1	5	5

Si bien se logró un aumento en la producción, este incremento en general fue marcado durante el 1º y 2º recambio de medio de cultivo, pero luego las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a detectadas en los sobrenadantes disminuyeron y tendieron a igualarse para todas las condiciones de cultivo. Esto puede haber ocurrido

debido a que al bajar la concentración de SFB o aumentar la de NaBu, se observó que las células tendían a desprenderse y morir. Este efecto es conocido ya que el NaBu induce la apoptosis celular de manera dependiente de la dosis. Otros autores, observaron como en nuestro caso, que la muerte celular ocurrió predominantemente en la porción de células desprenderse, tratadas con la máxima concentración de NaBu, pero no en las células adheridas. Una posible explicación para este fenómeno puede ser que los cambios que se producen en la superficie celular y en el citoesqueleto durante la apoptosis, llevan a las células a desprenderse (Mimura y col., 2001). Se piensa que además este efecto fue favorecido por la disminución del SFB, debido a que en experiencias anteriores ya se había observado que las células tendían a desprenderse del fondo de las placas, al disminuir la concentración del mismo.

Además, se observó un cambio importante en la morfología celular, adquiriendo las células una forma más ahusada. Este hecho no fue sorprendente, debido a que se sabe que el tratamiento de cultivos celulares con NaBu produce modificaciones de la estructura de la cromatina y del ensamblaje del citoesqueleto, alteraciones en la morfología celular, velocidad de crecimiento, síntesis de ADN actividades enzimáticas y diferente expresión de genes (D'Anna y col., 1980; Souleimani y Asselin, 1993).

Con el fin de analizar si la presencia de NaBu y la disminución del SFB influían en la funcionalidad de rhIFN-β1a , y para confirmar los resultados anteriores, se realizó una experiencia adicional. En este caso, se reemplazó el medio de la monocapa de células de cada clon por medio A suplementado con diferentes concentraciones de SFB o NaBu, de acuerdo con lo optimizado previamente para cada clon. A las 72 h se determinaron las concentraciones de células viables y de rhIFN-β1a mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro* (Tabla XVIII).

**Tabla XVIII. Aumento en la producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de las concentraciones óptimas de SFB y NaBu.**

La concentración de rhIFN-β1a, presente en los sobrenadantes tomados a las 72 h de exposición a los diferentes medios, fue determinada mediante ensayos de actividad biológica *in vitro* (UI/ml). Las productividades específicas (mUI/cél) fueron calculadas mediante el cociente entre la producción (UI/ml) y la concentración de células viables (cél/ml).

ND: no detectable.

Clon CHO pCI	Suplemento	cél. viables/ml	UI/ml	mUI/cél
2A5 1D5	5% V/V SFB	920.000	5.200	5,6
	0,5% V/V SFB	1.092.000	6.040	5,5
	0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu	385.000	39.040	101,4
2A6 1D7	5% V/V SFB	920.000	6.880	7,5
	0,1% V/V SFB	602.000	ND	-
	0,1% V/V SFB y 1 mM NaBu	146.250	10.210	69,8
2A6 1G5	5% V/V SFB	650.000	5.710	8,8
	0,1% V/V SFB	752.000	1.870	2,5
	0,1% V/V SFB y 5 mM NaBu	428.000	10.000	23,4

La actividad biológica del rhIFN- $\beta$ 1a producido se mantuvo en las diferentes condiciones. Si bien al disminuir la concentración de SFB la productividad específica no varió (como en el caso del clon CHO pCI 2A5 1D5) o disminuyó (para los clones CHO pCI 2A6 1D7 y 2A6 1G5), ésta aumentó aproximadamente entre 10 y 70 veces, según el clon, ante la presencia de NaBu en cultivos equivalentes. Los valores presentados en la Tabla XVIII reflejan una vez más los resultados obtenidos en experiencias anteriores.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla XVIII, también se observó que la concentración de células viables disminuye abruptamente ante el agregado de NaBu, sin un efecto tan marcado si sólo se disminuye la concentración de SFB. Por otro lado, se observó un deterioro en la morfología de las células vivas, atribuible a la presencia de NaBu.

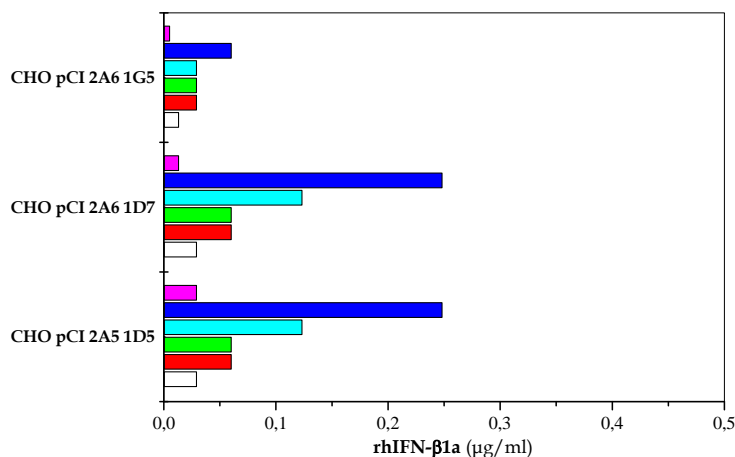
#### 5.4. Efecto del $ZnSO_4$

Otra posibilidad para aumentar la producción de rhIFN- $\beta$ 1a por parte de los clones es agregando  $Zn^{2+}$  al cultivo, dado que este catión tienen un marcado efecto sobre la estabilidad de ARNm que poseen regiones inestabilizantes (Taylor y Blackshear, 1995) similares a las presentes en la secuencia del ARNm de IFN- $\beta$ 1.

##### 5.4.1. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de diferentes concentraciones de $ZnSO_4$

La posible influencia del  $Zn^{2+}$  en la producción de los clones recombinantes se evaluó mediante cultivos en monocapa de células de cada clon en medio A suplementado con 0,5% V/V SFB y en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de  $ZnSO_4$ . Se decidió utilizar una baja concentración de SFB, debido a que en el suero animal el  $Zn^{2+}$  se encuentra unido a la albúmina (Prasad y Oberleas, 1970) por lo que altas concentraciones de SFB producirían el secuestro del catión. Cada 24 h se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco y se cuantificó la concentración de rhIFN- $\beta$ 1a utilizando la técnica de *immunodot*. De acuerdo con los resultados alcanzados (Fig. 43), se confirma que la presencia de  $Zn^{2+}$  en el medio de cultivo aumenta la producción de rhIFN- $\beta$ 1a para todos los clones estudiados.

En efecto, la expresión de rhIFN- $\beta$ 1a aumentó 2 veces para todos los clones cuando la concentración de  $Zn^{2+}$  es de 25 y 50  $\mu$ M. Cuando la concentración de  $Zn^{2+}$  es de 100 y 150  $\mu$ M aumentó entre 4 y 8 veces para los clones CHO pCI 2A5 1D5 y 2A6 1D7, respectivamente, siendo el incremento entre 2 y 4 veces para el clon CHO pCI 2A6 1G5 (Tabla XIX).



**Fig. 43. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>.**

Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN-β1a presente en los sobrenadantes tomados durante las primeras 24 h, en medio A suplementado con 0,5% V/V SFB en ausencia (□) y presencia de 25 (■), 50 (■), 100 (■), 150 (■) o 200 µM ZnSO<sub>4</sub> (■), para cada clon.

**Tabla XIX. Aumento en la producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5 y 2A6 1D7 en presencia de diferentes concentraciones de Zn<sup>2+</sup>.**

Resumen de los resultados mostrados en la Fig. 43.

Clon CHO pCI	Zn <sup>2+</sup> (µM)	Aumento de la producción (veces)
2A5 1D5 y 2A6 1D7	25 y 50	2
	100	4
	150	8

Si bien estos clones celulares presentan una sensibilidad diferente ante la presencia de Zn<sup>2+</sup> a la observada por otros autores, estos resultados son extrapolables a los de Taylor y Blackshear (1995). Estos autores han encontrado que células TK-L expuestas a concentraciones entre 50 y 100 µM de Zn<sup>2+</sup> presentan niveles aumentados de ARNm para c-fos y tristetraprolina (TTP), siendo ambos ARNm portadores de secuencias ARE, similares a las presentes en el ARNm de IFN-β1. También Cao (2004) observó efectos del Zn<sup>2+</sup> sobre la expresión de TTP. La TTP, además de poseer regiones ARE en su ARNm, es una proteína que se une desestabilizando los ARNm portadores de estas secuencias, dependiendo para esta actividad de la presencia de Zn<sup>2+</sup>. Si bien este último autor encontró que esta actividad es estimulada con concentraciones de 10 µM, disminuye con concentraciones superiores a 50 µM, y sugiere que este efecto se debería a una desestabilización de la estructura de este tipo de proteínas.

En nuestro caso, para los clones evaluados se encontró, además, que en los cultivos suplementados con concentraciones de ZnSO<sub>4</sub> de 100 y 150 µM, las

producciones aumentan durante las primeras 24 h, pero tienden a bajar en los recambios sucesivos. Esto puede atribuirse a la disminución de la cantidad de células viables observada al utilizar concentraciones de ZnSO<sub>4</sub> superiores a 50 µM. Similares observaciones han sido efectuadas para células TK-L expuestas a concentraciones superiores a 100 µM de Zn<sup>2+</sup> que no produjeron un aumento de ARNm, pero sí influyeron en la toxicidad celular (Taylor y Blackshear, 1995).

**5.4.2. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 para distintos tiempos de recolección de sobrenadantes**

La posible influencia del tiempo de cultivo en el efecto producido por el Zn<sup>2+</sup> sobre la producción de rhIFN-β1a de los clones se evaluó mediante cultivos en monocapa de células de cada clon en medio A suplementado con 0,5% V/V SFB y 150 µM ZnSO<sub>4</sub>. Cada 8, 12 o 24 h, y durante 2 días, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco y se cuantificó la concentración de rhIFN-β1a presente en los sobrenadantes utilizando la técnica de *immunodot*.

De acuerdo con los resultados alcanzados (Tabla XX) se confirma que el tiempo de exposición de las células al Zn<sup>2+</sup> influye en la producción de rhIFN-β1a modulada por este catión. Además, este efecto depende del clon productor. En efecto, mientras que para el clon CHO pCI 2A5 1D5 los recambios cada 8 o 12 h conducen a una mayor producción diaria acumulada de rhIFN-β1a, para los clones CHO pCI 2A6 1D7 y 2A6 1G5, la producción diaria alcanzada es superior o similar, respectivamente, cuando los recambios se efectúan cada 24 h.

