



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI-
ESFINGOMIELINASA-D EN CÉLULAS CHO RECOMBINANTES**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

GUILLERMO EDUARDO MALDONADO GARCÍA

DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Instituto de Investigaciones Biomédicas
DR. GERARDO CORZO BURGUETE
Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Marzo, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz. Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en los laboratorios C-132 y C-036, así como en la Unidad de Bioprocesos (a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán) del Departamento de Biotecnología y Biología Molecular.

Durante el trabajo experimental recibí una beca de maestría de CONACyT, además de haber contado con el apoyo económico otorgado a la Dra. Valdez del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT 220795, 178528, 181895 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA IN208415; PAPIIT 209113, 210013.

Además, recibí apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para participar en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en Guadalajara, Jalisco.

Y también se recibió apoyo técnico del Ing. Abel Blancas

Agradecimientos Personales

A la Dra. Adriana Valdez, por tener la paciencia y motivarme a terminar la tesis aun en momentos difíciles. Por sus consejos, guías y enseñanzas que llevaré toda mi vida. Gracias por aceptarme en su laboratorio y permitirme realizar una buena parte mi sueño profesional.

A todos mis compañeros de laboratorio y amigos Giroshi, Monse, Greta, Sara, Andres, Jessi, Darks, Diego, Andrea, Andreita, Saumel, Ram, Don Chaka, Dra. Marta y Mariana que siempre aportaron sus opiniones profesionales, personales, sus anécdotas, sus chistes, sus fiestas, sus ideas y comentarios que directa o indirectamente influenciaron mi persona y este trabajo.

A mis amigos Tocaio, Rurik, Nishel, Clauhz, Sr. Abundis, David, Pelucas que nunca han dejado de estar en mi vida que, con sus chistes, sus pláticas y sus vidas han cambiado quien soy y me han dado un lugar al cual pertenezco sin importar que tan lejos nos encontremos.

A Margarita por ser una fuente de inspiración, por ser una persona tan valiente, por ser mi motivadora y una luz en mi camino para continuar hacia adelante. Mi compañera en tierras lejanas, te agradezco tu preocupación y que siempre has estado para mí, siempre pendiente y siempre dispuesta a ayudarme. Gracias por todo, esta etapa concluida es por y para ti.

Y finalmente, a mis Padres a quienes debo todo lo que está escrito aquí, todo lo que tengo y todo lo que conseguiré en mi vida. Todo este trabajo ha sido posible gracias a su apoyo inmenso, que no tengo palabras para poder describir. Gracias por ser mis mentores, mis amigos. Este proyecto inició y terminó gracias a sus regaños, paciencia, consejos, sabiduría, insistencias, alegrías, tristezas, y se los dedico a ustedes más que a nadie.

Contenido

Lista de Tablas y figuras.....	7
Abstract	12
Resumen.....	13
1. Introducción	15
1.1. Género Loxosceles	15
1.2. Veneno del género Loxosceles y esfingomielinasa-D	16
1.3. Loxoscelismo	17
1.4. Anticuerpos	17
1.5. Variabilidad y genes de los anticuerpos.....	18
1.6. Estructuración de los anticuerpos.....	19
1.7. Anticuerpos monoclonales.....	20
2. Antecedentes	22
2.1. Células CHO	22
2.2. Regiones internas de entrada al ribosoma	24
2.3. Plásmidos con secuencias codificantes para cadenas pesada y ligera.....	25
3. Hipótesis.....	28
3.1. Objetivo general.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. Materiales	29
4.1. Plásmidos y construcciones.....	29
4.2. Cepas de E. coli Top10 transformadas con los diferentes plásmidos construidos previamente (Valdez-Cruz NA) y medio de cultivo.....	29
4.3. Línea celular usada y medios de cultivo.....	29
4.4. Equipos	30
4.5. Enzima de restricción	30
4.6. Kits.....	30
5. Metodología	32
5.1. Transformación de E. coli Top10 quimiocompetentes con los plásmidos con las secuencias codificantes para la cadena pesada o ligera.	32
5.2. Amplificación y purificación de plásmidos	32

5.3. Cultivo de células CHO DG44	32
5.4. Congelamiento de células CHO DG44	33
5.5. Transfección transitoria de células CHO DG44	33
5.6. Protocolo de digestión con la enzima Pvu I para transfección estable.....	33
5.7. Transfección estable de células CHO DG44	34
5.8. Protocolo de transformación alternativo.....	34
5.9. Extracción de mRNA y retrotranscripción	34
5.10. PCR, PCR anidada y electroforesis.....	35
5.11. Extracción de cDNA de gel y secuenciación	36
5.12. Liofilización y precipitación de muestras y lisis celular	36
5.13. SDS-PAGE y Western-blot de la cadena ligera y la cadena pesada.....	36
6. Resultados	38
6.1. Preparación y crecimiento de células CHO DG44 para transfectar	38
6.2. Transfección de células CHO DG44 transitorias.....	39
6.3. Transfección de células CHO DG44 estables y su crecimiento en medio selectivo	40
6.4. Selección clonal por geneticina y MTX.....	43
6.5. Identificación de los mRNAs de la cadena pesada y ligera en la clona P15-12.....	47
6.6. Secuenciación de cDNA de la cadena ligera y la cadena pesada	48
6.7. SDS-PAGE y Western Blot para identificar la cadena pesada y ligera del mAb 5C10 estable	48
6.8. Cuantificación mediante ELISA del anticuerpo anti-esfingomielinasa D.	52
7. Discusión	56
8. Conclusiones.....	58
9. Perspectivas	59
10. Referencias.....	61

Abreviaturas

BiP = Proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina

C = Región constante

cDNA = DNA complementario

CHO = Célula de ovario de hámster chino

DHFR = Dihidrofolato reductasa

DMSO= Dimetilsulfóxido

Fab = Fragmento de anticuerpo

Fc = Fracción cristalizable

FS = FreeStyle Max™

HC = Cadena pesada

HCI = Cadena pesada + IRES

HRP = Peroxidasa de rábano

Ig = Inmunoglobulina

IRES = Sitio interno de entrada del ribosoma

LC = Cadena ligera

LCI= Cadena ligera + IRES

mAb = anticuerpo monoclonal

mRNA= RNA mensajero

MTX = Metotrexato

OPD = o-fenildiamina

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

PDI = Proteína disulfuro-isomerasa

PPI = Peptidil-prolil isomerasa

PVDF = polifluoruro de vinilideno

SMD = Esfingomielinasa D

SRP = Partícula de reconocimiento de señal

V = Región hipervariable

WB = Western blot

Lista de Tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Venta (en millones de dólares) de 10 anticuerpos monoclonales en el mercado para el año 2014 y su impacto en el mercado (Tomado de Walsh, 2014). Se marca con (*) los anticuerpos que entraron en la lista de los 10 fármacos más vendidos en el mundo.

Tabla 2. Características de los plásmidos generados para la transfección de las células CHO DG 44 (Trabajo de laboratorio de la Dra. Valdez-Cruz, 2014).

Tabla 3. Resultados obtenidos para diferentes muestras de sobrenadante de la clona P15-12 estable a diferentes concentraciones de MTX en la prueba de ELISA. Las muestras se procesaron con la ELISA modificada y se compararon contra un anticuerpo anti-IL8 producido en células CHO.

Figuras

Figura 1. Distribución del género *Loxosceles* en Norteamérica, el Caribe y Centroamérica. (Gertsch y Ennik, 1983)

Figura 2. Sitio de corte (flecha) de la SMD sobre la esfingomielinina y los productos que genera (Gatt et al., 1978).

Figura 3. Estructura general de un anticuerpo IgG, mostrando las regiones hipervariables (V), las regiones constantes (C) y encuadrando las regiones de unión a antígeno (Fab) y la fracción cristalizable (FC) (Modificado de Boder y Jiang., 2011).

Figura 4. Plegamiento del dominio C_H1 de un anticuerpo IgG, donde entran en acción PDI, ERdj3, BiP y PPIasa (tomado de Braakman y Bulleid, 2011).

Figura 5. Estructura general de un anticuerpo IgG y su sitio de glicosilación en la Asn²⁹⁷ (tomado de Shade y Anthony, 2013). El cuadro en gris representa el núcleo del azúcar para el anticuerpo IgG, mientras lo que está fuera son extensiones variables. N: N-acetil glucosamina; M: Manosa; F: Fucosa; G: galactosa, S: ácido siálico. La microheterogeneidad en la glicosilación se refiere a la variación de las estructuras glicosídicas, que tiene efectos en la estabilidad, propiedades bioquímicas y actividad biológica de la molécula. En el caso de un anticuerpo terapéutico, puede generar efectos secundarios o diferentes respuestas de reconocimiento dependiendo de la estructura glicosídica que posea (Hintersteiner et al., 2016).

Figura 6. Sistema de presión de selección del metotrexato (MXT), mediante la inhibición de la dihidrofolato reductasa (Zaboikin et al., 2006).

Figura 7. Esquema de elementos contenidos en las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera.

Figura 8. Diferentes combinaciones de los plásmidos pC y pV para células transitorias y las células estables. Se señala la combinación control con una flecha roja. LC: Cadena ligera, HC: Cadena ligera, *dhfr*: gen de la enzima dihidrofolato reductasa, NeoR/KanR: gen de resistencia a Neomicina y Kanamicina.

Figura 9. A) Cinética de crecimiento de las células CHO DG44 sin transfectar en medio CD DG44 completo, en el inserto se muestra la línea de tendencia para el cálculo de μ_{\max} B) Viabilidad de las células CHO DG44.

Figura 10. Gel SDS-PAGE reductor (12.5% de acrilamida) de los sobrenadantes del día 6 de las células transfectadas con plásmidos circularizados. Carriles: **1.** Marcador de peso PageRuler; **2.** Control negativo (células tratadas sin plásmidos); **3.** Clona P15-12 0.625 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **4.** Clona P15-12 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **5.** Clona P15-36 0.625 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **6.** Clona P15-36 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **7.** Clona P5-20 0.625 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **8.** Clona P5-20 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **9.** Clona P20-3 0.65 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y **10.** Clona P20-3 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. **P5-20:** plásmidos 5 LCI pV y 20 HCl pC. **P15-12:** plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC. **P20-3:** plásmidos 3 LC pV, y 20 HCl pC. **P15-36:** plásmidos 36 HC pV y 15 LC pC.

Figura 11. A) Cinética de las células CHO DG44 usadas para la transformación con los plásmidos P3 (pV LC) y P5 (pV LCI) incubadas a 37°C, 55 rpm y 5% de CO₂. B) Viabilidad de las células durante su adaptación para ser transformadas. La viabilidad final a la que se transformaron fue de 93.8% y alcanzaron un tiempo de duplicación de 21.1 h.

Figura 12. Células viables 3 LC y 5 LCI después del cambio de medio de CD DG44 (insulina 4 mM, glutamina 8 mM) a OptiCHO™ (insulina 4 mM, glutamina 8 mM) incubadas a 37°C, 55 rpm y 5% de CO₂, B) Viabilidad de las células transformantes 3 LC y 5 LCI durante el proceso de transfección. P3: plásmido 3 LC pV. P5: plásmido 5 LCI pV.

Figura 13. Cinética de las células transfectadas P5-20 y P15-12. Las líneas negras indican el número de células viables/mL, mientras las líneas grises indican el porcentaje de viabilidad. La cinética de transfección inició cuando se cambio el medio CD DG44 por medio de selección OptiCHO™ a las 48 h después de realizarse la transfección (indicado con flecha roja) y las células se incubaron a 37°C, 90 rpm y 5% de CO₂. P5-20: 20 HCl pC y 5 LCI pV. P15-12: 15 LC pC y 12 HCl pV. Los asteriscos indican las muestras tomadas para Western Blot y SDS-PAGE.

Figura 14. Cinética de las células transfectadas de forma estable con 2 plásmidos linearizados A) P5-20 y B) P15-12 con geneticina a 250 µg/mL (naranja) y sin geneticina (azul) en medio de selección OptiCHO™ que permite crecer a las células que posean el plásmido pV. Ambas cinéticas se realizaron a 37°C, 90 rpm y 5% de CO₂ e iniciaron cuando se añadió la geneticina (250 ng/mL). Las líneas sólidas representan las células viables x10⁵/mL, mientras que las punteadas indican la viabilidad. En la gráfica se indica con una flecha el tiempo en el que se cambió la concentración de geneticina de 250 a 500 µg/mL en el cultivo de la clona P15-12. P5-20: plásmidos 20 HCl pC y 5 LCI pV. P15-12: plásmidos 15 LC pC y 12 HCl pV.

