

RESUMEN

Los interferones IFNs comprenden una familia conservada de proteínas con actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras que mantienen la homeostasis y la defensa del huésped.

Hay dos formas comercialmente disponibles de rhIFN- β 1: el glicosilado expresado en células CHO, denominado rhIFN- β 1a y el rhIFN- β 1b producido en *E. coli* como una proteína no glicosilada. A partir del estudio de ambas formas se ha demostrado que la porción glicosídica de la molécula mejora su estabilidad, solubilidad y actividad.

El rhIFN- β 1 es empleado como agente terapéutico en una variedad de enfermedades, como por ejemplo la esclerosis múltiple y la hepatitis.

En el presente trabajo de Tesis titulado "*Desarrollo de una tecnología de producción de interferón β recombinante humano en células eucariontes*" se desarrollaron diferentes estrategias tendientes a producir rhIFN- β 1a glicosilado.

Inicialmente se obtuvo rhIFN- β 1b puro para ser utilizado en la producción de Ab policlonales y MAb, que posteriormente fueron usados en el desarrollo de métodos inmunoquímicos.

Se plantearon diferentes diseños de ELISAs, seleccionando el ELISA de competición con Igs de conejo y el MAb 2C12, debido a que permite determinar la concentración de rhIFN- β 1 en muestras complejas con sensibilidad y especificidad adecuadas. Este ensayo posee un rango de linealidad comprendido entre 20 y 250 ng de rhIFN- β 1/ml y un límite de detección de 10 ng de rhIFN- β 1/ml.

Otro método inmunoquímico desarrollado fue el *immunodot*, que resultó un ensayo óptimo para el *screening* de las células productoras, por cumplir los requisitos de rapidez y sencillez, con un rango de sensibilidad apropiado, entre 10 y 310 ng de rhIFN- β 1/ml.

Para la detección de las moléculas de proteína recombinante biológicamente activa, se utilizaron células WISH y el virus VSV. Se seleccionó un bioensayo de 24 h cuyo rango de linealidad está comprendido entre 1,5 y 12,0 UI de rhIFN- β 1/ml y su límite de detección es de 1,4 UI de rhIFN- β 1/ml.

Las líneas celulares CHO.K1, CHO dhfr-, BHK.21 y NS0 fueron transfectadas por el método de lipofección, con los lípidos catiónicos LipofectAMINE, LipofectAMINE Plus y LipofectAMINE 2000, y DOTAP para las células HEK-293, en condiciones optimizadas previamente. Se utilizaron vectores con diferentes características, como lo son los vectores pCI-IFN- β 1, pKG4-IFN- β 1, p91023-IFN- β 1, pcDNA-IFN- β 1 y pzc-IFN- β 1.

Todas las líneas celulares recombinantes obtenidas produjeron rhIFN- β 1a principalmente en su forma glicosilada, excepto las líneas derivadas de BHK.21 que produjeron mayor proporción de la forma no glicosilada.

El proceso de coamplificación génica de los genes de dhfr y de hIFN- β 1 en las células CHO p91023 permitió aumentar hasta 6 veces la producción de la proteína recombinante al realizar la presión de selección gradual hasta 500 nM MTX. Sin embargo, una posterior presión con la máxima cantidad de antibiótico compatible con el crecimiento celular (350 μ M MTX), sólo permitió seleccionar clones con mayor resistencia al antibiótico, sin aumentar la expresión de rhIFN- β 1a. A pesar de la plasticidad inherente de los genomas eucariotas y de que la presión selectiva aplicada durante el cultivo continuo puede afectar la estabilidad de las secuencias transfectadas e integradas, los clones obtenidos mantuvieron su producción durante varios meses, por lo que se los considera estables.

Basándonos en la producción preferencial de la isoforma glicosilada y la alta productividad, se seleccionaron clones derivados de la línea CHO pCI-IFN- β 1, denominados CHO pCI 2A5 1D5, CHO pCI 2A6 1D7 y CHO pCI 2A6 1G5 para continuar con la optimización de las condiciones de cultivo.

Se adaptaron los clones al crecimiento con menores cantidades de SFB en el medio, con el objetivo de disminuir los costos de producción y facilitar la posterior purificación de la proteína recombinante.

A su vez, y teniendo en cuenta que la expresión de genes en los cultivos celulares es fuertemente dependiente de las condiciones de cultivo, se evaluó el efecto del agregado de distintos suplementos al medio. Así, se observó que la producción de rhIFN- β 1a aumentaba al adicionar a los cultivos NaBu y ZnSO₄. Sin embargo, estos incrementos en la expresión no pudieron mantenerse durante más de 3 días.

El clon CHO pCI 2A5 1D5 resultó ser el que mejor respondió a la presencia de los mencionados aditivos. Con el fin de prolongar su producción en el tiempo, se realizaron experiencias de pulsos en condiciones que favorecen la producción, y descansos en condiciones que resulten favorables para el crecimiento y mantenimiento celular. La mejor *performance* se alcanzó manteniendo el cultivo durante 9 días, con una frecuencia de pulsos y descansos de 24 h. La composición final del medio optimizado fue medio A suplementado con SFB al 0,5% V/V, NaBu 2 mM y ZnSO₄ 50 μ M durante los pulsos, y medio A suplementado con SFB al 1% V/V durante los descansos. Así se logró un aumento de las productividades de rhIFN- β 1a de hasta 4, 5 y 7 veces ante el agregado de ZnSO₄, NaBu y ambos aditivos, respectivamente, sin alterar la calidad de la proteína.