**Tabla XX. Producción de los clones que expresan rhIFN-β1a en presencia de Zn<sup>2+</sup> al variar el tiempo de recolección de los sobrenadantes.**

La concentración de rhIFN-β en los sobrenadantes de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7, 2A6 1G5 durante sucesivos recambios de medio suplementado con 0,5% V/V SFB y 150 µM de ZnSO<sub>4</sub> a diferentes tiempos se estimó mediante la técnica de *immunodot*.

En rojo se resaltan las producciones totales (suma de las producciones individuales) obtenidas cada día durante los diferentes recambios.

Clon CHO pCI	Días	Tiempo de recolección de los sobrenadantes							
		8 h				12 h			24 h
		1° (ng/ml)	2° (ng/ml)	3° (ng/ml)	Totales (ng)	1° (ng/ml)	2° (ng/ml)	Totales (ng)	Totales (ng)
2A5 1D5	1	16	31	16	63	16	31	47	16
	2	16	16	16	48	16	31	47	16
2A6 1D7	1	16	16	31	63	8	31	39	125
	2	8	8	8	24	16	31	47	62
2A6 1G5	1	16	16	31	63	16	31	47	62
	2	16	16	16	48	31	31	62	62

## 5.5. Efecto conjunto del butirato de sodio y del ZnSO<sub>4</sub>

### 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<sub>4</sub>

El posible efecto cooperativo del NaBu y el Zn<sup>2+</sup> sobre la estimulación de la producción del rhIFN-β1a de los clones se evaluó mediante cultivos en monocapa de células en medio A suplementado con concentraciones previamente optimizadas de SFB y NaBu para cada clon, y diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>. Cada 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco y se cuantificó la concentración de rhIFN-β1a presente en los sobrenadantes utilizando la técnica de *immunodot*.

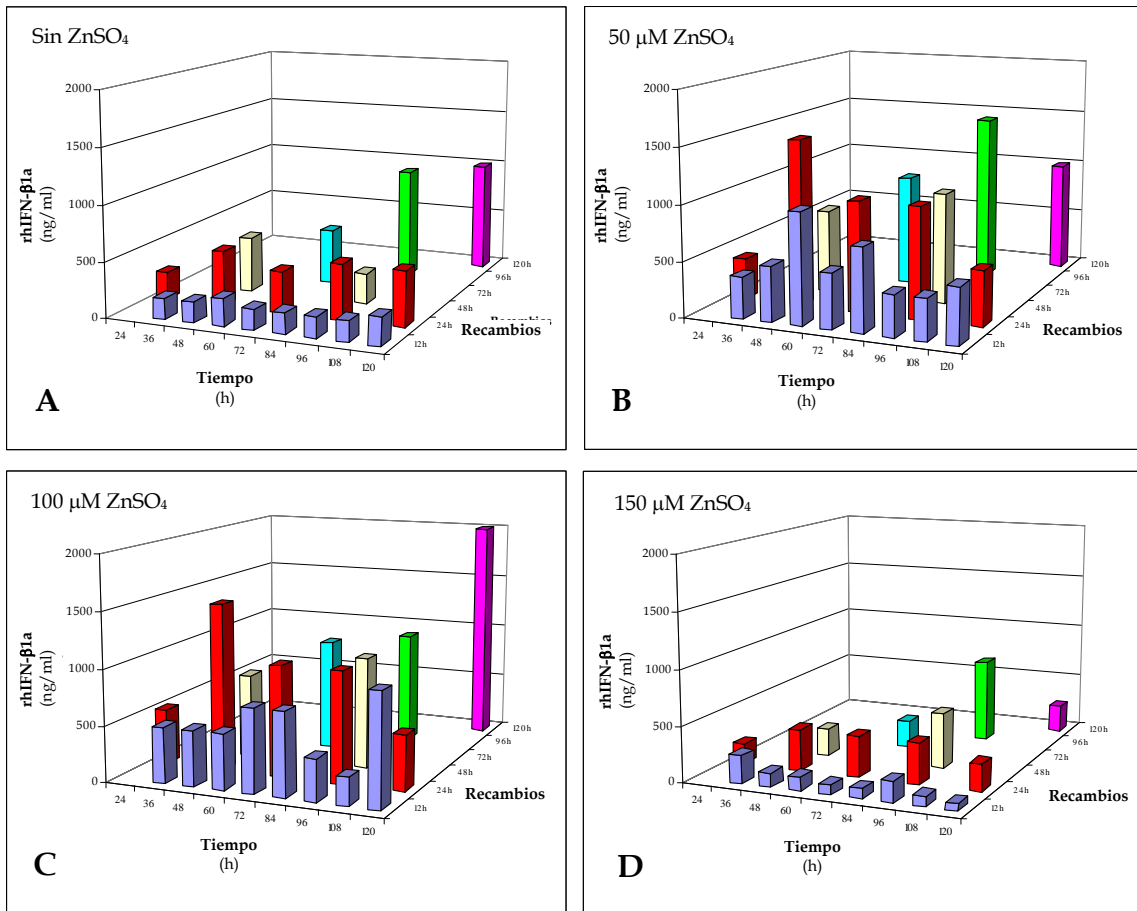
Para el clon CHO pCI 2A5 1D5 (Fig. 44) se observa que los mayores aumentos de la producción se generan para concentraciones de Zn<sup>2+</sup> comprendidas entre 50 y 100 μM (paneles B y C), y en ambos casos las cantidades de rhIFN-β1a cuantificados fueron similares. Sin embargo, no se observan cambios significativos de la producción de rhIFN-β1a entre los cultivos sin Zn<sup>2+</sup> (panel A) o suplementados con 150 μM Zn<sup>2+</sup> (panel D).

Para el clon CHO pCI 2A6 1D7 (Fig. 45; pág. 112) se observa un aumento significativo en la producción al agregar 50 o 100 μM de ZnSO<sub>4</sub> en el tercer recambio de 24 h (paneles B y C). En general, este clon demostró una respuesta similar al clon CHO pCI 2A5 1D5 pero con una menor producción de proteína recombinante. El agregado de 150 μM de ZnSO<sub>4</sub> (panel D) tampoco generó efectos positivos.

Para el clon CHO pCI 2A6 1G5 sólo se observa un leve aumento en la producción de rhIFN-β1a ante el agregado de 50 μM de ZnSO<sub>4</sub> (Fig. 46, panel B; pág. 113), siendo las producciones similares a la condición basal (Fig. 46, panel A) ante la presencia de 100 μM de ZnSO<sub>4</sub>.

Al analizar las concentraciones de rhIFN-β1a cuantificados en esta experiencia, durante los recambios de 48 h en ausencia de Zn<sup>2+</sup> (paneles A de las Figs. 44, 45 y 46), se observa un aumento durante el primer recambio, que disminuye en el segundo. Al comparar estos resultados con los valores obtenidos previamente y mostrados en la Fig. 42, si bien la tendencia en la producción es la misma, la cantidad de proteína recombinante detectada difiere. Este hecho puede deberse a diferencias en el estado inicial de las células durante cada experiencia y a inconvenientes relacionados con el método de cuantificación del rhIFN-β1a.

CHO pCI 2A5 1D5



**Fig. 44. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 en presencia de NaBu y diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>.**

Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN-β1a presente en los sobrenadantes tomados cada 12 h (■), 24 h (■), 48 h (■), 72 h (■), 96 h (■) y 120 h (■), en medio A suplementado con 0,5% V/V SFB, 2 mM NaBu, en ausencia (panel A) o presencia de ZnSO<sub>4</sub> en concentración de 50 μM (panel B), 100 μM (panel C) o 150 μM (panel D).

Para los clones estudiados, se observó un efecto cooperativo que combina la estimulación de la producción de rhIFN-β1a causada por el NaBu y el Zn<sup>2+</sup> en forma independiente, aumentándola aún más cuando se agregan en forma conjunta. También se encontró que esta cooperación es dependiente de la concentración del catión.

En resumen, la presencia de 150 μM de ZnSO<sub>4</sub> no resultó favorable para ninguno de los clones, pudiendo atribuirse este hecho al efecto deletéreo observado previamente ante la incorporación de altas concentraciones del catión en el cultivo, pero sí sería beneficiosa la adición de 50 o 100 μM de ZnSO<sub>4</sub>.