Figura 15. Cinética de las células P15-12 en medio de selección OptiCHO™ adicionado con Geneticina (500 µg/mL) y MTX (2nM), se aumentó la concentración de MTX a 20 nM en el momento indicado por la flecha (selección acelerada). La cinética se realizó a 37°C, 90 rpm y 5% de CO₂. Las líneas sólidas son células viables x 10⁵/mL, mientras que las punteadas indican el porcentaje de viabilidad. P15-12: plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC.

Figura 16. Cinética de las células P15-12 en medio de selección OptiCHO™ adicionado con Geneticina (500 µg/mL) y MTX (2nM) después con un aumento gradual de la concentración (5 nM, 10 nM y 20nM) indicado por la flecha. La cinética se realizó a 37°C, 90 rpm y 5% de CO₂. Las líneas sólidas son células viables x 10⁵/ml, mientras que las punteadas indican el porcentaje de viabilidad. P15-12: plásmidos y 15 LC pC y 12 HCl pV. Los asteriscos rojos indican las muestras tomadas para Western Blot y SDS Page.

Figura 17. Cinética de las células P15-12 en medio de selección OptiCHO™ adicionado con 500 µg/mL de geneticina y 100 nM de MTX, después se adicionó 150 nM y 200 nM de MTX (indicado por las flechas). La cinética se realizó en frasco T-25 a 37°C, 110 rpm y 5% de CO₂. Las líneas sólidas representan las células viables x 10⁵/mL y las punteadas indican el porcentaje de viabilidad. P15-12: plásmidos 15 LC pC y 12 HCl pV.

Figura 18. Obtención de amplicones a partir del cDNA obtenido de la clona P15-12: **M.P:** Marcador de peso molecular Gene O'Ruler 1 kb; **HC:** Producto de PCR directa del cDNA de la cadena pesada amplificado con los primers A y B; **LC R1:** Producto de la primera reacción de PCR anidada del cDNA de la cadena ligera amplificado con los primers C y héxameros random; **LC R2:** Producto de la segunda reacción de PCR anidada del cDNA de la cadena ligera amplificado con los primers C y D. Se señalan las bandas de interés con flechas rojas. Los productos esperados de HC10 y LC10 deben de presentar un tamaño de 551 y 594 pb respectivamente.

Figura 19. Análisis por A) SDS-PAGE y B) Western Blot de los sobrenadantes en condiciones desnaturizantes a diferentes días del cultivo de la clona P15-12 en medio OptiCHO™ durante la primera etapa de selección clonal: C3: día 11, C4: día 16 y C5: día 20. El control positivo (C2) es un anticuerpo anti-humano IgG de ratón y como marcador de peso (M)

PageRuler (Life-Technologies). Las flechas rojas indican posibles bandas de interés a 55 y 100 kDa. P15-12: plásmidos 15 LC pC y 12 HCl pV.

Figura 20. Western blot (A y B) de las muestras: carril C: control positivo mAb IgG; carril 3: genética 500 µg/mL sin MTX; carriles 4-7: Selección gradual con MTX: **C4** = 2 nM, **C5** = 5 nM, **C6** = 10 nM y **C7** = 15 nM y carriles 8-10: Selección gradual con MTX: **C8** = 5 nM, **C9** = 5 nM y **C10** = 10 nM. En la imagen A) la membrana se incubó con un anticuerpo de ratón anti-IgG humano a una dilución 1:2000 por 1.5 h a temperatura ambiente. En la imagen B) se desmarcó la membrana con solución MILD stripping (protocolo obtenido de Abcam) y se re-incubó con anticuerpo de ratón anti-IgG humano (1:1500) por 3 h a temperatura ambiente. Las flechas rojas indican posibles bandas de interés a 50 y 100 kDa.

Figura 21. Gel SDS-PAGE (12.5% de acrilamida) de las muestras de lisis celular y sobrenadantes provenientes de la clona P15-12. Carriles: **1.** Marcador de peso molecular PageRuler; **2.** Control negativo (Medio OptiCHO™); **3, 5, 7 y 9.** Lisado celular de cultivos con MTX (datos no mostrados) en los días 17 con 50 nM, día 24 con 100 nM, día 31 con 100 nM y día 36 con 100 nM. **4, 6, 8 y 10.** Sobrenadantes de cultivos con MTX (datos no mostrados) en los días 17 con 50 nM, día 24 con 100 nM, día 31 con 100 nM y día 36 con 100 nM de MTX. **P15-12:** plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC.

Figura 22. Western blot para detectar A) la cadena pesada y B) la cadena ligera del anticuerpo anti-SMD en muestras de sobrenadantes. **C-:** control negativo; **M.P.:** Marcador de peso PageRuler; **C+:** control positivo, de un anticuerpo anti-IL8; se corrieron 2 muestras de sobrenadante provenientes de la clona P15-12 estable con MTX 200 nM a los días 13 (D13) y 20 (D20) del cultivo; en la **figura A** se corrieron muestras del día 6 después de la transfección de las clonas transitorias P20-3, P5-20, P15-12 y P15-36. Las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-kappa humano para la cadena ligera y anti-FC humano para la cadena pesada a una dilución 1:10,000 por 1.5 h a temperatura ambiente.

Figura 23. Lectura colorimétrica y curva estándar obtenidas de la cuantificación por ELISA para los sobrenadantes de la clona P15-12 transfectada con plásmidos linealizados (marcadas con E) en diferentes días de cultivo. Día 17 con 20 nM MTX (D17), día 24 con 50 nM MTX (D24), día 31 con 50 nM MTX (D31) y día 36 con 50 nM MTX (D36) y de las clonas P20-3, P5-20, P15-12 y P15-36 transfectadas con plásmidos circularizados (marcadas con t) al día 6 después de la transfección. **P5-20:** plásmidos 5 LCI pV, y 20 HCl pC. **P15-12:** plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC. **P20-3:** plásmidos 3 LC pV, y 20 HCl pC. **P15-36:** plásmidos 36 HC pV y 15 LC pC. Se resaltaron los valores positivos con un *.

Figura 24. Lectura colorimétrica y curva estándar obtenidas de la cuantificación por ELISA para los liofilizados de las clonas transitorias P5-20 y P15-12 (marcadas con t) y la clona estable P15-12 a los días 17 (20 nM MTX), 24 (50 nM MTX), 31 (50 nM MTX) y 36 (50 nM

MTX) (marcadas con E). **P5-20**: plásmidos 5 LCI pV, y 20 HCl pC. **P15-12**: plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC.

Figura 25. A) Curva de absorbancia del protocolo modificado de ELISA usando un anticuerpo conjugado con HRP anti-IgG humano diluido 1: 20,000. B) Se ajustó la curva para obtener la línea recta de la ELISA.

Abstract

The poison of *Loxosceles* spider is a mixture of different components including different proteins like the sphingomyelinase D (SMD), which is a main component responsible for generating loxoscelism. To abolish the poison's toxicity, a monoclonal antibody (mAb), called 5C10, was obtained from hybridoma cells. This antibody recognized and neutralized the activity of a recombinant SMD (rSMD) (Moctezuma, 2008). Industrial production of this protein and its commercialization requires a high-yield expression system, that will be able to produce the mAb correctly folded, with the corresponding post-translational modifications necessary for its function.

CHO DG44 cells were chosen for mAb production in this work. These mammalian cells are grown in suspension and are easier to culture than adherent cells, also their *dhfr* system allows that transformed CHO DG44 cells grow in medium free from nucleotide precursors. In this work, these cells were transfected with 2 expression vectors that allow the separate synthesis of heavy chain and light chain of the antibody. Many constructions were used, that had internal ribosome entry sites (IRES), which generated different levels of expression for both chains, depending on the IRES employed, and different IRES entry sites that can also increase mRNA stability by altering its tridimensional conformation (Komar y Hatzoglou, 2011).

CHO DG44 cells were cultured in CD DG44 medium and then co-transfected with linearized plasmids to generate stable cells or circular plasmids for transient expression. FreeStyle Max lipofectamine was used with different plasmidic constructions and 48 h after transfection, culture medium was exchanged with selection medium to select transfected cells. This procedure reduced cell viability under 10%. In the transient strategy four plasmid pairs were tested using Agrawal et. al. (2013) methodology, which varies ADN/lipofectamine (w/v) ratio (Liu et al., 2008). Three different ADN/lipofectamine ratios were tested. However, none of the clones survived after the 6th day of transfection.

For stable transfections, Agrawal's methodology (2013) was also used. Cells transformation was successful. CHO DG44 cells were transfected and cells survived in selection medium using different concentrations of geneticin and methotrexate.

The presence of genes coding for the heavy and light chains in the stable clone P15-12, was confirmed detecting its mRNA. The mRNA extraction was performed, then a retrotranscription PCR (rtPCR) was used, and specific amplification by PCR was made. Both amplicons were seen, purified and then sequenced to confirm that they were the sequences of interest. A nested PCR was necessary for the light chain amplification due to its low mRNA strains.

To identify the recombinant monoclonal antibody, supernatants and cell samples obtained in stable cultures, were analyzed by SDS-PAGE gels, Western blot and ELISA. However the antibody was not detected. There are various possible causes: I) Resistance or escape from *dhfr* system (Flintoff y Essani, 1980); II) Irregular expression of heavy and light chains (Schlatter et al., 2005); and III) Factors and growth parameters in clone culture (Chusainow et al., 2008).

Resumen

El veneno de la araña *Loxosceles* es una mezcla compleja de diferentes componentes cuyo compuesto principal es la esfingomielinasa D (SMD) y el cual es responsable de generar un padecimiento conocido como loxoscelismo. Para contrarrestar la toxicidad del veneno se desarrolló en hibridomas un anticuerpo monoclonal (mAb) llamado 5C10 que es capaz de reconocer y neutralizar la actividad de la SMD recombinante (Moctezuma, 2008). Estas células se usaron debido a su capacidad de producir anticuerpos monoclonales. Sin embargo, para la producción industrial de esta proteína y su comercialización se requiere de un sistema de expresión con mejores rendimientos, que sea capaz de producir el mAb correctamente plegado y con las modificaciones post-traduccionales necesarias para su función.

Se seleccionaron las células CHO DG44, que son células de mamífero en suspensión y que se caracterizan por su facilidad de cultivo comparado con células adherentes y su sistema de selección *dhfr* que permite el crecimiento de las células transformadas en un medio libre de precursores de nucleótidos. En este trabajo, dichas células se transformaron con 2 vectores de expresión, que permiten la producción separada de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo. Se utilizaron varias construcciones, que contenían sitios internos de entrada del ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) que permiten un grado de expresión diferente en ambas cadenas, dependiendo el IRES usado, y que le confieren a los mRNAs mayor estabilidad por su conformación tridimensional (Komar y Hatzoglou, 2011).

Las células CHO DG44 cultivadas en medio CD DG44 fueron cotransfectadas con plásmidos linearizados para generar células estables o plásmidos circularizados para generar células transitorias. Para ambas transfecciones se usó la lipofectamina FreeStyle Max, con diferentes pares de construcciones plasmídicas y 48 h después de la transfección, el medio se cambió por el medio de selección para células transfectadas con los plásmidos. La viabilidad celular se redujo por debajo de <10%. En la estrategia transitoria se realizaron 4 combinaciones de plásmidos siguiendo la metodología de Agrawal et. al. (2013) que varía la relación de ADN/lipofectamina (w/v) (Liu et al., 2008). Se probaron 3 relaciones diferentes de ADN/lipofectamina. Sin embargo, ninguna clona sobrepasó el sexto día después de la transfección con una viabilidad menor al 10%.

