ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ESTABILIDAD DE LOS BANCOS DE CELULAS PRIMARIOS PARA LA PRODUCCION DE INTERFERON ALFA RECOMBINANTE.

Eladio Amador, Marlene Almazán, Marisel Quintana, Raúl A. Poutou y Maida Candelario.

Subdirección de Calidad. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado 6162, La Habana 6, C.P.10600, Cuba

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

Key words: interferon, Master Cell Bank, stability, recombinant

SUMMARY

A Master Cell Bank (M.C.B) stable for several years constitutes a guarantee for any productive process in the biotechnological industry, assuring in this way the consistency of the final product and a decrease of the production cost. To fulfill this objective, we must have a systematic control over each M.C.B. (controls that assure the genetic stability, fidelity of the information, the product purity and its biological activity)(1).

This work presents the results obtained in a study about the stability of the M.C.B. used in the production of recombinant human interferon α 2b (IFN α 2b hum-rec.) pointing out that they have been stable during 1 to 5 years (1987-1991). Moreover, we compare two kinetic parameters (specific growth rate and duplication time) between the transformed host cell and the host cell without transformation.

RESUMEN

Un Banco de Células Primario (B.C.P.) estable por varios años constituye una garantía para cualquier proceso productivo en la industria biotecnológica, asegurando de este modo la consistencia del producto final y una disminución del costo de producción. Para lograr este objetivo hay que tener un control sistemático sobre cada B.C.P. (Controles que aseguren la estabilidad genética, la fidelidad de la información, la pureza del producto y la actividad biológica)(1).

Este trabajo presenta los resultados obtenidos en un estudio sobre la estabilidad de los B.C.P. utilizados en la producción del interferón α 2b humano reccombinante (IFN α 2b hum-rec.), estableciendo que los mismos se han mantenido estables durante un período de tiempo que oscila entre 1 y 5 años (1987-1991). Además se hace una comparación de dos parámetros cinéticos (velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación) de dichos bancos con respecto a la cepa sin transformar.

INTRODUCCION

La ingeniería genética conjuntamente con la biotecnología ha hecho posible no sólo la identificación de genes que codifican para sustancias biológicamente activas, sino que también ha logrado transferir esta información contenida en el ADN hacia un microorganismo mucho más simple, fácil de controlar, y capaz de expresar dicha sustancia en cantidades superiores a las obtenidas por vía natural. Los sistemas diseñados para este fin están sujetos a alteraciones, que ocasionan inestabilidad al sistema provocando grandes pérdidas (1). Con el objetivo de evitar este fenómeno se debe implementar un sistema de B.C.P. definido como una cantidad de células de composición uniforme, que cumple con los requerimientos necesarios para la producción de determinada proteína (2) Para el establecimiento de un B.C.P. se deben establecer controles que aseguren la estabilidad genética, fidelidad de la información, pureza del producto y actividad biológica.

Estos controles abarcan la no alteración del gen, integridad del vector de transformación y comportamiento de éste en el hospedero, el análisis del sistema hospedero, los niveles de expresión de la proteína de interés y el control de su función biológica (3).

Un B.C.P. que se comporte establemente constituye una garantía para el proceso productivo de cualquier compañía biotecnológica, asegurando de este modo la consistencia del producto final.

Este trabajo presenta el establecimiento y la estabilidad de los BCP utilizados en la producción del IFN α 2b hum-rec. por 5 años consecutivos (1987-1991).

MATERIALES Y METODOS

El vector de expresión del IFN α 2b hum-rec es un plásmido derivado, del pBR322 portando el gen de resistencia a la ampicilina y el gen del IFN α 2b hum-rec, y fue construído en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Sistema hospedero

La transformación se realizó según Hanahan (4), en una E.coli K-12, cepa LE 392, cuya auxotrofía es Gal$^-$, Lac$^-$, Met$^-$ y Trp$^-$. Para tal objetivo se preparó un juego de placas con medio mínimo M9 (5) las cuales fueron suplementadas con una fuente de carbono y con aminoácidos. La auxotrofía a la lactosa se comprobó además por crecimiento en medio Mac Conkey (6) (tabla 1).

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

Tabla 1
Medios de cultivo empleados en el chequeo de auxotrofía de la cepa hospedera

Medios de cultivo utilizado	Crecimiento
M9 + Lactosa 4% + trp +met	no
M9 + Galactosa 2% + trp + met	no
M9 + Glucosa 4% + trp + met	si
M9 + Glucosa 4% + trp	no
M9 + Glucosa 4% + met	no
Mac Conkey	Colonias blancas

La pureza microbiana de cada B.C.P. se chequeó por siembra en placas triptona-soya-agar 37 μg/L (Amersham, U.K.), incubadas a 28 y 37°C durante 72 h. La viabilidad se determinó por el conteo directo de las colonias crecidas provenientes de una dilución 10^{-6}.