CHO pCI 2A6 1D7

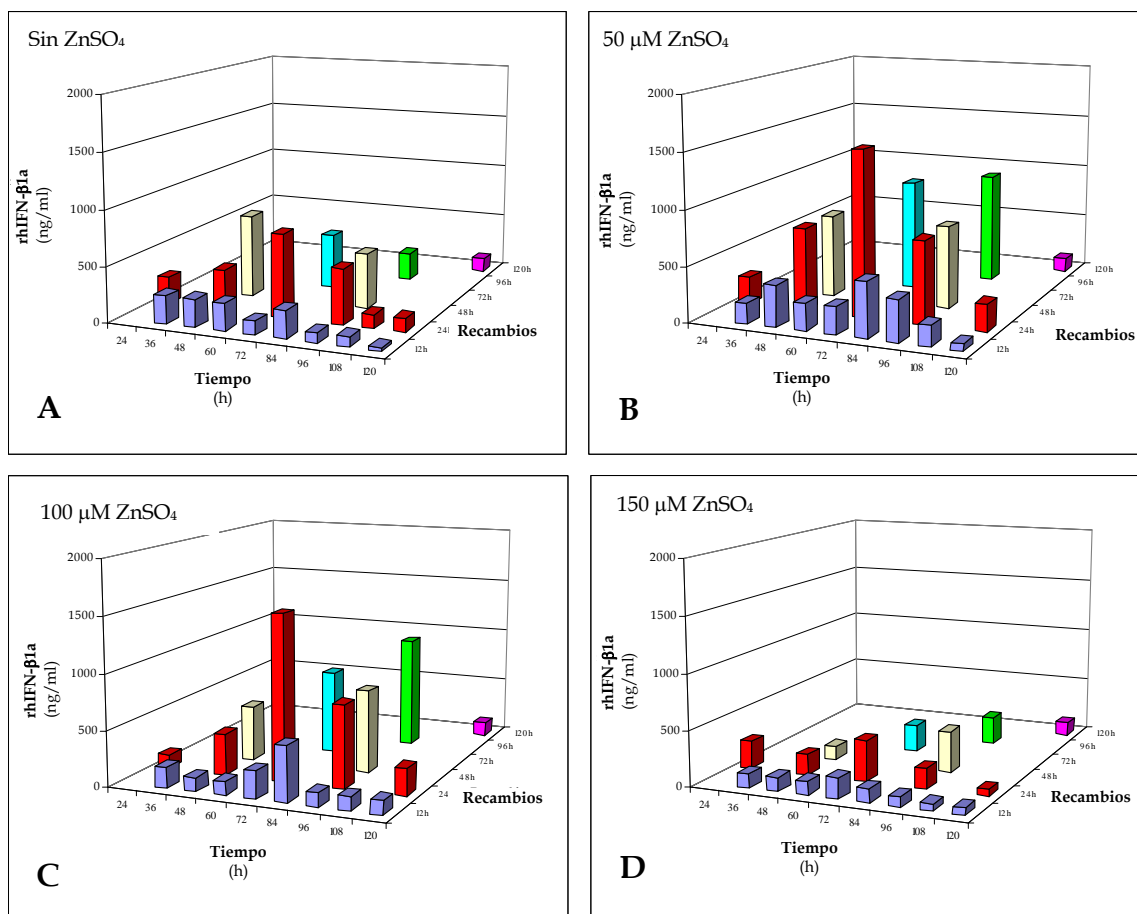


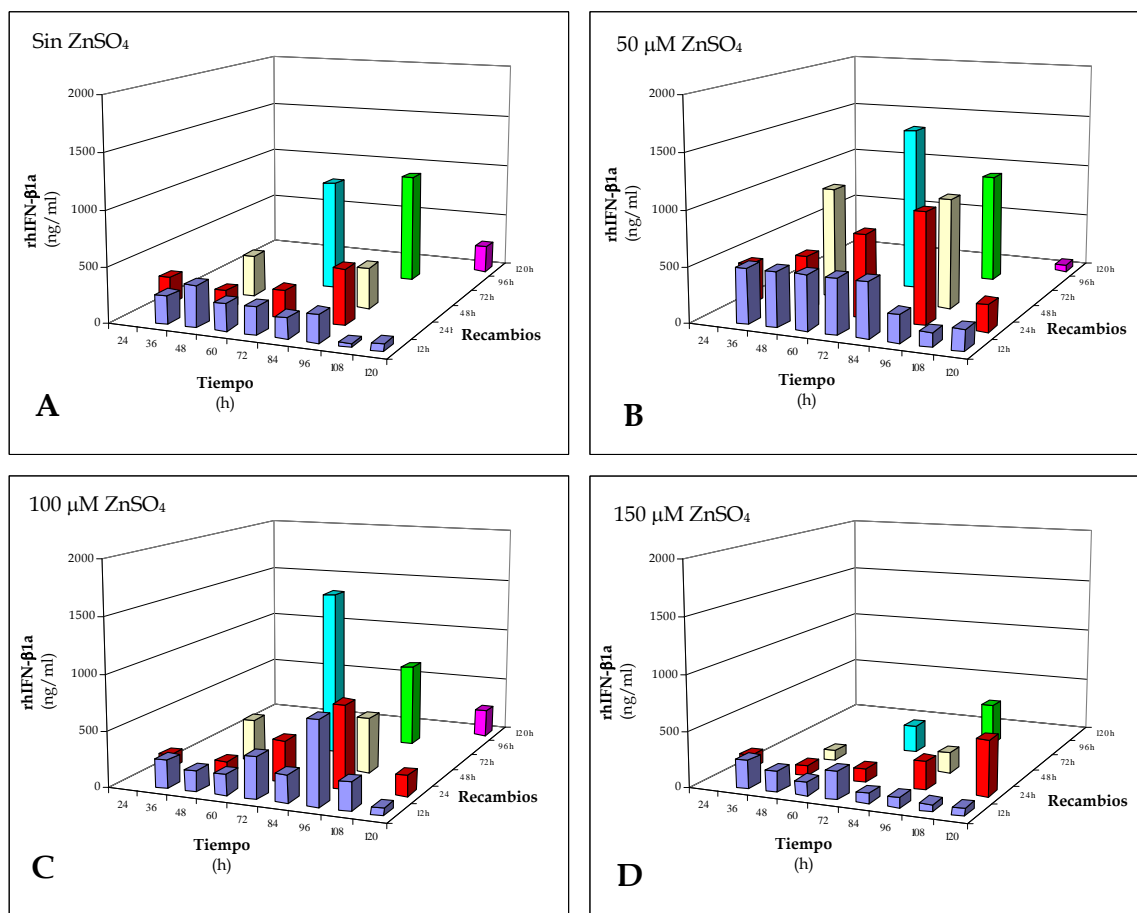
Fig. 45. Producción del clon CHO pCI 2A6 1D7 en presencia de NaBu y diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>.

Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN-β1a presente en los sobrenadantes tomados cada 12 h (■), 24 h (■), 48 h (■), 72 h (■), 96 h (■) y 120 h (■), en medio A suplementado con 0,1% V/V SFB, 1 mM NaBu, en ausencia (panel A) o presencia de ZnSO<sub>4</sub> en concentración de 50 μM (panel B), 100 μM (panel C) o 150 μM (panel D).

Se determinó, para cada clon, la masa total acumulada de rhIFN-β1a cuantificada por la técnica de *immunodot*, durante los recambios realizados cada 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h en medio A suplementado con las concentraciones previamente optimizadas de SFB y NaBu, en ausencia o presencia de ZnSO<sub>4</sub> en concentración de 50, 100 o 150 μM. Puede observarse claramente en la Fig. 47 (pág. 114) que las producciones fueron superiores al agregar 50 o 100 μM de ZnSO<sub>4</sub>, y que existiría una dependencia entre la masa total acumulada de proteína recombinante y el tiempo de recolección de los sobrenadantes, encontrando que recambios más frecuentes favorecen la cantidad de producto obtenido. Es decir, que si bien en algunos casos las producciones a 72, 96 y 120 h fueron altas, no fueron superiores a la suma de las producciones individuales obtenidas en los tiempos intermedios. En tanto, la masa total recolectada cada 12 h fue similar a la recogida cada 24 h, reflejando la conveniencia operativa y productiva de realizar los recambios cada 24 h.



CHO pCI 2A6 1G5



**Fig. 46. Producción del clon CHO pCI 2A6 1G5 en presencia de NaBu y diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>.**

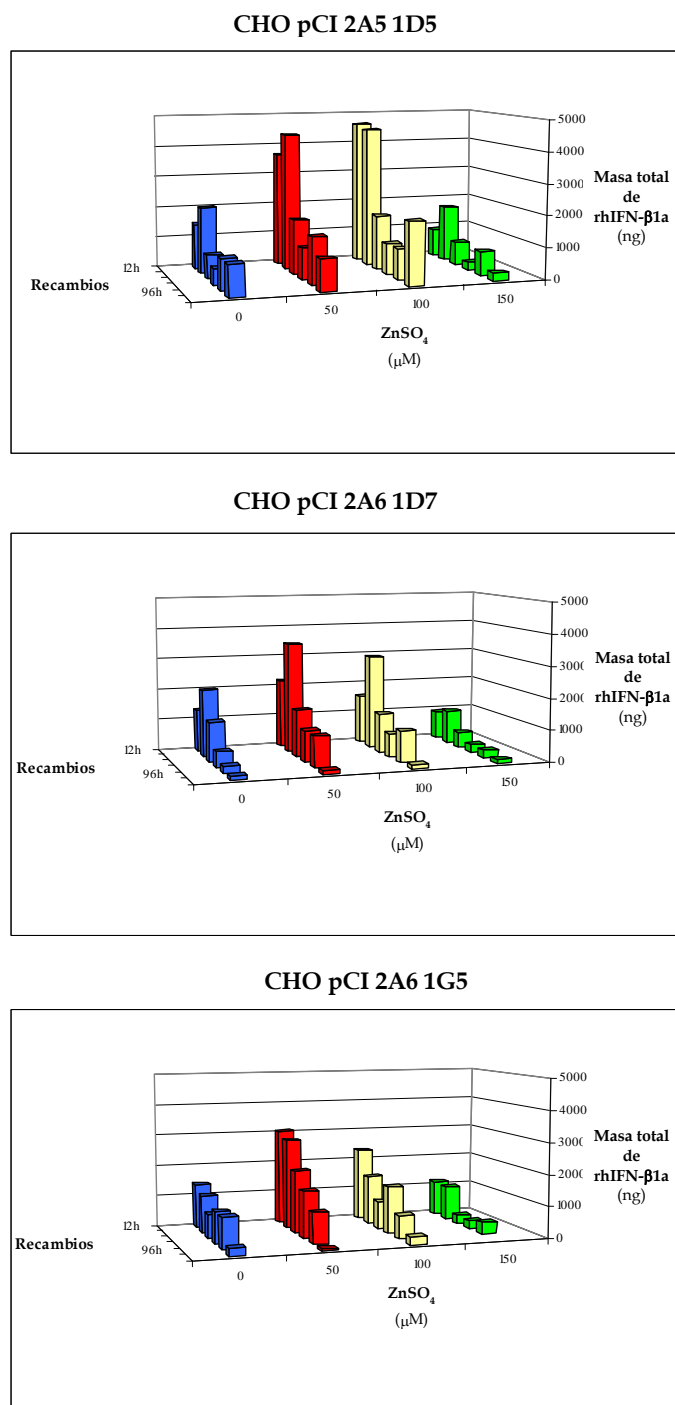
Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN-β1a presente en los sobrenadantes tomados cada 12 h (■), 24 h (■), 48 h (■), 72 h (■), 96 h (■) y 120 h (■), en medio A suplementado con 0,1% V/V SFB, 5 mM NaBu, en ausencia (panel A) o presencia de ZnSO<sub>4</sub> en concentración de 50 μM (panel B), 100 μM (panel C) o 150 μM (panel D).

Para corroborar los resultados obtenidos para los clones CHO pCI 2A5 1D5 y 2A6 1D7, y además seleccionar el clon y la condición de mayor producción, se realizó la valoración de la actividad biológica *in vitro* de algunos de los sobrenadantes ya analizados (Tabla XXI).

Se encontró que en el primer recambio de 24 h la producción no es muy alta, presumiéndose que aún las células no efectuaron las modificaciones que se producen ante el agregado de los aditivos.

Teniendo en cuenta el nivel acumulado de rhIFN-β1a hasta las 96 h de cultivo, la mejor opción, en general, parece ser la de realizar recambios cada 24 o 48 h, siendo las producciones a estos tiempos superiores a la de las 96 h. En todos los casos, a las 96 h la actividad biológica de rhIFN-β1a disminuye, lo que puede atribuirse a la inestabilidad de la proteína o a su pérdida por adhesión a otras proteínas o al

recipiente de cultivo a través de interacciones hidrofóbicas inespecíficas, condiciones que pueden evitarse realizando recambios de medio de cultivo más frecuentes.



**Fig. 47. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5, 2A6 1D7 y 2A6 1G5 en presencia de NaBu y diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>.** Los resultados mostrados en las Fig. 44, 45 y 46 se expresan como la concentración de rhIFN-β1a acumulada para cada frecuencia de recambios.