Para la cotransfección estable también se usó la metodología de Agrawal et al (2013). Las células transfectadas con los plásmidos p15 y p12 fueron resistentes al medio de selección y a diferentes concentraciones de geneticina y metotrexato fue posible obtener una línea celular. Para confirmar la presencia de los genes codificantes para la cadena pesada y ligera en la clona estable P15-12, se realizó extracción de mRNA, después se hizo retrotranscripción (rtPCR), y posteriormente una amplificación mediante PCR usando oligonucleótidos específicos para la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo. Los amplicones fueron purificados y secuenciados para confirmar que eran las secuencias de interés. Para la cadena ligera fue necesario realizar una PCR anidada debido a la baja concentración del mRNA.

Para identificar el anticuerpo producido se analizaron los sobrenadantes y muestras celulares, obtenidas de los cultivos estables, mediante SDS-PAGE, Western blot y ELISA. Sin embargo, no se logró detectar el anticuerpo en estos ensayos. Este fenómeno puede tener varias causas, como: I) Resistencia o escape del sistema *dhfr* (Flintoff y Essani, 1980); II) Expresión irregular de la cadena pesada y ligera (Schlatter et al., 2005); III) Factores y parámetros de crecimiento de la clona (Chusainow et al., 2008).

1. Introducción

1.1. Género *Loxosceles*

Se estima que en el mundo existen más de 35,000 especies de araña (Quintana y Otero, 2002). Todas las familias, con excepción de la familia Uloboridae y Holoarchaeidae, poseen glándulas venenosas (Meier y White, 1995). Los venenos tienen como función principal inmovilizar a la presa y poseen diferentes compuestos que tienen efectos secundarios, como puede ser fallo renal o la muerte (Foelix, 1996). Entre estas sustancias se encuentran: las neurotoxinas (antagonistas de receptores de glutamato, bloqueadores de receptores post-sinápticos colinérgicos y los que afectan los canales de sodio, potasio y cloro), péptidos no neurotóxicos (afectan directamente a las células), enzimas (hialuronidasas, metaloproteasas, fosfolipasas, etc.), componentes de bajo peso molecular (aminas biogénicas, aminoácidos, nucleótidos, poliaminas, sales inorgánicas) y necrotoxinas (esfingomielinasa D)(Rash y Hodgson, 2002).

Uno de los 4 géneros de araña, reportados por la OMS (1981) como peligrosos para la salud humana, es el de las arañas *Loxosceles* que se caracteriza por poseer una marca con forma de violín en la parte superior de su cuerpo, por lo que se conocen como arañas violinistas (De Roodt et al., 2004).

El género *Loxosceles* constituye un problema de salud a nivel mundial, incluido el continente americano donde se han encontrado cerca de 84 especies, de las cuales destacan *L. reclusa* al sur de los E.U.A. (Figura 1), *L. gaucho* en Brasil, *L. laeta* en Chile, Argentina y Perú, y *L. boneti* en México (Hoffmann, 1976; Gertsch y Ennik, 1983). En México se han reportado cerca de 39 especies de este género (Ramos y Vázquez, 2000), con una distribución de *L. boneti* en los estados de Guerrero, Puebla y Morelos (De Roodt et al., 2007) y *L. reclusa* en E.U.A., México y algunas zonas del Caribe y Centroamérica (Gertsch y Ennik, 1983).

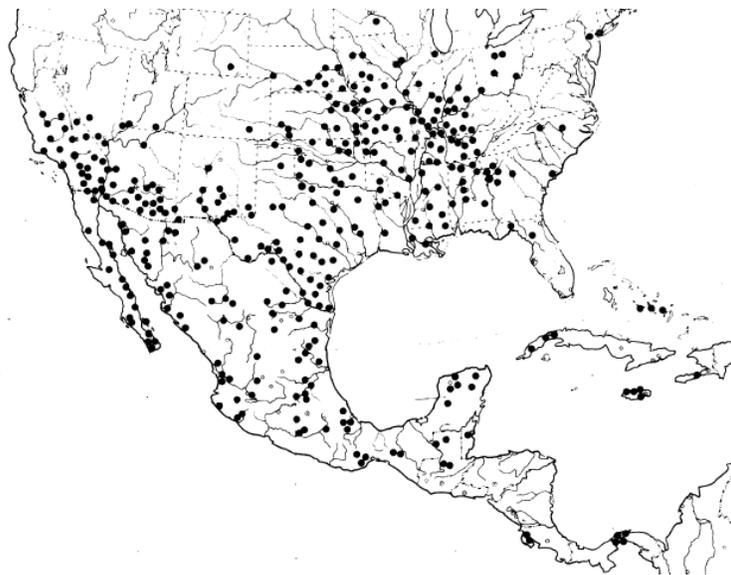


Figura 1. Distribución del género *Loxosceles* en Norteamérica, el Caribe y Centroamérica. (Gertsch y Ennik, 1983)

En 2011 el SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) reportó 46,722 casos de intoxicación en México, por mordedura de animales ponzoñosos, que incluyen a las arañas, con una incidencia de 40.13 personas afectadas por cada 100,000 habitantes. Los reportes estiman que 3,000 a 5,000 accidentes anuales por mordedura de araña ocurren en el mundo (Zavala y Díaz, 2004). Sin embargo, no existen organizaciones que reporten estas estadísticas periódicamente (Sampaio et al., 2016).

1.2. Veneno del género *Loxosceles* y esfingomielinasa-D

El veneno del género *Loxosceles* es una mezcla heterogénea de proteínas, ácidos y lípidos entre 5 a 850 kDa, aunque se estima que gran parte de estas moléculas encontradas en las glándulas es fluido digestivo. Considerando esto, se estima que las proteínas propias del veneno rondan los 5-40 kDa (Veiga et al., 2000). Algunos compuestos caracterizados del veneno del género *Loxosceles* son: histamina, serotonina, ácido gamma amino butírico, espermina, 5'-ribonucleótidos, fosfatasa alcalina, hialuronidasa, proteasa, esfingomielinasa, entre otros (Ramos y Vázquez, 2000).

De estos compuestos se ha encontrado que la espermina ocasiona dolor al inocularse en mamíferos (Ramos y Vázquez, 2000); la hialuronidasa se asocia con ruptura de polisacáridos y componentes de la matriz extracelular, actuando como dispersor del veneno (Young y Pincus, 2001); la loxolisina A y B tienen capacidad de degradación de fibronectina y colágeno respectivamente (Feitosa et al., 1998; Young y Pincus 2001). Sin embargo, la enzima que compone principalmente el veneno (hasta un 50%) es la esfingomielinasa D (SMD), que puede ocasionar necrosis en la piel y hasta daño sistémico (Fernandes et al., 2002; Ramos et al., 2004). Su función es hidrolizar el enlace fosfodiéster de la esfingomielina, generando fosfoceramida y colina (Figura 2) (Gatt et al., 1978). La esfingomielina es un fosfolípido integral de la membrana de muchas células como eritrocitos o células del epitelio vascular y puede componer hasta el 50% de los lípidos en ciertos tejidos (Jiménez, 2009).

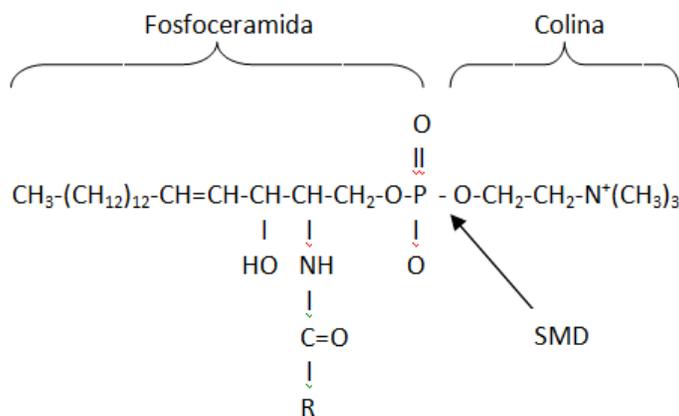


Figura 2. Sitio de corte (flecha) de la SMD sobre la esfingomielina y los productos que genera (Gatt et al., 1978).

La SMD es una fosfolipasa de alrededor de 33 kDa que se puede unir a las membranas celulares donde se encuentra la esfingomielina (de Alba, 1997). Una hipótesis acerca del mecanismo de acción de la enzima sobre las membranas dice que su receptor es la esfingomielina presente abundantemente en la monocapa externa (Rees et al., 1984). Por otro lado, Rees et al. (1984)

también sugieren que la enzima tiene una estructura secundaria anfipática, que permite su inserción en la membrana y después la hidrólisis de la esfingomielina.

1.3. Loxoscelismo

La araña *Loxosceles* es capaz de secretar de 0.15 a 0.45 μL de veneno por estimulación eléctrica y hasta 0.8 μg de SMD se puede obtener al disecar sus glándulas (Geren et. al, 1976). El resultado de una mordedura de la araña violinista desencadena una condición clínica conocida como loxoscelismo.

En varios experimentos se ha encontrado evidencia de que la enzima SMD es la responsable de iniciar eventos que dan lugar a:

- Loxoscelismo cutáneo: Caracterizado por necrosis severa, que se empieza a formar después de 24-36 h y se estima que entre el 84 y 97% de los casos de mordedura de araña violinista terminan en este tipo de lesión (De Roodt et. al, 2007).
- Loxoscelismo viscerocutáneo o sistémico: Envenenamiento de tipo severo desarrollado a partir de las 6-24 h, que puede terminar en coma y muerte (Fernandes et al., 2002; Tambourghi et al., 1998), con hasta un 17% de mortalidad, siendo la insuficiencia renal aguda la principal causa de muerte (Schenone et al., 1989; Franca et al., 2002).

Tambourghi et al. (1995) demostraron *in vitro* que la SMD es capaz de afectar a los eritrocitos, dejándolos vulnerables a lisis por activación del complemento. Sin embargo, en un estudio histológico, en piel de conejo, se inyectó veneno de *L. intermedia*, esfingomielinasa recombinante o SMD purificada y esto provocó un gran flujo de neutrófilos, demostrando que la SMD es la mayor o única toxina responsable del desarrollo de loxoscelismo cutáneo (Tambourghi et. al, 2005).

1.4. Anticuerpos

Los animales vertebrados poseen un sistema inmune que permite identificar lo ajeno al cuerpo, así como desechar aquello que se considere dañino (Abbas et al., 2008). Una estrategia importante que tiene nuestro organismo es el de generar anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) que son glicoproteínas producidas por los linfocitos B, que reconocen partículas ajenas al hospedero como bacterias, virus, parásitos o alguna molécula extraña (Kindt et al., 2006).

Los anticuerpos se dividen en 5 isotipos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Los anticuerpos de la categoría de las IgG, tienen 4 subtipos diferentes (1-4) (Abbas et al., 2008). Las IgG poseen una estructura tetramérica (Figura 3) compuesta por 2 cadenas pesadas (H) y 2 cadenas ligeras (L). Ambas cadenas se conforman por una región hipervariable (V) y regiones constantes (C), estos tipos de regiones se conocen como dominios de inmunoglobulina (Ig) y adquieren su estructura globular gracias a enlaces disulfuro. La cadena pesada de las IgG tiene 3 regiones constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}) a diferencia de la cadena ligera que solo tiene una región constante (C_L). Las cadenas pesadas y ligeras

se unen por un enlace disulfuro en las regiones C_{H1} y C_L respectivamente, formando un dímero HL. Las 2 regiones restantes en la cadena pesada se unen mediante 2 enlaces disulfuros a otro dímero HL igual, formando la estructura H₂L₂, mediante una región bisagra que se encuentran dentro del dominio C_{H2} y que forma la región Fc del anticuerpo (Figura 3) (Abbas et al., 2008; Kindt et al., 2006).

