



**Evaluación de las condiciones de producción de un anticuerpo humano recombinante en
células de glándula mamaria de cabra**

Ochoa Insuasti, María Teresa

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD(c)

Toledo Alonso, Jorge Roberto, PhD

05 de marzo del 2023

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Revisión de tesis

NOMBRE DEL ALUMNO

MARIA TERESA OCHOA INSUASTI

NOMBRE DEL ARCHIVO

MARIA TERESA OCHOA INSUASTI - Revisión de tesis

SE HA CREADO EL INFORME

5 mar 2023

Resumen

Fragmentos marcados	2	0,2 %
Fragmentos citados o entrecomillados	0	0 %

Coincidencias de la Web

usanpedro.edu.pe	1	0,1 %
revistabiomedica.org	1	0,1 %

**THELVIA
ISABEL RAMOS
GOMEZ**

Firmado digitalmente
por THELVIA ISABEL
RAMOS GOMEZ
Fecha: 2023.03.05
18:52:36 -05'00'.....

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, Ph.D.(c)

C.C: 1753960028



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Evaluación de las condiciones de producción de un anticuerpo humano recombinante en células de glándula mamaria de cabra**” fue realizado por la señorita **Ochoa Insuasti, María Teresa**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

THELVIA
ISABEL
RAMOS
GÓMEZ

Firmado
digitalmente por
THELVIA ISABEL
RAMOS GÓMEZ
Fecha: 2023.03.05
18:52:50 -05'00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD.(c)

C.C: 1753960028



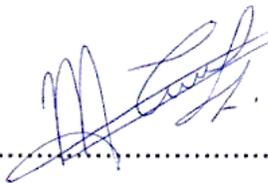
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Ochoa Insuasti, María Teresa**, con cédula de ciudadanía N° 1718818535, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Evaluación de las condiciones de producción de un anticuerpo humano recombinante en células de glándula mamaria de cabra”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023



.....
María Teresa Ochoa Insuasti

C.C: 1718818535



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Ochoa Insuasti, María Teresa**, con cédula de ciudadanía N° 1718818535, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Evaluación de las condiciones de producción de un anticuerpo humano recombinante en células de glándula mamaria de cabra”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

.....
María Teresa Ochoa Insuasti

C.C: 1718818535

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi familia por ser la razón por la que he culminado mis estudios, por su confianza y por todo el apoyo que me brindaron durante esta etapa universitaria.

A mi mamá y mi papá, por siempre ayudarme en todo momento en el que los necesité.

A mis hermanas, por creer en mí, escucharme y ayudarme en los momentos difíciles.

Agradecimientos

A mi familia e Inesita, por apoyarme, estar pendientes de mí, y por ser el mejor ejemplo de trabajo, honestidad, y cariño con el que me he podido formar.

A mi profesora y tutora de tesis, Dra. Thelvia Ramos, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en biotecnología humana; por su apoyo, enseñanzas, y ánimo constante.

Al profesor Jorge Roberto Toledo, por su apertura para realizar mi trabajo de titulación en su laboratorio, por su paciencia, confianza, mentoría y conocimientos compartidos durante el desarrollo de este trabajo.

A Catherine Meza, Viana Manrique y María José Leiva, por sus valiosos consejos y enseñanzas que me instruyeron y permitieron llevar a cabo este proyecto. A Carlita, Fer, Santi, Matheus, Bryan, Marce, M. Paz, Félix y Yerko, por su amistad, compañía y ayuda durante este proyecto, y a todo el laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, por su colaboración y ayuda en mi paso por la Universidad de Concepción.

A Nico, Josué y Nash, personas que este proyecto nos hizo coincidir en un país nuevo y desconocido, pero que con su amistad, consejos y apoyo lo convirtieron en un segundo hogar. Por estar en los buenos y malos momentos, y hacer de la casa nuestro lugar seguro.

De manera especial, a Esteban Mena, el mejor amigo que esta carrera me brindó. Por siempre estar presente en todos los momentos, por la ayuda, los consejos, las risas y los aprendizajes que tuvimos juntos y marcaron esa etapa de mi vida.

A todos mis amigos, especialmente a Flavia, Mari, Alexis, Angie, Uwe, Dus y Andrés, por su increíble amistad durante estos años de carrera. Aprecio cada momento que compartimos juntos.

Tabla de Contenidos

Informe de Originalidad	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo I: Introducción	17
Formulación del problema	17
Justificación del problema	19
Objetivos	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Hipótesis	21
Capítulo II: Marco teórico	22
Anticuerpos humanos	22
Anticuerpos humanos terapéuticos	23
Producción de anticuerpos humanos recombinantes	25
Sistemas de expresión	25
Glándula mamaria de cabra como sistema de expresión recombinante	28
Línea celular de glándula mamaria de cabra (GMGE)	29
Adenovirus como vectores de transferencia de genes	29

Vector adenoviral	29
Línea celular para la amplificación viral: HEK293A	32
Sistema Adeasy	32
Capítulo III: Metodología.....	35
Vector Adenoviral	35
Técnicas básicas para el manejo de líneas celulares	35
Descongelación de líneas celulares.....	35
Subcultivo de líneas celulares.....	36
Conteo celular.....	36
Congelación de líneas celulares	36
Etapa 1. Amplificación de vectores adenovirales	37
Infección de células HEK-293A con el vector adenoviral	37
Lisado de células HEK 293A para la recuperación de adenovirus	37
Titulación de los vectores adenovirales	38
Purificación del adenovirus mediante un gradiente continuo de cloruro de cesio ...	39
Etapa 2. Ensayo de infectividad del vector adenoviral en células GMGE	39
Etapa 3. Identificación y manipulación de proteínas	40
Precipitación de proteínas por ácido tricloroacético (TCA) y deoxicolato de sodio.	40
Cuantificación de proteínas totales mediante ácido bicinonínico (BCA)	40
Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida - SDS.....	41
Ensayo de inmunodetección por Western blot	42
Cuantificación y análisis estadístico	42
Capítulo IV: Resultados	43
Etapa 1. Amplificación del vector adenoviral	43

Etapa 2. Infección de células GMGE con el vector adenoviral amplificado	44
Diferencia de expresión recombinante entre MOIs	44
Expresión del anticuerpo humano recombinante a través del tiempo	46
Etapa 3. Análisis de la expresión de la proteína	48
Diferencia de expresión recombinante entre MOIs	48
Análisis estadístico	49
Expresión del anticuerpo recombinante a través del tiempo.....	51
Análisis estadístico	52
Capítulo V: Discusión.....	54
Conclusiones.....	60
Recomendaciones	61
Bibliografía	62
Apéndices	77

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Ejemplos de anticuerpos terapéuticos actualmente en comercialización</i>	24
Tabla 2 <i>Análisis de varianza para la expresión relativa de los anticuerpos recombinantes de cada tratamiento con distinto MOI a las 72 horas de infección adenoviral.</i>	50
Tabla 3 <i>Análisis de medias (Tukey 5%) para la variable intensidad de la banda de Western Blot de la expresión del anticuerpo recombinante a las 72 horas de la infección adenoviral</i>	50
Tabla 4 <i>Análisis de regresión lineal para la expresión relativa de los anticuerpos humanos recombinantes a las distintas horas post infección adenoviral.</i>	53

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Estructura de una inmunoglobulina G con las posibles modificaciones y alteraciones que puede presentar</i>	22
Figura 2 <i>Tipos de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos</i>	23
Figura 3 <i>Estructura interna de la glándula mamaria de cabra</i>	28
Figura 4 <i>Entrada clásica de un vector adenoviral a la célula</i>	30
Figura 5 <i>Estructura del adenovirus y su organización genómica con los genes de interés: tempranos (E1-4) y tardíos (L1-5).</i>	31
Figura 6 <i>Generaciones de vectores adenovirales</i>	32
Figura 7 <i>Metodología del sistema adenoviral Adeasy Quantum</i>	34
Figura 8 <i>Infección a través del tiempo de células HEK293A con un vector adenoviral que expresa un anticuerpo humano recombinante a un MOI de 5 UFC por célula.</i>	43
Figura 9 <i>Purificación de vectores adenovirales a partir de un gradiente de cloruro de cesio</i>	44
Figura 10 <i>Ensayo de infectividad de un vector adenoviral que expresa un anticuerpo humano recombinante a distintos MOIs en la línea celular GMGE.</i>	45
Figura 11 <i>Diferencias morfológicas en células control (-) y en células infectadas con un vector adenoviral a un MOI de 150 UFC por célula a las 72 horas post infección.</i>	46
Figura 12 <i>Ensayo de infectividad de un vector adenoviral a través del tiempo en células GMGE transducidas con un MOI de 125 UFC por célula.</i>	47
Figura 13 <i>Diferencias morfológicas en células GMGE infectadas con un MOI adenoviral de 125 UFC por célula a las 0 horas y 144 horas post infección.</i>	48
Figura 14 <i>Electroforesis y Western Blot de las muestras recolectadas de cada tratamiento con distinto MOI (25, 50, 100, 125 y 150 UFC por célula) a las 72 horas post infección.</i>	49
Figura 15 <i>Expresión relativa del anticuerpo humano recombinante de cada tratamiento con distinto MOI adenoviral a las 72 horas de infección.</i>	51

Figura 16 <i>Electroforesis y Western Blot de las muestras recolectadas cada 24 horas del ensayo de expresión recombinante de un anticuerpo humano mediante un MOI de 125 UFC por célula.</i>	52
Figura 17 <i>Expresión relativa del anticuerpo humano recombinante con un MOI de 125 con intervalos de 24 horas de infección hasta 6 días de estudio.</i>	53

Listado de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
BCA	Ácido bicinconínico
BMSC	Células madre mesenquimales de médula ósea
CAR	Receptor de "coxsackie y adenovirus"
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
DMEM	Medio "Eagle modificado de Dulbecco"
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
GFP	Proteína verde fluorescente
GMGE	Células de epitelio de glándula mamaria de cabra
HEK293A	Células embrionarias de riñón humano 293
MOI	Multiplicidad de infección
NGNA	Ácido N-glicolilneuramínico
PBS	Tampón fosfato salino
SiHa	Cáncer cervicouterino con virus del papiloma humano subtipo 16
SFB	Suero fetal bovino
TCA	Ácido tricloroacético
UFC	Unidades formadoras de color

Resumen

La producción de anticuerpos humanos recombinantes como agentes terapéuticos constituye en la actualidad una de las industrias de mayor crecimiento debido a la especificidad y eficiencia terapéutica de estas proteínas. Sin embargo, a pesar del continuo avance en el desarrollo molecular y estructural de los anticuerpos, sus métodos de producción siguen dependiendo del uso de líneas celulares, lo que demanda un alto costo de manufactura e incrementa el precio final de estas terapias. Por ello, buscar alternativas que optimicen la producción de anticuerpos terapéuticos a gran escala, es un desafío para la biotecnología actual. En este proyecto, se evaluaron las condiciones de producción de un anticuerpo humano recombinante en células de epitelio de glándula mamaria de cabra (GMGE), para una posterior escalabilidad *in vivo*, lo que buscaría sustituir la producción de estas proteínas complejas en cultivos celulares. Para ello, se amplificó un vector adenoviral recombinante que codificaba a un anticuerpo humano, hasta la obtención de un título de 1×10^9 Unidades Formadoras de Color (UFC) por mL. Las células GMGE se infectaron con el vector adenoviral amplificado para evaluar la expresión recombinante con distintas multiplicidades de infección (MOI): 25, 50, 100, 125 y 150 UFC/mL; y la expresión en relación al tiempo se evaluó a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas post infección de aquel MOI que presentó la mayor expresión recombinante. En este estudio, las condiciones ideales para la máxima producción de la proteína se dieron con un MOI de 125 UFC/mL durante 144 horas post infección. Además, se evidenció la capacidad de generación de modificaciones post traduccionales de las células GMGE debido al peso molecular obtenido del anticuerpo humano expresado, lo que asegura la integridad tanto del vector adenoviral como de las proteínas recombinantes generadas. Por tanto, se estableció la viabilidad de la producción de un anticuerpo humano recombinante en células GMGE, lo que hace factible el escalamiento de la producción *in vivo* e *in vitro*.

Palabras claves: Anticuerpo Humano Recombinante, Vector Adenoviral, GMGE, MOI

Abstract

The production of recombinant human antibodies as therapeutic agents is currently one of the fastest growing industries due to the specificity and therapeutic efficiency of these proteins. However, despite the continuous progress in the molecular and structural development of these antibodies, their production methods still rely on the use of cell lines, which demands a high manufacturing cost and increases the final price of these therapies. Therefore, searching for alternatives that optimize the production of therapeutic antibodies on a large scale constitutes a challenge for current biotechnology. In this project, the conditions for the production of a recombinant human antibody in goat mammary gland epithelium (GMGE) cells were evaluated for subsequent *in vivo* scalability, which seeks to replace the production of these complex proteins in cell cultures. For this purpose, a recombinant adenoviral vector encoding a human antibody was amplified to a titer of 1×10^9 Color Forming Units (CFU) per mL. GMGE cells were infected with the amplified adenoviral vector to evaluate recombinant expression at different multiplicities of infection (MOI): 25, 50, 100, 100, 125 and 150 CFU/mL; and expression over time was evaluated at 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours post infection of that MOI with the highest recombinant expression. In this study, the ideal conditions for maximum protein production occurred at a MOI of 125 CFU/mL during 144 hours post infection. In addition, the ability of the GMGE cells to generate post-translational modifications was evidenced due to the molecular weight obtained from the expressed human antibody, which ensures the integrity of both the adenoviral vector and the recombinant proteins generated. Therefore, the feasibility of the production of a recombinant human antibody in GMGE cells was established, making the upscaling of recombinant proteins *in vivo* and *in vitro* feasible as well.

Key words: Recombinant Human Antibody, GMGE, Adenoviral Vector, MOI

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Los anticuerpos terapéuticos han revolucionado a la medicina moderna al presentar propiedades biológicas que aumentan la especificidad de los tratamientos y disminuyen las interacciones no específicas de los fármacos utilizados en la actualidad (Shepard et al., 2017). La introducción de estas proteínas al mercado permitió el desarrollo de nuevas alternativas de terapia a varias enfermedades, siendo las de mayor alcance las oncológicas, inmunológicas y hematológicas (Grilo & Mantalaris, 2019).

La producción a gran escala de estos anticuerpos inició a partir de los experimentos de Köhler & Milstein (1975), quienes generaron anticuerpos de gran especificidad a partir de la fusión de células de mieloma murino con células beta. Mediante esta tecnología, en 1986 el primer anticuerpo monoclonal, denominado *Orthoclone (OKT3)*, fue aprobado por la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su comercialización como inmunosupresor para prevenir el rechazo a trasplantes renales (Sanlay et al., 2020). Sin embargo, la respuesta inmune no deseada fue generada en el organismo humano al reconocer a los fragmentos murinos del anticuerpo como agentes extraños (anticuerpos humanos anti-ratón o anti-droga); Por tanto, tecnologías de producción alternativas debieron ser desarrolladas (Kumar et al., 2019).

Al final de los años 80, la tecnología del ADN recombinante permitió la generación de anticuerpos quiméricos y humanizados que disminuyeron los problemas de incompatibilidad, a la vez que mejoraron la afinidad de unión hacia el antígeno (Lu et al., 2020; Sanlay et al., 2020). Los anticuerpos quiméricos poseen la región variable donde se encuentra el sitio de reconocimiento antígeno-anticuerpo de naturaleza murina mientras que el resto de la estructura proteica es de carácter humano (Sanlay et al., 2020). Por otro lado, los anticuerpos humanizados contienen únicamente las regiones hipervariables responsables del sitio de

reconocimiento de carácter murino, considerándose así, anticuerpos de naturaleza humana casi completa (Sanlay et al., 2020).

A pesar de que el desarrollo de las tecnologías antes mencionadas solucionó los problemas de incompatibilidad y mejoró la capacidad de unión antígeno-anticuerpo de los fármacos, la mayoría de estas técnicas requieren de una gran cantidad de recursos puesto que son llevadas a cabo en cultivos celulares (Carrara et al., 2021; Laible et al., 2020). Debido a que los anticuerpos humanos requieren de modificaciones post traduccionales, se deben utilizar células de mamífero, pero este sistema de expresión tiene un alto costo de producción y es poco escalable (Laible et al., 2020; O'Flaherty et al., 2020).