**Tabla XXI. Producción de los clones CHO pCI 2A5 1D5 y 2A6 1D7 en presencia de NaBu y diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>.**

Se determinaron por ensayos de actividad biológica *in vitro* las concentraciones de rhIFN-β1a presentes en los sobrenadantes tomados durante 4 días, cada 24, 48 y 96 h, en medio A suplementado con las cantidades de SFB y NaBu previamente optimizadas para cada clon, en presencia de 50 o 100 μM ZnSO<sub>4</sub>.  
 Total: nivel acumulado de rhIFN-β1a a las 96 h.

Clon CHO pCI	Días	Actividad biológica (UI/ml)					
		50 μM ZnSO <sub>4</sub>			100 μM ZnSO <sub>4</sub>		
		Cosecha de sobrenadante cada			Cosecha de sobrenadante cada		
		24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
2A5 1D5	1	14.680			5.770		
	2	47.510	54.490		38.000	14.650	
	3	47.510			9.120		
	4	26.040	100.540	33.880	7.600	21.570	35.440
	Total (UI)	135.740	155.130	33.880	60.490	36.220	35.440
2A6 1D7	1	3.000			3.310		
	2	3.000	6.360		3.310	4.550	
	3	10.780			5.730		
	4	6.940	38.060	38.060	6.480	15.600	15.600
	Total (UI)	23.720	44.420	38.060	18.830	20.150	15.600

Para ambos clones, por *inmunodot*, se detectaron similares cantidades de rhIFN-β1a durante los recambios a 24, 48 y 96 h con medio A suplementado con concentraciones óptimas de SFB, NaBu y 50 o 100 μM de Zn<sup>2+</sup>. A pesar de esto, los niveles acumulados de proteína recombinante determinados por actividad biológica fueron inferiores al aumentar la concentración del catión. Este hecho podría deberse a los diferentes principios en los que se basan los dos métodos de cuantificación utilizados. De hecho, mientras que el *inmunodot* permite detectar la proteína recombinante de manera independiente de si ésta es o no activa, los ensayos de actividad biológica *in vitro* sólo detectan las moléculas activas.

En concordancia con los resultados mostrados en la Fig. 47, las actividades detalladas en la Tabla XXI fueron superiores para el clon CHO pCI 2A5 1D5 en comparación con el clon CHO pCI 2A6 1D7.

En resumen, los resultados alcanzados sugieren que el clon CHO pCI 2A5 1D5 es el que más aumenta la producción ante el agregado conjunto de NaBu y Zn<sup>2+</sup>, y la mejor condición resulta aquélla en la que el medio es suplementado con 0,5% V/V SFB, 2 mM NaBu y 50 μM de ZnSO<sub>4</sub>.

### 5.6. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5. Experiencias de pulsos y descansos

Se intentó prolongar en el tiempo la producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 teniendo en cuenta los resultados previos, que indicaron que la presencia de NaBu en

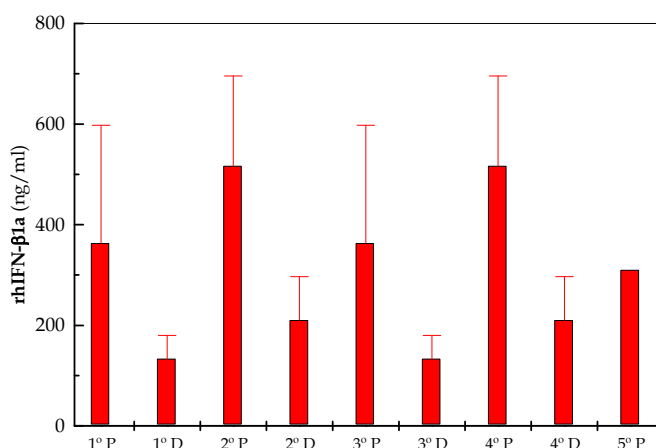
el cultivo permite aumentar la producción de rhIFN- $\beta$ 1a, pero este incremento es marcado durante los primeros recambios de medio de cultivo y luego las concentraciones de proteína recombinante tienden a disminuir.

Con tal fin 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 evaluó el agregado de diferentes aditivos a los cultivos y la variación de los tiempos de exposición al realizar los pulsos y descansos.

### 5.6.1. Pulsos en presencia de butirato de sodio

Tratando de prolongar el tiempo de producción del clon recombinante y la vida de las células, se realizaron experiencias de pulsos en presencia de NaBu y descansos sin este aditivo.

Se partió de una monocapa de células del clon CHO pCI 2A5 1D5, realizando pulsos de 48 h con medio A suplementado con 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu, y descansos de 24 h con medio A suplementado con 1% V/V SFB, en forma alternada durante 14 días. Para cada recambio de medio, se determinó en el sobrenadante la concentración de rhIFN- $\beta$ 1a utilizando la técnica de *immunodot*.



**Fig. 48. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.**

Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a presentes en los sobrenadantes de los cultivos realizados con medio A suplementado con 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (pulsos de 48 h), y de aquéllos realizados en medio A suplementado con 1% V/V SFB (descansos de 24 h).

La barra rellena y la línea vertical representan el promedio y la desviación estándar de los resultados alcanzados en tres ensayos independientes.

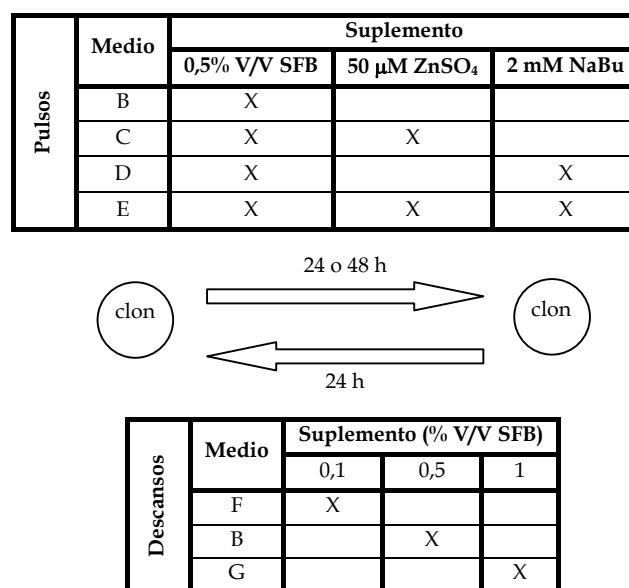
Si bien las diferencias en la producción durante los pulsos y descansos no son significativas, se puede observar una tendencia a alcanzar concentraciones superiores durante los pulsos (Fig. 48).

En este tipo de cultivo se observan cambios morfológicos en la monocapa celular, pero ésta permaneció adherida y manteniendo la producción de la proteína recombinante, a diferencia de los resultados obtenidos previamente, cuando sin un período de recuperación.

En forma similar a los resultados mostrados por Mimura y col. (2001), que mantuvieron el crecimiento de células CHO recombinantes durante un mes en presencia de 2 mM NaBu con cambios de medio cada 24 h, en este ensayo se logró mantener el cultivo en adecuadas condiciones, por lo menos durante los 14 días de duración del ensayo.

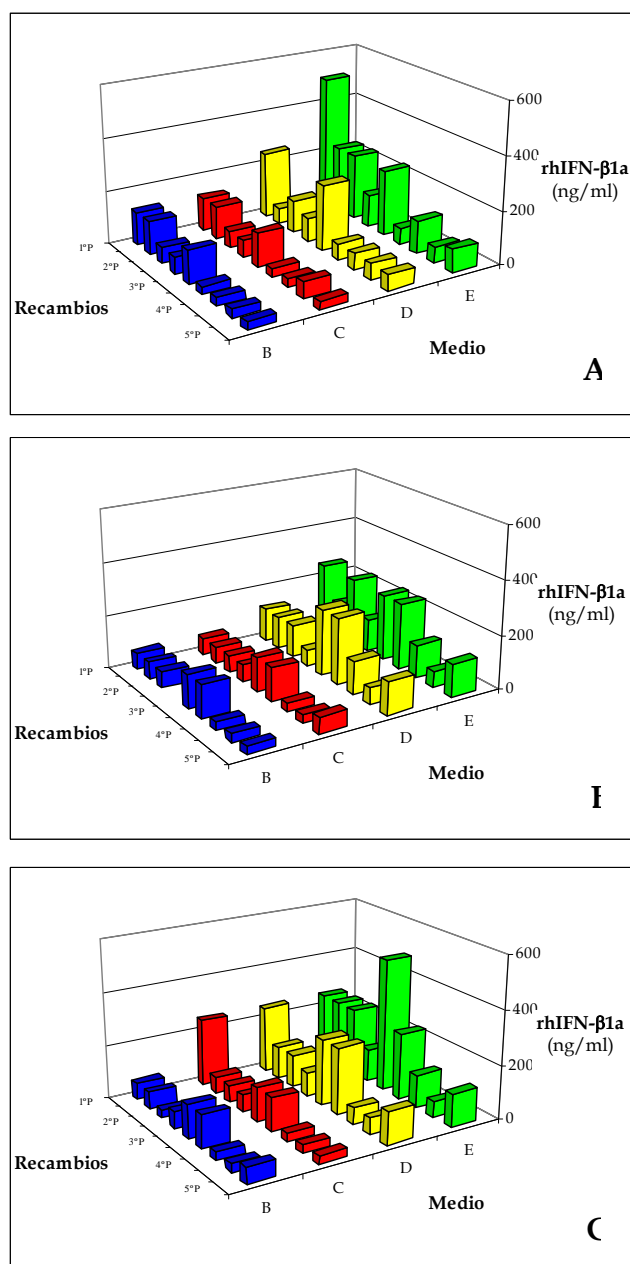
**5.6.2. Variaciones de la duración de los pulsos y de la concentración del suero fetal bovino durante los descansos**

Para tratar de optimizar el tiempo de duración de los pulsos y la concentración de SFB durante los descansos se efectuó la siguiente experiencia. Partiendo de una monocapa de células se realizaron pulsos, de 24 o 48 h, y descansos, de 24 h, con diferentes medios como se detalla en la Fig. 49. Durante cada recambio se estimó en el sobrenadante la concentración de rhIFN-β1a utilizando la técnica de *immunodot*.



