

ADAPTACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS CHO-K1 y HEK293 A MEDIOS LIBRES DE SUERO FETAL BOVINO. EVALUACIÓN EN ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN TRANSIENTE.

Lotterberger Julieta.

Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico del Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.

Director: Dr. Diego Fontana. Co-director: Dr. Claudio Prieto.

Área temática: Ciencias biológicas.

Palabras claves: Células animales, Medios de cultivos libres de suero, transfección transiente.

INTRODUCCIÓN

En la producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico obtenidas a partir de cultivos de células animales, la elección de medios de cultivo que resulten óptimos para el crecimiento de las células y que generen una elevada productividad, es un paso clave durante la optimización del bioproceso. Se sabe que existe una relación directa entre el medio de cultivo utilizado y la producción de las proteínas recombinantes (McGillicuddy y col, 2018). En particular los medios libres de suero fetal bovino (SFM, *Serum Free Media*) utilizados comúnmente para el cultivo de células en suspensión cuentan con muchas ventajas con respecto a los medios formulados con suero, entre las que se pueden mencionar la no utilización de compuestos de origen animal (y de potenciales contaminaciones), menor costo, menor variabilidad entre los lotes producidos y disminución de inconvenientes durante la etapa final de purificación (Van der Valk y col, 2010).

Por otra parte, la transfección transitoria es un método altamente extendido para obtener cantidades suficientes de una proteína recombinante de interés en un corto período de tiempo y, por lo tanto, su optimización para obtener elevadas concentraciones de producto es de gran importancia. La composición de los SFM tiene un efecto directo en la eficiencia del proceso de transfección, como así también de las productividades obtenidas (Baldi y col, 2007), (Gutiérrez-Granados y col, 2018).

OBJETIVOS

- 1) Adaptar cultivos de células sCHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) y sHEK293 (*Human Embryonic Kidney*) a medios SFM.
- 2) Caracterizar el crecimiento de las células en cada uno de los medios de cultivos adaptados.
- 3) Evaluar la utilización de dichos cultivos celulares para la expresión de proteínas de interés biotecnológico a través de la técnica de transfección transiente. Analizar la eficiencia de transfección de las células en cada medio de cultivo.

METODOLOGÍA

Adaptación de los cultivos de células sCHO-K1 y sHEK293:

En primera instancia, a partir de bancos celulares de trabajo de células CHO-K1 y HEK293 adaptadas previamente a los medios EXCELL302 (SAFC Biosciences) y EXCELL293 (SAFC Biosciences) respectivamente, se evaluó la adaptación a otros SFM comerciales, algunos de ellos conteniendo hidrolizados vegetales y otros químicamente definidos, libre de toda proteína animal. Los medios utilizados fueron: AmpliCHO CD Medium (Kerry), HEK CD Medium (Kerry) y BHK-21 Production Medium CD (Thermo).

Proyecto enmarcado en sistema de Formación extracurricular, título: "Adaptación y optimización de cultivos de células HEK293 y CHO-K1 a medios libre de suero y de proteínas animales. Su aplicación en la producción de proteínas de interés biotecnológico en sanidad animal". Director: Dr. Diego Fontana. RESOLUCIÓN: C.D.N°:674.

Se llevó a cabo el proceso de adaptación secuencial, partiendo de 100 % EXCELL302 y EXCELL293 y luego aumentando paulatinamente la proporción del nuevo medio de cultivo: 75 %- 25 %, 50 %- 50 %, 25 %- 75 %, hasta obtener cultivos adaptados al 100 % del nuevo medio. Se obtuvieron cultivos de CHO-K1 adaptados a AmpliCHO CD Medium, y BHK-21 Production Medium CD y cultivos de sHEK293 adaptados a los medios HEK CD Medium y BHK-21 Production Medium CD.

Caracterización de los cultivos obtenidos:

Una vez que se obtuvieron las células en cada uno de los medios de cultivos mencionados realizamos ensayos para evaluar su crecimiento en condiciones *batch*. Se llevaron a cabo curvas de crecimiento, evaluando la concentración celular y viabilidad de las células cada 24 h, durante 5 a 7 días. A partir de los datos obtenidos en las curvas de crecimiento se calcularon los parámetros cinéticos de crecimiento para sCHO-K1 y sHEK293 en cada condición.

Transfección transiente para producción de proteínas recombinantes:

Finalmente se realizaron las transfecciones transientes para la expresión de proteínas heterólogas en cada una de las condiciones y además se probaron distintos agentes de transfección para optimizar el proceso. Como agentes de transfección se usaron, por un lado, el polímero catiónico llamado polietilénimina (PEI) y por otro, un compuesto comercial basado en lípidos catiónicos denominado *Freestyle Max (Gibco)*. Se trabajó con el plásmido pLV-pLK-GFP, para expresión de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein, GFP*). La eficiencia de transfección de las células en los distintos medios de cultivos fue evaluada por citometría de flujo.