La cuantificación de las proteínas totales se realizó según Lowry (7).

Los valores correspondientes a la concentración de IFN α 2b hum rec. se determinaron por medio de un ELISA (8).

Para el estudio de la estabilidad del B.C.P. del IFN α 2b hum rec. se utilizaron los B.C.P. correspondientes a los años 1987, 1988, 1989, 1990 y 1991.

Se realizaron tres fermentaciones por cada B.C.P. y tres fermentaciones de la cepa hospedero sin transformar (Fermentadores B.E. Marubishi, volumen de la fermentación 1.5 L, aereación 1.5 vvm, temperatura 37°C, pH 7, durante 24 h). De cada proceso fermentativo se calcularon la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) y el tiempo de duplicación (minutos), y se determinó la concentración de proteínas totales por Lowry (7).

Porcentaje de expresión del IFN α 2b

Se calculó a partir de la relación IFN α 2b hum-rec. (ELISA)/proteínas totales (Lowry).

Actividad biológica del IFN α 2b

La actividad antiviral del IFN α 2b se determinó mediante la técnica de inhibición del efecto citopatogénico del virus Mengo en células Hep-2 de tumor laríngeo humano, comparándose con un estándar internacional de interferón (9).

Control del vector de transformación

Para comprobar la integridad del vector de expresión pAG 11-3 se procedió a realizar un mapeo plasmídico con endonucleasas de restricción (CIGB) teniendo en cuenta un previo análisis teórico del patrón de bandeo de cada digestión enzimática (figura 1). Para este estudio se purificó el ADN plasmídico (10) y se prepararon las siguientes digestiones (11) EcoRI, PvuI, HindIII, PstI, y BglII. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: ADN Lambda digerido con HindIII y ADN pBR322 digerido con AluI.

