# BANCO DE CELULAS PRIMARIO (BCP): CARACTERIZACION Y PAPEL EN LA PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES.

Raúl Alberto Poutou Piñales, Eladio Amador Martínez, Maida Candelario Frontela.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, Ciudad de la Habana, Cuba.

Recibido en septiembre de 1993. Aprobado en enero de 1994.

Key words: Cell bank, recombinant DNA, biotechnology.

#### **SUMMARY**

This review presents the main points to consider to prepare a Master Cell Bank addressed to the production of recombinant proteins, which is the first step for assuring the consistence of these productions and to obtain a product with the optimal quality to satisfy the market demands. An example is given showing the stability studies of the Master Cell Bank for the production of recombinant surface antigen of hepatitis B virus.

#### RESUMEN

Esta revisión bibliográfica presenta los puntos más importantes a considerar para la confección de un Banco de Células Primario destinado a la producción de proteínas recombinantes, lo que constituye el primer paso para asegurar la consistencia de este tipo de producciones y la obtención de un producto con la calidad optima para satisfacer las necesidades del mercado. Se ejemplifica mostrando algunos resultados del estudio de estabilidad del Banco de Células Primario destinado a la producción del antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B.

# INTRODUCCION

Actualmente la Biotecnología y dentro de ésta, las novedosas técnicas de recombinación de genes, ocupan un lugar cimero en la elaboración de productos farmacéuticos. Esta metodología conocida como tecnología del ADN recombinante incluye la manipulación y ordenamiento de segmentos de ácidos nucleicos (genes), con el objetivo, entre otros de producir sustancias destinadas al diagnóstico, prevención y tratamiento de diferentes patologías que afectan a los seres vivos. Es importante señalar que en muchos casos la obtención de estas sustancias por vía natural se hace muy difícil en función de la fuente empleada para su extracción, pudiendo resultar costoso, arriesgado e insuficiente para los requerimientos mundiales. Como toda tecnología, por novedosa que pueda resultar, lleva implícito cierto nivel de riesgo (1). Uno de estos riesgos es la obtención de un producto que difiera del obtenido por vía natural, afectando parámetros como la identidad, potencia o la actividad biológica, la seguridad y la consistencia de la producción.

La identidad y seguridad de los productos obtenidos por la vía del ADN recombinante, así como la consistencia de este tipo de producciones, ha sido objeto de atención de diferentes organizaciones nacionales e internacionales como, la Parenteral Drug Association (PDA), el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) y la World Health Organization (WHO) entre otros, siendo para nosotros también de particular interés. Este tema es motivo de la presente revisión, a la cual se ha sumado la experiencia de algunos años en la producción de moléculas recombinantes destinadas al uso terapéutico.

# BANCO DE CELULAS PRIMARIO

Es de todos conocido que los sistemas diseñados con el propósito de fabricar moléculas recombinantes pueden resultar inestables, lo cual dependerá de cuan extraña sea la nueva molécula para el hospedero.

Con el fin de lograr la estabilidad de estas producciones, es que se elaboran los Bancos de Células Primarios (BCP), que constituyen además una vía para conocer si las alteraciones generadas por la interacción del hospedero con la construcción genética atentan contra la obtención del producto adecuado.

El BCP, designado también lote semilla, consiste en un conjunto de alícuotas homogéneas de un cultivo microbiológicamente puro que se almacena bajo condiciones que garanticen sus estabilidad genética. A partir del BCP es que se prepara el Banco de Células de Trabajo (BCT).

La construcción y caracterización del BCP (2,3) debe ser el primer paso en la producción de fármacos por la vía del ADN recombinante. El conocimiento detallado del mismo no se limita al banco como tal, sino que abarca desde la verificación de la construcción genética hasta la identificación del hospedero empleado para la expresión del producto.

Cualquier compañía biotecnológica que se respete confiere gran importancia al BCP, considerando que es el elemento promotor de la estabilidad de una producción.

#### CONSTRUCCION GENETICA

La construcción genética consiste en la introducción de una secuencia nucleotídica que codifique para la síntesis de un producto determinado en otra secuencia mayor (vector de expresión), formada por otros genes reguladores cuyo producto de síntesis facilita la expresión del gen clonado.