En resumen, este trabajo de tesis permitió establecer un sistema de producción adecuado de rhIFN- β 1a, generando células recombinantes estables y seleccionando condiciones óptimas para su cultivo.

SUMMARY

Interferons comprise a conserved family of proteins with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory activities that keep the homeostasis and the host defenses.

There are two forms of rhIFN- β 1 commercially available: the glycosylated form expressed in CHO cells, named rhIFN- β 1a and the rhIFN- β 1b produced in *E. coli* as a non glycosylated protein. From the study of both forms, it has been demonstrated that the glycosidic portion of the molecule improves its stability, solubility and activity.

The rhIFN- β 1 is employed as a therapeutic agent in a wide variety of diseases, like multiple sclerosis and hepatitis.

In the present Thesis work titled: "*Development of a technology for the production of recombinant human interferon β in eukaryotic cells*" several strategies tending to produce glycosylated rhIFN- β 1a were carried out.

In the first place we obtained pure rhIFN- β 1b to be employed for the production of polyclonal and monoclonal antibodies, to be used in the development of immunochemicals assays.

We designed different types of ELISAs, and finally selected a competition ELISA that uses rabbit Igs and the MAAb 2C12. This immunoassay shows the capability for quantifying the rhIFN- β 1 present in complex samples with an adequate sensibility and specificity. It presents a linear range between 20 and 250 ng of rhIFN- β 1 per ml and a detection limit of 10 ng of rhIFN- β 1 per ml.

We also developed an easy and fast immunoassay, the immunodot, that became a very valuable tool for the rapid screening of producing cells. The linear range of this assay is between 10 and 310 ng of rhIFN- β 1 per ml.

For the determination of the biological activity in the supernatants, we employed WISH cells and VSV virus. With this system we could perform a bioassay that lasted only 24 hours, with a lineal range between 1.5 and 12.0 IU of rhIFN- β 1 per ml and a detection limit of 1.4 IU of rhIFN- β 1 per ml.

CHO.K1, CHO dhfr-, BHK.21, NS0 and HEK-293 cells were transfected by lipofection under optimized conditions, using the cationic lipids LipofectAMINE, LipofectAMINE Plus and LipofectAMINE 2000 for all of them, except for the last cell line, for which DOTAP was employed. Vectors with different characteristics previously obtained were used: pCI-IFN- β 1, pKG4-IFN- β 1, p91023-IFN- β 1, pcDNA-IFN- β 1 and pzc-IFN- β 1.

All recombinant cell lines mainly produced glycosylated forms of rhIFN- β 1a, but recombinant BHK.21 cell lines principally produced the non glycosylated form.

The gene coamplification of dhfr and the hIFN- β 1 genes in CHO p91023 cells increased up to six times the production of the recombinant protein, once a gradual selective pressure up to 500 nM MTX was performed. However, when quantities as high as the maximum concentration of the antibiotic tolerated by the cells (350 μ M MTX) were applied, clones more resistant to the antibiotic were selected, but with no enhanced productivity. Despite the inherent plasticity of the eukaryotic genomes and that the selective pressure exercised during the continuous culture might affect the stability of the transfected or integrated sequences, the obtained clones maintained their production levels for several months, indicating their stability.

Based on the preferential production of the glycosylated isoform and the high productivity, we selected clones derived from the CHO pCI-IFN- β 1 cell line, called CHO pCI 2A5 1D5, CHO pCI 2A6 1D7 and CHO pCI 2A6 1G5 to continue with the optimization of the culture conditions.

With the purpose of diminishing the production costs and, at the same time, facilitating the subsequent purification of the protein, those clones were adapted to grow in a medium with lower amounts of FCS.

At the same time, considering that gene expression in cell cultures is strongly dependent on culture conditions, the effect of the addition of different supplements to the medium was evaluated. It was found that the rhIFN- β 1a production increased by adding NaBu and ZnSO₄. Unfortunately, this enhancement could not be kept for more than three days.

The clone CHO pCI 2A5 1D5 resulted the one that reached the best response to the addition of NaBu and ZnSO₄. With the aim of extending the production of this clone in time, several experiences of pulse periods under conditions that favoured the production, and rest periods under the best conditions for growth and cell maintenance were performed. The best result was obtained when the culture was maintained during nine days, with a frequency of pulse and rest periods of twenty four hours. The final composition of the optimized medium was medium A supplemented with 0,5% V/V FCS, 2 mM NaBu and 50 μ M ZnSO₄ during the pulse periods and medium A supplemented with 1% V/V FCS, during the rest periods. In this way it was achieved a maximum increase in the rhIFN- β 1a production of four, five and seven times with the addition of ZnSO₄, NaBu and both reagents together, respectively, without altering the quality of the protein.

In summary, this Thesis work allowed the establishment of a rhIFN- β 1a production system, by generating stable recombinant cells and developing optimum conditions for its cultivation.