También se ha evaluado el uso de animales transgénicos como plataforma de producción de anticuerpos (Fallahi & Mohammadhassan, 2020); no obstante el procedimiento de inserción genética a partir de embriones presenta una metodología compleja que puede desarrollar varios riesgos como la generación de posicionamientos aleatorios de la secuencia de interés, alterando así, la funcionalidad natural de los genes huéspedes (An et al., 2019; Mocombe, 2020). Además, la eficiencia de producción es baja puesto que no resulta factible utilizar esta tecnología en gran cantidad de animales de manera simultánea y requiere de meses de espera hasta que el animal crezca y produzcan la proteína de interés (Hunter, 2019). En este sentido, aún se precisan de nuevas plataformas de producción que aseguren la integridad de la molécula a la vez que logren disminuir los costos de manufactura (Puetz & Wurm, 2019).

El uso de vectores adenovirales como sistema de transferencia de genes dirigida específicamente hacia células mamíferas secretoras de proteínas como aquellas de glándula mamaria, ha sido considerado como alternativa de producción (Leiva et al., 2021). Estas células tienen la capacidad de desarrollar modificaciones post traduccionales, y la transferencia de genes a partir de vectores adenovirales es relativamente simple y más económica que la transgénesis (Luo et al., 2007). Su uso supone una producción más alta de proteínas, un fácil

acceso a la purificación a partir de la leche de cabra (*Capra hircus*), y con ello, una mejor escalabilidad (Laible et al., 2020).

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la manipulación de animales es una práctica que requiere de varios recursos y personal especializado (Sánchez et al., 2007). Por ello, evaluar las condiciones de producción mediante ensayos *in vitro* permite establecer la viabilidad y posibles limitaciones que el escalamiento en animales podría presentar en el desarrollo de este tipo de moléculas complejas (Ingle, 2019; Ogorevc et al., 2017).

Justificación del problema

Los anticuerpos terapéuticos son la clase de fármacos de mayor inversión y producción en los últimos años (Lu et al., 2020). En el 2019, los ingresos de la industria farmacéutica por la producción de estas proteínas fue de 115 billones de dólares, y para el 2030 se espera que esta cifra alcance los 300 billones de dólares (Lu et al., 2020). A la fecha, existen 113 anticuerpos aprobados por la FDA para su comercialización (The Antibody Society, 2023).

Los anticuerpos como fármacos se desarrollan con el objetivo de mimetizar o restaurar afecciones del sistema inmunológico de un individuo (Bayer, 2019). Por ello, las enfermedades con mayor uso de estos biofarmacéuticos son las autoinmunes, metabólicas, infecciosas, y varios tipos de cáncer (Lu et al., 2020). De hecho, 52 de los anticuerpos aprobados en Estados Unidos y la Unión Europea están destinados al tratamiento de enfermedades oncológicas (The Antibody Society, 2023).

Sin embargo, el costo asociado a la producción de anticuerpos terapéuticos en cultivos celulares encarece el precio final de estas terapias (Carrara et al., 2021). En promedio, se estima que la terapia con anticuerpos monoclonales para tratar patologías como el cáncer es de USD 100.000 superior que el tratamiento de cualquier otra enfermedad por año (Hernandez et al., 2018). Esto se correlaciona con el costo de producción de estas moléculas que varía entre USD 50 - 100 por gramo en células CHO (Kelley, 2009). Por tanto, establecer nuevos procedimientos para producir anticuerpos terapéuticos humanos a menor costo, de manera que

se incremente su accesibilidad, es un desafío para la biotecnología actual (McDonnell et al., 2022).

En este aspecto, la generación de anticuerpos humanos a partir de glándula mamaria de mamíferos ha demostrado ser una plataforma adecuada para la obtención industrial de glicoproteínas recombinantes (Leiva et al., 2021). De manera específica, las cabras han probado ser una plataforma rentable y a gran escala de anticuerpos monoclonales debido a su tiempo de gestación relativamente corto, a su abundante producción de leche, y a su costo de mantenimiento relativamente bajo en comparación a otros sistemas de producción (Hua et al., 2021; Laible et al., 2020).

La glándula mamaria de estos animales resulta ideal para la producción de anticuerpos recombinantes debido al aumento de expresión de las proteínas propias de la leche durante la etapa de gestación y lactancia (Clark, 1998; Zhang et al., 2019). De esta manera, se pueden aprovechar los promotores y elementos regulatorios en estas etapas para una alta producción de las secuencias genéticas insertadas de interés, como en este caso, de anticuerpos humanos recombinantes (Maga & Murray, 1995; Moura et al., 2011).

De igual manera, el procedimiento resultaría ser más práctico que aquel utilizado en animales transgénicos, puesto que la morfología de la glándula se presta a una inserción directa del vector de transferencia desde el pezón del animal, hacia sus ductos alveolares que es donde se producen naturalmente las proteínas (Montesino & Toledo, 2006).

Por ello, considerando que el uso de animales requiere de recursos y de personal especializado, en el presente trabajo se propone la evaluación de las condiciones de producción de un anticuerpo humano recombinante en células de epitelio de glándula mamaria de cabra (GMGE) para su posterior escalabilidad *in vivo* e *in vitro*. Para ello, se planteó el uso de un vector adenoviral como sistema de transferencia de un gen que codificaba a un anticuerpo humano, y su viabilidad de producción recombinante se evaluó a partir de un ensayo de infectividad (Agilent Technologies, 2016). Con ello, y la evaluación de la integridad de la

proteína recombinante expresada, se puede determinar la viabilidad de un escalamiento de producción recombinante *in vivo* e *in vitro*.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar las condiciones de producción de un anticuerpo humano recombinante en células de glándula mamaria de cabra.

Objetivos específicos

Amplificar el vector adenoviral correspondiente al anticuerpo humano recombinante a través de la línea celular HEK-293A.

Expresar el anticuerpo humano recombinante mediante la transducción de células de glándula mamaria de cabra con los vectores adenovirales amplificados.

Determinar los niveles de expresión recombinante mediante técnicas analíticas.

Hipótesis

La transducción de células de glándula mamaria de cabra con una multiplicidad de infección de 100 UFC/célula presenta una mayor expresión de anticuerpo recombinante que una menor o mayor multiplicidad de infección.

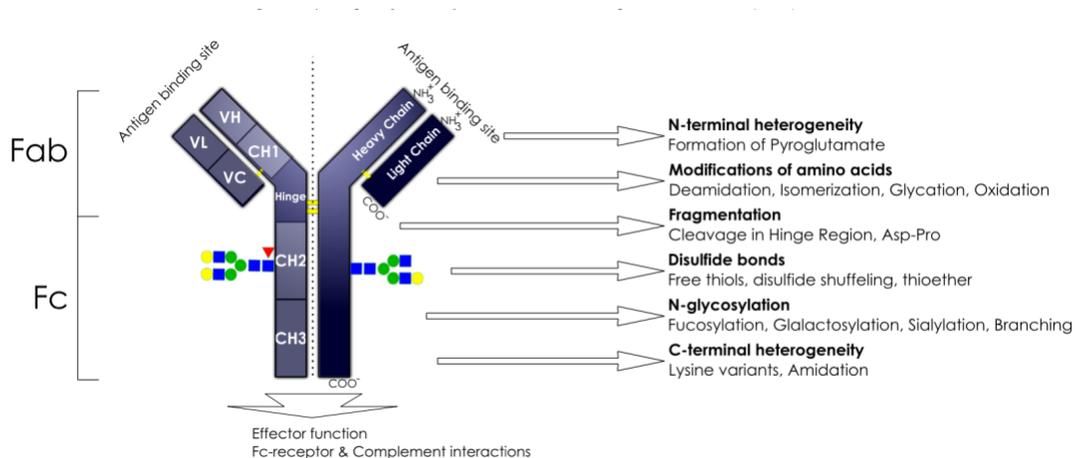
Capítulo II: Marco teórico

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos son proteínas pertenecientes al sistema inmunológico generados a partir de células B que reconocen a sustancias extrañas al cuerpo humano (Lu et al., 2020). Estas sustancias son conocidas como antígenos y el objetivo de los anticuerpos es unirse a ellos para generar una respuesta inmunitaria que los neutralice (Luo et al., 2022). Los anticuerpos son estructuras conformadas por cadenas de aminoácidos, dos pesadas de 50 kDa y dos ligeras de 25 kDa, resultando en un peso molecular de 150 kDa (Castelli et al., 2019). La estructura del anticuerpo se divide en fragmentos de acuerdo a los distintos dominios de las cadenas. El fragmento de unión al antígeno (Fab) se encuentra constituido por los dominios variable ligero (VL) y variable pesado (VH), mientras que el fragmento cristalizante (Fc) está conformado por los dominios constante ligero (CL) y constante pesado (CH1-3) (Figura 1) (Higel et al., 2016).

Figura 1

Estructura de una inmunoglobulina G con las posibles modificaciones y alteraciones que puede presentar



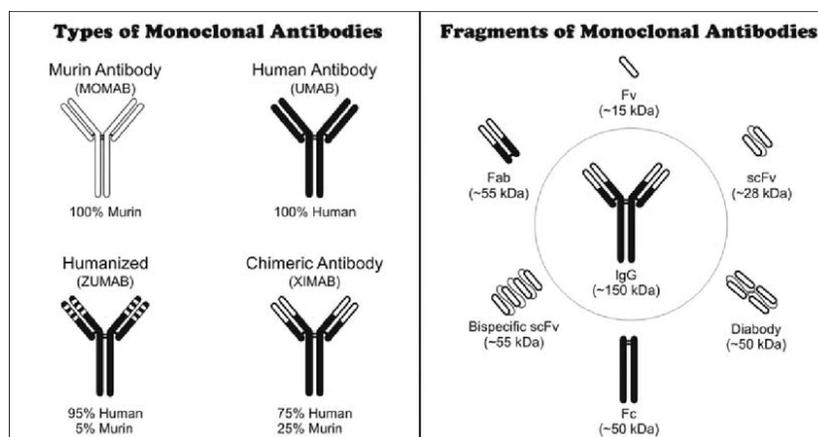
Nota. Tomado de “N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies binding and Fc fusion proteins” (p. 95), por Higel et al.,

2016, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 100.

Existen dos tipos de anticuerpos dependiendo de su sitio reconocimiento al antígeno: monoclonales y policlonales (Ascoli & Aggeler, 2018). Los anticuerpos monoclonales reconocen a un sitio específico del antígeno y son generados a partir de la clonación de un tipo específico de células (Singh et al., 2020), mientras que, los anticuerpos policlonales se dirigen hacia distintos sitios de reconocimiento de los antígenos y son producidos por la clonación de distintos tipos de células (Figura 2) (Ascoli & Aggeler, 2018).

Figura 2

Tipos de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos



Nota. Tomado de “Therapeutic monoclonal antibodies: ScFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals” (p. 33), por Pucca et al., 2011, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47.

Anticuerpos humanos terapéuticos

Anticuerpos humanos son desarrollados para el reconocimiento específico de proteínas o células patógenas dentro del cuerpo humano (Aziz et al., 2022). Esta respuesta terapéutica se encuentra dirigida especialmente a enfermedades como el cáncer (Zahavi & Weiner, 2020), desordenes autoinmunes (Hörner et al., 2022), afecciones cardiovasculares y distintos tipos de infecciones (Grilo & Mantalaris, 2019; Santos et al., 2018).

Fragmentos de anticuerpos son desarrollados con el objetivo de disminuir la unión antígeno-anticuerpo inespecífica y disminuir las reacciones inmunogénicas (Figura 2) (Bates & Power, 2019). Los fragmentos más comunes dentro de la investigación biomédica son los fragmentos variables de cadena única (scFV) y de unión al antígeno (Fab) (Kholodenko et al., 2019). Los scFV son un solo polipéptido constituido por las regiones variable ligero y variable constante de la inmunoglobulina (Khaing et al., 2021); mientras que los fab están conformados por la región constante y la región variable de las cadenas ligeras y pesadas del dominio de unión al antígeno (Wang et al., 2022).

Tabla 1

Ejemplos de anticuerpos terapéuticos actualmente en comercialización

Anticuerpo terapéutico	Enfermedad (Año de aprobación por la FDA)	Compañía	Ingresos generados en el 2018 (USD)
Adalimumab (Humira)	Artritis reumatoide (2002) Psoriasis (2008) Uveítis (2018)	AddVie	\$19.9 bn
Nivolumab (Opdivo)	Melanoma (2015) Carcinoma de células renales (2015)	Bristol-Myers Squibb	\$7.6 bn
Pembrolizumab (Keytruda)	Cáncer de cabeza y cuello (2016) Linfoma (2018) Cáncer cervical (2018)	Merck & Co	\$7.2 bn

Anticuerpo terapéutico	Enfermedad (Año de aprobación por la FDA)	Compañía	Ingresos generados en el 2018 (USD)
Trastuzumab (Herceptin)	Cáncer de mama (1998) Cáncer gástrico (2010)	Roche	\$6.8 bn
Bevacizumab (Avastin)	Cáncer colorectal (2004) Carcinoma de células renales (2009) Glioblastoma (2011)	Roche	\$6.8 bn

Nota. Tomado de “Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases” (p. 29), por Lu et al., 2020, *Journal of Biomedical Science*, 27.

Producción de anticuerpos humanos recombinantes

La tecnología del ADN recombinante permite la expresión de proteínas de interés mediante el aislamiento e inserción de su secuencia genética en organismos receptores (Nambisan, 2017; Y. Wang et al., 2019). Estos organismos o sistemas de expresión, pueden ser bacterias, levaduras, plantas, animales y distintas líneas celulares (Puetz & Wurm, 2019). El uso particular de cualquiera de estos organismos huésped depende de la estructura de la proteína de interés que se busque expresar, especialmente en relación a las modificaciones post traduccionales que ciertas moléculas complejas requieren (Mizukami et al., 2018).

Sistemas de expresión

Bacterias

Las bacterias fueron el primer sistema de expresión usado para la producción de proteínas recombinantes a partir de inserción genética (Moura et al., 2011). Las ventajas de estos organismos para la producción recombinante es su rapidez de crecimiento, alta densidad celular, uso de medio de cultivo económico y sencillo, y su facilidad de transformación de ADN exógeno (Amann et al., 2019; Rosano & Ceccarelli, 2014). Por otro lado, las desventajas que

presentan es una baja expresión recombinante, complejidad en el proceso de purificación y carencia de la maquinaria necesaria para el desarrollo de modificaciones post traduccionales importantes como la eliminación de péptido señal, glicosilación y procesamiento proteolítico (Dyck et al., 2003; Yang et al., 2022).

Levaduras

Las levaduras son microorganismos de crecimiento rápido y de alta densidad celular que resulta ideal para un escalamiento industrial en fermentadores (Mizukami et al., 2018). Estos organismos presentan un alto rendimiento de expresión, generación de plegamiento proteico correcto, presencia de glicosilación, y facilidad de purificación ya que excreta las proteínas generadas al medio extracelular (Lestari & Novientri, 2021). Sin embargo, dentro del proceso de glicosilación, las levaduras generan N-glicanos hipermanosilados con más de 100 residuos de manosa adicionales que pueden generar respuesta inmunogénica en los humanos (Mizukami et al., 2018).

Líneas celulares mamíferas

Las líneas celulares mamíferas poseen la maquinaria de glicosilación con mayor similitud a la humana (Donini et al., 2021). Las células del ovario de hámster chino (CHO) son las más estudiadas y utilizadas para la producción de proteínas terapéuticas debido a su crecimiento en suspensión como células individuales lo que favorece el escalamiento en biorreactores (Kim et al., 2020). Estas células permiten la amplificación del gen, tiene un alto rendimiento de expresión, permiten mejorar las estrategias de selección y desarrollan un correcto plegamiento proteico (Mizukami et al., 2018). Sin embargo, las células no humanas generan epítomos altamente inmunogénicos como la galactosa- α -1,3-galactosa (α -gal) y el ácido N-glicolilneuramínico (NGNA), lo cual afecta la funcionalidad de la proteína expresada (Biaggio et al., 2015).

