



EFFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR Y LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN SOBRE LA PRODUCCION DE IFN γ HUMANO Y VECTORES ADENOVIRALES USANDO EL SISTEMA DE EXPRESIÓN TRANSITORIO HEK293/Ad5.

Concepción Sosa García, Angélica Meneses Acosta,
Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa,
Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209. angelica_meneses@uaem.mx

Palabras clave: HEK293/Ad5- IFN γ , MOI, DC.

Introducción. Debido al aumento de la demanda de productos biofarmacéuticos, surge la necesidad de optimizar los sistemas de expresión existentes, basados en parámetros básicos de cultivo celular como son la multiplicidad de infección (MOI) y la densidad celular (DC); parámetros que han demostrado afectar la producción de adenovirus (1). En el caso de proteínas glicosiladas se ha utilizado mayoritariamente la línea celular CHO (Chinese Hamster Ovary), sin embargo, tiene la desventaja de no glicosilar con el mismo patrón que el encontrado en las proteínas humanas (2). Hoy en día, las células HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) son un sistema bien establecido para la producción de vectores adenovirales recombinantes, vacunas, agentes contra el cáncer y son la línea predominante para la expresión transitoria de proteínas que, a diferencia de la expresión estable, implica la producción de proteínas a corto plazo (3,4). Así, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la MOI y la DC, sobre el metabolismo celular, la producción de IFN γ y el título adenoviral usando el sistema de expresión transitorio HEK293/Ad5, con la finalidad de identificar las condiciones óptimas de producción de IFN γ y Ad5 recombinantes.

Metodología. El cultivo de células HEK293 adherentes se mantuvo en medio DMEM-F12, suplementado con 10% de SFB, a 37°C, 5% de CO₂. Las cinéticas de infección se realizaron en placas de 6 pozos, usando una matriz experimental de 3x3 (DC: 0.6, 1 y 1.5 x 10⁶ cel/mL; MOI: 0.1, 1 y 5), las cinéticas se siguieron por 5 días. El conteo celular se realizó mediante la técnica de exclusión de Azul de tripano. Se cuantificó el consumo de glucosa y glutamina y la producción de glutamato y lactato, con el analizador bioquímico YSI 2200. Las partículas virales infectivas del stock de Ad5/IFN γ y el producido durante las cinéticas de infección se cuantificaron por la técnica de End Point Dilution. El transgene del IFN γ se determinó por RT-PCR. El IFN γ secretado al medio de cultivo por las células infectadas se detectó por la técnica de Western Blot y su cuantificación se llevó a cabo por la técnica de ELISA.

Resultados. En las cinéticas de infección se observó que la MOI más pequeña permiten un mayor crecimiento celular y, conforme aumenta la DC, la diferencia de células viables entre las infecciones con MOI 1 y 5 se hacen

menores. Se observó consumo de glucosa y glutamina, en el caso del lactato y glutamato se observó su producción y también su consumo. Se demostró por RT-PCR la eficiencia de la transcripción mediante la amplificación de un segmento de 120 pb correspondiente al gen de IFN γ . El título viral y la producción de IFN γ se muestran en la Figura 1.

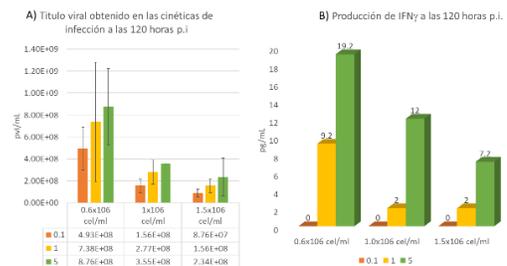


Fig. 1. Título adenoviral obtenido y producción de IFN γ . La máxima productividad de vectores adenovirales fue de 8.76 x 10⁸ pvi/mL (A) y 19.2 pg/mL IFN γ (B), encontrados en la combinación de 0.6x10⁶ cel/mL a MOI 5, y a las 120 horas post infección.

Conclusiones. Se identificaron las condiciones de infección que resultaron en los mayores rendimientos para la producción de vectores adenovirales y de IFN γ humano, se encontraron en la combinación de la densidad más baja con la MOI mas alta utilizadas en este trabajo y a las 120 horas post infección. Así, una alta productividad de proteína recombinante está acompañada de una alta productividad del vector adenoviral.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo financiero otorgado por CONACyT CB-2015, 257408; al apoyo CONACyT INFR-2014, por medio del proyecto 226271. Asimismo, se agradece al CONACyT por el otorgamiento de la beca 574588.

Bibliografía.

1. Yamada K, et al. (2009) Adenovirus vector production using low-multiplicity. *Cytotechnology*. 59:153–160.
2. Dumont J, et al. (2015). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*. 36:1110–1122.
3. Hu J, et al. (2018). Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *Cells Tissues Organs*. 205(1):1-8.
4. Swiech KV, Picanço-Castro V, Covas DT, (2012). Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr Purif*. 84:147–153.