La construcción genética debe ser verificada a fin de demostrar la integridad del vector de expresión, lo cual debe hacerse antes y después de confeccionado el BCP. En ambos casos se requiere de un análisis de restricción, estos resultados se comparan contra un patrón para conocer si ha ocurrido aparición o pérdida de sitios de corte. De manera similar debe hacerse con la secuencia nucleotídica del gen clonado (4), puesto que una vez introducido el vector en el hospedero queda expuesto a modificaciones producto de su interacción con la célula. Entiéndase por modificaciones, las mutaciones (deleciones, inserciones, sustituciones) que pueden afectar la secuencia nucleotídica del gen, la expresión y/o la estructura primaria de la proteína. Es importante no olvidar que el código genético es degenerado y pueden ocurrir alteraciones que impliquen cambios en la secuencia nucleotídica del gen y no en la secuencia aminoacídica de la proteína, así como mutaciones en zonas no comprometidas con el centro activo de la proteína (5,6), pudiendo no afectar su actividad biológica. Estos análisis son efectivos en el caso de construcciones genéticas replicativas, a diferencia de las construcciones integrativas a las cuales después de confeccionado el BCP es muy difícil realizarle la secuenciación del gen y el análisis de restricción del vector. Para estos casos se recomienda evidenciar la presencia del gen en el cromosoma del hospedero a través de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), así como la verificación del patrón de integración mediante la técnica del Southern-Blot (ver Caracterización del BCP).

# HOSPEDEROS

Son todas aquellas células de bacterias, levaduras u organismos superiores que sirven de receptores de la construcción genética. Demostrar la identidad del hospedero es de vital importancia, pues aún cuando la proteína clonada sea sintetizada de manera correcta, queda a merced de sufrir una serie de modificaciones que son controladas por la célula, tales como, corte de secuencias líderes inmediatamente después de la síntesis, glicosilación (7), acetilación, etc. Dichas modificaciones pueden además generar alteraciones que atenten contra la integridad de la proteína, pudiendo ocurrir degradación intracelular de la misma, la síntesis de un producto tóxico para la célula hospedero, la obtención de una sustancia capaz de producir reacciones secundarias inesperadas, además de la pérdida de la actividad biológica.

Demostrar la pureza e integridad del hospedero significa determinar la presencia de agentes adventicios (micoplasmas, hongos, bacterias contaminantes, etc), verificar el cariotipo, los marcadores genéticos, el fenotipo, así como el tiempo de duplicación y la velocidad específica de crecimiento. Es decir verificar todos aquellos parámetros que permiten asegurar la identidad del hospedero.

Los hospederos más usados para estos fines han sido las bacterias, ej: *Escherichia coli*, algunas levaduras y células de organismos superiores (8).

## TRANSFORMACION DEL HOSPEDERO

La confección de un BCP comienza con la transformación o la introducción de la información genética en el hospedero. Para este efecto el método seleccionado debe ser aquel que reporte mayor número de transformantes (9) para cada sistema en específico. En la actualidad se conocen varios métodos con los que se han obtenido buenos resultados: la transformación convencional, la electroporación, la transfección y la microinyección. La posibilidad de obtener gran número de transformantes hos obliga a contar con un sistema de selección basado generalmente en el conocimiento de los marcadores genotípicos del vector de expresión y del hospedero.

Una vez obtenido los clones positivos, deben seleccionarse aquellos que expresen el mayor porcentaje del la proteína clonada. Un cultivo en fase logarítmica y homogéneo del clon seleccionado (4) se almacena a bajas temperaturas en viales de cierre herméticos conteniendo medio de cultivo fresco, así quedan confeccionados los BCP. Estas unidades deben ser divididas al menos en dos grupos numéricamente iguales y almacenadas en lugares diferentes, bajo condiciones que aseguren su

estabilidad y bajo la custodia y control de las instancias de Control y Aseguramiento de la Calidad de cada institución productora.

#### CARACTERIZACION DEL BCP

La caracterización del BCP debe hacerse con un número de unidades estadísticamente representativas. A continuación veremos alguno de los análisis más importantes con que se logra caracterizar un BCP, el análisis que se emplea varía dependiendo del tipo de sistema que se trate.

-Pureza microbiana: tiene como objetivo evidenciar que el BCP está libre de agentes adventicios.

-Viabilidad microbiana: permite conocer la concentración de células vivas.

-Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación: ambos parámetros cinéticos son índices del crecimiento microbiano y conocerios nos permite detectar anomalías durante el proceso productivo.