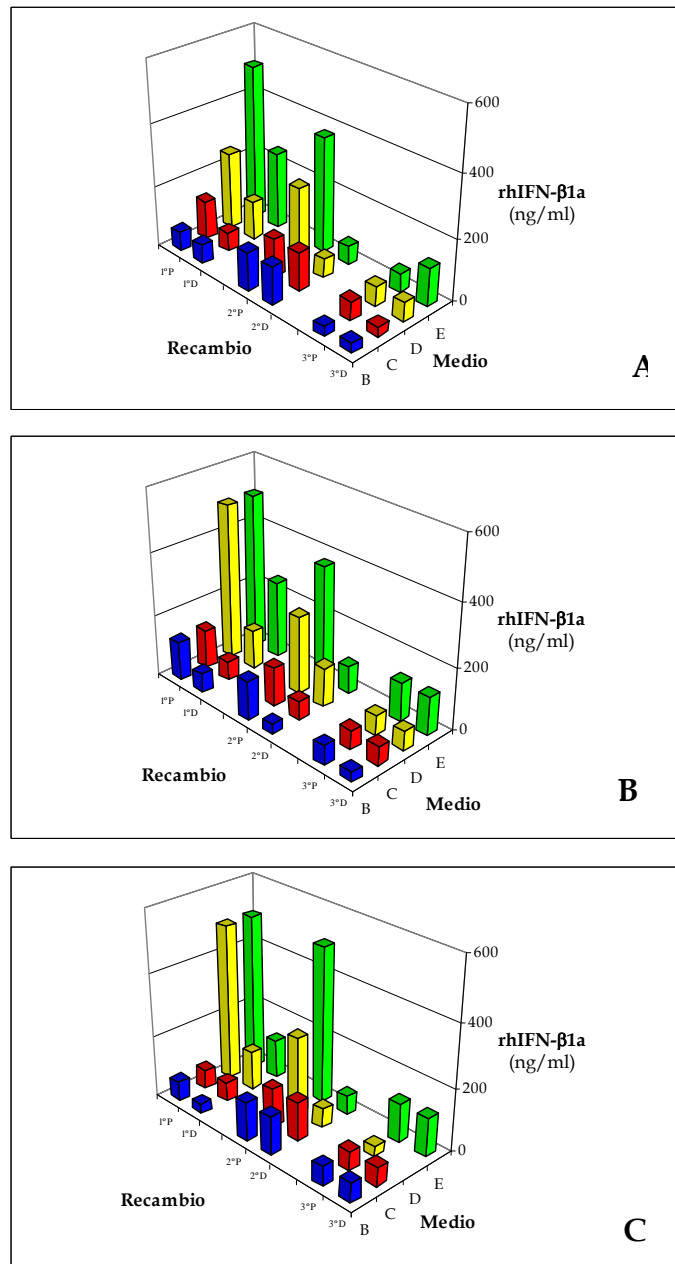
**Fig. 49. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.**  
 Se realizaron pulsos de 24 o 48 h y descansos de 24 h, en medio A con la adición de los suplementos indicados.

En las Figs. 50 y 51 se muestran las producciones del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante los pulsos de 24 o 48 h y los descansos de 24 h, realizados con los diferentes medios.



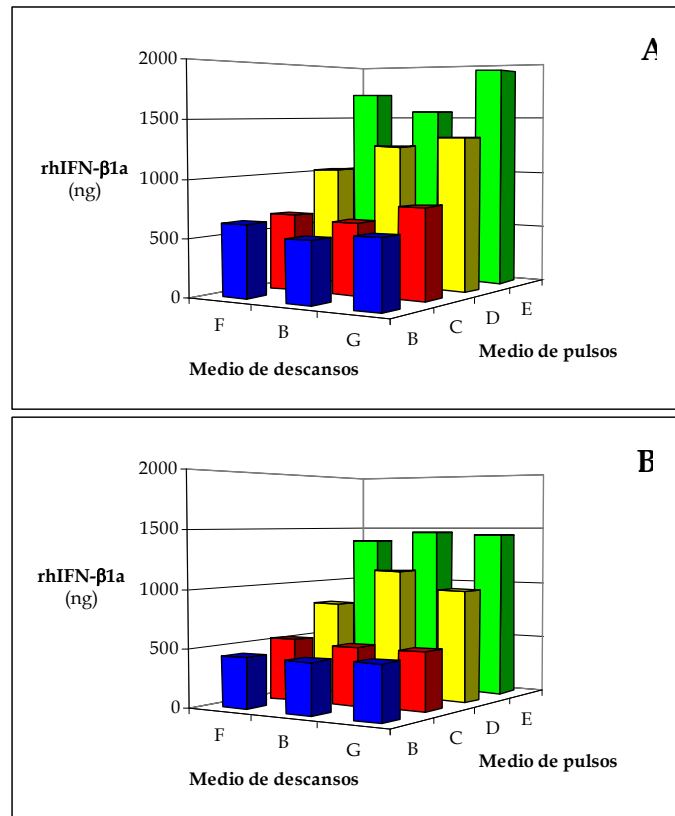
**Fig. 50. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos de 24 h y descansos de 24 h.**

Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN-β1a presentes en los sobrenadantes de los cultivos de los pulsos de 24 h, realizados con medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB (■), 0,5% V/V SFB y 50 μM ZnSO<sub>4</sub> (■), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (■), o 0,5% V/V SFB, 50 μM ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu (■); siendo los descansos de 24 h, realizados en medio A suplementado con SFB al 0,1 % V/V (panel A), 0,5 % V/V (panel B) o 1% V/V SFB (panel C).



**Fig. 51. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos de 48 h y descansos de 24 h.**

Se cuantificaron por la técnica de *immunodot* las concentraciones de rhIFN-β1a presentes en los sobrenadantes de los cultivos de los pulsos de 48 h, realizados con medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB (■), 0,5% V/V SFB y 50 μM ZnSO<sub>4</sub> (■), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (■), o 0,5% V/V SFB, 50 μM ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu (■); siendo los descansos de 24 h, realizados en medio A suplementado con SFB al 0,1 % V/V (panel A), 0,5 % V/V (panel B) o 1% V/V SFB (panel C).



**Fig. 52. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 en diferentes condiciones de cultivo.**

Se sumaron las producciones de rhIFN-β1a cuantificadas por la técnica de *immunodot* presentes en los sobrenadantes de cultivos de los pulsos de 24 h (panel A) y 48 h (panel B), realizados con medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB (■), 0,5% V/V SFB y 50 μM ZnSO<sub>4</sub> (■), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (■), o 0,5% V/V SFB, 50 μM ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu (■), siendo los descansos de 24 h realizados con medio A suplementado con SFB al 0,1% V/V (Medio F), 0,5% V/V (Medio B) y 1% V/V (Medio C).

En la Fig. 52 se observa la masa total de rhIFN-β1a producido durante los 9 días del ensayo de pulsos y descansos, en ella se resumen los datos obtenidos en las Figs. 50 y 51.

Pudo encontrarse un aumento de la producción en forma creciente, al comparar las producciones en medio suplementado sólo con SFB con las obtenidas cuando se agrega ZnSO<sub>4</sub>, NaBu y ambos en forma conjunta. No se observó variación de la producción al agregar únicamente ZnSO<sub>4</sub>.

Hubo una leve tendencia a aumentar la producción de rhIFN-β1a con el agregado de mayores cantidades de SFB cuando los pulsos fueron de 24 h, pero no hubo variaciones significativas al variar la concentración de SFB del medio de los descansos cuando los pulsos fueron de 48 h.

Se observó que las producciones fueron superiores al realizar todos los recambios cada 24 h. De esta manera, las células serían expuestas a condiciones subóptimas durante menos tiempo.



La producción máxima se obtuvo al realizar los pulsos de 24 h y los descansos con medio A suplementado con 1% V/V SFB.

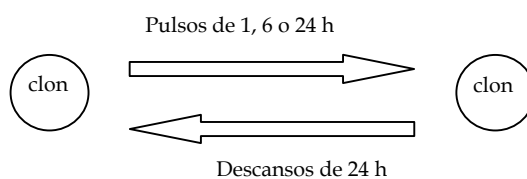
Teniendo en cuenta que los pulsos con una duración superior a las 24 h no resultaron más efectivos en cuanto a la producción, surgió el interés de analizar qué ocurría al disminuir este tiempo, realizando los descansos con medio A suplementado con 1% V/V SFB.

**5.6.3. Variación de la duración de los pulsos y presencia de ZnSO<sub>4</sub> durante los descansos. Evaluación de la adición de glicerol**

Por otro lado, dado que se ha descrito que el Zn<sup>2+</sup> lleva a un incremento en el número de células, mediante la estimulación de la división celular y la supresión de la apoptosis (Perry y col., 1997, Hartmann y col., 2001), se decidió agregar Zn<sup>2+</sup> también durante los descansos. Además, teniendo en cuenta que el glicerol reduciría la agregación de rhIFN-β1a durante su producción (Rodríguez y col., 2005), se evaluó su efecto empleándolo como suplemento de los medios.

Se analizó la posibilidad de reducir el tiempo de duración de los pulsos, teniendo en cuenta el agregado de los aditivos antes mencionados. Se partió de cultivos en monocapa del clon CHO pCI 2A5 1D5 realizando pulsos y descansos en forma alternada en las condiciones detalladas en la Fig. 53 durante 7 días.

Pulsos	Medio	Suplemento			
		0,5% V/V SFB	50 μM ZnSO <sub>4</sub>	2 mM NaBu	1% V/V glicerol
	B	X			
	C	X	X		
	D	X		X	
	E	X	X	X	
	B'	X			X
	C'	X	X		X
	D'	X		X	X
	E'	X	X	X	X

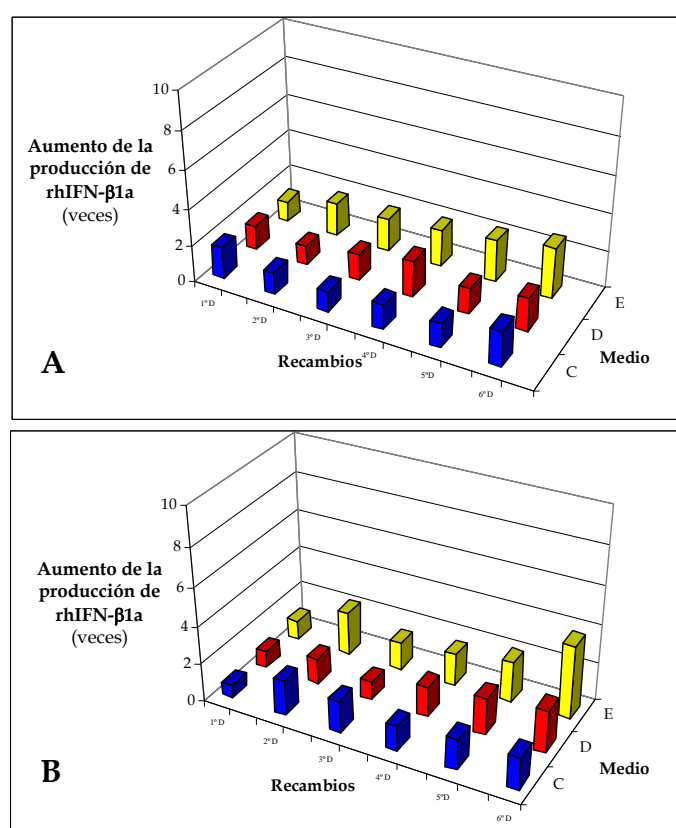


Descansos	Medio	Suplemento		
		1% V/V SFB	50 μM ZnSO <sub>4</sub>	1% V/V glicerol
	G	X		
	F	X	X	
	G'	X		X
	F'	X	X	X

**Fig. 53. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.** Se realizaron pulsos de 1 h, 6 h o 24 h y descansos de 24 h, en medio A con la adición de los suplementos indicados.