RESULTADOS y CONCLUSIONES

Se lograron adaptar las células sCHO-K1 a los medios BHK-21 Production Medium y AmpliCHO CD Medium alcanzando densidades celulares máximas de $2,5 \times 10^6$ cél/ml y $4,0 \times 10^6$ cél/ml en cultivos *batch*, respectivamente. Por otro lado, también obtuvimos cultivos de sHEK293 adaptados a los medios BHK-21 Production Medium y HEK CD Medium, los cuales llegaron a densidades celulares de $5,0 \times 10^6$ cél/ml en el primer caso, y de $6,5 \times 10^6$ cél/ml en el segundo.

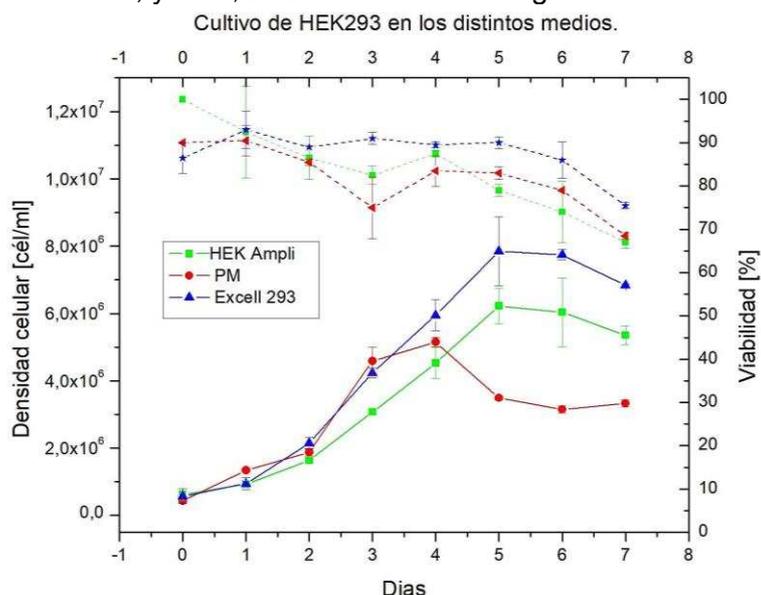


Gráfico 1. Curva de densidad y Viabilidad celular vs días, correspondiente a cultivo de células HEK293 en cada uno de los medios SFM estudiados.

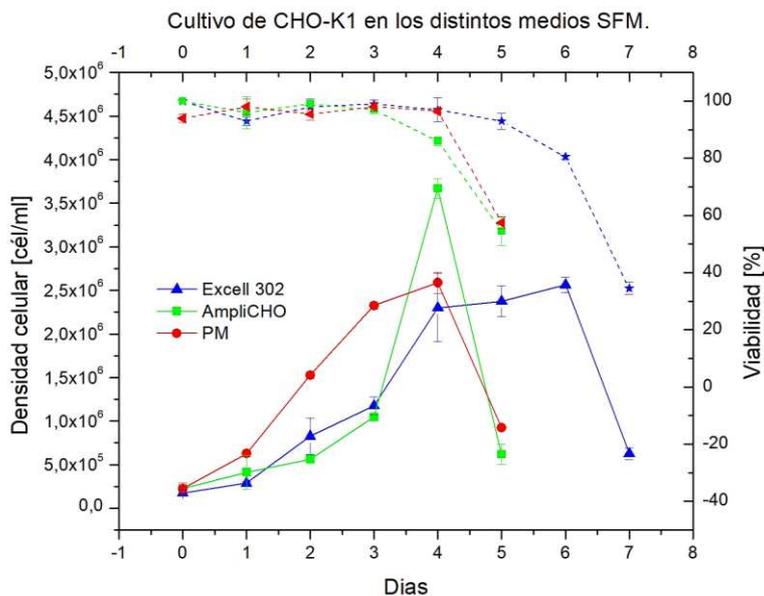


Gráfico 2. Curva de densidad y Viabilidad celular vs días, correspondiente a cultivo de células CHO-K1 en cada uno de los medios SFM estudiados.

Luego, en los ensayos de transfección obtuvimos un 5 % de células transfectadas utilizando los medios EXCELL, tanto para HEK293 como para CHO-K1, independientemente del agente de transfección. Por otro lado, el cultivo de sCHO-K1 en medio BHK-21 Production Medium CD presentó un 26 % de células positivas utilizando FSM como agente de transfección, demostrando una clara mejora en la eficiencia de transfección. Además, el cultivo de sHEK293 en medio HEK CD Medium presentó un porcentaje de células transfectadas del 36 % usando FSM y del 22 % con PEI como agente de transfección. Estos resultados preliminares demuestran que la composición de estos dos SFM genera un incremento significativo de la eficiencia de transfección en células CHO-K y HEK293, en comparación con los SFM previamente utilizados.

En conclusión, podemos decir que los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son muy alentadores brindando mucha información que será de gran utilidad para continuar trabajando en la optimización de los ensayos de transfección transitoria de células en suspensión.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Baldi, L.,** et al, 2007. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol Lett.*
- Gutiérrez-Granados, S.,** et al, 2018. Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Critical Reviews in Biotechnology.*
- McGillicuddy, N.,** et al, 2018. Examining the sources of variability in cell culture media used for biopharmaceutical production. *Biotechnol Lett.*
- Van der Valk, J.,** et al, 2010. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal-bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro, Elsevier.*