-Análisis de restricción: permite verificar la construcción genética después de haber interactuado con el medio interno del hospedero. Consiste en el corte de la molécula de ADN con enzimas de las cuales se conoce el número de sitios por donde debe cortar y el número de bandas que originan al visualizar el ADN a través de una electroforesis en gel de agarosa, para este análisis se requiere extraer el vector de expresión de la célula.

-Secuencia nucleotídica: la técnica anterior y esta muestran si ha existido algún tipo de mutación en el vector, producto de su interacción con el hospedero.

Para obtener la secuencia en el caso de construcciones integrativas (10), (aquella donde el vector de expresión reconoce una secuencia en el genoma del hospedero y se inserta en ella) se puede purificar el ARN mensajero que codifica para la proteína en cuestión y clonarlo para así verificar la secuencia codificante antecesora. En este caso es posible la aparición de modificaciones producto de la manipulación y no de la interacción de la construcción con el hospedero original.

-Análisis de los patrones de integración: se aplica en aquellas construcciones de tipo integradas, donde se hace necesario determinar si ocurrió la integración en los sitios correctos. Para ello se requiere purificar ADN de 10 transformantes como mínimo, de un control negativo (célula hospedero sin transformar) y del ADN plasmídico que se insertó, posteriormente cada ADN es enfrentado a una sonda marcada radioactivamente, el número de sitios de integración queda marcado en forma de manchas sobre una lámina radiográfica después de realizar la técnica del Southern-Blot.

-Demostración de la presencia del gen en el cromosoma: se logra localizando el gen con una sonda complementaria la cual es amplificada a través de la técnica del PCR.

-Estabilidad plasmídica: permite conocer qué porcentaje de las células presentes en el cultivo son capaces de mantener la nueva información genética después de cierto número de generaciones. Este análisis se basa en el uso de los marcadores de selección.

-Número de copias plasmídicas: se determina en el caso de construcciones replicativas donde el ADN plasmídico coexiste con el ADN cromosomal. Los plásmidos o vectores de expresión en general se construyen de forma tal que se incremente la eficiencia en la iniciación de la transcripción (11,12,13), lo cual se logra con el uso de promotores fuertes y sitios eficientes para la unión a los ribosomas. Aún con la mejor combinación promotor, sitio de unión a los ribosomas y hospedero, la cantidad de la proteína expresada se verá incrementada en la medida que aumente el número de copias plasmídicas.

-Reconocimiento inmunológico: se realiza mediante técnicas como el Western-Blot (2) donde la proteína expresada es enfrentada a un anticuerpo específico, que puede estar conjugado a una enzima, a un isótopo radiactivo u oro coloidal. La aparición de manchas es una evidencia de la identidad inmunológica de la proteína.

-Actividad biológica o potencia del producto activo: ambas son la evidencia final para proceder a la liberación del BCP, la primera debe ser demostrada mediante el enfrentamiento de la proteína al sustrato o a la célula blanco. Para la potencia (vacunas) deben inmunizarse animales a los cuales se les mide el incremento del título de anticuerpos específicos en el tiempo.

#### DOCUMENTACION DEL BCP

Una buena documentación constituye una parte bien importante en el sistema de garantía de la calidad de cualquier empresa biotecnológica (14).

El documento acreditativo o expediente del BCP debe estar redactado de manera tal que elimine cualquier tipo de ambiguedad, con una presentación clara y ordenada, facilitando así la funcionalidad del mismo.

Los documentos que forman parte del expediente deben ser los siguientes:

1- Historia del clonaje y método de transformación del hospedero.

- 2- Planillas de liberación de los componentes del banco, acompañada de los resultados de cada análisis practicado así como el código del Procedimiento Patrón de Operación empleado para cada técnica.
- 3- Certificado de liberación del banco, donde aparezcan los resultados de los análisis, en el cual debe señalarse el nombre y la firma del investigador que estuvo a cargo su confección y del funcionario de la instancia de calidad correspondiente responsabilizado con su liberación, almacenamiento y custodia.