En el sobrenadante de cada recambio de medio de cultivo se determinó la concentración de rhIFN- $\beta$ 1a mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro*. Posteriormente, se calcularon las producciones específicas, teniendo en cuenta la concentración de células viables correspondiente. Los resultados se expresan en forma relativa respecto a la condición en la cual los pulsos se realizan en ausencia de los aditivos Zn<sup>2+</sup> y NaBu.

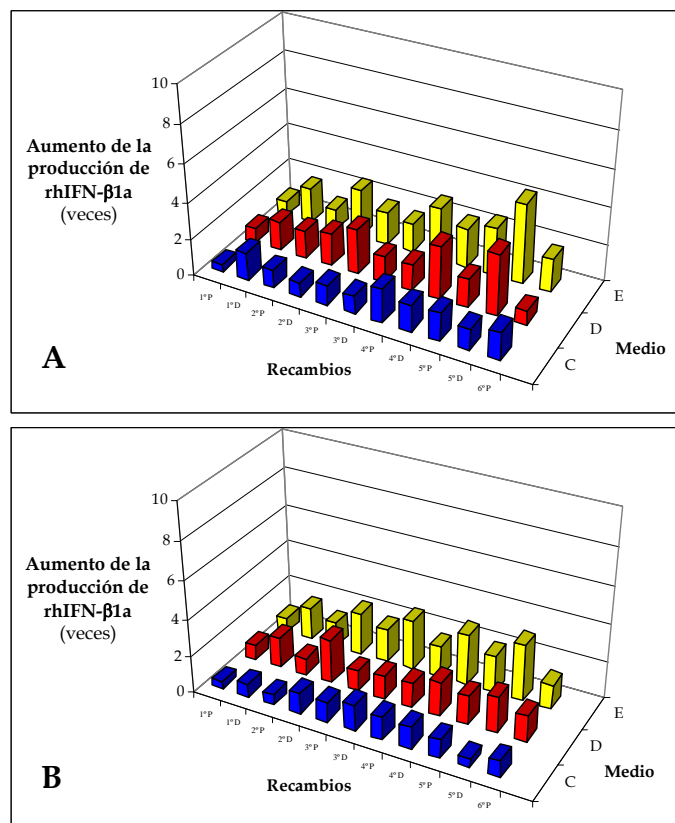
Al analizar las productividades obtenidas durante los recambios realizados en la experiencia en la que los pulsos fueron de 1 h, se encontró que aumentan aproximadamente hasta 2 veces ante el agregado de ZnSO<sub>4</sub> o NaBu, siendo el incremento superior, y aproximado de hasta 4 veces, cuando los pulsos se realizaron en presencia de ambos aditivos (Fig. 54).



**Fig. 54. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos de 1 h y descansos de 24 h.**

Se cuantificaron mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro* las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a presentes en los sobrenadantes de los descansos de 24 h, cuando los pulsos fueron de 1 h, y se determinaron las productividades. Posteriormente se calculó el aumento de la producción realizando el cociente entre las productividades en el medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB y 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> (■), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (■), o 0,5% V/V SFB, 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu (■), y la obtenida en el medio A suplementado con 0,5% V/V SFB; cuando los descansos fueron realizados en medio A suplementado con 1% V/V SFB (panel A), o 1% V/V SFB y 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> (panel B).

De igual manera, para la experiencia de pulsos de 6 h, los aumentos fueron aproximadamente de hasta 2, 3 y 4 veces, ante el agregado de  $\text{ZnSO}_4$ , NaBu o los dos, respectivamente (Fig. 55). Para la experiencia en la cual los pulsos fueron de 6 h, se encontró que el aumento en las productividades fue mayor durante los descansos, pudiendo atribuirse este efecto al hecho de que los descansos fueron de 24 h.

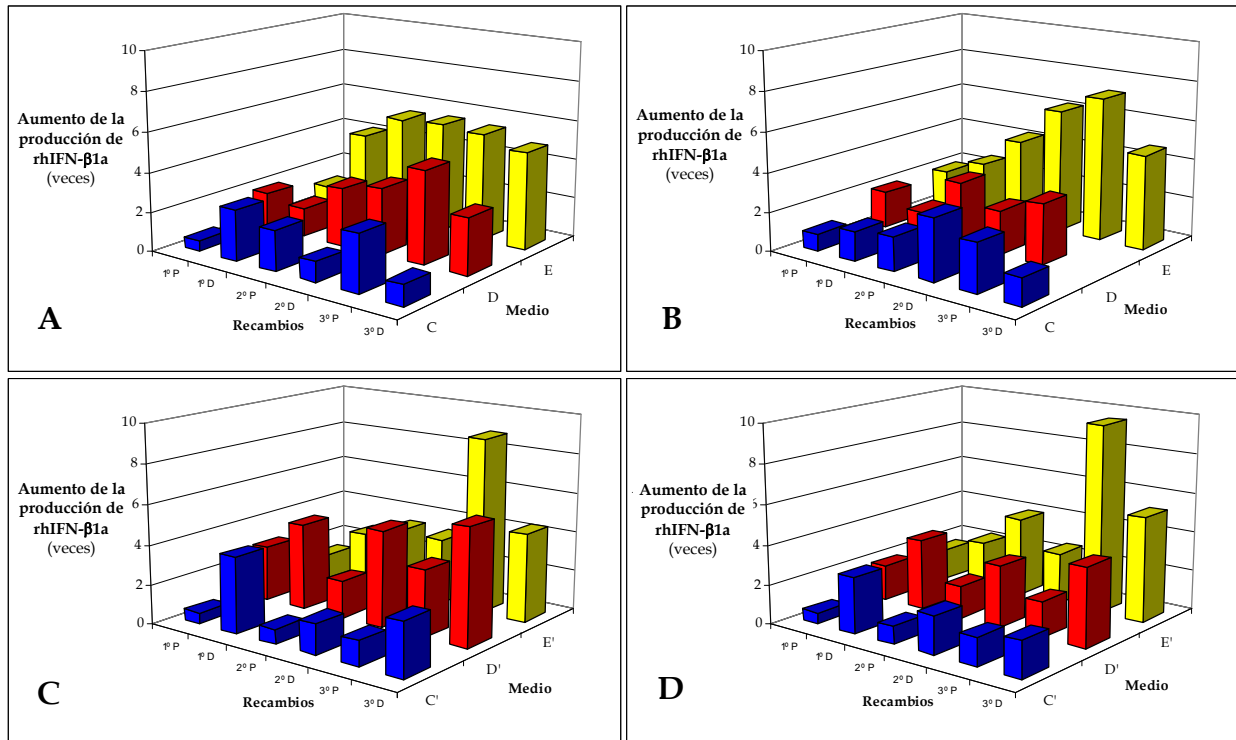


**Fig. 55. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos de 6 h y descansos de 24 h.**

Se cuantificaron mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro* las concentraciones de rhIFN- $\beta$ 1a presentes en los sobrenadantes los pulsos de 6 h y los descansos de 24 h, y se determinaron las productividades. Posteriormente se calculó el aumento de la producción realizando el cociente entre las productividades en el medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB y 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  (■), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (■), o 0,5% V/V SFB, 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  y 2 mM NaBu (■), y la obtenida en el medio A suplementado con 0,5% V/V SFB; cuando los descansos fueron realizados en medio A suplementado con 1% V/V SFB (panel A), o con 1% V/V SFB y 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  (panel B).

Del análisis de la Fig. 56, donde se muestran los resultados obtenidos durante los recambios realizados en la experiencia en la que los pulsos fueron de 24 h y sin glicerol (paneles A y B), se observa un aumento de las productividades en forma creciente de hasta 3, 5 y 7 veces, aproximadamente, ante el agregado de  $\text{ZnSO}_4$ , NaBu y ambos aditivos, respectivamente, por lo menos durante los 7 días que duró el ensayo. Además, se encontró que ante el agregado de  $\text{ZnSO}_4$  o NaBu por separado las

productividades aumentaron más durante los pulsos que los descansos, mientras que se mantuvieron similares en el caso en que ambos aditivos fueron adicionados.



**Fig. 56. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos de 24 h y descansos de 24 h.**

Se cuantificaron mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro* las concentraciones de rhIFN-β1a presentes en los sobrenadantes de los pulsos y descansos de 24 h, y se determinaron las productividades. Posteriormente se calculó el aumento de la producción realizando el cociente entre las productividades en el medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB y 50 μM ZnSO<sub>4</sub> (■), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (■), o 0,5% V/V SFB, 50 μM ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu (■), y la obtenida en el medio A suplementado con 0,5 % V/V SFB; cuando los descansos fueron realizados en medio A suplementado con 1% V/V SFB (panel A), 1% V/V SFB y 50 μM ZnSO<sub>4</sub> (panel B), 1% V/V SFB y glicerol 1% V/V (panel C), y 1% V/V SFB, 50 μM ZnSO<sub>4</sub> y glicerol 1% V/V (panel D).

Se desconoce el motivo por el cual los resultados fueron más homogéneos cuando no se utilizó glicerol.

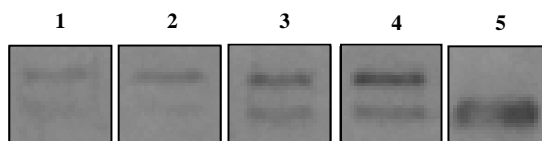
En el ensayo en el que se adicionó glicerol (Fig. 56, paneles C y D), sólo durante el tercer pulso y descanso se observó una diferencia sustancial en la producción ante el agregado de ambos aditivos juntos al compararlas con las productividades obtenidas con cada uno de ellos por separado, a diferencia de lo encontrado en la experiencia sin glicerol donde las productividades fueron aumentando en presencia de ZnSO<sub>4</sub>, NaBu y ambos aditivos.

No se encontraron diferencias en la concentración de rhIFN-β1a 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-β1a.