Líneas celulares humanas como las células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) son otra alternativa para la expresión de proteínas por sus ventajas de producción

recombinante como su rápido crecimiento (Noh et al., 2019), desarrollo celular normal sin la necesidad de suero como nutriente, capacidad de escalamiento de producción a cultivo por suspensión, y su alta receptividad hacia la inserción de genes de interés (Tan et al., 2021). Sin embargo, debido a los requerimientos nutricionales que estas células necesitan, la desventaja de este sistema recae en los altos costos de producción (Tan et al., 2021).

Entre los avances tecnológicos para el mejoramiento de líneas celulares, la ingeniería de células permite la adición de aquellas enzimas humanas necesarias para asegurar la integridad de la proteína con las modificaciones post traduccionales humanas, o por otro lado, la inhibición de enzimas no humanas que pueden causar respuesta inmunogénica no deseada en el cuerpo humano (Chai et al., 2020; Nguyen et al., 2021).

Animales transgénicos

Los animales transgénicos como sistemas de expresión son ideales para generar las modificaciones post traduccionales necesarias de las proteínas y obtener un alto rendimiento de producción (Tripathi & Shrivastava, 2019). Entre los animales que han sido genéticamente editados para este objetivo se encuentran las gallinas, conejos, cerdos, ovejas, cabras y vacas (Alvarado et al., 2019). Cada uno de estos presenta ventajas y desventajas en relación al rendimiento de producción, facilidad de purificación de las proteínas, entre otros (Ghanbari et al., 2022).

Actualmente, las fuentes de obtención más comunes de proteínas a partir de animales transgénicos son la leche y los huevos, en el caso de los mamíferos y las gallinas, respectivamente (Tripathi & Shrivastava, 2019). Sin embargo, las limitaciones que presenta el uso de estos organismos son los patógenos zoonóticos que podrían estar presentes en las preparaciones proteicas donde se encuentran las moléculas de interés (Amann et al., 2019; Tripathi & Shrivastava, 2019).

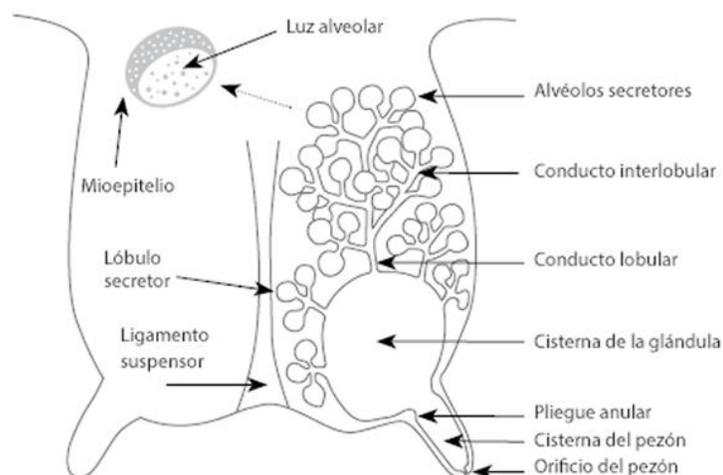
Glándula mamaria de cabra como sistema de expresión recombinante

La glándula mamaria de cabra es de tipo exocrina apocrina de composición túbulo-alveolar cuyas células epidérmicas producen proteínas de suero (β - lactoglobulina y α -lactoalbúmina) y caseínas (α s1, α s2, β y κ) (Clark, 1998; Moura et al., 2011). Estas células transcriben los genes de las proteínas a niveles elevados especialmente durante la etapa de gestación y lactancia (Xuan et al., 2022). Además, la expresión de estas proteínas se encuentran reguladas de manera positiva por hormonas lactogénicas como la progesterona, estrógenos, insulina, glucocorticoides y prolactina (Sadovnikova et al., 2021), por lo que un aumento de la producción de proteínas se da especialmente durante la etapa de gestación de estos animales (Truchet & Honvo-Houéto, 2017).

La producción de proteínas recombinantes mediante inserción genética resulta práctico en glándula mamaria puesto que la morfología de este órgano permite la inserción directa del vector de transferencia por el pezón del animal hacia sus conductos alveolares (Figura 3) (Montesino & Toledo, 2006).

Figura 3

Estructura interna de la glándula mamaria de cabra



Nota. Tomado de “Ubres de ovejas y cabras: Introducción a la anatomía y fisiología”, por Sanz, 2021 (<https://aboutsmallruminants.com/es/aspectos-basicos-ubre-ovejas-cabras/>).

Línea celular de glándula mamaria de cabra (GMGE)

Las líneas celulares se generan para el estudio del comportamiento celular, regulación de genes, y optimización de producción de proteínas (Tripathi & Shrivastava, 2019). Por ello, Sánchez et al. (2007) desarrollaron una línea celular de epitelio de glándula mamaria de cabra (GMGE) a partir de *Capra hircus*, para el estudio de la regulación de crecimiento, respuesta hormonal y propiedades bioquímicas de la glándula mamaria.

Las características que presenta esta línea celular no transformada, es una morfología epitelial y una respuesta a inhibición de la proliferación por contacto entre células (Sánchez et al., 2007). Además, a pesar de que la presencia de hormonas es indispensable para la expresión de proteínas de la leche (Xuan et al., 2022), esta línea celular únicamente requiere de insulina y del factor de crecimiento epidérmico, tanto para la producción de proteínas, como para su tiempo de duplicación (Sánchez et al., 2007).

Adenovirus como vectores de transferencia de genes

Vector adenoviral

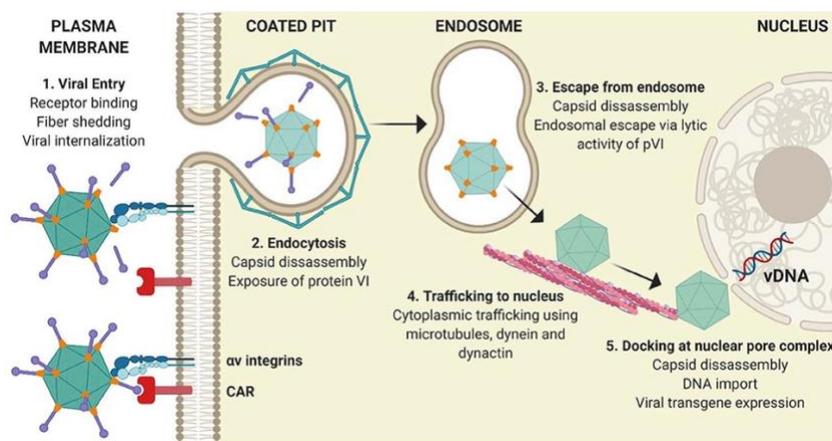
Los adenovirus son virus no envueltos cuyo genoma se compone de ADN lineal de doble cadena de aproximadamente 36 kb (Diaz, 2021). Su estructura consiste en una cápside compuesta en su mayoría por hexosas, bases pentosas y fibras que protegen al ADN adenoviral (Figura 4) (Mendonça et al., 2021). Los adenovirus de los serotipos humanos 2 y 5 son los más estudiados y caracterizados por lo que son estos los más usados para la transferencia de genes (Syyam et al., 2022).

El mecanismo de infección temprano de estos virus consiste en su entrada a la célula por endocitosis a partir de la unión de la fibra y base pentona de su cápside viral con el receptor “Coxsackie y adenovirus” (CAR) e integrinas presentes en la superficie celular, respectivamente (Mendonça et al., 2021). En el citoplasma celular, el adenovirus se libera de los endosomas mediante su proteína VI que al interactuar con el citoplasma, desencadena su función lítica, y permite el escape del endosoma (Coughlan, 2020). El adenovirus libre, migra hacia el núcleo

celular mediante redes de microtúbulos, importinas e histonas, donde realiza su proceso de replicación y transcripción viral (Figura 4) (Pied & Wodrich, 2019).

Figura 4

Entrada clásica de un vector adenoviral a la célula



Nota. Tomado de “Factors Which Contribute to the Immunogenicity of Non-replicating Adenoviral Vected Vaccines” (p. 6), por Coughlan, 2020, *Frontiers in Immunology*, 11.

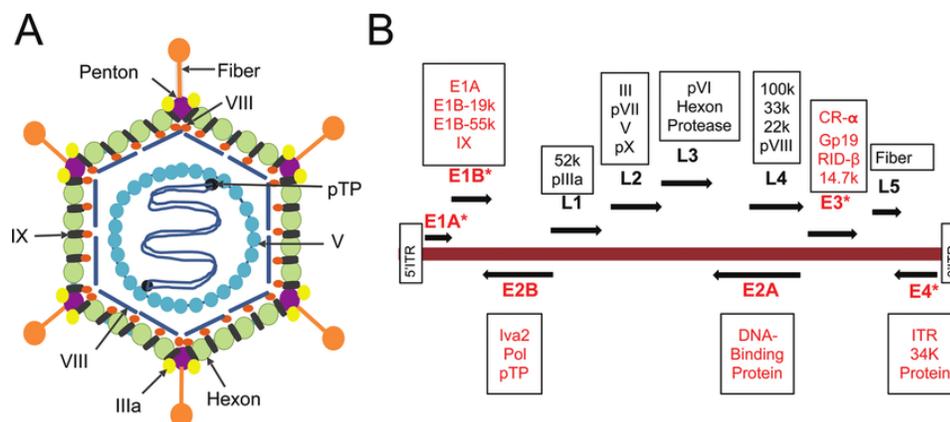
Dentro de su genoma, se han clasificado a los distintos genes de acuerdo a la etapa infectiva en la que se expresen y el efecto de su producto génico en la fisiología de la célula huésped (Luo et al., 2007). De acuerdo al orden de transcripción, los genes tempranos (E1-4) están implicados en la expresión de genes virales, replicación de ADN viral e inhibición de la apoptosis celular (Jennings & Parks, 2023; Luo et al., 2007). Los genes tardíos (L1-5) expresan las proteínas de la cápside adenoviral (hexosas, pentosas y fibras), por lo que tienen como función el ensamblaje del virus (Mendonça et al., 2021).

Para el desarrollo de adenovirus recombinantes, las modificaciones (inserciones y deleciones) se dan en sitios específicos de los genes E1-E4 considerando que no son esenciales para el virus (Wold & Toth, 2013). Dependiendo del gen al que se haya realizado la deleción, los procesos fisiológicos normales del virus se ven alterados, como en la capacidad de empaquetamiento, reducción de efectos citopáticos y en la disminución de la respuesta inmunitaria del huésped (Luo et al., 2007; Singh et al., 2018). Por ello, la deleción de sus genes

E1-E4, responsables de la replicación viral, generan un virus de replicación defectuosa ideal para el funcionamiento como vector de material genético hacia distintos tipos de células y tejidos (Díaz, 2021; Gao et al., 1996; Luo et al., 2007).

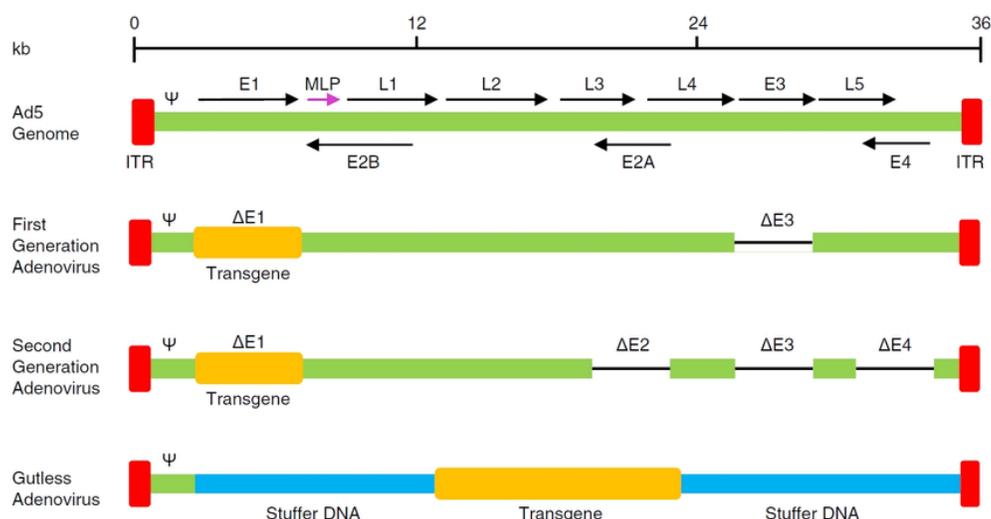
Figura 5

Estructura del adenovirus y su organización genómica con los genes de interés: tempranos (E1-4) y tardíos (L1-5)



Nota. Tomado de “Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects” (p. 55), por Singh et al., 2018, IntechOpen.

A partir del conocimiento de la función de los genes E1-E4 en la infección viral, se desarrollaron modificaciones en el genoma de estos vectores adenovirales para mejorar la transducción de material genético en líneas celulares, y aumentar su eficiencia y seguridad como vectores en terapia génica (Bulcha et al., 2021). En la Figura 6 se observan 3 generaciones de vectores adenovirales. La primera generación es un constructo con los genes E1 y E3 eliminados (Liu & Seol, 2020). La segunda generación además de las anteriores deleciones mencionadas, fueron removidos los genes E2 y E4 (Chang, 2021); y la tercera generación consiste únicamente en los sitios ITRs y la señal de empaquetamiento (Bulcha et al., 2021).

Figura 6**Generaciones de vectores adenovirales**

Nota. Tomado de “Helper virus-free gutless adenovirus (HF-GLAd): A new platform for gene therapy” (p. 567), por Liu & Seol, 2020, *BMB Reports*, 53.

Línea celular para la amplificación viral: HEK293A

La línea celular HEK-293 fue desarrollada en 1977 a través de la infección adenoviral de células de riñón embrionario humano con ADN de adenovirus tipo 5 (Abaandou et al., 2021). La línea transformada resultante expresa el producto génico E1 A/B del adenovirus, necesario para la replicación viral al codificar proteínas que inician el ciclo viral (Luo et al., 2007). Esta línea celular se ha constituido como una de la más importante para la amplificación de vectores adenovirales (Tan et al., 2021).

Sistema Adeasy

La tecnología Adeasy consiste en una metodología para la producción de proteínas a partir de la inserción de material genético de interés en células huéspedes con adenovirus como vector de transferencia de genes (Agilent Technologies, 2016). Esta técnica fue desarrollada por He et al. (1998) y se basa en tres fases: el acoplamiento de la secuencia de interés a un plásmido de transferencia, la generación del plásmido adenoviral recombinante a

partir de recombinación homóloga, y la generación de vectores adenovirales mediante líneas celulares mamíferas. Para su optimización, la recombinación homóloga se realiza en *Escherichia coli* y la amplificación de los vectores adenovirales en la línea celular HEK-293A por la presencia de los genes E1 necesarios para la replicación viral (Bi et al., 2021; Luo et al., 2007).

