



## CARACTERIZACIÓN DE BANCOS CELULARES EUKARIOTES PRODUCTORES DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Néstor Octavio Pérez<sup>1</sup>, Margarita Campos<sup>1</sup>, Lidia Leal<sup>1</sup>, Araceli Patrón<sup>2</sup>, Oliver López<sup>3</sup>,  
Miriam Cedillo<sup>1</sup> y Jaime Uribe Wiechers<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Investigación y Desarrollo, PROBIOMED S.A. de C.V., Planta Tenancingo. Cruce de Carret. Acatzingo-Zumpahuacan SN, C.P. 52400, Tenancingo Edo. de México. Tel 0155-11662279. nestor.perez@probiomed.com.mx. <sup>2</sup> Unidad de Microscopia, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. <sup>3</sup> Unidad de Microscopia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

*Palabras clave: Bancos celulares, caracterización, bigenéricos.*

**Introducción.** La caracterización de bancos celulares es un componente clave en el control de productos biotecnológicos. De la misma forma que el producto terminado debe alcanzar ciertos parámetros para poder usarse, los bancos celulares deben cumplir ciertos criterios de aceptación para usarse en producción. La caracterización de los bancos debe ser lo suficientemente profunda como para detectar la presencia de otras especies microbianas, agentes adventicios, agentes endógenos y contaminantes moleculares.

**Metodología.** Se caracterizó un banco celular productor de Eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO). Para ello se desarrollaron diferentes metodologías, incluyendo pruebas de identidad, pureza y estabilidad. La identidad de la clona se determinó por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos primarios específicos y un anticuerpo primario marcado con fluoresceína, se utilizaron controles sin anticuerpo primario. La identidad molecular de la clona se llevo a cabo demostrando el dogma centra de la biología molecular. Se demostró la presencia e identidad del gen de la rHuEPO mediante PCR-RFLP, se demostró la transcripción del gen mediante la técnica de Northern Blot, el procesamiento adecuado de intrones se demostró por RT-PCR y la identidad del transcrito se demostró por secuenciación de los productos del RT-PCR. La producción de la proteína se demostró mediante la técnica de ELISA. Se uso una segunda prueba de inmunofluorescencia para descartar la presencia de células HeLa. La determinación de bacterias, hongos y levaduras contaminantes se llevó a cabo cultivando extractos celulares en medios tioglicolato y nutritivo. La determinación de *Mycoplasma* se hizo usando un kit comercial de PCR-ELISA y se determinó la actividad de retrotranscriptasa utilizando un kit comercial. La presencia de virus se determinó mediante ensayos *in vitro* utilizando cuatro líneas celulares reporteras, MBDK (bovinas), VERO (primate), WISH (humanas) y NCTC929 (múrinas). Se busco efecto citopático y alteraciones morfológicas. Se hicieron también pruebas de hemaglutinación, tinción de hematoxilina-eosina (HE) y microscopia electrónica de transmisión. Como prueba de identidad se utilizó la determinación del número de copias del gen mediante una técnica de "slot blot" y se determinó el número de copias del gen a diferentes pases celulares.

**Resultados y discusión.** La inmunofluorescencia confirmó la identidad de la clona recombinante y descarto la posibilidad de una contaminación por células HeLa, el principal contaminante de líneas celulares. Se obtuvo un fragmento de PCR del tamaño esperado que incluye los intrones y exones del gen recombinante. El análisis de restricción coincide con

los fragmentos esperados según su secuencia nucleotídica. La detección de una banda discreta por Northern blot demuestra la transcripción del gen, mientras que el RT-PCR demostró el procesamiento correcto de los intrones. La secuencia obtenida de la banda de RT-PCR confirmó la identidad del gen recombinante. La expresión de la proteína fue demostrada por ELISA. Juntas estas pruebas nos dan certeza de la identidad de la clona recombinante. No se observó crecimiento microbiano en ninguno de los medios de cultivo probados, asegurándose la ausencia de bacterias, levaduras y hongos. Tampoco se detecto *Mycoplasma spp.*, ni actividad de retrotranscriptasa, sugiriendo la ausencia de la bacteria y de retrovirus. Ninguna de las líneas celulares reporteras usadas mostró efecto citopático o alteraciones morfológicas en comparación a controles sin inocular, sugiriendo ausencia de agentes virales capaces de infectar a estas líneas celulares. Las células provenientes del banco no son capaces de hemaglutinar glóbulos rojos de cobayo, ni de pollo a 25 y 4 °C confirmando la ausencia de agentes virales hemaglutinantes. La tinción de HE no mostró presencia de cuerpos de inclusión característicos de infecciones virales, ni cambios morfológicos evidentes. La microscopia electrónica de transmisión no mostró alteraciones morfológicas a nivel subcelular compatibles con infecciones virales tales como desorganización celular, cuerpos de inclusión, vacuolización y exceso de membranas. Todas estas pruebas juntas aseguran la pureza y ausencia de virus de este banco celular. Demostramos la estabilidad genética del banco al medir el número de copias del gen recombinante mediante la técnica de "Slot blot", esta clona recombinante conserva el mismo número de copias en el banco maestro, el banco de trabajo y en células del final del proceso.

**Conclusiones.** Hemos usado técnicas de microbiología básica y herramientas moleculares para caracterizar bancos celulares, logrando una caracterización muy completa que garantiza la seguridad de los bancos celulares que utilizamos en la producción de proteínas recombinantes.

### Bibliografía.

1. Food and Drug Administration. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals. 1993. ([www.fda.gov/cber/guidelines.html](http://www.fda.gov/cber/guidelines.html)).
2. ICH Tripartite Guideline. Analysis of the expresión construct in cells used for production of rDNA derived protein products. 1995. ([www.ich.org/ich5q.html](http://www.ich.org/ich5q.html)).
3. ICH Tripartite Guideline. Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological /Biological products. 1997. ([www.ich.org/ich5q.html](http://www.ich.org/ich5q.html)).