El número de células varió entre aproximadamente  $5 \cdot 10^5$  cél/ml para el primer día y  $1,5 \cdot 10^6$  cél/ml a partir del cuarto día. No se encontraron variaciones importantes en cuanto al número de células (Fig. 57, paneles A, C, E y G) para las mismas condiciones ensayadas cuando en el medio de descanso se agregó o no  $ZnSO_4$ . Por lo tanto, este aditivo no mostró un efecto estimulador de la división celular ni supresor de la apoptosis en los sistemas de cultivo ensayados.

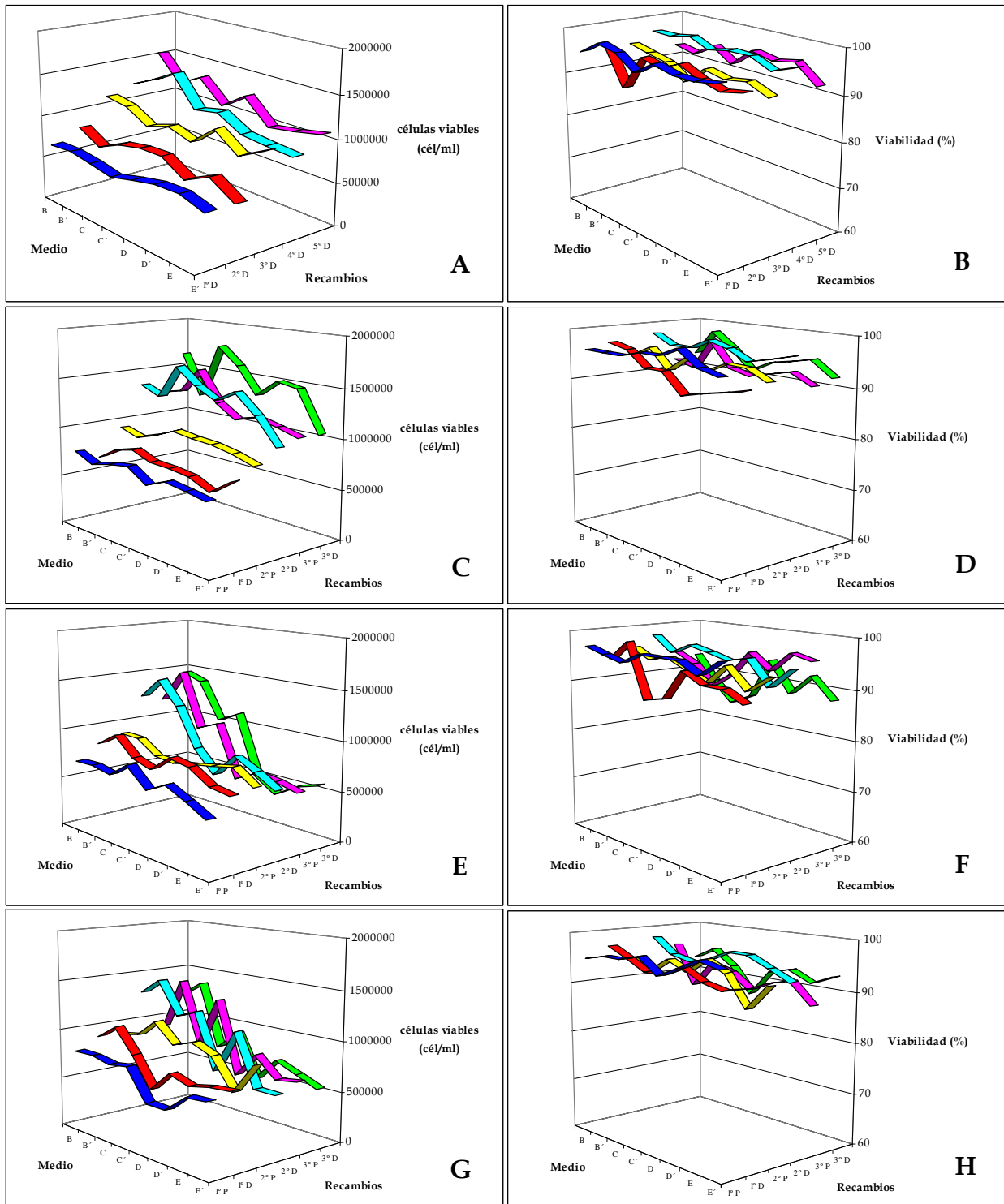
Los cultivos se mantuvieron en buen estado y similares entre sí para cada pulso o descanso, a pesar de la presencia de NaBu, que influyó en el número de células viables, disminuyéndolo a partir del segundo descanso sobre todo para las experiencias de recambios cada 24 h. Como puede observarse también en las gráficas, a pesar de que en algunos casos la cantidad de células viables disminuyó, la viabilidad fue similar para todas las condiciones, y próximas al máximo (Fig. 57, paneles, B, D, F y H).

Se analizaron los sobrenadantes de los pulsos y descansos por *Western blot*. En la Fig. 58 se muestran los resultados obtenidos para los sobrenadantes de los pulsos de 24 h en ausencia y presencia de NaBu, de  $Zn^{2+}$  o de ambos. En todos los casos se observaron las dos bandas correspondientes a las formas glicosiladas y sin glicosilar de rhIFN- $\beta$ 1a. Resultados análogos se obtuvieron para los sobrenadantes procedentes de las experiencias realizadas con las otras frecuencias de recambio y para los de los descansos. Estos resultados sugieren que el agregado de los aditivos no modifica la estructura de la proteína recombinante. Este hecho está en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores. En efecto, se ha demostrado que la presencia de NaBu no afecta la adición de hidratos de carbono a IgG producidas en células CHO.K1 (Mimura y col, 2001). También, Sung y col. (2004), quienes midieron la actividad de glicosidasas tales como fucosidasa,  $\beta$ -hexaminidasa,  $\beta$ -galactosidasa y sialidasa en el sobrenadante de cultivo de células creciendo en presencia de NaBu, encontraron que la actividad de las glicosidasas en los sobrenadantes de cultivo no variaron en presencia de hasta 10 mM de NaBu.



**Fig. 58. Análisis por *Western blot* de las moléculas de rhIFN- $\beta$ 1a producidas por el clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.**

Fueron analizados los sobrenadantes de pulsos de 24 h realizados en medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB (línea 1), 0,5% V/V SFB y  $50 \mu M ZnSO_4$  (línea 2), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (línea 3), y 0,5% V/V SFB,  $50 \mu M ZnSO_4$  y 2 mM NaBu (línea 4), y 22,5 ng de estándar no glicosilado (Betaferon) (línea 5).



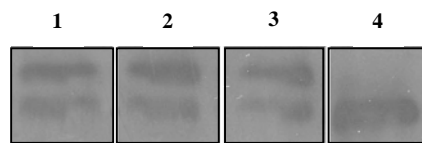
**Fig. 57. Variaciones del número de células del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.**

Se contaron las células viables y las muertas presentes en cada uno de los recambios de medio realizados y se determinó la viabilidad celular para cada caso.

En los paneles A y B se muestran las células viables y la viabilidad de la experiencia en la que los pulsos fueron de 1 h; en los paneles C y D, las de la experiencia en la que los pulsos fueron de 6 h; en los paneles E y F, las de la experiencia en la que los pulsos fueron de 24 h; y en los paneles G y H, las de la experiencia en la que los pulsos fueron de 24 h en presencia de glicerol 1% V/V.

Por otro lado, y dado que fueron sembradas iguales alícuotas de sobrenadante, los resultados de este ensayo de *Western blot* demuestran claramente el aumento creciente de la concentración total de rhIFN- $\beta$ 1a, y de la forma glicosilada en particular, ante el agregado de ZnSO<sub>4</sub>, NaBu y ambos.

Se analizó además si la presencia de ZnSO<sub>4</sub>, durante los descansos, o de glicerol, durante toda la experiencia, afectaba la glicosilación de rhIFN- $\beta$ 1a. Con tal objetivo, se realizó un ensayo de *Western blot* en el que se compararon, para un dado tiempo, los sobrenadantes de los descansos con los diferentes medios, provenientes de los pozos donde los pulsos fueron hechos en presencia de NaBu y ZnSO<sub>4</sub>. Como se observa en la Fig. 59 no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las proporciones de formas glicosiladas y sin glicosilar, ni la aparición de alguna otra forma de rhIFN- $\beta$ 1a.



**Fig. 59. Análisis por *Western blot* de las moléculas de rhIFN- $\beta$ 1a producidas por el clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.**

Fueron analizados los sobrenadantes de descansos de 24 h, cuando los pulsos fueron realizados en medio A suplementado con 0,5% V/V SFB, 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu, y los descansos se efectuaron con medio A suplementado con 1% V/V SFB (línea 1), 1% V/V SFB y 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> (línea 2), 1% V/V SFB, 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> y 1% V/V glicerol (línea 3), y 22,5 ng de estándar no glicosilado (Betaferon) (línea 4).

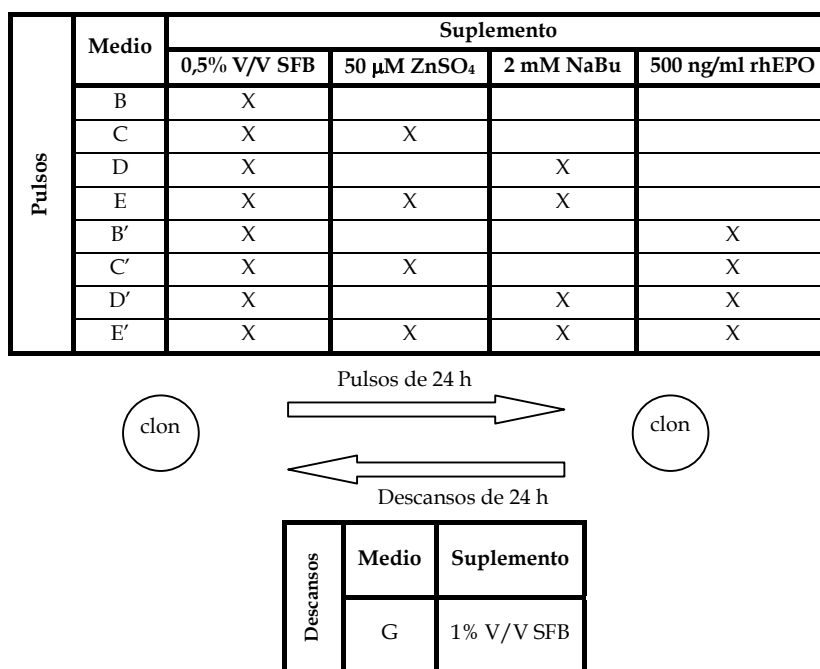
Se concluyó, entonces, que la mejor condición es la de realizar tanto pulsos como descansos de 24 h. Como no se observaron diferencias en el número de células ni en las productividades obtenidas en las experiencias donde los descansos se realizaron con medio A suplementado con 1% V/V SFB en ausencia o presencia de 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, ni en las experiencias realizadas en presencia de glicerol, no sería necesario utilizar estos suplementos, por no resultar efectivos para este tipo de cultivo.