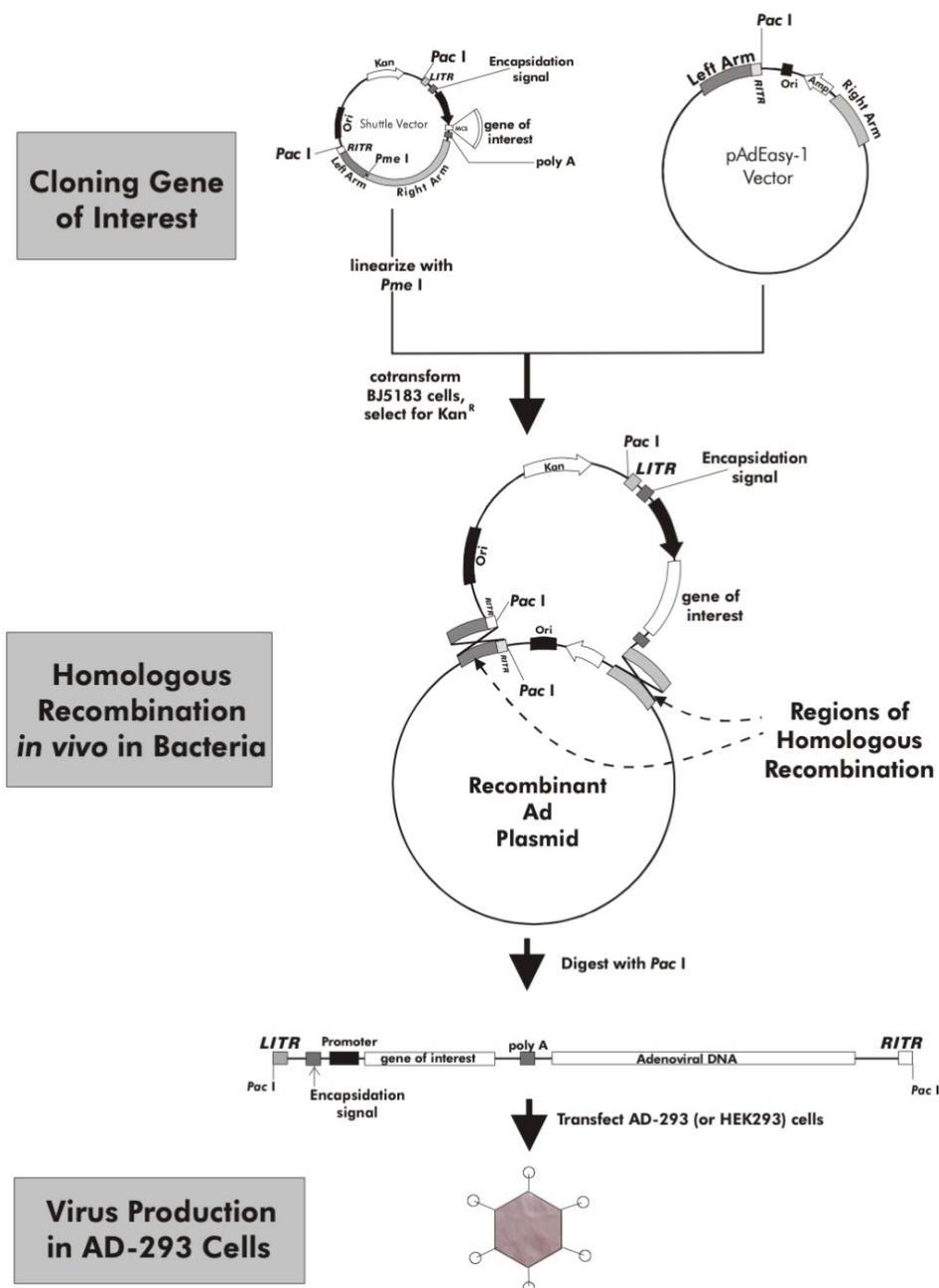
En la primera fase de esta técnica, un constructo genético en forma de ADN complementario previamente estructurado y sintetizado es insertado en un vector de transferencia de 7.4 kb que contiene un gen de resistencia a kanamicina (Agilent Technologies, 2016). El plásmido resultante es linealizado con la enzima PmeI y es transfectado a *Escherichia coli* junto con el plásmido “pAdEasy-1” que contiene el ADN genómico del adenovirus (He et al., 1998).

El segundo paso consiste en la recombinación homóloga de estos dos vectores dentro de *E. coli* para el acoplamiento de la secuencia de interés en el genoma del adenovirus (Luo et al., 2007). La selección de los vectores recombinantes se realiza a partir de ensayos de resistencia al antibiótico y mediante análisis de enzimas de restricción (Agilent Technologies, 2016; Chartier et al., 1996).

El vector resultante es linealizado con PacI para exhibir sus repeticiones terminales invertidas, y ser transducido a células HEK-293 para su ensamblaje y amplificación (Farnós et al., 2020; He et al., 1998).

Figura 7

Metodología del sistema adenoviral Adeasy Quantum



Nota. Tomado de “AdEasy Adenoviral Vector System Instruction Manual”, por Agilent Technologies, 2016 (<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/240009.pdf>).

Capítulo III: Metodología

El presente trabajo se desarrolló en tres etapas. La primera consistió en la amplificación del vector adenoviral en la línea celular HEK-293A. Este período permitió obtener los vectores adenovirales con título de 1×10^9 UFC/mL. La segunda etapa consistió en la infección de células GMGE a partir de los vectores adenovirales amplificados a distintas multiplicidades de infección y la recolección de muestras del sobrenadante de manera diaria durante 6 días consecutivamente post transducción. En la última etapa, las muestras se procesaron y analizaron mediante técnicas analíticas.

Vector Adenoviral

El vector adenoviral proporcionado en este estudio contenía un casete de expresión de un anticuerpo humano recombinante de una sola cadena y el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP). El vector adenoviral fue elaborado a partir de la tecnología Adeasy (Agilent Technologies, 2016) por el Laboratorio de Fisiopatología y Fármacos de la Universidad de Concepción, Chile.

La Universidad de Concepción se reserva la identidad del anticuerpo humano expresado en este estudio, al ser parte de investigaciones en curso.

Técnicas básicas para el manejo de líneas celulares

Descongelación de líneas celulares

La descongelación de las líneas celulares, HEK-293A (ATCC CRL 1573) y GMGE (CIGB, Cuba), se realizaron a partir del protocolo de Gibco (2020).

El criovial de la línea celular se dispuso en un baño de agua a 37°C por menos de un minuto. Inmediatamente, las células descongeladas se añadieron gota a gota en un tubo de centrifugación con 5 mL de medio DMEM y SFB 10%. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo DMEM al 10% de SFB para su posterior siembra en placas de cultivo adherente (Corning, EE. UU). En el caso de las células GMGE, el medio de cultivo de

crecimiento siempre se suplementó con 10 ng/mL of EGF (Gibco, EE. UU) y 10 ug/mL de insulina (Novo nordisk, Dinamarca). Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

Subcultivo de líneas celulares

Mediante el protocolo de Gibco (2020), el medio de cultivo metabolizado se descartó de la placa y las células se lavaron con PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.09 g/L, pH 7.2) a un volumen aproximado de 0,5 mL por cada 10 cm² de placa. La solución de PBS se retiró, se añadió tripsina (Gibco, EE. UU) a un volumen de 0,3 mL por cada 10 cm² de placa, y se incubó durante 3-4 minutos a 37°C con 5% de CO₂. La acción de la tripsina se neutralizó con medio DMEM al 10% de SFB. El medio con las células despegadas se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm, el sobrenadante se descartó y las células precipitadas se resuspendieron en nuevo medio de cultivo de crecimiento para el subcultivo en placas nuevas.

Conteo celular

Las células se lavaron con PBS, se añadieron tripsina y se centrifugaron tal como en los pasos realizados para el subcultivo de líneas celulares. Las células centrifugadas se resuspendieron con medio DMEM a un volumen mínimo según la cantidad de células precipitadas y se tomó una alícuota de 10 uL a la que se añadió 10 uL de azul de tripán (Sigma, alemania) (Strober, 2015). Esta solución se añadió en una cámara de Neubauer a un volumen de 10 uL y se observaron las células en microscopio (Olympus BH-2) en campo claro. Se contabilizó el número de células visibles, y se determinó la cuantificación total a partir de la fórmula:

$$\frac{\#Células}{mL} = \frac{\#Células\ contabilizadas}{\# recuadros\ contabilizados} \times 10.000 \times factor\ de\ dilución$$

Congelación de líneas celulares

La congelación de las líneas celulares se realizó a partir del protocolo descrito por Gibco (2020). Cultivos celulares con una confluencia del 80-90% se lavaron con PBS, se añadieron

tripsina, se centrifugaron y se contabilizaron tal como en la metodología presentada en el conteo celular. La concentración de células ideal para congelar fue de 1×10^6 células/mL por lo que, después del conteo celular, se centrifugaron las células y se resuspendieron en un volumen de medio de congelación que garantice esa concentración. Inmediatamente, las células se dispensaron en criotubos (Sigma, EE. UU) previamente enfriados a 4°C a un volumen de 1 mL por criotubo.

Para una congelación gradual de las células, los criotubos se almacenaron en el recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) a -80°C durante 24 horas y posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido.

Etapa 1. Amplificación de vectores adenovirales

Infección de células HEK-293A con el vector adenoviral

Una vez las células alcanzaron el 80-90% de confluencia, se realizó un cambio de medio con SFB al 2%, se añadió el volumen de adenovirus correspondiente a una multiplicidad de infección de 5 partículas virales por célula, y se incubó toda la noche, o en su defecto de 8 a 14 horas, a 37°C y 5% de CO_2 (Agilent Technologies, 2016). Después del tiempo esperado de infección, se realizó un cambio de medio completo y a las 24 horas un cambio de medio parcial con DMEM al 2% de SFB. Aproximadamente a las 48 horas de infección, se recuperó todo el medio de cultivo junto con las células infectadas, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron las células en medio DMEM sin suero a un volumen del 10% del usado en la infección por placa (Agilent Technologies, 2016).

Fotografías del proceso de infección se tomaron cada 24 horas mediante la estación de captura de imágenes celulares FLoid™ (Invitrogen, EE. UU).

Lisado de células HEK 293A para la recuperación de adenovirus

Las células recuperadas se dispusieron a tres ciclos de congelación/descongelación a temperaturas de -20°C a 37°C (Siqueira-Silva et al., 2009). Se centrifugó a 4000 rpm por 10

minutos, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su titulación y/o siguiente uso.

Titulación de los vectores adenovirales

La titulación se realizó mediante el método de Unidades Formadoras de Color (UFC) en una placa de 96 pocillos (Costar, EE. UU) a partir de diluciones seriadas 1/5 partiendo desde una dilución 1/40 de la muestra viral con medio DMEM sin SFB mediante el protocolo proporcionado por (Sánchez et al., 2004).

Las diluciones seriadas fueron realizadas en una placa auxiliar previamente adicionada de $160\ \mu\text{L}$ de medio DMEM sin SFB en cada pocillo. Para ello, en los pocillos de la columna 1 se adicionó $40\ \mu\text{L}$ de la muestra adenoviral previamente diluida (1/40) y con una pipeta multicanal se resuspendió un mínimo de 7 veces, se tomó $40\ \mu\text{L}$ de la dilución y se transfirió a la siguiente columna. Las puntas de la pipeta se cambiaron en cada dilución.

Las diluciones preparadas se adicionaron en una placa destinada a la titulación que fue sembrada el día anterior con células HEK293A a razón de $5 * 10^4$ células por pocillo en un volumen de $100\ \mu\text{L}$ de medio DMEM con SFB al 10%. La confluencia de las células no debió superar el 80%.

El volumen adicionado de las diluciones fue de $40\ \mu\text{L}$ por pocillo y se realizó lentamente para evitar desprender la monocapa celular. La placa se incubó a 37°C con 5% de CO_2 y se visualizaron las células verdes fluorescente a las 56 - 72 horas de infección en microscopio de fluorescencia con luz UV (Olympus BH-2, EE. UU).

Se contabilizaron las células en las columnas de mayor dilución, y se calculó su concentración a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Título adenoviral} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \# \text{células verdes} * 5^{\# \text{de columna}} * 1000$$

Purificación del adenovirus mediante un gradiente continuo de cloruro de cesio

La metodología utilizada para la purificación del adenovirus se basó en el protocolo presentado por Agilent Technologies (2016) y Su et al. (2019).

En un tubo de polialómero (Kendro Laboratory Products, EE. UU) se realizó un gradiente de cloruro de cesio a partir de la adición de 8 mL de CsCl 1.4 (53 g + 87mL de 10mM Tris-HCl pH 7.9) seguido de la adición cuidadosa de 6 mL de CsCl 1.2 (26.8 g +92 mL de 10mM Tris-HCl pH 7.9) por las paredes del tubo. Al gradiente realizado se le añadió lentamente 14 mL del sobrenadante antes recuperado y titulado, evitando perturbar las soluciones de CsCl. El tubo con el gradiente y la muestra se centrifugó a 23 000 rpm durante 90 minutos a 4°C y con una velocidad de desaceleración igual a 0 en ultracentrífuga (Sorvall, EE. UU).

Una vez formados los halos de adenovirus en el gradiente de CsCl, el exceso de las soluciones de CsCl 1.2 y 1.4 se retiraron del tubo con ayuda de pipetas Pasteur (Hirshmann Laborgeräte). De igual manera se retiró el halo que contenía los adenovirus defectuosos.

La muestra resultante del tubo se dispuso en una membrana de poro con un cut off de 12-14 kDa (Spectra, EE. UU) para retirar los restos de cloruro de cesio mediante diálisis. La solución utilizada para la diálisis fue un buffer 10mM Tris, 2 mM MgCl₂, 4% de sucrosa, pH 8.0. El volumen del buffer utilizado correspondió a 200 veces el volumen de la solución concentrada del adenovirus y se cambió cada hora durante tres rondas a 4°C.

La solución dializada se recuperó en tubos de centrifugación para su almacenamiento a -80°C hasta su posterior uso, y se tomó una alícuota de 10 µL para su titulación.

Etapa 2. Ensayo de infectividad del vector adenoviral en células GMGE

Células GMGE se sembraron a razón de $8 * 10^5$ células por pozo en una placa adherente de 6 pocillos (Costar, EE.UU) con medio de crecimiento DMEM al 10% de SFB y los suplementos específicos para estas células (10 ng/mL de EGF y 10 µg/mL de insulina). Transcurridas las 24 horas, las células tenían a una confluencia del 80% y cada pocillo se infectó con una distinta multiplicidad de infección: 0, 25, 50, 100, 125 y 150 UFC/célula con

medio DMEM al 2% de SFB y los suplementos antes mencionados (Agilent Technologies, 2016).

A las 16 horas post infección, se retiró el medio metabolizado y se añadió medio DMEM con los suplementos, pero sin SFB para disminuir la interferencia de proteínas en los posteriores ensayos analíticos. Las muestras para determinar la expresión de las proteínas por cada MOI consistieron en una alícuota de 500 μ L del medio de cultivo total (3 mL) de cada pocillo recolectado cada 24 horas post infección. A las 72 horas, se realizó un cambio de medio temporal por DMEM al 5% de SFB y suplementos, para disponer a las células de nutrientes y evitar su senescencia. Transcurridas 8 horas desde la adición de medio con SFB a las células, se realizó un cambio de medio de cultivo con DMEM sin SFB y se continuó con la recolección de muestras cada 24 horas hasta las 144 horas de tratamiento.

Fotografías del proceso de infección se tomaron cada 24 horas mediante la estación de captura de imágenes celulares FLoid™ (Invitrogen, EE. UU).

Etapas 3. Identificación y manipulación de proteínas

Precipitación de proteínas por ácido tricloroacético (TCA) y deoxicolato de sodio.

La precipitación de proteínas se llevó a cabo mediante la metodología de Koontz (2014). Las muestras de sobrenadante recolectadas se precipitaron a partir de la adición de deoxicolato de sodio (1.5 mg/mL) a un volumen en relación 1/10 con el de la muestra. Se agitó vigorosamente y se mantuvo en reposo por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadió un volumen de TCA a la misma relación 1/10 con la muestra, se agitó por 1 minuto y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se descartó y las proteínas precipitadas se resuspendieron en un volumen de PBS de acuerdo a la concentración requerida de la proteína.

Cuantificación de proteínas totales mediante ácido bicinonínico (BCA)

La cuantificación de proteínas se realizó a partir del protocolo para el ensayo de proteínas de Pierce (Thermo Fisher Scientific, 2020). La curva estándar de concentraciones

conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) se realizó en un rango de 0.05 a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína. La solución A+B se preparó a volúmenes en relación 50:1 (Solución A: B).

Las muestras conocidas de BSA y aquellas a examinar se añadieron en los pozos de una placa de 96 pocillos a un volumen de 5 μL , se adicionó 200 μL de la solución A+B y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

La lectura de la placa se realizó a una absorbancia de 592 nm en lector de placas (BIO-TEK, EE. UU).

Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida - SDS

Para detectar la expresión de la proteína de interés, se realizó una electroforesis desnaturalizante de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10%. Geles de 1mm de espesor al 10% de poliacrilamida se prepararon según la metodología desarrollada por Laemmli (1970).