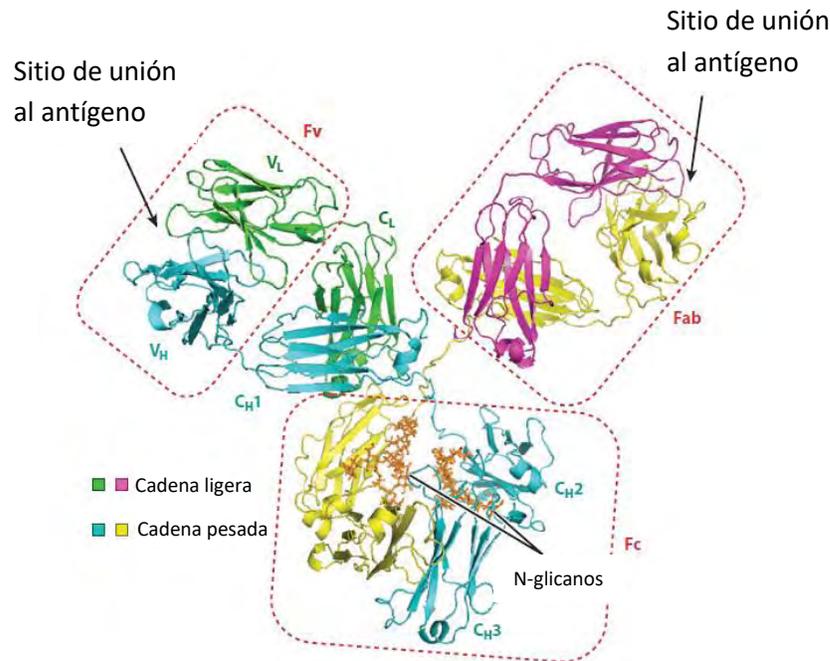


Figura 3. Estructura general de un anticuerpo IgG, mostrando las regiones hipervariables (V), las regiones constantes (C) y encuadrando las regiones de unión a antígeno (Fab) y la fracción cristalizante (Fc) (Modificado de Boder y Jiang., 2011).

Entre los años 50 y 60, mediante el análisis de anticuerpos de suero y γ -globulina, se logró dilucidar la estructura los anticuerpos (Edelman y Poulik, 1961; Elgert, 1998; Porter, 1959). Edelman y Poulik (1961) con el uso de agentes reductores como dithiothreitol, encontraron que habían 2 subunidades diferentes en un anticuerpo de γ -globulina, unidas por enlaces disulfuro: La cadena pesada y la cadena ligera. Por otro lado, usando papaína para degradar la γ -globulina, se encontraron 3 fragmentos de peso molecular cercano a 50 kDa, siendo que 2 de los fragmentos fueron similares y mantenían la capacidad de unión al antígeno (llamados como Fab), mientras que el tercero mostraba una estabilidad mayor y que fue identificado como Fc (Porter, 1959; Elgert, 1998). Con estos trabajos se llegó a la conclusión de que un anticuerpo contiene 2 estructuras importantes por la función que cumplen: La región Fab (fragment antibody) que se compone por la cadena ligera, es decir, región V_L y C_L, y las regiones C_{H1} y V_H de la cadena pesada, ésta parte se encarga del reconocimiento de los antígenos; y la región Fc (fracción cristalizante) que se encarga principalmente de unir las cadenas pesadas a través de la región bisagra, darle estabilidad al anticuerpo y más importante aún a la función efectora del anticuerpo, que consiste principalmente en la unión a receptores del fragmento Fc (FcRs) (revisión de Hajela, 1991; Kindt et al., 2016).

1.5. Variabilidad y genes de los anticuerpos

La gran diversidad de anticuerpos generados por los linfocitos B permite reconocer una variedad de epítomos que ingresan al organismo, esto se origina gracias a un proceso de variabilidad originado por la alteración genómica de las células B secretoras de anticuerpos. Este proceso se conoce como recombinación V(D)J y requiere del ensamblaje de los diferentes exones que pertenecen a las regiones V, D y J de los genes de la cadena ligera y la cadena pesada. Estas regiones se llaman así por variable (V), diversidad (D) y unión o “*joining*” (J), que darán lugar a las diferentes partes de una cadena pesada o ligera.

Además de la recombinación V(D)J existen 2 procesos más que permiten aumentar la variabilidad en los anticuerpos: Hipermutación somática (SHM) y Recombinación *class-switch* (SCR, por sus siglas en inglés). La SHM genera una alta tasa de mutaciones puntuales en las regiones V de los exones y también selecciona las células B que produzcan anticuerpos de alta afinidad, mientras SCR permite el cambio de isotipo de los anticuerpos para modificar la función efectora de las inmunoglobulinas (Chaudhuri y Alt, 2004).

1.6. Estructuración de los anticuerpos

El ensamblaje de las inmunoglobulinas tipo IgG ha sido ampliamente estudiado, especialmente la región C_{H1}, debido a que, a diferencia de los demás dominios del anticuerpo, este no tiene una distribución y número de residuos hidrofóbicos cargados que permitan el plegamiento correcto y por lo tanto requiere del dominio C_L para su correcto plegamiento (Feige et. al, 2009). Se sabe que, al inicio de la síntesis de los anticuerpos, la cadena peptídica naciente es reconocida por la SRP (signal recognition particle). El complejo ribosoma-peptido-SRP es anclado a la membrana a través del receptor de SRP, para que el ribosoma sea sitio-localizado cercanamente al translocón Sec61 α , y después la cadena de aminoácidos del anticuerpo sea sintetizada de forma cotraduccional hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE) (revisión de Braakman y Bulleid, 2011; High, 1995).

Dentro del RE, los dominios se estructuran dependiendo de sus características tanto de secuencia como de carga. En el caso de los dominios C_L o C_{H2}, esto se da de manera autónoma; mientras que el dominio C_{H1} requiere de interactuar con C_L para formar el núcleo hidrofóbico que le permita iniciar el proceso de plegamiento (Feige et. al, 2010). Además, son necesarias varias chaperonas para que el dominio C_{H1} adquiera su estructura correcta. Principalmente se requiere de la chaperona “BiP” (“immunoglobulin heavy-chain binding protein”) o GRP78 para su correcto plegamiento y retención en el RE (Haas y Wabl, 1983; Hendershot et. al, 1987). También se estructuran por la interacción con la peptidil prolina isomerasa o PPI (revisión de Feige et. al, 2010; Lilie et al., 1993; Lilie et al., 1995), y la formación de puentes disulfuro con ayuda de la proteína disulfuro isomerasa (PDI, por sus siglas en inglés) (Figura 4) (Roth y Pierce, 1987). Otras proteínas involucradas en el plegamiento del anticuerpo y más específicamente del dominio C_{H1}, incluyen a ERdj3 como co-chaperona de BiP, GRP94 o endoplasmina que es una chaperona que actúa después de BiP (revisión de Braakman y Bulleid, 2011; Melnick et. al, 1994; Schlatter et. al, 2005).

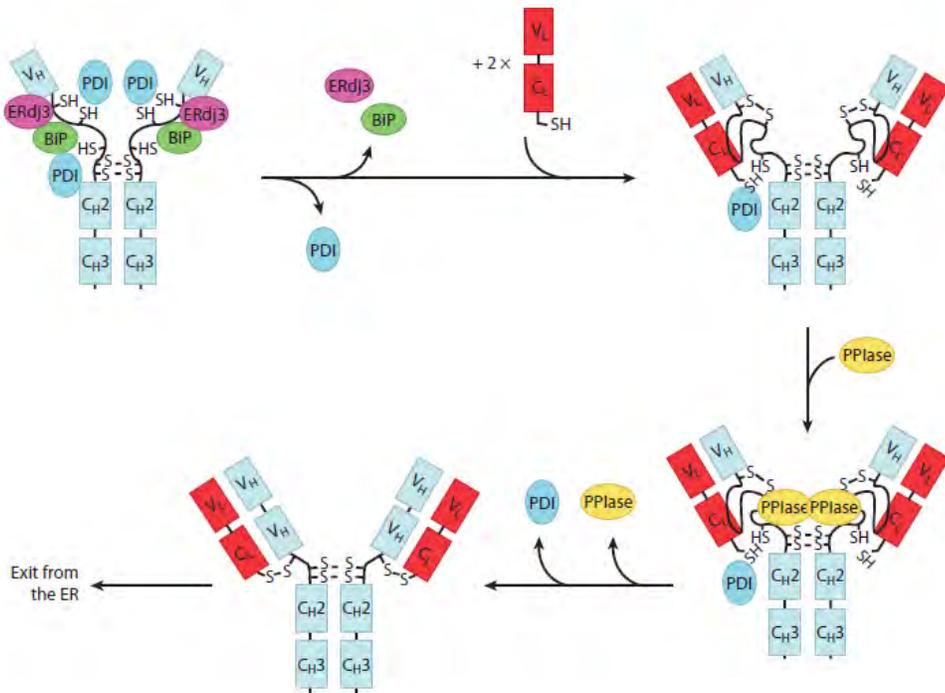


Figura 4. Plegamiento del dominio C_{H1} de un anticuerpo IgG, donde entran en acción PDI, ERdj3, BiP y PPIasa (tomado de Braakman y Bulleid, 2011).

1.7. Anticuerpos monoclonales

En 1975, Köhler y Milstein, crearon una metodología que permite generar anticuerpos monoclonales o mAbs (“monoclonal antibodies” por sus siglas en inglés) (Abbas et al., 2008). Estas moléculas proteicas pueden reconocer un único epítipo (secuencia de aminoácidos de los antígenos que puede ser reconocida), lo cual los vuelve de gran interés en las áreas de diagnóstico, investigación y terapéutica.

Los mAbs del tipo de inmunoglobulina IgG tienen sitios de N-glicosilación en las asparagina 297 de la región C_{H2} (Figura 5) cuya presencia es esencial para las funciones efectoras del IgG, la estabilidad y en algunos casos su eficacia terapéutica, lo cual depende de la microheterogeneidad de la glicofoma que posea el anticuerpo (Jefferis, 2005; Zheng et al., 2011).

Los mAbs son producidos mediante la fusión de células mieloma de ratón y células de bazo de ratón (hibridomas). El principio de ésta fusión radica en que las células de mieloma son inmortalizadas, mientras que las células de bazo son capaces de producir anticuerpos contra un antígeno específico que fue inyectado previamente en un ratón para que produjera el anticuerpo deseado (Köhler y Milstein, 1975; Köhler y Milstein, 1976). La fusión permite la generación de líneas celulares inmortales y capaces de generar anticuerpos, después de realizar un proceso de clonación (Abbas et. al, 2008).

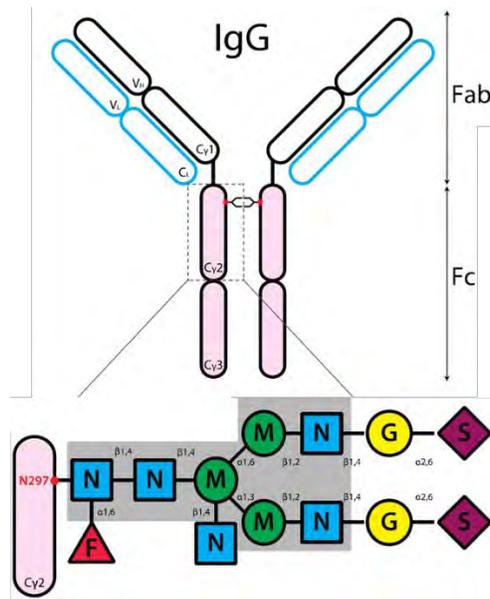


Figura 5. Estructura general de un anticuerpo IgG y su sitio de glicosilación en la Asn²⁹⁷ (tomado de Shade y Anthony, 2013). El cuadro en gris representa el núcleo del azúcar para el anticuerpo IgG, mientras lo que está fuera son extensiones variables. N: N-acetil glucosamina; M: Manosa; F: Fucosa; G: galactosa, S: ácido siálico. La microheterogeneidad en la glicosilación se refiere a la variación de las estructuras glicosídicas, que tiene efectos en la estabilidad, propiedades bioquímicas y actividad biológica de la molécula. En el caso de un anticuerpo terapéutico, puede generar efectos secundarios o diferentes respuestas de reconocimiento dependiendo la estructura glicosídica que posea (Hintersteiner et al., 2016).

En 1984 se desarrolló el primer mAb quimérico que contenía las regiones constantes de un anticuerpo de humano y las regiones variables de un anticuerpo producido en hibridomas (Morrison et al., 1984), insertando los genes de la región variable de origen murino junto con los genes de la región constante humana en 2 plásmidos (uno para la cadena ligera y otro para la cadena pesada) y transfectándolos a la línea de mieloma murino J558L mediante fusión de protoplastos. Esto se realizó con la finalidad de evitar las reacciones adversas causadas por el uso de proteínas producidas por células de ratón en el ser humano (Miller et. al, 1981; Miller y Levy, 1981). A finales de los años 80 se han generado mAbs humanizados donde aproximadamente el 90% de la molécula (regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera) es de origen humano y las regiones hipervariables del anticuerpo son de origen murino (Reichman et. al, 1988).