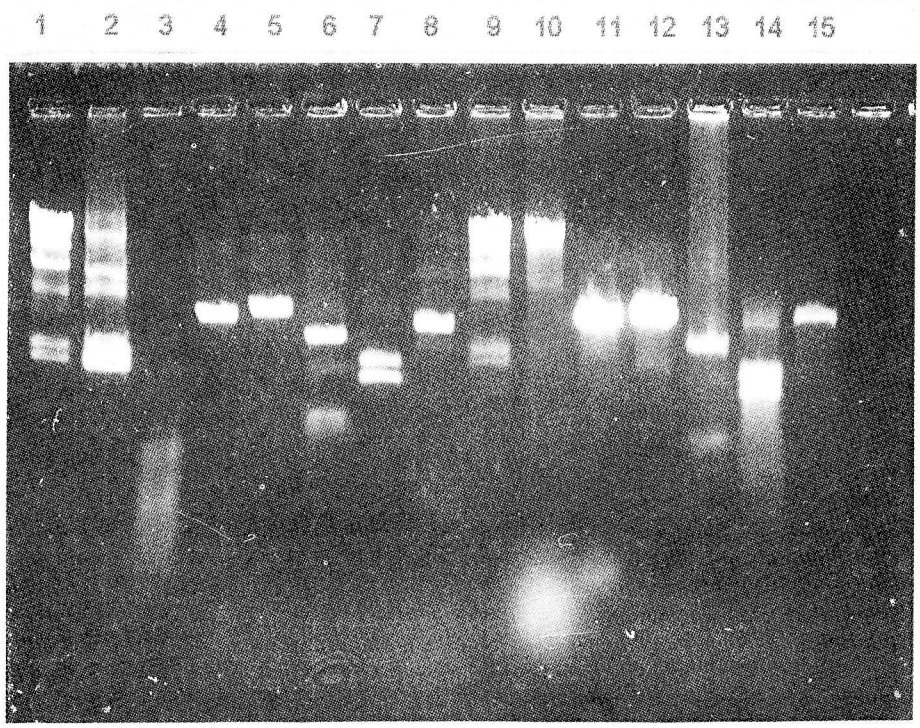

Fig 1: Chequeo de restricción del pAG11-3, vector de expresión que codifica para la síntesis del IFN α 2b hum rec 1 y 9 Lambda HindIII; 2- pAG11-3 nativo; 3-pBR322 AluI; 4 y 11- pAG11-3 BglII; 5 y 12- pAG11-3 EcoRI; 6 y 13- pAG11-3 HindIII; 7 y 14- pAG11-3 Pst I; 8 y 15- pAG11-3 PvuI. Las enzimas EcoRI y PvuI poseen un solo sitio de corte, linealizando el plásmido y dando lugar a una banda de 3.5 Kb. La enzima HindIII tiene dos sitios de corte generando dos bandas, una de 2.5 Kb y otra de 1 Kb. La enzima PstI corta en dos sitios generando dos bandas de 1.9 y 1.6 Kb respectivamente. La enzima BglII tiene dos sitios de corte y da lugar a la formación de dos bandas, una de 3.2 Kb y otra de 0.26 Kb.

El control del gen que codifica para la síntesis del IFN α 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 μg/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 fórmula:

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

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 α 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 10^8 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 10^7 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^{-1})	1.17	1.06	1.08	1.03	1.11	1.14
Tiempo 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 10^8 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

se ha mantenido de un año a otro, mostrando así que las condiciones de almacenamiento garantizan la estabilidad del banco. Además de demostrar que el procedimiento de preparación de los B.C.P está bajo control, ya que los parámetros medidos de un banco a otro oscilan en un rango estrecho de valores.

La concentración de IFN α 2b hum-rec. detectada por el ELISA se comporta similarmente, sobre todo si tenemos en cuenta que dicho método presenta un coeficiente de variación inter-ensayo de 10%.

El por ciento de expresión del IFN α 2b hum-rec. oscila entre 0.99 y 1.26% (coeficiente de variación 10.49%), lo que puede deberse al proceso fermentativo o a las técnicas analíticas utilizadas (figura 2).

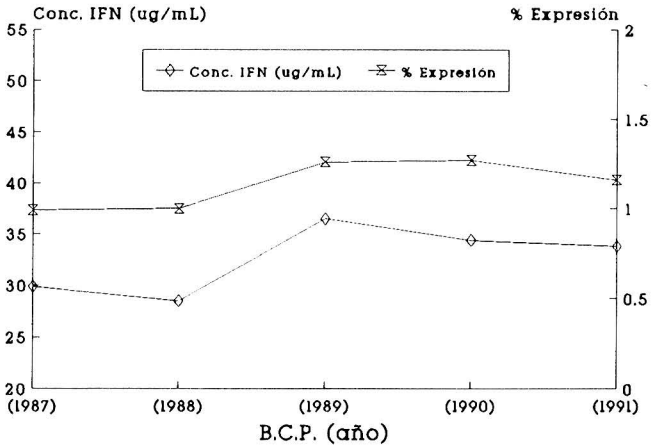

Fig. 2. Comportamiento de la concentración de IFN determinado por ELISA (μg/mL) y % de expresión de cada B.C.P.

CONCLUSIONES

El análisis global de todos los estudios realizados demuestra que los B.C.P utilizados para el proceso de producción del IFN α 2b hum-rec. tienen una estabilidad en tiempo real de al menos 5 años, conservados en las condiciones establecidas, y que existe consistencia en cuanto a su preparación.

REFERENCIAS

1- P.M.A. (1991). Pharmaceutical Technology **15(2)**:34-40.

2- COMMONWEALTH (1986). Guideline for manufacture and quality control of therapeutic goods produced by recombinant DNA technology. Australian Bicentennial Sponsor.

3- W.H.O. (1988). Requirements for Biological Substances No 41, Technical Report Series No 771.

4- HANAHAN, D (1983). J.Mol.Biol. **166**:577-585.

5- MILLER, J. H. (1972). Experiments in Molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 431.

6- BENCHMARLS (1990). BioTechniques, **8(5)**:1082

7- LOWRY, O.H.; N.J. ROSEMBROUGH; A.L. FARR y R.J. RANDAL (1951). J.Biol.Chem. **193**:265-275.

8- CRUZ, S. y C. DUARTE (1990). Biotecnología Aplicada **7(2)**:132-141.

9- BARCELONA, S. (1983). Determinación de la actividad de interferón. Memorias del I Seminario Cubano sobre Interferón, La Habana, 47-51.

10- PROMEGA (1991). Protocols and Applications Guide 40-41

11- MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH and J. SAMBROOK (1982). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

12- SANGER, F. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463.

13- LURIA, S.E. y J.W. BURROUS (1957). Journal of Bacteriology **471**:74.

14- BURNT, D. (1989). Sym. 85th Amer. Soc. for Microbiol. Mach3.