Las muestras de proteínas, previamente precipitadas y resuspendidas en PBS, se les añadió buffer de carga (glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, Tris-base 0.0625 g/L, bromofenol azul 0.001%, pH 6.8) a un volumen de 1 μL por cada 5 μL de muestra proteica. La solución resultante se calentó a 95°C durante 5 a 10 minutos. Las muestras proteicas reducidas y el marcador de peso molecular tris-glicina (AccuRuler RGB MaestroGen, EE. UU) se cargaron en el gel de poliacrilamida y se corrió en buffer Tris-Glicina (glicina 144 g/L, Tris base 30 g/L, SDS 0.1%, pH 8.3.) en una cámara electroforética vertical (Biorad, EE.UU) a una corriente constante de 30 mA durante 1 hora y 30 minutos (Sambrook & Russell, 2006).

Para la visualización de las proteínas, el gel se tiñó con azul de coomasie (GE Healthcare, Suecia) durante 1 hora, se lavó tres veces con solución de destinción (metanol 10% y ácido acético 10%) y se reveló en el equipo LI-COR ODYSSEY-Clx mediante el software Image Studio v3.1.4.

Ensayo de inmunodetección por Western blot

Para determinar la presencia del anticuerpo humano, se realizó una inmuno-detección de la proteína según el procedimiento caracterizado por (Burnette, 1981). El gel de poliacrilamida se transfirió a una membrana de nitrocelulosa BA-85 (Schleicher & Schuell, Alemania) mediante buffer de Tris base 5.8 g/L, glicina 2.9 g/L, metanol 20%, pH 9.2, y el equipo de transferencia semi-húmeda (Biorad, EE. UU) con una corriente continua a 0,3 A y 25 V durante 30 minutos. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS durante una hora. Transcurrido ese tiempo, se adicionó el anticuerpo IgG antihumano de burro Alexa Fluor® 790 (nº de cat. 709- 655-149) diluido en relación 1:5000 en TBS Tween (0.1%) durante una hora. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con una solución de TBS 1X, Tween20 0,1%, SDS 0,01%. La membrana se analizó para la detección de fluorescencia en el equipo ODYSSEY-C1x (LI-COR Biosciences, EE.UU.) junto con el software Image Studio.

Cuantificación y análisis estadístico

El análisis de cuantificación de la expresión proteica a partir de Western Blot se analizó mediante el software ImageJ. Los valores de intensificación de la banda del Western Blot se sometieron al análisis de normalidad según Shapiro Wilks y homocedasticidad mediante la prueba de Levene; también se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y de diferenciación de medias (Tukey al 5%) para analizar la diferencia de expresión recombinante entre MOIs, y una regresión lineal para la expresión del anticuerpo recombinante a través del tiempo

Capítulo IV: Resultados

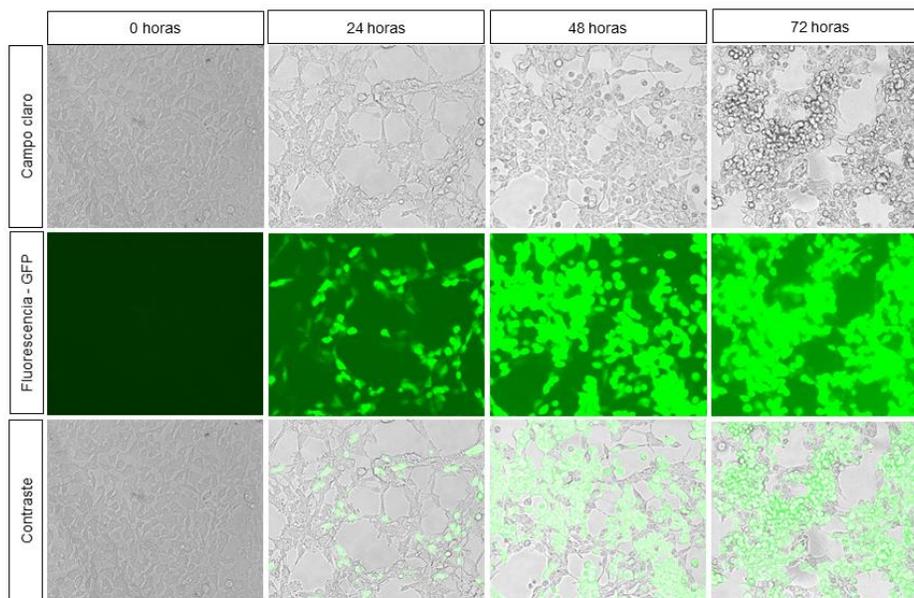
Etapa 1. Amplificación del vector adenoviral

La multiplicación del vector adenoviral se realizó en la línea celular HEK-293A. En la Figura 8 se observa la infección a través del tiempo por la presencia de GFP dentro de las células. Se evidencia la propagación de la infección hacia células próximas por el aumento del número de células infectadas y la intensidad de fluorescencia cada 24 horas (Figura 8).

Además, la morfología de las células muestra cambios en el tiempo; las células se retraen y se alejan entre ellas a partir de las 24 horas de la infección, y a partir de las 48 horas, parecen perder su capacidad de adhesión y forman aglomerados en suspensión (Figura 8).

Figura 8

Infección a través del tiempo de células HEK293A con un vector adenoviral que expresa un anticuerpo humano recombinante a un MOI de 5 UFC por célula



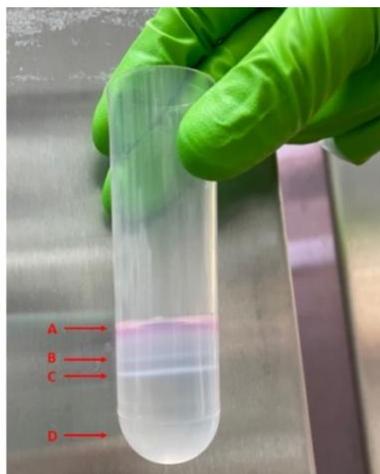
Nota. Las fotografías fueron capturadas con un aumento de 100x en campo claro (fila superior), campo con emisión de fluorescencia GFP (fila media) y un contraste de ambos (fila inferior).

Los adenovirus amplificados se purificaron a fin de eliminar todos los restos del medio de cultivo y desechos celulares que suelen permanecer después de la lisis celular. En la Figura

9, se observa la separación de los componentes de la solución de adenovirus después de su purificación mediante un gradiente de cloruro de cesio. Dentro de los componentes separados, se distingue un halo blanco fino correspondiente a adenovirus defectuosos (Figura 9.B) y un halo blanco grueso correspondiente a adenovirus infectivos (Figura 9.C), por lo que hubo una mayor proporción de adenovirus íntegros para la expresión recombinante.

Figura 9

Purificación de vectores adenovirales a partir de un gradiente de cloruro de cesio



Nota. Los componentes separados a partir del gradiente se distinguen a partir de A) restos del medios de cultivo B) adenovirus defectuosos C) adenovirus infectivos, y D) restos celulares de mayor densidad.

La infección de cada placa de 100 mm de diámetro produjo un aproximado de $1 * 10^9$ UFC. En total, se realizó la infección adenoviral de 60 placas de 100 mm de diámetro, y después de la purificación y diálisis, se obtuvo un total de $50 * 10^9$ UFC.

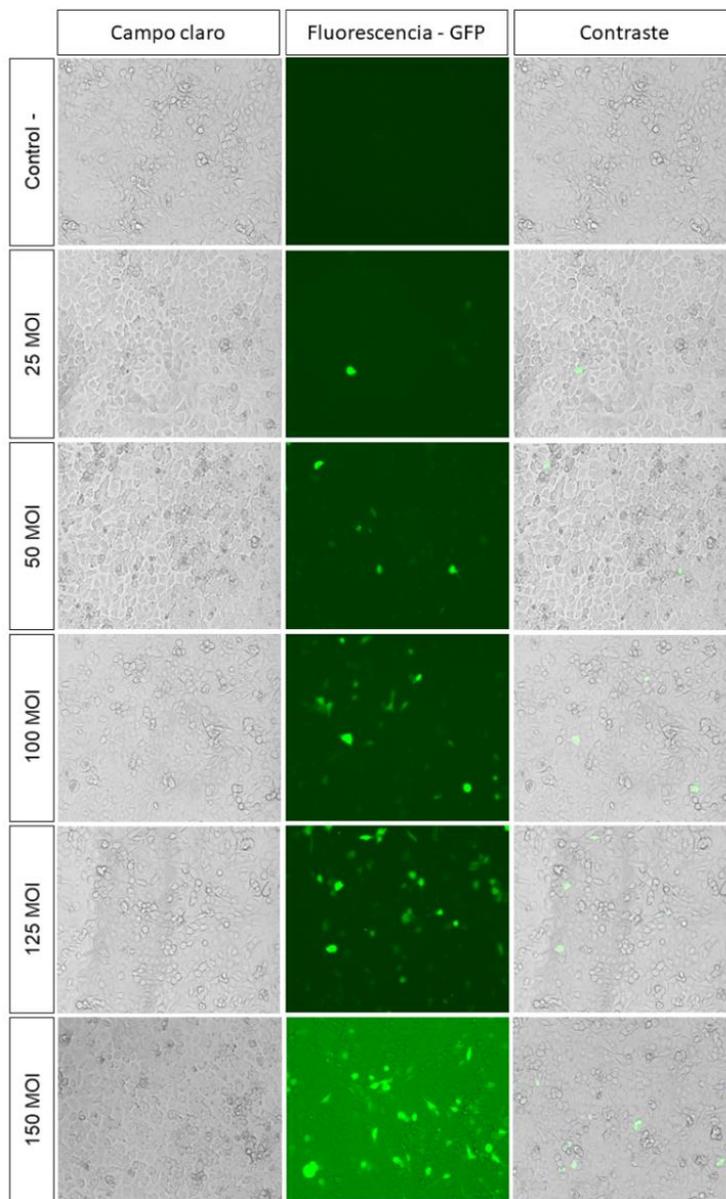
Etapas 2. Infección de células GMGE con el vector adenoviral amplificado

Diferencia de expresión recombinante entre MOIs

La capacidad de infección del vector adenoviral en células GMGE se evidenció a partir de un ensayo comparativo con distintos MOIs adenoviral. En la Figura 10 se observa las diferencias en expresión recombinante y en la morfología de las células para tratamiento.

Figura 10

Ensayo de infectividad de un vector adenoviral que expresa un anticuerpo humano recombinante a distintos MOIs en la línea celular GMGE

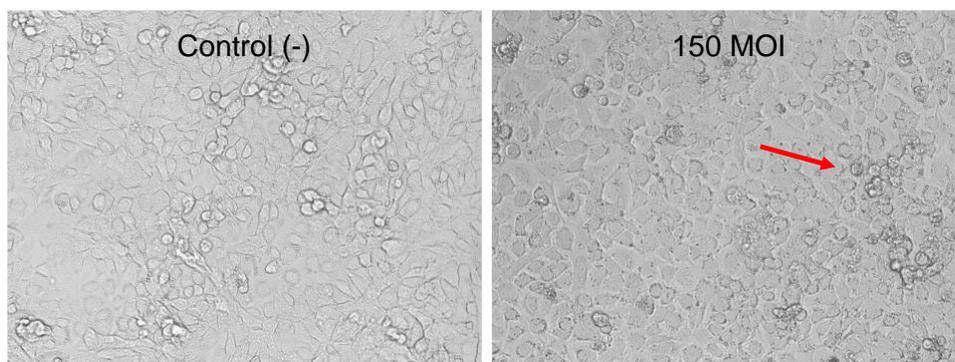


Nota. Las fotografías fueron capturadas con un aumento de 100x en campo claro (columna izquierda), campo con emisión de fluorescencia GFP (columna media) y un contraste de ambos campos (columna derecha).

De acuerdo a la Figura 10, la diferencia de expresión de proteínas entre cada MOI es evidente por la cantidad de células infectadas y la intensidad de la fluorescencia que presenta cada tratamiento. Estos resultados sugieren que a mayor MOI, mayor es la intensidad de fluorescencia, y con ello, de expresión recombinante. Además, diferencias en la morfología de las células y la presencia de vacuolas y restos celulares se evidenciaron únicamente en las células infectadas con un MOI de 150 UFC por célula (Figura 11).

Figura 11

Diferencias morfológicas en células control (-) y en células infectadas con un vector adenoviral a un MOI de 150 UFC por célula a las 72 horas post infección



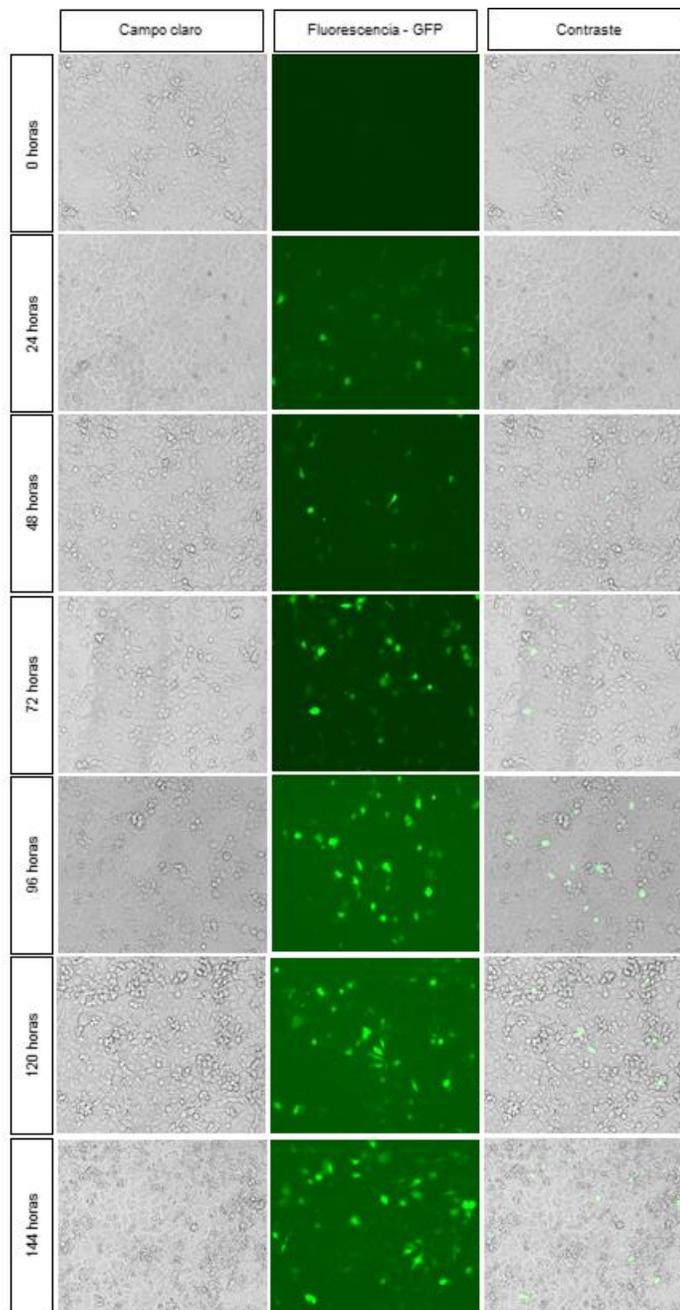
Nota. Existe presencia de aglomerados tanto en células control (-) como en aquellas infectadas con adenovirus, sin embargo, en las células infectadas se observa gran cantidad de vacuolas y aglomeraciones de células retraídas como la indicada en la imagen derecha.

Expresión del anticuerpo humano recombinante a través del tiempo

La expresión del anticuerpo humano recombinante en el transcurso del tiempo se evidenció a partir del análisis de la infección adenoviral con un MOI de 125 UFC por célula. En la Figura 12 se observa el incremento de la intensidad de la fluorescencia en el citoplasma celular cada 24 horas de análisis, mas no un incremento en el número de células infectadas.