# ESTUDIO DE ESTABILIDAD A TIEMPO REAL DEL BCP

Inmediatamente después de la caracterización del BCP deben comenzarse los estudios de estabilidad a tiempo real (15). Estos estudios deben hacerse de manera sistemática, lo que permitirá conocer qué parámetros y en qué medida son afectados por el tiempo bajo las condiciones de almacenamiento. Consideramos importante señalar que la estabilidad de estos bancos depende en gran medida de cuan estable es la interacción entre el vector de expresión y el hospedero, y es afectada por variaciones en las condiciones de almacenamiento.

## LIBERACION DEL BCP

La liberación del banco debe hacerse una vez que todos los resultados y documentos estén debidamente aprobados. El nuevo banco liberado es la fuente de preparación de los Bancos de Células de Trabajo (BCT). Para el caso de transformaciones complejas como aquellas en que se emplean plásmidos integrativos, o células de organismos superiores como hospederos, pueden generarse a partir de este primer banco otros BCP similares.

Siguiendo la metodología descrita varios BCP han sido preparados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología en Ciudad de la Habana con el objetivo de producir proteínas recombinantes tales como el factor de crecimiento epidérmico, el interferón alfa 2b , la estreptoquinasa y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Los resultados del estudio de la estabilidad a tiempo real del BCP destinado a la producción del antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B, con el cual se elabora la vacuna recombinante contra la hepatitis B, se muestran en la tabla 1. Este banco fue preparado en el año 1989 y ha sido verificado durante cuatro años de forma consecutiva. Los cambios que se observan en la viabilidad no se consideran importantes porque los valores se mantienen dentro del mismo orden logarítmico.

Tabla 1
Estudios de estabilidad del BCP para la producción del antígeno de superficie recombinante del virus de la Hepatitis B

	Años							
Parámetros	1989	1990	1991	1992	1993			
Viabilidad células/mL	9.9x10 <sup>6</sup>	7.8x106	5.1x10 <sup>6</sup>	3.6x10 <sup>6</sup>	1.3x10 <sup>6</sup>			
Secuencia Nucleotídica	Bien	Bien	Bien	Bien	Bien			
Patrón de Integración	Bien	Bien	Bien	Bien	Bien			
Pureza Microbiana	Pura	Pura	Pura	Pura	Pura			
Conservación del marcador de selección-	100%	100%	100%	100%	100%			

#### CONCLUSIONES

Un BCP estable por varios años constituye una garantía para cualquier proceso productivo en la industria biotecnológica, asegurando de este modo la consistencia del producto final, la disminución del costo de producción, el prestigio y la credibilidad en el productor.

#### REFERENCIAS

- 1- WINKLER, K.C. (1988). Safety and Risk of Handling Organisms with Recombinant DNA. Chimicaoggi, Part I 19 (3):19-23.
- 2- OFFICE OF BIOLOGICAL RESEARCH AND REVIEW CENTER FOR DRUGS AND BIOLOGICS (1985). Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant-DNA Technology. Code Federal Regulations 21: April 10.
- 3- AMADOR, E.; R.A. POUTOU; M. CANDELARIO; M. QUINTANA (1993). Banco de Células (BC): Primer Paso en la Tecnología de Fármacos Recombinantes. Trabajo presentado en el V Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farnacéuticas, celebrado en Ciudad de La Habana, Cuba. del 12 al 16 de Abril.
- 4- POUTOU, R.A. (1992). Banco de Células Destinados a la Producción de Proteínas Recombinantes. Conferencia impartida en el XX Congreso Centroamericano y del Caribe de Ciencias Farmacéuticas, celebrado en Ciudad Guatemala, del 29 de Noviembre al 3 de Diciembre.
- 5- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD/ ORGANIZACION PANAMERICANA DE SALUD, ORGANIZACION DE ESTADOS AMERICANOS, OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS, INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA (1988). Guias para el uso y la Seguridad de las Técnicas de Ingeniería Genética o Tecnología del ADN Recombinante. ISSN0534 - 5391 DRE (EUA/88/001) Washington, DC, 11CA, pp.151.
- 6- CINZA, A.M.; M. QUINTANA; J. LOMBARDERO; R.A. POUTOU; E. PEREZ; L.C. PEREZ; C.M. MELLA; V. BESADA; G. PADRON; L. CASTELLANOS; R. ESTRADA (1991). Establecimiento de un Cultivo Discontinuo para la

El control del gen que codifica para la síntesis del IFN  $\alpha$  2b se realizó secuenciando dicho gen (12).