2. Antecedentes

A partir de sueros hiperinmunes de caballos inmunizados con una mezcla de toxinas recombinantes de 3 especies de *Loxosceles* (*L. laeta*, *L. boneti* y *L. reclusa*), se han obtenido derivados enriquecidos con IgG, capaces de neutralizar la SMD recombinante de *L. boneti*. En la tesis de la M. en C. Lucía Jiménez (2009), la dosis efectiva media (ED₅₀) reportada – que es la cantidad de derivado enriquecido con IgG necesaria para neutralizar el 50% de actividad de 1 mg de la SMD – fue de 2.1 mg de IgGs enriquecidos. El Instituto Bioclon en 2009 registró un faboterápico polivalente (fragmentos de anticuerpo obtenidos de suero hiperinmune de caballo) anti-*Loxosceles* y posteriormente lo comercializó en 2011, llamándolo Reclusmyn® o Loxmyn®, que es capaz de neutralizar 150 µg de las necrotoxinas de *L. reclusa*, *L. laeta* y *L. boneti* y es el equivalente a mínimo 0.8 mg de veneno (Alagón, 2012).

En la tesis de la M. en C. Claudia Moctezuma (2008) se reportó que el anticuerpo monoclonal (mAb) 5C10 de origen murino y producido en hibridomas, es capaz de reconocer y neutralizar a la esfingomielinasa D recombinante, pero se desconoce todavía si su efecto es por unión al sitio activo de la enzima. Además, se caracterizó la actividad del anticuerpo, su fragmento Fab y un Fab quimérico con regiones constantes humanas producido por *E. coli*. Los resultados obtenidos indicaron que tanto el anticuerpo 5C10 como el fragmento Fab podían reconocer y neutralizar la SMD recombinante, mientras que el Fab 5C10 quimérico expresado en *E. coli*, únicamente reconoció a la enzima SMD recombinante. De la misma manera, en la tesis de licenciatura de la Biol. Elba Campos (2010) se volvió a expresar el Fab quimérico en *E. coli* de manera monocistrónica, de tal manera que el fragmento se plegara *in vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos indicaron que el Fab 5C10 quimérico solamente podía reconocer y no neutralizar a la esfingomielinasa D recombinante. Con dicha información se concluyó que el anticuerpo debía ser generado en un sistema de expresión que pudiera producir el anticuerpo monoclonal estructurado correctamente y que pudiera realizar las modificaciones post-traduccionales apropiadas.

2.1. Células CHO

Las células de mamífero, como las células de ovario de hámster chino (CHO), células de linfoma murino (NS0) o células de riñón de embrión humano (HEK) son comúnmente usadas para la expresión de proteínas heterólogas que posean modificaciones post-traduccionales, especialmente cuando su actividad biológica depende de estas (Wurm, 2004). En 1986, fue aprobado el primer mAb de origen murino anti-CD3 muronomab (OKT3), por la FDA. Sin embargo, se encontró que estos generaban reacciones alérgicas o respuestas de anticuerpos humanos anti-murinos (HAMAs, por sus siglas en inglés), que se encargaban de eliminar el mAb del hospedero. En 1997, fue aprobado el biofármaco Rituximab, un mAb quimérico (humano-murino) que reducía considerablemente los efectos secundarios de un anticuerpo murino (Kelley, 2009; Ribatti, 2014; Liu, 2015). Después de esto, los mAbs alcanzaron un porcentaje del 7% en el mercado global de farmacéuticos para el 2010 con 43 mil millones de dólares generados, 75% de este dinero provenía de los 5 mAbs más vendidos. Para el año 2013, 9 mAbs generaron ganancias de más de 1 mil millones de dólares anuales, convirtiéndose así en medicamentos “*blockbuster*” (Tabla 1) (Elvin et. al, 2013). En 2013, 6 mAbs

entraron en la lista de los 10 farmacéuticos más vendidos, siendo el mAb Humira el fármaco más vendido a nivel mundial con 11 mil millones de dólares (Walsh, 2014).

Tabla 1. Venta (en millones de dólares) de 10 anticuerpos monoclonales en el mercado para el año 2014 y su impacto en el mercado (Tomado de Walsh, 2014). Se marca con (*) los anticuerpos que entraron en la lista de los 10 fármacos más vendidos en el mundo.

Marca	Ventas 2013 (US\$ m)	Mercado (%)	Línea celular	Fecha de aprobación (EU)	Blanco terapéutico
Avastin*	6,970	16.02	CHO	2004	VEGF
MabThera/Rituxan*	7,910	15.76	CHO	1997	CD20
Humira*	11,000	15.04	CHO	2002	TNF
Remicade*	8,370	14.98	Sp2/O	1998	TNF
Herceptin*	6,910	13.46	CHO	1998	HER2
Lucentis*	4,270	7.14	<i>E. coli</i>	2006	VEGF
Erbix	1,920	4.12	Sp2/O	2004	EGFR
Tysabri	-	2.83	NSO	2004	α 4-integrina
Synagis	-	2.38	NSO	1998	RSV
Xolair	-	1.72	CHO	2003	IgE

Desde que las células CHO fueron aceptadas para la expresión del activador de plasminógeno tisular (tPa), han tenido gran dominio para la expresión de proteínas recombinantes terapéuticas (Kelley, 2009). De los 28 mAbs aprobados en EU y Europa para 2012, el 43% (12/28) han sido producidos en células CHO, además en el top 20 de biofármacos más vendidos del 2013 se encuentran 7 de estos anticuerpos monoclonales (Tabla 1) (Reichter, 2012; Walsh, 2014).

Las células CHO son las más utilizadas para la producción industrial de proteínas con fines clínicos o terapéuticos, incluyendo a los anticuerpos monoclonales (mAb). Esto representa el 33% de todos los sistemas de expresión usados para la producción de los terapéuticos hasta el 2013 (Walsh, 2014). Debido a los bajos rendimientos de producción y de baja densidad en cultivos adherentes, se han generado líneas celulares que puedan crecer en suspensión, tales como CHO-K1, CHO-DXB11 y CHO-DG44 (Urlaub y Chasin, 1980; De Jesús y Wurm, 2011; Agrawal et al., 2012). Las células DG44 (Thermo Sci. NY, USA) fueron modificadas mediante mutagénesis química y poseen el sistema de selección dihidrofolato reductasa (-DHFR) (Figura 6). Este sistema consiste en células deficientes de la enzima DHFR, de tal manera que no puedan sobrevivir en medios de cultivo que no contengan los precursores de los nucleótidos timidina e hipoxantina (Urlaub y Chasin, 1980). Cuando la célula es transfectada con un plásmido que codifica para la DHFR, entonces la célula podrá sobrevivir en un medio sin necesitar la presencia de los precursores de nucleótidos. También se ha desarrollado un método de presión de selección usando metotrexato (MTX), el cual inhibe la enzima DHFR y obliga a la célula a generar mayor cantidad de enzima DHFR para sobrevivir (Urlaub y Chasin, 1980; Kaufman et al., 1985). De igual forma, la selección con MTX permite aumentar el número de copias del gen *dhfr* y, por ende, del gen heterólogo. Sin embargo, este compuesto trae consigo problemas que generan resistencia en las células CHO cuando se realiza una adaptación acelerada aumentando

la concentración en un paso. También se pueden generar alteraciones en la *dhfr* que generan clones resistentes y que no expresan las proteínas deseadas (Gupta et al., 1977; Flintoff et al., 1976; Assaraf y Schimke, 1987).

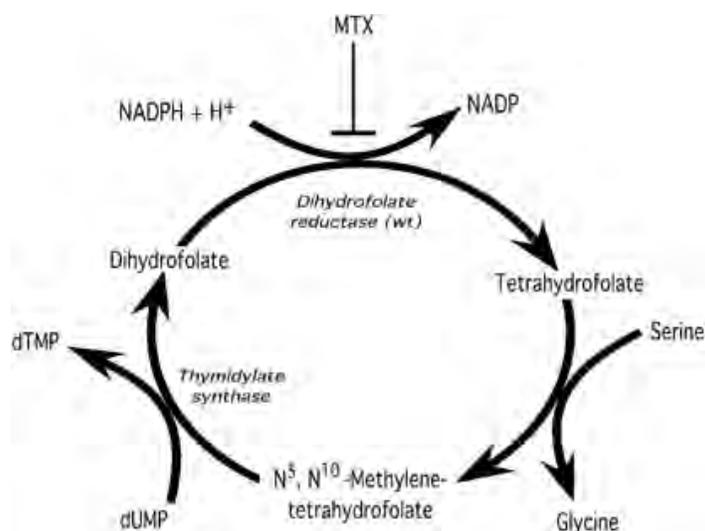


Figura 6. Sistema de presión de selección del metotrexato (MXT), mediante la inhibición de la dihidrofolato reductasa (Zaboikin et al., 2006).

Los rendimientos de producción de anticuerpos generados en células CHO han alcanzado los 5 g/L en los últimos años gracias a diferentes estrategias de cultivo (Yu et al., 2011) y cepas de alta producción (Reinhart et al., 2015). Por ejemplo, se produjeron cultivos de células en suspensión, el uso de medios enriquecidos, diferentes tipos de alimentación (batch o fed-batch) e incluso por el uso de biorreactores como los desechables (WAVE) alcanzado concentraciones de hasta $>2 \times 10^8$ células/mL (Wurm, 2004; Birch y Racher, 2006; Falkman et al., 2012; Clincke et al., 2013). Es importante destacar las estrategias moleculares desarrolladas en los últimos años, como las mejoras a los vectores de expresión que incluyen promotores más fuertes o cuya regulación de la traducción no requiere del reconocimiento del cap 5' (Komar y Hatzoglou, 2011) como por ejemplo el uso de los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés).

2.2. Regiones internas de entrada al ribosoma

Las regiones IRES son secuencias 5' no traducibles (5' UTR, por sus siglas en inglés) que forman parte del ARN mensajero y representan una alternativa de traducción, usada por algunos virus o ARNs de origen eucarionte (Chamond et al., 2014; Cobbold et al., 2010; Xia y Holcik, 2009). La manera canónica de inicio de la traducción se da cuando *cap*, el nucleótido modificado del extremo 5', es reconocido en el ARN mensajero por diversos factores iniciadores y el ribosoma 43S escanea la secuencia hasta encontrar el codón de inicio de la traducción (Kieft, 2008; Hellen y Sarnow, 2001). Los sitios IRES son sistemas independientes del reconocimiento del *cap*, y por lo tanto no están sujetos a tantos mecanismos de regulación, ni de la mayoría de factores iniciadores (eIF); además se ha observado que los sitios IRES pueden poseer una estructura secundaria y terciaria que

permiten la interacción con algunos eIFs y hasta llegando a eliminar completamente la necesidad de que estos factores estén presentes, siendo únicamente requerida la región IRES y el ribosoma 40S (Komar y Hatzoglou, 2011).

Las secuencias IRES se encuentran varios pares de bases río arriba del codón de inicio AUG y poseen estructuras (Balvay et al., 2009), por ejemplo, en células eucariotas tienen una estructura secundaria débil (Xia y Holcik, 2009).

En 2005, Schlatter et al. obtuvieron su mayor producción de un mAb cuando la relación entre la concentración plasmídica de la cadena pesada y la concentración plasmídica de la cadena ligera se encontraban en una proporción 3:2 en sus células productoras de mAb. Además, sugirieron con base en sus resultados, que el exceso intracelular de la cadena LC mejora la eficiencia de uso tanto para el gen *hc* como para el polipéptido HC en células estables y con esto se incrementa la tasa de plegamiento y ensamblaje de los mAbs. A partir de esta información, la búsqueda para generar diferentes vectores de expresión que produzcan diferencialmente (en su relación óptima) ambas cadenas del anticuerpo de interés es primordial. Una de las soluciones ha sido el uso de secuencias IRES.