Figura 12

Ensayo de infectividad de un vector adenoviral a través del tiempo en células GMGE transducidas con un MOI de 125 UFC por célula

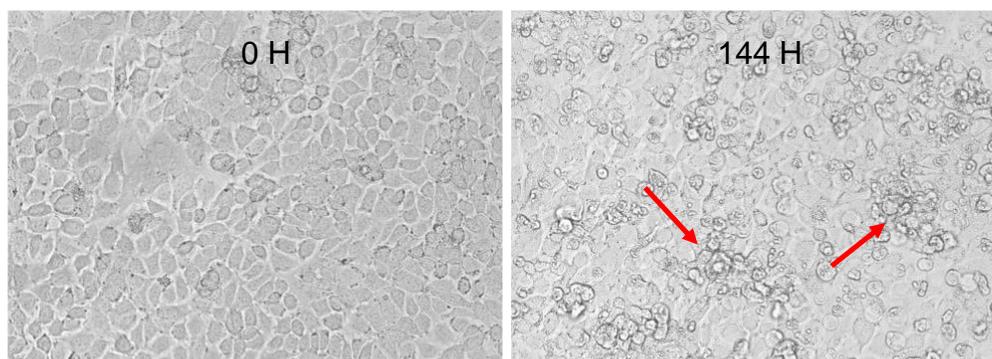


Nota. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 100x en campo claro (columna izquierda), campo con emisión de fluorescencia GFP (columna media) y un contraste de ambos campos (columna derecha).

Hasta las 48 horas de la infección, las células mantenían una distribución homogénea y de una sola capa, para a partir de las 48 horas, formar aglomeraciones que se mantuvieron adheridas a la placa de cultivo (Figura 12). Además, no se observó desplegamiento evidente de las células durante las 144 horas de infección que fueron analizadas.

Figura 13

Diferencias morfológicas en células GMGE infectadas con un MOI adenoviral de 125 UFC por célula a las 0 horas y 144 horas post infección



Nota. Las células en un tiempo 0 de infección se distribuyen homogéneamente visualizándose como una monocapa celular, mientras que, a las 144 horas de infección, existe la presencia de aglomerados en forma de domos adheridos a la placa de cultivo.

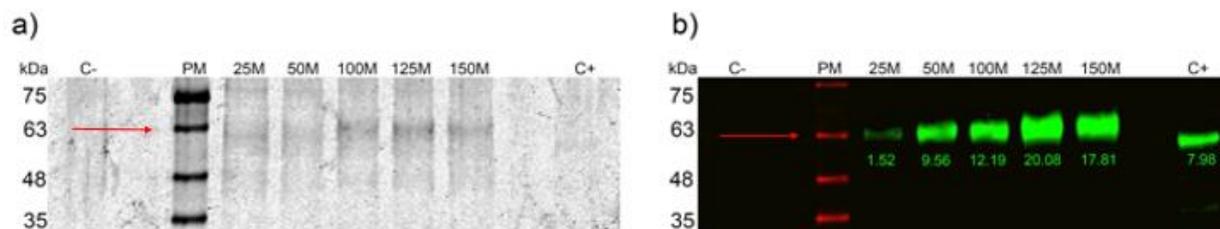
Etapas 3. Análisis de la expresión de la proteína

Diferencia de expresión recombinante entre MOIs

Mediante inmuno-detección se evidenció la expresión de una proteína con un peso molecular aproximado de 63 kDa en todos los tratamientos con distintos MOIs. En la Figura 14 se observa la diferencia en la intensidad de las bandas, presentando una mayor intensidad aquellas pertenecientes a los tratamientos con una mayor cantidad de vectores adenovirales por célula.

Figura 14

SDS PAGE (10%) y Western Blot de las muestras recolectadas de cada tratamiento con distintos MOIs (25, 50, 100, 125 y 150 UFC por célula) a las 72 horas post infección



Nota. La proteína detectada en todos los tratamientos presenta un peso molecular aproximado de 63 kDa. Los números debajo de las bandas corresponden a su cuantificación a partir de la intensidad de la fluorescencia detectada por el software ImageJ. El control positivo (C+) corresponde a un anticuerpo humano IgG comercial con afinidad hacia el mismo antígeno que el anticuerpo humano recombinante expresado en este estudio. (PM) Marcador de peso molecular tris-glicina (AccuRuler RGB MaestroGen, EE. UU).

Análisis estadístico

La producción de la proteína mediante distintos MOI se evaluó a través de la expresión relativa de acuerdo a la intensidad de fluorescencia de las bandas en el Western Blot y su normalización. Para esta variable, el análisis de varianza (ANOVA) presentó diferencias estadísticas altamente significativas, y no hubo diferencias estadísticas para las repeticiones (Tabla 2). A partir de este análisis se puede concluir que los MOIs sí contribuyeron en la expresión de los anticuerpos recombinantes.

Tabla 2

Análisis de varianza para la expresión relativa de los anticuerpos recombinantes de cada tratamiento con a las 72 horas de infección adenoviral

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F calculado	Valor P
MOI	4	1.796	24.40	0.0045*
Réplica	1	0.008334	0.1133	0.7534 ^{ns}
Residual	4	0.07359		

Nota. Valor: $p < 0.01$ (**), no se presentaron diferencias significativas (ns).

El MOI de 125 UFC por célula produjo la mayor expresión relativa de proteínas recombinantes, sin embargo, fue estadísticamente similar al MOI de 100 y 150 (Tabla 3). Por lo tanto, se concluye que este es el rango de MOI que produce una mayor expresión del anticuerpo recombinante.

Tabla 3

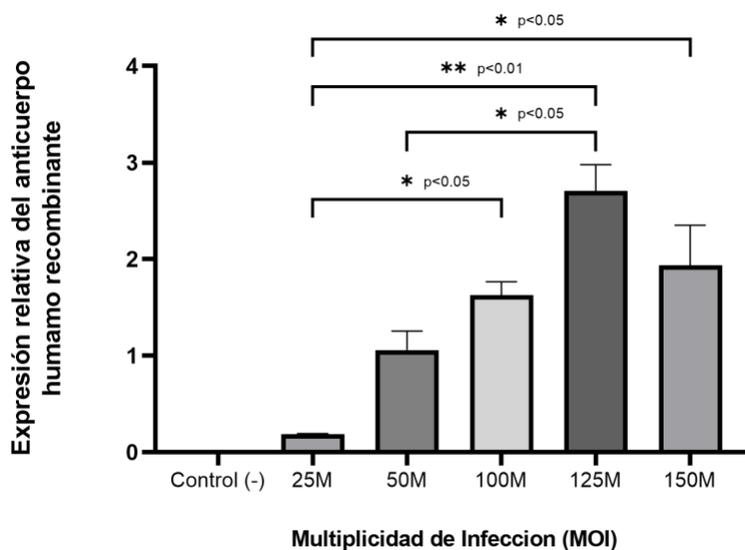
Análisis de medias (Tukey 5%) para la variable intensidad de la banda de Western Blot de la expresión del anticuerpo recombinante a las 72 horas de la infección adenoviral

MOI	Expresión relativa media	Grupo de Tukey
25M	0.1833	C
50M	1.058	BC
100M	1.625	AB
125M	2.706	A
150M	1.938	AB

Nota. Las medias con una letra en común, no son significativamente distintas ($p \geq 0.05$).

Figura 15

Expresión relativa del anticuerpo humano recombinante de cada tratamiento con distinto MOI adenoviral a las 72 horas de infección



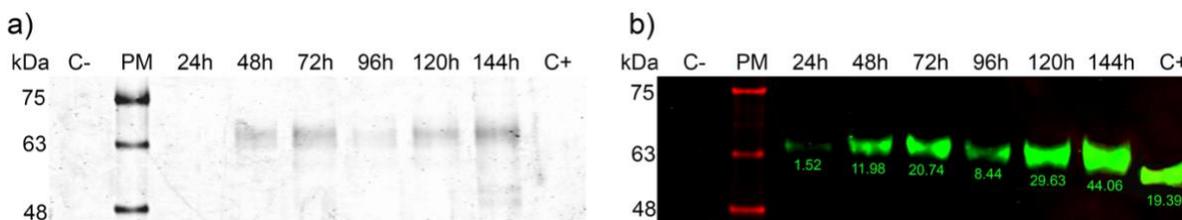
Nota. Los datos se expresan como media \pm Desviación Estándar (D.E.). La significación estadística entre grupos se determinó mediante ANOVA de una vía de comparaciones múltiples, a partir del test de Tukey. Valor: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), no se presentaron diferencias significativas (ns).

Expresión del anticuerpo recombinante a través del tiempo

Mediante inmuno-detección se evidenció la presencia de proteínas humanas durante todas las horas de estudio (24 a 144 horas) como se muestra en la Figura 16. Considerando que hubo un cambio de medio total a las 72 horas post infección (después de haber tomado la muestra de aquel día), los resultados sugieren una expresión progresiva de proteínas durante las 144 horas de estudio.

Figura 16

SDS PAGE (10%) y Western Blot de las muestras recolectadas cada 24 horas del ensayo de expresión recombinante de un anticuerpo humano mediante un MOI de 125 UFC por célula



Nota. La proteína detectada presenta un peso molecular aproximado de 63 kDa. Los números debajo de las bandas corresponden a su cuantificación a partir de la intensidad de la fluorescencia detectada por el software ImageJ. El control positivo (C+) corresponde a un anticuerpo humano IgG comercial con afinidad hacia el mismo antígeno que el anticuerpo humano recombinante expresado en este estudio. (PM) Marcador de peso molecular tris-glicina (AccuRuler RGB MaestroGen, EE. UU).

Análisis estadístico

La producción de la proteína en el tiempo se evaluó mediante la expresión relativa de acuerdo a la intensidad de fluorescencia de la banda de Western Blot y su normalización para las muestras tomadas cada 24 horas post infección. Para esta variable, se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar el comportamiento de la expresión recombinante mediante la ecuación de la recta generada (Tabla 4). Este análisis permite concluir que la expresión relativa de los anticuerpos recombinantes varió significativamente cada 24 horas después de la infección, y que hasta las 144 horas de análisis, presentó una tendencia positiva de crecimiento en relación a la producción.

Tabla 4

Análisis de regresión lineal para la expresión relativa de los anticuerpos humanos recombinantes a las distintas horas post infección adenoviral

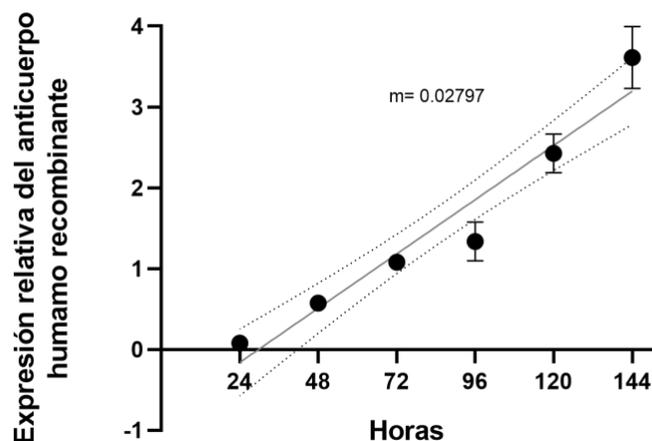
Fuente de variación	Pendiente	R ²	Prob>F
Expresión de anticuerpos	0.02797	0.9231	<0.0001***

Nota. ***Diferencias altamente significativas (Valor $p < 0.001$).

La disminución de expresión del anticuerpo a las 96 horas se debe al cambio de medio realizado a 72 horas en el que se retiró completamente el medio de cultivo junto con las proteínas expresadas hasta ese día. Sin embargo, la expresión del anticuerpo continuó en aumento durante las siguientes horas de estudio, incrementando hasta 3 veces más la concentración de proteínas producidas desde las primeras 24 horas post infección

Figura 17

Expresión relativa del anticuerpo humano recombinante con un MOI de 125 con intervalos de 24 horas de infección hasta 6 días de estudio



Nota. Los datos se expresaron como media \pm D.E. La pendiente de la recta es de 0.02797, mostrando una tendencia positiva hasta finalizar los 6 días de estudio.

Capítulo V: Discusión

La eficiencia y seguridad de la terapia a partir de anticuerpos humanos recombinantes para distintas enfermedades ha generado un incremento de la demanda en la industria farmacéutica (Tsumoto et al., 2019). Por ello, nuevas formas de producción son continuamente evaluadas para aumentar el rendimiento, disminuir los costos de producción y por lo tanto reducir los costos del medicamento (Kelley, 2009). Entre las distintas formas de producción, He et al. (1998) y Robbins & Ghivizzani (1998) proponen el uso de adenovirus como vectores de transferencia de genes codificantes de proteínas. La ventaja de usar adenovirus es su capacidad de acoplamiento de constructos genéticos de hasta 7.5 kb, su alta capacidad de infección a distintos tipos de células y tejidos, y su alta tasa de replicación (Luo et al., 2007). En este proyecto se estudió un vector adenoviral que contenía un casete de expresión de un anticuerpo humano recombinante de una sola cadena, y fue elaborado a partir de la tecnología Adeasy por el Laboratorio de Fisiopatología y Fármacos de la Universidad de Concepción, Chile.

Durante la primera fase del proyecto, el vector adenoviral se amplificó para comprobar su capacidad replicativa y obtener un título viral suficiente para su uso en ensayos posteriores. En la Figura 8, se observa el aumento de la intensidad de fluorescencia de GFP y del número de células infectadas. Este incremento en el tiempo de la expresión de GFP fue un indicativo de una correcta expresión y replicación adenoviral en células HEK293A a partir de un MOI de 5 UFC por célula, resultados similares a los obtenidos por Wei et al. (2017). Un factor esencial para la adecuada amplificación del vector adenoviral, fue el uso de células HEK293A por la presencia del gen en *trans* E1 en su genoma, indispensable para la replicación y empaquetamiento de vectores adenovirales no replicativos como el usado en este trabajo (Wu et al., 2014).

Los cambios morfológicos de las células HEK293A iniciaron con una retracción celular durante las primeras 24 horas de la infección, y avanzaron hasta adoptar una forma

redondeada producto del desprendimiento celular, aspecto también observado por Nowak-Terpiłowska et al. (2021). Según Walters et al. (2002), durante la etapa temprana de la infección adenoviral (30-60h), gran cantidad de pentosas y fibras son liberadas de las células infectadas hacia el medio extracelular; estas estructuras de la cápsula del adenovirus interactúan con los receptores CAR, heparán-sulfato e integrinas de las células HEK293 y provocan la disociación de las uniones estrechas entre células, lo que genera retracción celular (Walters et al., 2002). Según Siqueira-Silva et al. (2009) esta es una estrategia del ciclo viral del adenovirus para disponer de mayor superficie celular y continuar con su infección y replicación, lo cual también se evidenció en los resultados obtenidos en este ensayo, ya que el número de células infectadas incrementaron significativamente a través del tiempo. Además, se observó un cambio en la coloración del medio de cultivo durante la infección a un ritmo más rápido que en condiciones habituales, lo cual se atribuye al cambio de pH por la metabolización de los nutrientes del medio de cultivo y por los restos celulares generados por los efectos citotóxicos de la infección (Agilent Technologies, 2016).

La purificación del vector adenoviral mediante un gradiente de cloruro de cesio separó las partículas adenovirales infecciosas de las partículas defectuosas en bandas claramente distinguibles, lo que es descrito por Agilent Technologies (2016). En la Figura 9 se observaron las dos bandas, siendo la de mayor grosor aquella con las partículas adenovirales infecciosas, por lo que la mayor parte de los adenovirus amplificados se encontraban íntegros junto con el casete de expresión del anticuerpo humano de interés, resultando en un proceso exitoso de infección como lo menciona Armendáriz-Borunda et al. (2011). Según Agilent Technologies (2016), para que las bandas generadas puedan ser visibles en el gradiente, el título del vector adenoviral debe corresponder a un mínimo de $1 * 10^9$ UFC/mL, lo cual estuvo acorde al título final obtenido en este ensayo de aproximadamente $15 * 10^9$ UFC/mL en 3.2 mL .

El ensayo realizado para identificar la multiplicidad de infección óptima de vectores adenovirales en la línea celular de glándula mamaria de cabra se realizó a partir del adenovirus

previamente amplificado. Este ensayo de infectividad permitió observar los cambios en el fenotipo celular producidos por la infección adenoviral, y también comprobar la receptividad de las células GMGE a los vectores adenovirales (Agilent Technologies, 2016).