Para comprobar la estabilidad plasmídica del pAG 11-3 dentro del huésped se procedió a realizar siembras de una dilución de  $10^{-6}$  de un cultivo de células transformadas con más de 80 generaciones, sobre placas de medio LB (13) y LB + ampicillina (50  $\mu$ g/mL), las cuales fueron incubadas a 37°C durante 12 h y contadas las colonias al término de este tiempo.

La estabilidad plasmídica se determinó con la siguiente formula:

$$\%Estab. = \frac{\#Col.LB + Amp.}{\#Col.LB}x100$$

Donde: Col.LB + Amp significa colonias crecidas en medio de cultivo LB más ampicillina y ColLB representaría el número de colonias crecidas en el mismo medio de cultivo sin el antibiótico.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Los B.C.P. utilizados en la producción de IFN  $\alpha$  2b hum rec. fueron controlados, atendiendo a 5 parámetros (tabla 2).

Los valores que se muestran en las tablas 2 y 3 para los B.C.P. preparados en 1987, 1988, 1989, 1990 y 1991 fueron determinados en 1992 y no existen diferencias significativas entre estos y los obtenidos de manera inmediata a la preparación de cada banco o tiempo cero (datos no mostrados). Cada determinación es el resultado de una muestra representativa de cada banco, la cual se tomó siguiendo el criterio estadístico:

$$N=0.4\sqrt{n}$$

Donde:

N es el número de viales a tomar para el ensayo. n es el número de viales que conforma el banco en el instante de tomar la muestra.

Tabla 2
Resultados de los controles realizados a los B.C.P.

Parámetros	1987	1988	1989	1990	1991
Viabilidad (x 10 <sup>8</sup> cell/mL)	1.2	2.4	2.2	4.5	4.1
Estabilidad plasmídica (%)	99	99	99	100	100
Proteínas totales (mg/mL)	3.02	2.87	2.89	2.93	2.91
Concentración IFN por ELISA (mg/mL)	29.9	28.5	36.5	34.4	33.8
% Expresión	0.99	1.0	1.26	1.17	1.16
Actividad biológica (x 10 <sup>7</sup> UI/mL)	5.79	5.10	8.24	7.1	8.4

Tabla 3

Comparación de algunos parámetros entre la cepa transformada
y la cepa sin transformar

Parámetros	1987	1988	1989	1990	1991	LE 392
Velocidad específica (h <sup>-1</sup> )	1.17	1.06	1.08	1.03	1.11	1.14
Ticmpo de duplicación (min)	35.4	39.2	38.5	40.0	36.1	37.0
Concentración de proteína (mg/mL)	3.02	2.87	2.89	2.93	2.91	2.86

La viabilidad de los microorganismos mantenidos en glicerol al 20% a -70°C fluctúa entre 1.2 y 4.5 x 10<sup>8</sup> células por mililitro (tabla 2), lo cual se considera estable, pues todos los valores se encuentran en el mismo orden.

El chequeo auxotrófico corrobora el estado fisiológico del microorganismo huésped, permitiendo identificar la cepa (14).

La caracterización del vector de expresión mediante el mapeo de restricción demuestra que no hay aparición o pérdida de sitios de cortes según el nivel de detección del método y que el patrón de restricción teórico esperado coincide con el patrón de bandas obtenido en la electroforesis (figura 1), lo que constituye un indicio de integridad del plásmido (1). En cuanto a la secuenciación del gen del IFN α 2b hum-rec. los resultados para los cinco B.C.P. estudiados coinciden, correspondiéndose las secuencias obtenidas con la teórica reportada, esto da un alto grado de confianza y fiabilidad al B.C.P., pues se comprueba que a nivel genético no existen mutaciones (13), ya que de existir alguna de talla considerable, este método la detectaría. La estabilidad plasmídica se mantiene por más de 80 generaciones en un 99%, valor que asegura que la estabilidad de cada B.C.P es elevada (1). El análisis realizado comparando los parámetros cinéticos de las fermentaciones de los diferentes B.C.P con respecto a la cepa sin transformar (tabla 3) nos informa que la presencia de un ADN foráneo no implica mayor consumo de energía para el microorganismo huésped, pues los valores de velocidad específica y tiempo de duplicación de la cepa sin transformar y de la transformada (B.C.P) están muy cercanos (14) (tabla 3).

El control de la viabilidad de cada B.C.P demuestra que el número de microorganismos transformados vivos