Otro problema del uso de vectores policistrónicos en mamíferos es que la eficiencia traduccional se reduce cuando hay múltiples marcos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) (Kauffman et al., 1987). La adición de diferentes elementos 5' traduccionales como los IRES ha permitido mejorar la expresión de proteínas en estos plásmidos, gracias al inicio de la traducción independiente de la región cap que otorgan estas regiones a los genes que se encuentran en la 2da o posteriores posiciones de las construcciones policistrónicas (Jang et al., 1989; Kaufman et al., 1991). Se han desarrollado otras estrategias para controlar mejor la relación de LC contra HC en la producción de anticuerpos recombinantes, así como la transcripción de varios genes en un mismo mensajero. Ho et al. (2012), generaron un vector tricistrónico capaz de producir 500 mg/L o hasta 10 veces más que un vector multi-promotor o que un sistema de co-transfección, gracias al arreglo de los genes de LC y HC en el vector, así como el uso de sitios IRES en la región 5' de cada gen. Otra estrategia ha sido el uso de elementos Furina-2A que permiten la co-expresión de los genes de las cadenas LC y HC en un mismo mRNA, pero que ha tenido menor productividad que vectores con sitios IRES, debido a que la producción de ambas cadenas es muy similar (Davies et. al, 2011; Ho^a et. al, 2013).

Una estrategia a considerar en la producción de mAbs ha sido la co-transfección con plásmidos que expresen diferentes proteínas e insertarlos dentro de una misma célula. Esta técnica se ha usado para la producción de proteínas fluorescentes como YFP y CFP (Goedhart et al., 2011), luciferasas (Underhill, 2010), para anticuerpos (Pybus et al., 2014; Akbarzadeh-Sharbat et al., 2013) o una mezcla de los anteriores para convertirse en un sistema que permite medir la eficiencia de transfección (Assur et al., 2012). Un sistema comercial de co-transfección que ha probado ser efectivo en la producción de mAbs es el sistema CHO DG44 de Thermo Sci. NY, USA.

2.3. Plásmidos con secuencias codificantes para cadenas pesada y ligera

En un trabajo previo del grupo se construyeron diferentes plásmidos para la transfección de células CHO que son pC y pV, ambos contienen el promotor de citomegalovirus (CMV) y se les colocaron las secuencias de los genes codificantes para expresar ya sea la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo anti-esfingomielinasa-D. Estos genes se insertaron monocistricamente en ambos plásmidos, además de que cuentan con un sitio IRES del gen c-myc (de origen eucariote) para la cadena pesada y de EMCV (proveniente del virus de la encefalomiocarditis) para la cadena ligera. La región IRES del gen c-myc se ha confirmado con capacidad para la traducción libre del cap 5' en mRNA, así como también se demostró que tiene 5 veces más actividad que el IRES de EMCV (Stoneley et al., 2000). Estos sitios en teoría permitirán niveles de expresión de ARN mensajero diferentes para poder variar la relación de ambas cadenas (pesada y ligera) del anticuerpo según lo reportado por Schlatter et al. (2005). También se construyeron plásmidos control que carecen de secuencia IRES para comprobar las diferencias de expresión de las cadenas LC y HC. El plásmido pV cuenta con el promotor CMV, un sitio de multiclonación, una región IRES de EMVC, el gen que codifica para DHFR y un origen de replicación pUC.

Por otro lado, el plásmido pC cuenta con el promotor CMV, un sitio de clonación, un origen de replicación pUC y un gen de resistencia a Neomicina.

Los fragmentos de la cadena pesada y ligera insertados en los plásmidos contienen las características ejemplificadas en la figura 7. Para la cadena pesada se construyó un inserto que incluye la región IRES del gen c-myc (en los plásmidos indicados en la tabla 2) con la idea de facilitar la transcripción de la cadena HC, una secuencia Kozak (Kozak, 1991) que es la región de inicio de la transcripción para organismos eucariontes, una secuencia líder que es la señal de secreción (Dalton y Barton, 2014) de la proteína al medio, la región variable de la cadena pesada (V_H), la región constante (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}) junto con la región bisagra que permite la unión de 2 dímeros de cadena pesada y cadena ligera para formar el mAb anti-SMD, el codón de paro (Stop) y un elemento de trans-activación *cis* (CTE, por sus siglas en inglés) que ayuda a la estabilidad y expresión postranscripcional del mRNA. Para la cadena ligera se usó la región IRES del virus EMCV (en los plásmidos indicados en la tabla 2), la secuencia Kozak (Kozak, 1991) en la secuencia líder que es la señal de secreción (Dalton y Barton, 2014), la región constante (C_L) y variable (V_L) de la cadena ligera del mAb anti-SMD, el codón de paro (Stop) y un elemento de trans-activación *cis* (CTE).

Inserto de la cadena pesada



TOTAL: 2104 bases

Inserto de la cadena ligera:



TOTAL: 1576 bases

Figura 7. Esquema de elementos contenidos en las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera.

Se diseñaron y construyeron en el laboratorio 6 plásmidos diferentes con las características mostradas en la Tabla 2, los cuales no fueron construidos a partir de ADN sintético. Con estas combinaciones de plásmidos se esperaba obtener 4 clonas diferentes, la clona control (cadena pesada y ligera sin secuencia IRES), mientras las otras 3 presentarían una región IRES en la cadena pesada, una región IRES en la cadena ligera o ambas cadenas con una región IRES.

Tabla 2. Características de los plásmidos generados para la transfección de las células CHO DG 44 (Valdez-Cruz NA, et al., 2014, no publicado).

Número de clona	Plásmido	Inserto (gen codificante)	Tamaño (kb)
12	pV	Cadena pesada + IRES c-myc	6.5
5	pV	Cadena ligera + IRES EMCV	6
36	pV	Cadena pesada	6.1
3	pV	Cadena ligera	5.4
20	pC	Cadena pesada + IRES c-myc	7.5
15	pC	Cadena ligera	6.4

3. Hipótesis

Las células CHO DG44 transformadas con los plásmidos contruidos de forma estable o transitoria, producen el anticuerpo monoclonal anti-esfingomielinasa D.

3.1. Objetivo general

Usando los plásmidos previamente contruidos, transformar células CHO DG44, para producir de manera diferencial la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-esfingomielinasa D.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las células CHO DG44 transfectadas con diferentes combinaciones de los plásmidos pV y pC contruidos que contienen las secuencias codificantes para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo anti-esfingomielinasa D.
- Determinar la producción de mRNA de las cadenas ligera y pesada en las transformantes positivas a los procesos de selección clonal.
- Evaluar la producción de la cadena pesada, la cadena ligera y el anticuerpo completo en las células CHO transfectadas.

4. Materiales

4.1. Plásmidos y construcciones

El plásmido pC contiene un gen de resistencia a neomicina y un gen de resistencia a ampicilina. El plásmido pV contiene el gen *dhfr* y un gen de resistencia a ampicilina.

Primers A 5' CTG AGG TCA CAT GCG NN 3' y B 5' GCT CTT CTG CGT GTA NN 3': Diseñados para la amplificación del mRNA mensajero de la cadena pesada del anticuerpo (Sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM). Estos primers generan un amplicon de 551 pb, perteneciente a la región CH₂ y CH₃ del anticuerpo.

Primers C 5' GCC CTG GCC GAC ATA NN 3' y D 5' GCA GGC GTA ACT TTG NN 3': Diseñados para la amplificación del mRNA mensajero de la cadena ligera del anticuerpo (Sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM). Estos primers generan un amplicon de 594 pb, perteneciente a la región VL y CL del anticuerpo.

4.2. Cepas de *E. coli* Top10 transformadas con los diferentes plásmidos construidos previamente (Valdez-Cruz NA) y medio de cultivo.

Clona 3 LC pV: Cepa transformada con pV que contiene la cadena ligera del mAb.

Clona 5 LCI pV: Cepa transformada con pV que contiene la cadena ligera del mAb y la región IRES de EMCV.

Clona 12 HCI pV: Cepa transformada con pV que contiene la cadena pesada del mAb y la región IRES de *c-myc*.

Clona 15 LC pC: Cepa transformada con pC que contiene la cadena ligera del mAb.

Clona 20 HCI pC: Cepa transformada con pC que contiene la cadena pesada del mAb y la región IRES de *c-myc*.

Clona 36 HC pV: Cepa transformada con pV que contiene la cadena pesada del mAb.

Medio LB (1 L): Se preparó con 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se esterilizó en autoclave y previo a la inoculación se añadió ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

4.3. Línea celular usada y medios de cultivo.

CHO DG44: Células de mamífero cultivadas en suspensión (Thermo Sci. NY, USA).

Medio CD DG44 (40 mL): Se preparó con 38.8 mL de medio CD DG44 (Thermo Sci. NY, USA), 16 µL de insulina Humulin N (Eli & Lilly Co.) (100 U/mL) y 1.2 mL de L-glutamina 100x Biowest (200mM).

Medio OptiCHO™ (40 mL): Se preparó con 38.8 mL de medio OptiCHO™ (Thermo Sci. NY, USA), 16 µL de insulina Humulin N (Eli & Lilly Co.) (100 U/mL) y 1.2 mL de L-glutamina 100x Biowest (200mM).

Otros reactivos para medio OptiCHO™:

- Metrotexato 1mM (Sigma-Aldrich): Se diluyó dependiendo la concentración que se requería.
- Geneticina™ 50 mg/ml (Gibco™): Diluir a 500 µg/mL de medio OptiCHO™.

4.4. Equipos

Incubadora para *E. coli*: Las condiciones de operación para los cultivos de *E. coli* fueron 37°C de temperatura y 200 rpm de agitación.

Incubadora Nuair NU-5000 para cultivo de células de mamífero: Las condiciones de operación para el cultivo de las células CHO DG44 fueron 37°C de temperatura, entre 55-90 rpm de agitación y 5% de CO₂ con humedad.

Fuente de voltaje y cámaras de electroforesis de BIORAD: Para realizar geles 1D-SDS PAGE.

Transblot BIORAD: La transferencia semi-húmeda se realizó a 25 V, 350 mA por 90 minutos.

Espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 5: Se usó a 600nm de longitud de onda para la medición de absorbancia de los cultivos de *E. coli*.

Lector de placas para ELISA Stat Fax 4200 Awareness Technology: La lectura se realizó a 490 nm para la técnica ELISA usando como agente revelador OPD.

Termociclador PCR Express Thermo Hybrid: Se utilizó para realizar las reacciones de PCR y PCR anidada en plásmidos y cDNA.

Escaner Li-cor C-Digit: Utilizado para revelar membranas de Western Blot de PVDF con los reactivos SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate y SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate.

Fotodocumentador Gel Doc EZ Imager: Se ocupó para revelar geles teñidos con azul de Coomassie para ver proteínas o teñidos con bromuro de etidio para observar material genético.

Nanodrop Lite Thermo Scientific: Se usó para cuantificación de ADN y proteínas.

Microscopio invertido AE 2000 Motic: Para la cuantificación por azul de tripano de las células viables.

Microscopio óptico Labomed y cámara Neubauer: Para la cuantificación por azul de tripano de las células viables.

Centrífuga Eppendorf 5804 R: Para la centrifugación de muestras de proteína, biomasa o material genético.

4.5. Enzima de restricción

***Pvu I*:** Se usó 1 U de la enzima por 1 µg de ADN de acuerdo con lo establecido por el proveedor y todas las reacciones se incubaron a 37°C (Thermo Sci. NY, USA).

4.6. Kits

Zipy Kit Plasmid miniprep: Kit para la extracción y purificación de plásmidos de células

2D-Quant Kit: Usado para la cuantificación de proteína en muestras a analizar por SDS-PAGE y Western Blot.

Bethyl Laboratories, inc. Human IgG ELISA Quantitation Set: Kit de ELISA para la cuantificación del anticuerpo en los sobrenadantes de cultivo de células CHO DG44 transfectadas. Como reactivo para revelar se usó OPD SigmaFast™.

RNeasy mini Kit (Qiagen, Bethesda USA): Usado para la extracción de mRNA de la clona P15-12, así como la remoción del ADN genómico de estas células CHO transfectadas.

Thermo Scientific RevertAid H Minus Reverse Transcriptase: Se usó para realizar la retrotranscripción del mRNA extraído de la clona P15-12 y obtener el cDNA, que se necesita para amplificar los fragmentos de cDNA provenientes de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo.