Como se observa en la Figura 14, la proteína expresada presentó un peso aproximado de 63kDa, que corresponde con el diseño bioinformático de la proteína en estudio cuyo peso molecular se predijo en un aproximado de 58 kDa con un sitio potencial de glicosilación.

Debido a que el anticuerpo expresado presentó un peso molecular mayor al previsto, este resultado sugiere que hubo presencia de modificaciones post traduccionales en su estructura. Según Sánchez et al. (2007), la línea celular de glándula mamaria utilizada, indujo la polifucosilación y la N,N'-diacetilactosediainilación de los N-glicanos de la eritropoyetina humana recombinante. Por ello, se sugiere que el anticuerpo humano recombinante sufrió de modificaciones post traduccionales similares a los que se desarrollarían en la glándula mamaria de una cabra (Ogorevc et al., 2017).

Cabe recalcar que el control positivo usado en la inmuno-detección es un anticuerpo humano recombinante comercial que tiene como objetivo el mismo antígeno y que a diferencia del anticuerpo presentado en este estudio, sí posee todas las cadenas de un IgG. Por ello, la banda visualizada corresponde a la cadena pesada de su estructura de 50 kDa.

Para cuantificar la expresión del anticuerpo recombinante, se evaluaron las muestras a las 72 horas post transducción adenoviral, ya que se ha evidenciado mayores niveles de expresión proteica en este tiempo (Mancia et al., 2004). En la Figura 15 se observa que la expresión de anticuerpos recombinantes se produjo en todos los tratamientos estudiados, y se obtuvieron tres grupos de significancia estadística, y a pesar de la similitud estadística entre los MOIs de 100, 125 y 150 (rango A), se evidenció una mayor intensidad de fluorescencia en la banda de 125M, lo que sugiere a este MOI como el óptimo para obtener la mayor producción de proteínas recombinantes en las condiciones de este ensayo. Según Kossila et al. (2002), la eficiencia de expresión de proteínas recombinantes está directamente relacionada con la

eficiencia de la infección adenoviral a través de los receptores CAR de las células. En un estudio de Gaillet et al. (2007) se diseñaron líneas celulares CHO que expresaban un transactivador (CHO-cTA) y células CHO que además sobre expresaban receptores CAR (CHO-cTA-CAR) para la producción de proteínas recombinantes a partir de vectores adenovirales; y en la evaluación de distintos MOIs adenovirales en un rango de 50 a 500 UFC por células, se encontró que el MOI óptimo fue de 500 para ambas líneas celulares, pero con una mayor producción de proteínas en las células CHO-cTA-CAR. Estos resultados confirman la relación de los receptores CAR con la eficiencia de la infección adenoviral y consecuentemente con la producción de proteínas recombinantes.

En el estudio de Gaillet et al. (2007) la expresión de proteínas recombinantes fue directamente proporcional y progresiva con el MOI adenoviral infectado hasta un MOI de 500; mientras que en el estudio de (Wen et al., 2018) se evaluó la expresión de una proteína recombinante en un rango de 10 a 1250 MOI en células madre mesenquimales de médula ósea humana, en el que se evidenció una disminución de la expresión recombinante al MOI de 1250. Según, Siqueira-Silva et al. (2009) al igual que en la línea celular HEK-293A, MOIs muy elevados, generan un exceso de fibras y pentosas que saturan a los receptores CAR de las células y afectan en la adhesión y en las uniones estrechas de las células. Por ello, la saturación de estos receptores provoca efectos citotóxicos y con ellos la destrucción de la mono capa celular que afecta la expresión de proteínas (Lv et al., 2019; Suchman & Blair, 2007), aspecto que aparentemente sucede con el MOI 150 en este estudio.

En el estudio de Parra et al. (2019), se infectaron células proveniente de cáncer cervicouterino que contiene el virus del papiloma humano subtipo 16 (SiHa) con un vector adenoviral que codificaba a un anticuerpo humano recombinante. El MOI de infección óptimo para la mayor producción de la proteína fue de 80, según el análisis realizado a las 72 horas después de la infección (Parra et al., 2019). Estos resultados sugieren una mayor receptividad

por parte de las células SiHa hacia la infección adenoviral, en comparación con las células GMGE, lo cual pudo deberse a una mayor cantidad de receptores CAR en células humanas.

Para los resultados obtenidos, debido a que la producción de proteínas recombinantes con los MOIs de 100, 125 y 150 UFC por célula presentan similitud estadística, no resulta claro si la expresión de proteínas recombinantes se puede incrementar con la exposición de MOIs más altos, o, por el contrario, podría disminuir su expresión. Por ello, estudios de infectividad con un rango más amplio de MOI podría ayudar a aclarar este comportamiento.

En relación a la producción del anticuerpo a través del tiempo, en la Figura 16 se presenta un aumento progresivo de la expresión recombinante hasta las 144 horas del estudio. A pesar de que no existen estudios relacionados a la producción de proteínas recombinantes en células de glándula mamaria de cabra que analicen la expresión recombinante después de las 72 horas, la evaluación de la expresión en otros tipos de células evidencia una producción proteica de hasta 20 días post infección (Xu et al., 2013). En un estudio de (Xu et al., 2013) se evaluaron dos proteínas recombinantes en células progenitoras de médula ósea de cabra (BMPCs) y se demostró que la mayor expresión para ambas moléculas fue a las 96 y 144 horas post infección. Por otro lado, Wen et al. (2018) produjo un factor de crecimiento en células madre mesenquimales de médula ósea (BMSC) a partir de un MOI adenoviral de 250, y obtuvo la mayor expresión recombinante a las 72 horas después de la infección. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que la expresión de la proteína pueda continuar después de las 144 horas, tiempo hasta que se evaluó en este estudio, especialmente porque a este tiempo no se evidenció disminución de la tendencia de producción del anticuerpo.

Según (Sánchez et al., 2007), la línea celular GMGE responde bien a la inhibición de la proliferación por contacto, lo cual podría resultar ventajoso en la producción de proteínas recombinantes por la necesidad de mantener un control de proliferación de las células infectadas (Donaldson et al., 2021). Además, dentro de los cambios morfológicos que se desarrollaron en la línea celular a través del tiempo, no se observó ningún cambio evidente, ni

desprendimiento de las células, pero sí la generación de aglomerados celulares en forma de domos a partir de las 72 horas de la infección. Este mismo comportamiento lo evidenció (Sánchez et al., 2007) durante el desarrollo de la línea celular, lo que se debió a la senescencia del cultivo celular, exceptuando aquellas células que eran parte del domo. Sin embargo, el desarrollo de estas estructuras no fue un limitante en la expresión del anticuerpo, puesto que la producción siguió en aumento hasta las 144 horas a pesar de la formación de los domos a partir de las 120 horas.

Con ello, los resultados analizados comprobaron la integridad del vector adenoviral a partir de la infección y replicación exitosa en la línea celular HEK-293A. Además, la infección con vectores adenovirales en la línea celular GMGE demostró su receptividad a la producción de proteínas recombinantes y la presencia de maquinaria de generación de modificaciones post-traduccionales. Por tanto, se concluye que el vector adenoviral utilizado presenta una capacidad infectiva íntegra para la producción *in vivo* de proteínas recombinantes humanas en glándula mamaria de cabra, y se sugieren estudios complementarios para analizar la viabilidad de la producción de anticuerpos recombinantes en células GMGE.

Conclusiones

- Se obtuvieron $50 * 10^9$ UFC de adenovirus infectivo a partir de la amplificación de un vector adenoviral en células HEK293A y su purificación mediante un gradiente de cloruro de cesio.
- La línea celular GMGE expresó anticuerpos humanos a partir de la infección con vectores adenovirales. La condición óptima para la expresión recombinante es a través de un MOI adenoviral de 125 UFC por célula.
- La producción de anticuerpos humanos recombinantes, hasta el día 6, presentó una tendencia positiva de expresión, incrementando hasta 3 veces más la concentración de proteínas producidas desde las primeras 24 horas post infección.
- La eficiencia de infección de los vectores adenovirales depende de la cantidad de receptores CAR que poseen las células huésped.
- La línea celular GMGE generó modificaciones post traduccionales en los anticuerpos humanos expresados.

Recomendaciones

- Realizar ensayos de producción de proteínas recombinantes a partir de MOIs de infección más altos que los analizados en este estudio para comprobar la receptividad de las células GMGE a concentraciones altas de adenovirus y su efecto en la expresión proteica.
- Realizar ensayos de producción de proteínas recombinantes en células GMGE durante un rango de tiempo mayor al analizado en este estudio (6 días) para determinar la cinética de producción de proteínas. Especialmente para identificar el tiempo en el que la expresión recombinante alcanza su máxima concentración.

Bibliografía

- Abaandou, L., Quan, D., & Shiloach, J. (2021). Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. *Cells*, *10*(7), 1667. <https://doi.org/10.3390/cells10071667>
- Agilent Technologies. (2016). *AdEasy Adenoviral Vector System Instruction Manual*. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/240009.pdf>
- Alvarado-Madrigal, M. F., Chavarría-Quirós, T., Leiva-Montero, B., & Mora-Román, J. J. (2019). Recombinant protein production from transgenic animals: Systems and applications. *Revista Tecnología En Marcha*, *32*(4), 133–144. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i4.4798>
- Amann, T., Schmieder, V., Fastrup Kildegaard, H., Borth, N., & Andersen, M. R. (2019). Genetic engineering approaches to improve posttranslational modification of biopharmaceuticals in different production platforms. *Biotechnology and Bioengineering*, *116*(10), 2778–2796. <https://doi.org/10.1002/bit.27101>
- An, L., Yang, L., Huang, Y., Cheng, Y., & Du, F. (2019). Generating Goat Mammary Gland Bioreactors for Producing Recombinant Proteins by Gene Targeting. *Methods Mol Biol*, *1874*, 391–401. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0_23
- Armendáriz-Borunda, J., Bastidas-Ramírez, B. E., Sandoval-Rodríguez, A., González-Cuevas, J., Gómez-Meda, B., & García-Bañuelos, J. (2011). Production of first generation adenoviral vectors for preclinical protocols: Amplification, purification and functional titration. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *112*(5), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.07.018>
- Ascoli, C. A., & Aggeler, B. (2018). Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *BioTechniques*, *65*(3), 127–136. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>
- Aziz, M., Iheanacho, F., & Hashmi, M. F. (2022). Physiology, Antibody. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546670/>
- Bates, A., & Power, C. A. (2019). David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical

- Prospects of Antibody Fragments. *Antibodies*, 8(2), 28.
<https://doi.org/10.3390/antib8020028>
- Bayer, V. (2019). An Overview of Monoclonal Antibodies. *Semin Oncol Nurs*, 35(5), 150927.
<https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.006>
- Bi, Y., Gu, L., Wang, J., Chang, Y., Jin, M., Mao, Y., Wang, H., & Ji, G. (2021). A Novel System for Simple Rapid Adenoviral Vector Construction to Facilitate CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing. *The CRISPR Journal*, 4(3), 381–391.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0110>
- Biaggio, R. T., Abreu-Neto, M. S., Covas, D. T., & Swiech, K. (2015). Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation. *Bioprocess Biosyst Eng*, 38(8), 1495–1507. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1392-9>
- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–24.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
- Burnette, W. N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112(2), 195–203.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Carrara, S. C., Ullitzka, M., Grzeschik, J., Kornmann, H., Hock, B., & Kolmar, H. (2021). From cell line development to the formulated drug product: The art of manufacturing therapeutic monoclonal antibodies. *International Journal of Pharmaceutics*, 594, 120164.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120164>
- Castelli, M. S., McGonigle, P., & Hornby, P. J. (2019). The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(6), e00535. <https://doi.org/10.1002/prp2.535>
- Chai, Y.-R., Cao, X.-X., Ge, M.-M., Mi, C.-L., Guo, X., & Wang, T.-Y. (2020). Knockout of cytidine

- monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase in Chinese hamster ovary cells by CRISPR/Cas9-based gene-editing technology. *Biochemical Engineering Journal*, 161, 107663. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107663>
- Chang, J. (2021). Adenovirus Vectors: Excellent Tools for Vaccine Development. *Immune Network*, 21(1). <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e6>
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., & Mehtali, M. (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 70(7), 4805–4810. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.7.4805-4810.1996>
- Clark, A. J. (1998). The Mammary Gland as a Bioreactor: Expression, Processing, and Production of Recombinant Proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3(3), 337–350. <https://doi.org/10.1023/A:1018723712996>
- Coughlan, L. (2020). Factors Which Contribute to the Immunogenicity of Non-replicating Adenoviral Vectored Vaccines. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00909>
- Diaz, O. (2021). *Development of adenoviral vectors armed with TNF-related therapeutic proteins for gene therapy*: [University of Groningen]. <http://hdl.handle.net/11370/a6c8d929-4606-467f-9753-3f6a46e474b3>
- Donaldson, J. S., Dale, M. P., & Rosser, S. J. (2021). Decoupling Growth and Protein Production in CHO Cells: A Targeted Approach. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.658325>
- Donini, R., Haslam, S. M., & Kontoravdi, C. (2021). Glycoengineering Chinese hamster ovary cells: a short history. *Biochemical Society Transactions*, 49(2), 915–931. <https://doi.org/10.1042/BST20200840>
- Dyck, M., Lacroix, D., Pothier, F., & Sirard, S. (2003). Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications. *Trends in Biotechnology*, 21(9).

[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00190-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00190-2)

Fallahi, S., & Mohammadhassan, R. (2020). A Review of Pharmaceutical Recombinant Proteins and Gene Transformation Approaches in Transgenic Poultry. *Journal of Tropical Life Science*, *10*(2), 163–173. <https://doi.org/10.11594/jtls.10.02.09>

Farnós, O., Gelaye, E., Trabelsi, K., Bernier, A., Subramani, K., Kallel, H., Yami, M., & Kamen, A. A. (2020). Establishing a Robust Manufacturing Platform for Recombinant Veterinary Vaccines: An Adenovirus-Vector Vaccine to Control Newcastle Disease Virus Infections of Poultry in Sub-Saharan Africa. *Vaccines*, *8*(2), 338. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020338>

Gaillet, B., Gilbert, R., Amziani, R., Guilbault, C., Gadoury, C., Caron, A. W., Mullick, A., Garnier, A., & Massie, B. (2007). High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch. *Biotechnol Prog*, *23*(1), 200–209. <https://doi.org/10.1021/bp060187j>

Gao, G. P., Yang, Y., & Wilson, J. M. (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *Journal of Virology*, *70*(12), 8934–8943. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.12.8934-8943.1996>

Ghanbari, M., Ivantsova, M., Atambire, A., & Kanwugu, O. (2022). *An overview of transgenic animals: Benefits, risks, and regulations*. <https://doi.org/10.1063/5.0068972>

Gibco. (2020). *gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>

Grilo, A. L., & Mantalaris, A. (2019). The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends in Biotechnology*, *37*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014>

He, T.-C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(5), 2509–2514.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19394/>

- Hernandez, I., Bott, S. W., Patel, A. S., Wolf, C. G., Hospodar, A. R., Sampathkumar, S., & Shrank, W. H. (2018). Pricing of monoclonal antibody therapies: higher if used for cancer? *Am J Manag Care*, *24*(2), 109–112.
- Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., & Friess, W. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, *100*, 94–100. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2016.01.005>
- Hörner, S., Moustafa-Oglou, M., Teppert, K., Hagelstein, I., Kauer, J., Pflügler, M., Neumann, K., Rammensee, H.-G., Metz, T., Herrmann, A., Salih, H. R., Jung, G., & Zekri, L. (2022). IgG-Based Bispecific Anti-CD95 Antibodies for the Treatment of B Cell-Derived Malignancies and Autoimmune Diseases. *Cancers*, *14*(16), 3941. <https://doi.org/10.3390/cancers14163941>
- Hua, R., Liu, J., Li, Y., Fan, Y., Zeng, B., Geng, G., & Li, Q. (2021). Novel Functional Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone Acquired from Goat Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07208>
- Hunter, P. (2019). The prospects for recombinant proteins from transgenic animals. *EMBO Reports*, *20*(8), e48757. <https://doi.org/10.15252/embr.201948757>
- Ingle, A. D. (2019). *Alternatives and Refinement for Animal Experimentation in Cancer Research* (H. Kojima, T. Seidle, & H. Spielmann (eds.); pp. 69–75). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2447-5_9
- Jennings, M. R., & Parks, R. J. (2023). Human Adenovirus Gene Expression and Replication Is Regulated through Dynamic Changes in Nucleoprotein Structure throughout Infection. *Viruses*, *15*(1), 161. <https://doi.org/10.3390/v15010161>
- Kelley, B. (2009). Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at

