



CARACTERIZACIÓN DE LA LINEA CELULAR CHO DG44 PTA 3356 Y AMPLIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL PRODUCIDO

*Ma. Fernanda Sánchez, **Vanessa Hernández, *J. Antonio Serrato. (*)Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México D.F., CP. 14080. (**) Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Mor. CP. 62250. Correo electrónico: fersg91@gmail.com, serratoiner@gmail.com

Palabras clave: Células CHO, cultivo celular, anticuerpo monoclonal.

Introducción. Se estima que para el año 2015 las ventas de proteínas recombinantes de uso terapéutico se encuentren cerca de los \$150,000 millones de dólares siendo los Anticuerpos Monoclonales (AcM) los más solicitados⁽¹⁾. Con el fin de cubrir la demanda de estos productos se han desarrollado diferentes sistemas de amplificación génica para optimizar la expresión de proteínas recombinantes de entre los cuales el sistema Dehidrofolato Reductasa – Metotrexato (DHFR-MTX) ha sido el más utilizado⁽²⁾. Dicho sistema se basa en la co-expresión y amplificación del gen codificante para la proteína de interés junto con el gen DHFR indispensable en la síntesis de ácidos nucleicos. La presión de selección con MTX (fármaco inhibidor de la enzima DHFR) promueve, como un mecanismo de resistencia al fármaco, el aumento en el número de copias de ambos genes⁽³⁾ lo que se traduce en un aumento en la expresión de proteína.

En el presente trabajo se determinó el efecto de la presión de selección y amplificación con MTX sobre el crecimiento y metabolismo de la línea celular CHO DG44 PTA 3356 así como en la expresión y glicosilación del AcM humanizado producido.

Metodología. Se realizó la caracterización cinética del crecimiento y metabolismo de la línea celular CHO DG44 PTA 3356 en medio químicamente definido (CD Opti CHO) mediante cultivos en frascos spinners a 37°C, 5% CO₂ y 120 rpm, a concentraciones de MTX en un rango de 100 a 3200 nM.

El crecimiento y viabilidad celular se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer y tinción con el colorante azul de Tripiano. Se determinaron las velocidades de consumo y producción de metabolitos (glucosa, lactato y glutamina) mediante la medición de la concentración de metabolitos en un multianalizador bioquímico YSI 2700 y 2900.

La concentración de AcM producido se determinó mediante inmunoensayo (ELISA). El AcM de los sobrenadantes de los cultivos se purificó por cromatografía de afinidad con proteína G. La pureza y el perfil de N-glicosilación del AcM se realizó mediante gel desnaturante SDS-PAGE y cromatografía líquida en fase normal respectivamente.

Resultados. A lo largo del esquema de exposición a MTX se determinó una disminución gradual en la velocidad específica de crecimiento y en las velocidades de consumo y producción de glucosa y lactato

respectivamente. Se determinó un incremento en la concentración de AcM recombinante producido por la línea celular (Véase Fig1).

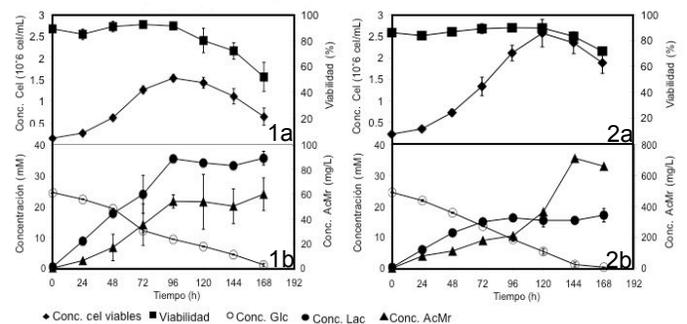


Fig. 1. Comparación de cinéticas de crecimiento, metabolismo y producción de AcM recombinante de la línea celular CHO DG44 control (1a, 1b) y a 1600 nM de MTX (2a, 2b).

En la Fig 2 se muestra el perfil de peso molecular del AcM purificado por cromatografía de afinidad. Se observa que presentan el tamaño característico de las cadenas ligera y pesada de una IgG humana. El AcM recombinante presentó también un perfil de N-glicosilación comparable al humano.

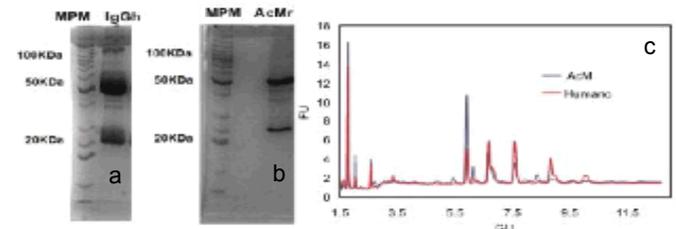


Fig. 2. SDS-PAGE y perfil de N-glicosilación de AcM humanizado recombinante e IgG humana. Bandas correspondientes a cadena ligera y pesada de IgG humana (a), AcMr (b). Perfil de N-glicosilación del AcMr (azul) e IgG humana (rojo) (c).

Conclusiones. Se determinó un incremento de casi 12 veces la concentración máxima de AcM producido con un estímulo de 1600 nM MTX. Se determinó una disminución en las velocidades de crecimiento y de consumo y producción de metabolitos.

Agradecimiento. Al proyecto CONACyT CB-2010-155653. Al grupo de trabajo de los Doctores Tonatiuh Ramírez y Laura Palomares del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología UNAM.

Bibliografía.

1. Bandaranayake, A., Almo, S. (2013). *FEBS LETTERS*. vol(588):253-260
2. Omasa, T. (2002). *JBB*. Vol(94): 600-605
3. Cacciatore J., Chasin L., Leonard, E. (2010). *BA*. Vol. (28): 673-681