DNA/RNA Shield Zymo Research: Usado para la conservación y almacenamiento de células CHO DG44 cosechadas para la posterior extracción del mRNA y la retrotranscripción del mismo.

Thermo Scientific kit PCR: Se utilizó para realizar las reacciones de amplificación de los plásmidos linearizados y amplificación de las muestras de cDNA en PCR y PCR anidada.

5. Metodología

5.1. Transformación de *E. coli* Top10 quimiocompetentes con los plásmidos con las secuencias codificantes para la cadena pesada o ligera.

Se descongeló un vial de células de *E. coli* One Shot™ Top10 quimiocompetentes (Thermo Sci. NY, USA), guardado a -70°C. Se añadieron 3 µL o 10 ng de un plásmido, pV o pC, al vial y se mezcló suavemente. La mezcla se incubó en hielo por 30 min y después se le realizó un choque térmico por 50 seg a 42°C. Terminando este paso se regresó el vial al hielo por 2 min y se añadieron 250 µL de medio S.O.C. una vez pasado el tiempo. El vial se mantuvo 1 h a 37°C y 225 rpm.

Las células transformantes se inocularon en una caja de Petri con medio LB y ampicilina (100 µg/mL), y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias resistentes al antibiótico fueron seleccionadas y se comprobó la transformación del plásmido correspondiente a través de la purificación, digestión del plásmido con la enzima *Pvu I* y su observación en geles de agarosa e identificación de su tamaño en pares de bases (PB).

5.2. Amplificación y purificación de plásmidos

Los plásmidos pC y pV fueron amplificados en *E. coli* One Shot™ Top10 en 50 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) por 10 h, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Thermo Sci. NY, USA). Para seguir la cinética bacteriana se tomaron muestras de 100 µL del cultivo cada hora y fueron analizadas por espectrofotometría a 600 nm. Una vez terminado el crecimiento los cultivos se centrifugaron por 30 min a 3,000 rpm y se desechó el sobrenadante, mientras que los pellets se guardaron a -20°C, para que en los siguientes pasos se extrajeran y purificaran los plásmidos siguiendo el manual de uso del Kit Zippy Plasmid miniprep de Zymo Research.

5.3. Cultivo de células CHO DG44

Un vial de células CHO DG44 con 10% DMSO y medio CD DG44 (Thermo Sci. NY, USA), guardado en nitrógeno líquido, fue descongelado, usando medio nuevo CD DG44 completo (L- glutamina 8 mM), además se les adicionó 16 µL (100 U/mL) de insulina, en frascos T-25. Las células fueron crecidas a una temperatura de 37°C, con 5% de CO₂, hasta alcanzar $\approx 1.2 \times 10^6$ células viables/mL y una viabilidad máxima de 85%. Posteriormente, se procedió a dividir el cultivo en 3 frascos T-25 con medio nuevo, donde las células alcanzaron 1.2×10^6 células viables/mL y una viabilidad máxima de 92%, listas para la transfección.

Además, se realizaron pases en frascos T-75 hasta alcanzar una densidad máxima de 1.73×10^6 células viables/mL y 88.1% de viabilidad y cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL hasta obtener una densidad máxima de 4.2×10^6 células viables/mL y 89% de viabilidad, para tener mayores volúmenes (10-30 mL) de transfección y obtener mayor número de crioviales para hacer un banco celular.

Para determinar la viabilidad celular, se realizó un conteo en microscopio con cámara de Neubauer diluyendo la muestra 1:1 con azul de tripano al 0.4 % y contando el número de células vivas y muertas, para obtener el porcentaje de viabilidad y la concentración celular por mL.

5.4. Congelamiento de células CHO DG44

Las células CHO DG44, crecidas en medio CD DG44 y con una densidad celular de 1×10^6 células viables/mL, fueron transferidas a un tubo Falcon estéril y se concentraron a 1×10^7 células viables/mL. Se añadió DMSO a una concentración final del 10 %. Las células fueron resuspendidas, alicuotadas en 1 mL y congeladas lentamente, como lo indicaba el manual del proveedor (Thermo Sci. NY, USA)

5.5. Transfección transitoria de células CHO DG44

Los plásmidos purificados de los cultivos de *E. coli* se cuantificaron en un espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Sci. NY, USA). Cuando las células DG44 cultivadas en frascos T25 alcanzaron una concentración aproximada de 1×10^6 células viables/mL se inició su transfección transitoria, pasando 1×10^6 células viables a pozos de 1 mL (en una caja de 24 pozos) donde se realizó la transformación con 2 concentraciones del agente de transformación (0.5 y 1 μ L de FS/mL) y los plásmidos circularizados. Las células se dejaron 4 h estáticas (Agrawal et al., 2013; Liu et al., 2008). Se recuperaron los sobrenadantes a los días 2 y 6 después de la transfección.

Las células CHO DG44 transitorias se co-transfectaron con 2 plásmidos: uno pV y uno pC, cada uno expresará la cadena pesada o la cadena ligera de acuerdo con las combinaciones mostradas en la Figura 8.

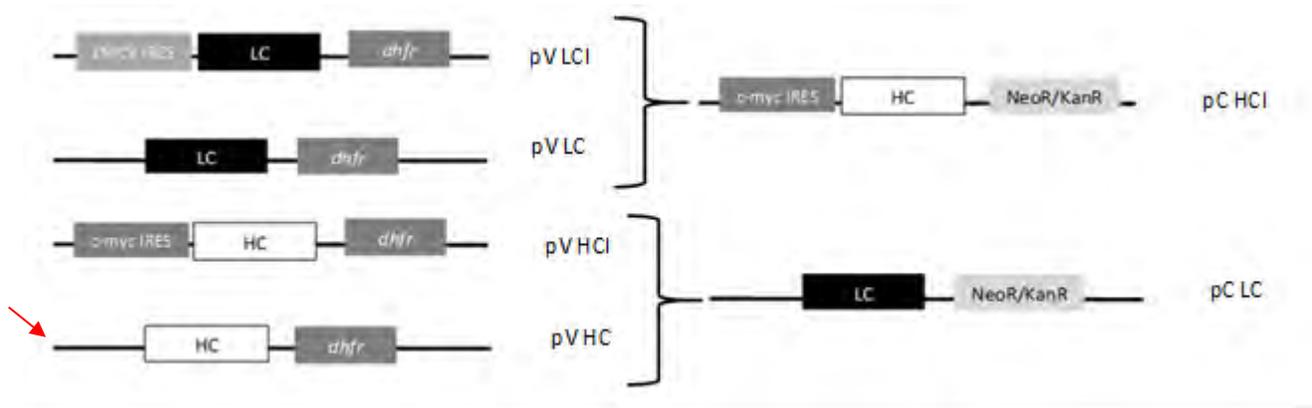


Figura 8. Diferentes combinaciones de los plásmidos pC y pV para células transitorias y las células estables. Se señala la combinación control con una flecha roja. LC: Cadena ligera, HC: Cadena ligera, *dhfr*: gen de la enzima dihidrofolato reductasa, *NeoR/KanR*: gen de resistencia a Neomicina y Kanamicina.

5.6. Protocolo de digestión con la enzima *Pvu I* para transfección estable

Los plásmidos purificados se cuantificaron en un espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Sci. NY, USA) y posteriormente fueron digeridos con la enzima *Pvu I* para linearizarlos y, durante la transfección, para generar células estables.

La digestión con *Pvu I* requirió de 5 μ L de buffer B3 10x, 1-3 μ g de ADN purificado, 1-3 U de *Pvu I* (1 U/ μ g) de ADN), para plásmidos requiere de 50 mM de KCl y aforar a 50 μ L con H₂O grado PCR. La reacción se incubó a 37°C, mientras que la inactivación se realizó a 80°C por 20 min.

La digestión de los plásmidos se comprobó en un gel de agarosa 1% y 3 μ L de bromuro de etidio, añadiendo 1-3 μ L de muestra y corriendo a 70-80 volts por 80 min.

5.7. Transfección estable de células CHO DG44

A 3.5×10^5 células viables en un volumen de 5 mL se le añadieron 3 μ g de cada plásmido linearizado y lipofectamina. Las células transfectadas se incubaron a una temperatura de 37°C, con 5% de CO₂, a 55 rpm, hasta que alcanzaron una viabilidad del 90%. Después se transfirieron las células a medio de selección OptiCHO™ (Thermo Sci. NY, USA) con 8mM de L-glutamina y cuando se alcanzó una sobrevivencia superior al 90% se añadieron 500 μ L/mL de geneticina™. Posteriormente, cuando las células alcanzaron más del 70% de viabilidad se realizó una segunda ronda de selección con metotrexato 500nM en medio OptiCHO™ + geneticina™ (500 μ g/mL) y las células se mantuvieron hasta que volvieron a alcanzar más del 70% de viabilidad.

Después del proceso de selección con antibiótico y habiendo alcanzado una viabilidad mayor al 70% se añadió metotrexato (2nM), cuya concentración se aumentó hasta 200 nM. A lo largo del proceso se tomaron muestras del sobrenadante para evaluarlas en SDS-PAGE teñidas con Coomassie, Western Blot y cuantificación por ELISA.

5.8. Protocolo de transformación alternativo

Las células CHO DG44 se co-transfectaron de manera transitoria (con plásmidos circularizados) y estable (con plásmidos linearizados), usando la metodología de Agrawal et al. (2013), para expresar la cadena pesada y la cadena ligera de acuerdo con las combinaciones de plásmidos mostradas en la figura 8. Se transformaron células CHO DG44 por arriba de 1×10^6 células/mL y preparando las soluciones de los plásmidos y el agente de transformación por separado.

Después de la transformación se realizó la selección de las clonas con mayor viabilidad con medio selectivo, antibiótico y MTX, de estos cultivos se colectó el sobrenadante para cuantificar la proteína total e identificar mediante Western blot y ELISA el anticuerpo producido.

5.9. Extracción de mRNA y retrotranscripción

Se tomaron 4.5 mL de un cultivo de células CHO DG44 transfectadas que se nombraron P15-12, y que contienen los plásmidos LC pC y HCl pV linearizados, a una concentración de 6×10^6 células/mL, se centrifugaron por 10 min a 450 rpm y se resuspendieron para obtener 1×10^7 células/mL junto con un volumen del reactivo DNA/RNA SHIELD™ (Zymo Research) y se guardaron a -70°C para una posterior extracción de mRNA.

La muestra se descongeló en hielo, se tomaron 350 μL de esta muestra y 350 μL del buffer de lisis RLT (Kit RNeasy miniprep de Qiagen), la mezcla se agitó usando una jeringa con aguja estéril y libre de RNAsas. A la mezcla se le añadió un volumen de alcohol al 70% (no desnaturalizado) y se mezcló por pipeteo (como lo describe el proveedor).

El volumen total se pasó a una columna del kit RNeasy spin que se centrifugó por 15 s a $>8000 \times g$ ($>10,000$ rpm), se recuperó el permeado y se procedió a la remoción del ADN genómico agregando 60 μL de una mezcla de DNasa I y buffer para la DNasa 1x, incubando la mezcla por 15 min a temperatura ambiente ($20-30^{\circ}\text{C}$).

Después de lavar la columna RNeasy con buffer RW1 se realizaron 2 lavados con 500 μL de buffer RPE por 15 s y 2 min a $>8000 \times g$. Se tiró el permeado y se centrifugó la columna por 1 min a $>8000 \times g$ con 50 μL de agua libre de RNAsas, este paso se repitió una vez.

La retrotranscripción se realizó con la enzima transcriptasa reversa ReverseAid H minus de Thermo Scientific, siguiendo la siguiente reacción: RNA total extraído 9 μL , primer HC10R 1 μL , primer LC10R 1 μL , hexámeros random 1 μL , Thermo RiboLock Inhibidor de RNasa 0.5 μL a un volumen total de 12.5 μL .

La mezcla se incubó por 5 min a 65°C . Posteriormente se añadieron el resto de los componentes de la reacción: 12.5 μL de la reacción anterior, buffer de reacción 5x 4 μL , 2 μL de dNTPs 10mM, transcriptasa reversa 1 μL a un volumen total de 19.5 μL . La reacción se incubó por 10 min a 25°C , después a 42°C por 1 hora y se terminó a 70°C por 10 min. El cDNA obtenido se guardó a -20°C .