- a crossroads. *MAbs*, 1(5), 443–452. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.5.9448>
- Khaing, K. K., Rangnoi, K., Michlits, H., Boonkerd, N., Teaumroong, N., Tittabutr, P., & Yamabhai, M. (2021). Application of Recombinant Human scFv Antibody as a Powerful Tool to Monitor Nitrogen Fixing Biofertilizer in Rice and Legume. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e02094-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.02094-21>
- Kholodenko, R. V., Kalinovsky, D. V., Doronin, I. I., Ponomarev, E. D., & Kholodenko, I. V. (2019). Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations. *Curr Med Chem*, 26(3), 396–426. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170817152554>
- Kim, Y. J., Han, S. K., Yoon, S., & Kim, C. W. (2020). Rich production media as a platform for CHO cell line development. *AMB Express*, 10(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01025-3>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Koontz, L. (2014). TCA Precipitation. In *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 3–10). Elsevier. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012420119400001X>
- Kossila, M., Jauhiainen, S., Laukkanen, M. O., Lehtolainen, P., Jääskeläinen, M., Turunen, P., Loimas, S., Wahlfors, J., & Ylä-Herttuala, S. (2002). Improvement in Adenoviral Gene Transfer Efficiency after Preincubation at +37°C in Vitro and in Vivo. *Molecular Therapy*, 5(1), 87–93. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0516>
- Kumar, R., Parray, H. A., Shrivastava, T., Sinha, S., & Luthra, K. (2019). Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 907–918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage {T4}. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Laible, G., Cole, S., Brophy, B., Maclean, P., How Chen, L., Pollock, D. P., Cavacini, L., Fournier, N., De Romeuf, C., Masiello, N. C., Gavin, W. G., Wells, D. N., & Meade, H. M. (2020). Transgenic goats producing an improved version of cetuximab in milk. *FASEB BioAdvances*, 2(11), 638–652. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00059>
- Leiva, M. J., Parra, N. C., Contreras, M. A., Tavares, K. C. S., Macaya, L., Martins, L., Gaudencio, S., Hidalgo, Á., Kozak, R. P., González, A., Sánchez, O., Toledo, J. R., & Montesino, R. (2021). Expression and characterization of a novel single-chain anti-vascular endothelial growth factor antibody in the goat milk. *Journal of Biotechnology*, 338, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.06.025>
- Lestari, C. S. W., & Novientri, G. (2021). Advantages of yeast-based recombinant protein technology as vaccine products against infectious diseases. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 913(1), 12099. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/913/1/012099>
- Liu, J., & Seol, D.-W. (2020). Helper virus-free gutless adenovirus (HF-GLAd): A new platform for gene therapy. *BMB Reports*, 53. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.11.185>
- Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., & Wu, H.-C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
- Luo, J., Deng, Z.-L., Luo, X., Tang, N., Song, W.-X., Chen, J., Sharff, K. A., Luu, H. H., Haydon, R. C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & He, T.-C. (2007). A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nature Protocols*, 2(5), 1236–1247. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.135>
- Luo, S., Su, Y., Peng, X., Wang, S., Peng, J., & Ma, J. (2022). *Antigen-Specific Antibody Design and Optimization with Diffusion-Based Generative Models for Protein Structures*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.07.10.499510>
- Lv, Y., Xiao, F.-J., Wang, Y., Zou, X.-H., Wang, H., Wang, H.-Y., Wang, L.-S., & Lu, Z.-Z. (2019).

- Efficient gene transfer into T lymphocytes by fiber-modified human adenovirus 5. *BMC Biotechnology*, 19(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0514-x>
- Maga, E. A., & Murray, J. D. (1995). Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology (N Y)*, 13(13), 1452–1457. <https://doi.org/10.1038/nbt1295-1452>
- Mancia, F., Patel, S. D., Rajala, M. W., Scherer, P. E., Nemes, A., Schieren, I., Hendrickson, W. A., & Shapiro, L. (2004). Optimization of Protein Production in Mammalian Cells with a Coexpressed Fluorescent Marker. *Structure*, 12(8), 1355–1360. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.06.012>
- McDonnell, S., Principe, R. F., Zamprognio, M. S., Whelan, J., McDonnell, S., Principe, R. F., Zamprognio, M. S., & Whelan, J. (2022). *Challenges and Emerging Technologies in Biomanufacturing of Monoclonal Antibodies (mAbs)*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/online-first/84864>
- Mendonça, S. A., Lorincz, R., Boucher, P., & Curiel, D. T. (2021). Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *Npj Vaccines*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00356-x>
- Mizukami, A., Caron, A. L., Picanço-Castro, V., & Swiech, K. (2018). Platforms for Recombinant Therapeutic Glycoprotein Production. *Methods Mol Biol*, 1674, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5_1
- Mocombe, P. C. (2020). Genetic Engineering and Its Application in Animal Breeding: Review. *Archives in Biomedical Engineering & Biotechnology*, 4(4), 1–5. <https://irispublishers.com/abeb/fulltext/genetic-engineering-and-its-application-in-animal-breeding.ID.000595.php>
- Montesino, R., & Toledo, J. R. (2006). La glándula mamaria: biofábrica para la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnología Aplicada*, 23(4), 271–278. <https://biblat.unam.mx/es/revista/biotecnologia-aplicada/articulo/la-glandula-mamaria->

biofabrica-para-la-produccion-de-proteinas-recombinantes

- Moura, R. R., Melo, L. M., & Freitas, V. J. de F. (2011). Production of recombinant proteins in milk of transgenic and non-transgenic goats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 927–938. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000500010>
- Nambisan, P. (2017). Chapter 4 - Recombinant DNA Technology and Genetically Modified Organisms. In P. Nambisan (Ed.), *An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology* (pp. 83–126). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128092316000041>
- Nguyen, N. T. B., Lin, J., Tay, S. J., Mariati, null, Yeo, J., Nguyen-Khuong, T., & Yang, Y. (2021). Multiplexed engineering glycosyltransferase genes in CHO cells via targeted integration for producing antibodies with diverse complex-type N-glycans. *Scientific Reports*, 11(1), 12969. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92320-x>
- Noh, S. M., Shin, S., & Lee, G. M. (2019). Cell Line Development for Therapeutic Protein Production. In *Cell Culture Engineering* (pp. 23–47). John Wiley & Sons, Ltd. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527811410.ch2>
- Nowak-Terpiłowska, A., Śledziński, P., & Zeyland, J. (2021). Impact of cell harvesting methods on detection of cell surface proteins and apoptotic markers. *Braz J Med Biol Res*, 54(2), e10197. <https://doi.org/10.1590/1414-431X202010197>
- O’Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L. M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., & Butler, M. (2020). Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: {A} review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, 43, 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
- Ogorevc, J., Zorc, M., Dovč, P., Ogorevc, J., Zorc, M., & Dovč, P. (2017). *Development of an In Vitro Goat Mammary Gland Model: Establishment, Characterization, and Applications of Primary Goat Mammary Cell Cultures*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/57795>

- Parra, N. C., Mansilla, R., Aedo, G., Vispo, N. S., González-Horta, E. E., González-Chavarría, I., Castillo, C., Camacho, F., & Sánchez, O. (2019). Expression and Characterization of Human Vascular Endothelial Growth Factor Produced in SiHa Cells Transduced with Adenoviral Vector. *Protein J*, 38(6), 693–703. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09867-y>
- Pied, N., & Wodrich, H. (2019). Imaging the adenovirus infection cycle. *FEBS Letters*, 593(24), 3419–3448. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13690>
- Pucca, M., Bertolini, T., Barbosa, J., Galina, S., & Geciane, P. (2011). Therapeutic monoclonal antibodies: ScFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, 31–38. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>
- Puetz, J., & Wurm, F. M. (2019). Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes*, 7(8), 476. <https://doi.org/10.3390/pr7080476>
- Robbins, P. D., & Ghivizzani, S. C. (1998). Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 80(1), 35–47. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00020-5)
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sadovnikova, A., Garcia, S. C., & Hovey, R. C. (2021). A Comparative Review of the Extrinsic and Intrinsic Factors Regulating Lactose Synthesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 26(2), 197–215. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09491-6>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(4), pdb.prot4540. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4540>
- Sánchez, O, Montesino, R., Toledo, J. R., Rodríguez, E., Díaz, D., Royle, L., Rudd, P. M., Dwek,

- R. A., Gerwig, G. J., Kamerling, J. P., Harvey, D. J., & Cremata, J. A. (2007). The goat mammary glandular epithelial (GMGE) cell line promotes polyfucosylation and N,N'-diacetyllactosedi-aminylation of N-glycans linked to recombinant human erythropoietin. *Arch Biochem Biophys*, *464*(2), 322–334. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.027>
- Sánchez, Oliberto, Toledo, J. R., Rodríguez, M. P., & Castro, F. O. (2004). Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *J Biotechnol*, *114*(1–2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.009>
- Sanlay, G., Bekcioglu, O., & Başbınar, Y. (2020). A Review on The Development, Production Strategies, and Utilization of Monoclonal Antibodies. *JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES*, *4*(3). <https://doi.org/10.30621/jbachs.2020.1243>
- Santos, M. L. dos, Quintilio, W., Manieri, T. M., Tsuruta, L. R., & Moro, A. M. (2018). Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Braz. J. Pharm. Sci.*, *54*. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001007>
- Sanz, M. (2021). *Ubres de ovejas y cabras: Introducción a la anatomía y fisiología*. <https://aboutsmallruminants.com/es/aspectos-basicos-ubre-ovejas-cabras/>
- Shepard, M., Phillips, G. L., Thanos, C. D., & Feldmann, M. (2017). Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, *17*(3), 220–232. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.17-3-220>
- Singh, A., Mishra, A., & Verma, A. (2020). Chapter 17 - Antibodies: monoclonal and polyclonal. In A. S. Verma & A. Singh (Eds.), *Animal Biotechnology (Second Edition)* (pp. 327–352). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012811710100015X>
- Singh, S., Kumar, R., Agrawal, B., Singh, S., Kumar, R., & Agrawal, B. (2018). *Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/62883>

- Siqueira-Silva, J., Yeda, F. P., Favier, A.-L., Mezin, P., Silva, M. L., Barrella, K. M., Mehnert, D. Ú., Fender, P., & Hársi, C. M. (2009). Infection kinetics of human adenovirus serotype 41 in HEK 293 cells. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*, 736–744.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000500013>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, *111*, A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Su, Q., Sena-Esteves, M., & Gao, G. (2019). Purification of the Recombinant Adenovirus by Cesium Chloride Gradient Centrifugation. *Cold Spring Harb Protoc*, *2019*(5).
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095547>
- Suchman, E., & Blair, C. (2007, September). *Cytopathic Effects of Viruses Protocols*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Cytopathic-Effects-of-Viruses-Protocols-Suchman-Blair/01480caa434e24be4ea5855ba3fe4b15ca670859>
- Syyam, A., Nawaz, A., Ijaz, A., Sajjad, U., Fazil, A., Irfan, S., Muzaffar, A., Shahid, M., Idrees, M., Malik, K., & Afzal, S. (2022). Adenovirus vector system: construction, history and therapeutic applications. *BioTechniques*, *73*(6), 297–305. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0051>
- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.796991>
- The Antibody Society. (2023). Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US. In *The Antibody Society*. <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>
- Thermo Fisher Scientific. (2020). *MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf*.
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
- Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of

- Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00420>
- Truchet, S., & Honvo-Houéto, E. (2017). Physiology of milk secretion. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 31(4), 367–384. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>
- Tsumoto, K., Isozaki, Y., Yagami, H., & Tomita, M. (2019). Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy*, 11(2), 119–127. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0130>
- Walters, R. W., Freimuth, P., Moninger, T. O., Ganske, I., Zabner, J., & Welsh, M. J. (2002). Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*, 110(6), 789–799. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00912-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00912-1)
- Wang, C., Hong, J., Yang, Z., Zhou, X., Yang, Y., Kong, Y., Chen, B., Wu, H., Qian, B.-Z., Dimitrov, D. S., Zhou, X., Wu, Y., & Ying, T. (2022). Design of a Novel Fab-Like Antibody Fragment with Enhanced Stability and Affinity for Clinical use. *Small Methods*, 6(2), 2100966. <https://doi.org/10.1002/smt.202100966>
- Wang, Y., Han, Q., Cui, G., & Sun, J. (2019). Hiding Messages Based on DNA Sequence and Recombinant DNA Technique. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 18, 299–307. <https://doi.org/10.1109/TNANO.2019.2904842>
- Wei, Q., Fan, J., Liao, J., Zou, Y., Song, D., Liu, J., Cui, J., Liu, F., Ma, C., Hu, X., Li, L., Yu, Y., Qu, X., Chen, L., Yu, X., Zhang, Z., Zhao, C., Zeng, Z., Zhang, R., ... He, T.-C. (2017). Engineering the Rapid Adenovirus Production and Amplification (RAPA) Cell Line to Expedite the Generation of Recombinant Adenoviruses. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(6), 2383–2398. <https://doi.org/10.1159/000475909>
- Wen, Q., Zhang, S., Du, X., Wang, R., Li, Y., Liu, H., Hu, S., Zhou, C., Zhou, X., & Ma, L. (2018). The Multiplicity of Infection-Dependent Effects of Recombinant Adenovirus Carrying HGF Gene on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow

- Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 734.
<https://doi.org/10.3390/ijms19030734>
- Wold, W. S. M., & Toth, K. (2013). Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 13(6), 421–433.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507798/>
- Wu, N., Zhang, H., Deng, F., Li, R., Zhang, W., Chen, X., Wen, S., Wang, N., Zhang, J., Yin, L., Liao, Z., Zhang, Z., Zhang, Q., Yan, Z., Liu, W., Wu, D., Ye, J., Deng, Y., Yang, K., ... He, T.-C. (2014). Overexpression of Ad5 precursor terminal protein accelerates recombinant adenovirus packaging and amplification in HEK-293 packaging cells. *Gene Ther*, 21(7), 629–637. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.40>
- Xu, H. H., Liu, S. H., Guo, Q. F., Liu, Q. H., & Li, X. Y. (2013). Osteogenesis induced in goat bone marrow progenitor cells by recombinant adenovirus coexpressing bone morphogenetic protein 2 and basic fibroblast growth factor. *Braz J Med Biol Res*, 46(9), 809–814. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20132929>
- Xuan, R., Wang, J., Zhao, X., Li, Q., Wang, Y., Du, S., Duan, Q., Guo, Y., Ji, Z., & Chao, T. (2022). Transcriptome Analysis of Goat Mammary Gland Tissue Reveals the Adaptive Strategies and Molecular Mechanisms of Lactation and Involution. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14424. <https://doi.org/10.3390/ijms232214424>
- Yang, H., Wang, H., Wang, F., Zhang, K., Qu, J., Guan, J., Shen, W., Cao, Y., Xia, Y., & Chen, X. (2022). Efficient extracellular production of recombinant proteins in E. coli via enhancing expression of *dacA* on the genome. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(4), kuac016. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac016>
- Zahavi, D., & Weiner, L. (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 9(3), 34. <https://doi.org/10.3390/antib9030034>
- Zhang, T., Yuan, Y., Lu, R., Xu, S., Zhou, M., Yuan, T., Lu, Y., Yan, K., & Cheng, Y. (2019). The goat β -casein/CMV chimeric promoter drives the expression of hLF in transgenic goats

produced by cell transgene microinjection. *International Journal of Molecular Medicine*, 44(6), 2057–2064. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4382>

Apéndices