#### **5.6.4. Presencia de rhEPO durante las experiencias de pulsos y descansos en condiciones óptimas**

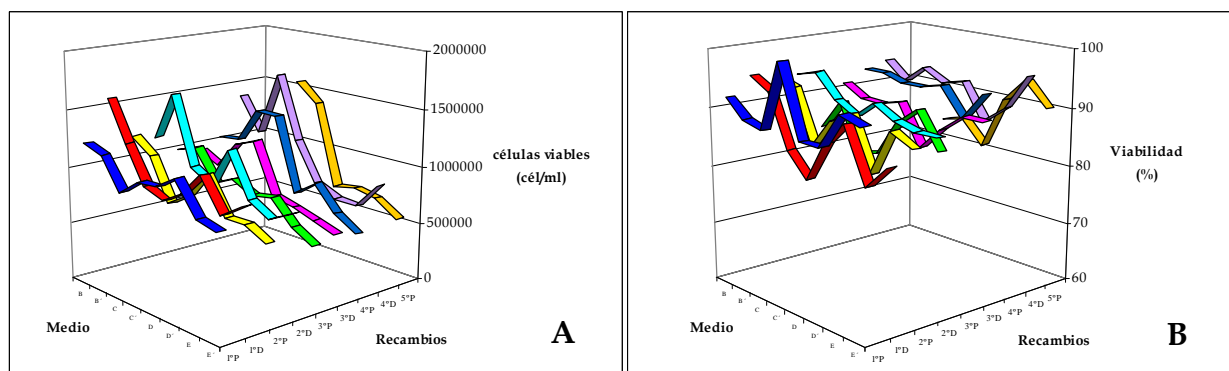
Con el fin de mantener la calidad del cultivo celular con una alta producción de proteína recombinante, se realizó una experiencia en la que se agregó rhEPO durante los pulsos y descansos, debido a que esta proteína actuaría manteniendo la viabilidad celular inhibiendo el proceso de apoptosis (Silva y col., 1996; Kumral y col., 2005; Um y Lodish, 2006).

Se partió de cultivos en monocapa del clon CHO pCI 2A5 1D5 realizando pulsos y descansos en forma alternada en las condiciones detalladas en la Fig. 60 durante 9 días.

Se determinó en el sobrenadante de cada recambio de medio de cultivo la concentración de rhIFN-β1a mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro*. Posteriormente se calcularon las producciones específicas, teniendo en cuenta la concentración de células viables correspondiente. Los resultados se expresan en forma relativa respecto a la condición en la cual los pulsos se realizan en ausencia de los aditivos Zn<sup>2+</sup>, NaBu y rhEPO.



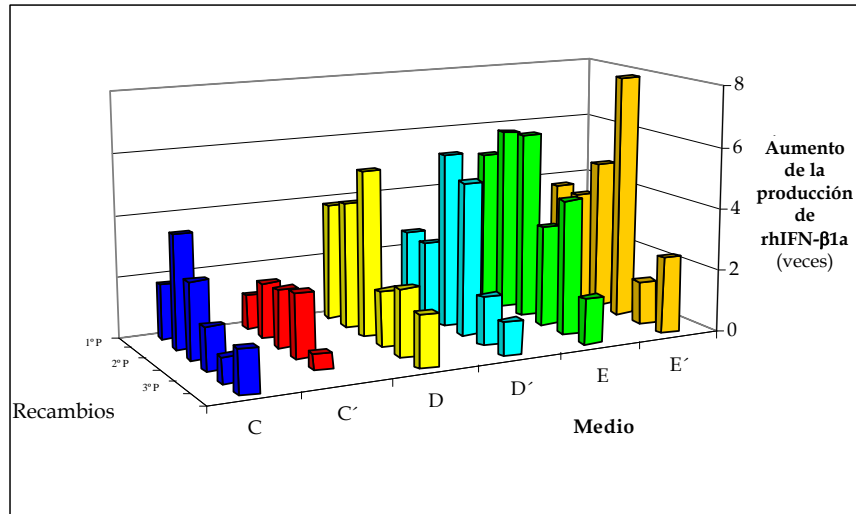
**Fig. 60. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.** Se realizaron pulsos y descansos de 24 h cada uno, en medio A con la adición de los suplementos indicados.



**Fig. 61. Variaciones del número de células del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.** Se realizó el recuento de células viables (panel A) y la estimación de la viabilidad (panel B) de los cultivos correspondientes a la experiencia en la que los pulsos y los descansos fueron realizados en presencia o ausencia de rhEPO.



Como se observa en la Fig. 61 no se hallaron importantes variaciones en la concentración celular (panel A) para los mismos medios cuando la única diferencia fue la presencia o ausencia de rhEPO, por lo que esta proteína no cumpliría con la función antiapoptótica que se esperaba. La disminución en el número de células viables ante la presencia de NaBu fue notoria a partir del tercer descanso (panel A), pero la viabilidad (panel B) se mantuvo entre 80 y 100% para las diferentes condiciones ensayadas.



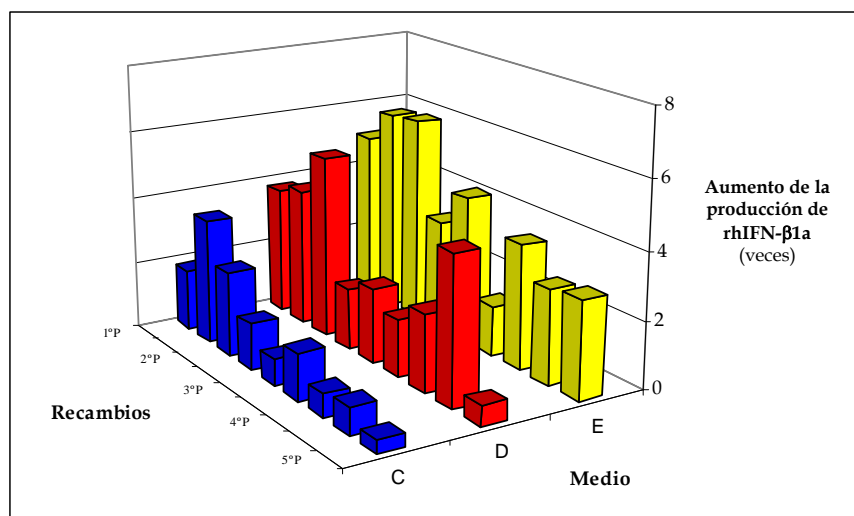
**Fig. 62. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.**

Se cuantificaron mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro* las concentraciones de rhIFN-β1a presentes en los sobrenadantes de los pulsos y descansos de 24 h, y se determinaron las productividades. Posteriormente se calculó el aumento de la producción realizando el cociente entre las productividades en el medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB y 50 μM ZnSO<sub>4</sub>, en ausencia (■) o presencia de rhEPO (■); o 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu, en ausencia (■) o presencia de rhEPO (■); 0,5% V/V SFB 50 μM ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu, en ausencia (■) o presencia de rhEPO (■); y la obtenida en el medio A suplementado con 0,5% V/V SFB.

En la Fig. 62 se muestra el aumento de la producción de rhIFN-β1a para el ensayo de pulsos y descansos en ausencia o presencia de rhEPO. En ésta se observan los aumentos en las productividades durante los tres primeros pulsos y descansos. Al comparar los aumentos de la producción entre los pares de medio que sólo se diferencian por el agregado de rhEPO no se hallaron variaciones atribuibles a su presencia.

En la Fig. 63, se muestran los resultados obtenidos durante los recambios realizados en ausencia de rhEPO con pulsos y descansos de 24 h. Se observa un aumento de las productividades en forma creciente de hasta 4, 5 y 6 veces, aproximadamente, ante el agregado de ZnSO<sub>4</sub>, NaBu y ambos aditivos, respectivamente, por lo menos durante los 9 días que duró el ensayo. Si bien hasta el segundo pulso no se observaron muchas diferencias en las productividades, comparando los recambios donde sólo se agregó NaBu con los que se agregó NaBu y

ZnSO<sub>4</sub>, a partir del segundo descanso, el aumento fue más notorio. En general, el incremento de las productividades fue superior durante los pulsos.

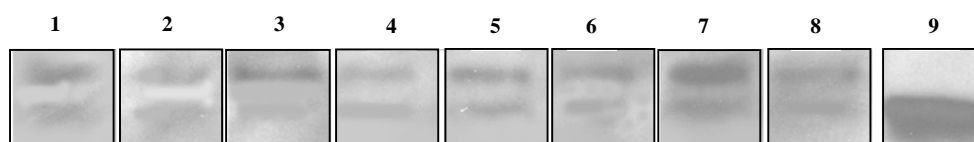


**Fig. 63. Producción del clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.**

Se cuantificaron mediante ensayos de valoración de la actividad biológica *in vitro* las concentraciones de rhIFN-β1a presentes en los sobrenadantes de los pulsos y descansos de 24 h, y se determinaron las productividades. Posteriormente se calculó el aumento de la producción realizando el cociente entre las productividades en el medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB y 50 μM ZnSO<sub>4</sub> (■), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (■), o 0,5% V/V SFB, 50 μM ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu (■), y la obtenida en el medio A suplementado con 0,5 % V/V SFB.

Los resultados fueron similares a los obtenidos en la experiencia de la sección 5.6.3. que duró 7 días, en la que también la mayor producción se observó al realizar los pulsos en presencia de NaBu y ZnSO<sub>4</sub>.

Mediante el ensayo de *Western blot* (Fig. 64), y como en las experiencias anteriores, se confirmó que hay una menor cantidad de rhIFN-β1a presente en los sobrenadantes de los descansos que en los de los pulsos. Además, se comprobó el aumento creciente de la concentración de rhIFN-β1a ante el agregado de ZnSO<sub>4</sub>, NaBu y ambos, respectivamente.



**Fig. 64. Análisis por *Western blot* de las moléculas de rhIFN-β1a producidas por el clon CHO pCI 2A5 1D5 durante experiencias de pulsos y descansos.**

Fueron analizados los sobrenadantes de pulsos realizados en medio A suplementado con: 0,5% V/V SFB (línea 1), 0,5% V/V SFB y 50 μM ZnSO<sub>4</sub> (línea 3), 0,5% V/V SFB y 2 mM NaBu (línea 5), y 0,5% V/V SFB, 50 μM ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM NaBu (línea 7); y de los descansos realizados con medio A suplementado con 1% V/V SFB para cada pulso (líneas 2, 4, 6 y 8, respectivamente); y 22,5 ng de estándar no glicosilado (Betaferon) (línea 9).