5.10. PCR, PCR anidada y electroforesis

Obtenido el cDNA de la retrotranscripción, se procedió a amplificar por PCR aquellos cDNAs de la cadena pesada (HC, amplicon de 551 pb) y de la cadena ligera (LC, amplicon 594).

Para amplificar la cadena pesada solo fue necesario realizar la PCR directa con los primers A y B, pero en el caso de la cadena ligera se realizó una PCR anidada. En la primera reacción de la PCR anidada se usó el primer LC10R y hexámeros de nucleótidos al azar, mientras que en la segunda reacción se usaron tanto el primer “*forward*” y “*reverse*” de la LC llamados C y D.

Las reacciones de PCR se realizaron con 2 μL del buffer de reacción 1x, 0.4 μL de dNTPs 10mM, primer forward (A o C) 0.4 μL , primer reverse (B o D) o hexámeros al azar 0.4 μL , cDNA $<1,000$ ng 1 μL , MgSO_4 5mM 2 μL , H_2O grado inyectable 12.8 μL , Taq pol (0.5 μL taq pol + 1.5 μL H_2O) 1 μL para un volumen total de 20 μL .

La reacción de PCR se corrió: 1 ciclo a 94°C por 5 min; 32 o 35 ciclos a 94°C por 45 s, 52°C por 45 s y 72°C por 1 min; y 1 ciclo a 72°C por 10 min.

5.11. Extracción de cDNA de gel y secuenciación

A partir de las bandas obtenidas de la amplificación con los oligonucleótidos usados, los fragmentos de ADN fueron recuperados usando el kit *EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction* (Bio Basic Inc). El protocolo se siguió como se indica en el manual de uso. Brevemente se cortaron las bandas de interés y se añadieron 200 µL de solución con agarasa. Estos se incubaron 50-60°C por 10 min hasta disolver. La solución se pasó por las columnas EZ-10 y se tiró el permeado por centrifugación, el DNA recuperado fue lavado y recolectado en buffer libre de Dnasas.

Las muestras se cuantificaron en Nanodrop y se guardaron a -20°C para su posterior secuenciación en un secuenciador automático (Applied Biosystems) del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.12. Liofilización y precipitación de muestras y lisis celular

Después de 48 h de la transfección celular, se tomaron muestras del sobrenadante y de las células cada 3 días. Las muestras de sobrenadantes se precipitaron mediante un protocolo de TCA-acetona (Proteomics and Mass Spectrometry Facility, Cornell University, EU) o fueron liofilizadas y resuspendidas en agua con PMSF (Sigma-Aldrich).

Por otro lado, las muestras celulares se lisaron, mediante lavados con PBS y una centrifugación a 10,000 rpm en solución IEF más PMSF.

5.13. SDS-PAGE y Western-blot de la cadena ligera y la cadena pesada

La producción del anticuerpo anti-esfingomielinasa D en la clona P15-12 fue determinada en los sobrenadantes de los cultivos mediante SDS-PAGE y ensayos de Western-Blot.

Los sobrenadantes fueron cuantificados usando el protocolo del kit 2D-Quant, y usando un espectrofotómetro Nanodrop lite (Thermo Scientific). Las muestras se separaron en un gel de acrilamida al 12.5%, en condiciones desnaturalizantes con β -mercaptoetanol. Se usó como control positivo un anticuerpo IgG y el marcador de peso fue PageRuler 10 a 250 kDa (ThermoFisher Scientific).

Los geles se tiñeron con una solución azul de Coomassie o fueron transferidos a una membrana de PVDF de Millipore para continuar con el Western Blot. La membrana fue bloqueada con leche 5% por 1 h e incubada con un anticuerpo de ratón anti-IgG humano acoplado a HRP (Sigma-Aldrich) que reconoce la región Fc, más tarde se reveló con SuperSignal West luminol pico y SuperSignal West luminol femto (Thermo Scientific) en un escáner LICOR C-Digit. Algunas membranas se lavaron usando un protocolo de *stripping* que permite el desbloqueo de la membrana de PVDF y la remoción de los anticuerpos primarios y secundarios mediante varios lavados con una solución que tiene Tween 20 1% y SDS 0.1% para poder reutilizar la membrana (protocolo de Abcam, 2014).

5.14. Cuantificación por ELISA del anticuerpo anti-esfingomielinasa D

Las muestras usadas para la cuantificación por ELISA fueron sobrenadantes o liofilizados. El procedimiento se realizó en placas de 96 pozos de acuerdo con el procedimiento del kit de ELISA (Bethyl Laboratories, inc.). Se usó un anticuerpo de recubrimiento de pozo y se incubó por 1 h, después se bloquearon los pozos con una solución de BSA (1%) por 30 min, una vez realizado el bloqueo se añadieron las muestras o la curva estándar y se dejaron incubando por 2 h, se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG-Fc humana acoplado a HRP (horseradish peroxidase) y finalmente el sustrato usado para la reacción con la HRP fue o-fenildiamina (SIGMAFAST™ OPD de Sigma Aldrich) que se lee a 492 nm en un lector de placas.

La curva estándar se realizó en un inicio a una concentración de 500 ng/mL. Sin embargo, debido a que hubo saturación, la concentración máxima se redujo a 250 ng/mL y se usaron 6 concentraciones de 250 a 3.5 ng/mL.

6. Resultados

6.1. Preparación y crecimiento de células CHO DG44 para transfectar

Con la finalidad de caracterizar las células CHO DG44 y de asegurar su velocidad de crecimiento y viabilidad previo a la transfección, se crecieron las células en medio completo CD DG44 (Thermo Sci. NY, USA) en un frasco T-25, a 37°C, 5% de CO₂ y a 95 rpm con un inóculo inicial de 3 x 10⁵ células viables/mL, alcanzando una biomasa máxima de 1.2 x 10⁶ células/mL en 62 h aproximadamente (Figura 9A). La viabilidad inicial fue cercana a 75% a las 12 h de inóculo, posteriormente aumentó a 80% a las 24h y se mantuvo así a lo largo de la cinética hasta alcanzar 90% de viabilidad (Figura 9B), con una velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) de 0.0342 h⁻¹.

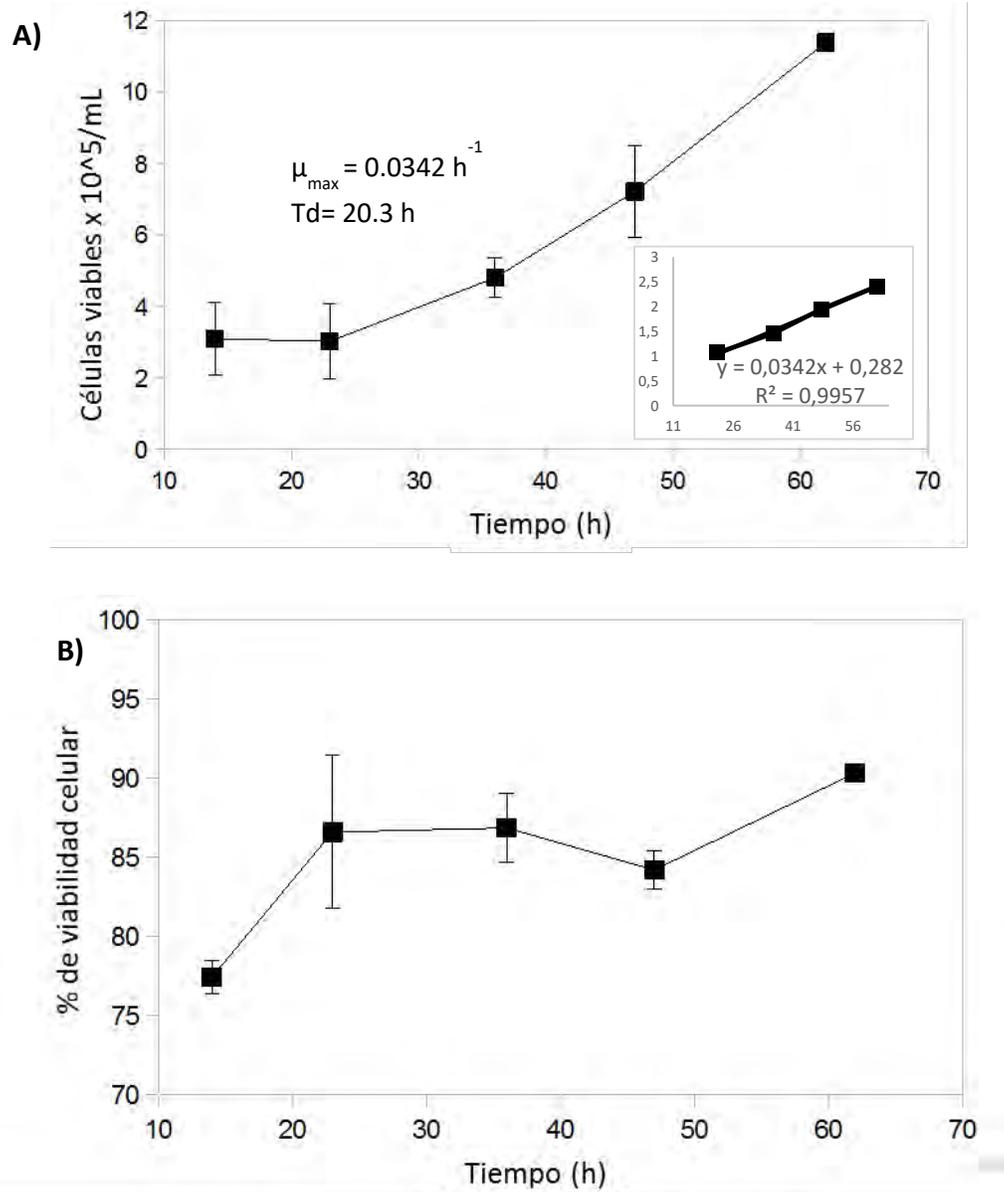


Figura 9. A) Cinética de crecimiento de las células CHO DG44 sin transfectar en medio CD DG44 completo, en el inserto se muestra la línea de tendencia para el cálculo de μ_{\max} B) Viabilidad de las células CHO DG44.

6.2. Transfección de células CHO DG44 transitorias

Para obtener una producción de mAb se realizaron transfecciones transitorias usando diferentes combinaciones de plásmidos circularizados. Las células usadas para transfección transitoria alcanzaron una viabilidad de 90.5% y hasta 1.5×10^6 células/mL. 1×10^6 células en 1 mL se colocaron por pozo, en una caja de 24 pozos. Se usaron 10 pozos, 2 con controles negativos (sin ningún plásmido) y 8 para transfectar con las diferentes combinaciones de plásmidos que corresponden a las clonas P20-3 (20 HCl pC y 3 LC pV), P5-20 (20 HCl pC y 5 LCI pV), P15-12 (15 LC pC y 12 HCl pV) y P15-36 (15 LC pC y 36 HC pV) con 1.25 y 0.625 $\mu\text{L/mL}$ de solución para transfección en medio completo CD DG 44 (L- glutamina 8mM y 100 U/mL de insulina). Durante seis días se siguió la viabilidad de las células. Se observó que después de este tiempo, todos los cultivos decrecieron en viabilidad hasta el 10 %. De cualquier forma, se obtuvieron muestras durante los cultivos en los días 2 y 6 para su estudio con SDS-PAGE y ELISA.

Para las células transitorias se evaluaron los sobrenadantes de las combinaciones P20-3, P5-20, P15-12 y P15-36 en geles de SDS-PAGE (Figura 10). En el gel se cargaron muestras de las clonas transfectadas con 0.625 $\mu\text{L/mL}$ de solución para transfección (carriles 3, 5, 7 y 9) y muestras de las clonas transfectadas con 1.25 $\mu\text{L/mL}$ de solución para transfección (carriles 4, 6, 8 y 10). En el gel se añadió el mismo volumen de sobrenadante para todas las muestras, por lo que al comparar la intensidad de las bandas de las muestras con 1.25 $\mu\text{L/mL}$ de solución de transfección contra las muestras tratadas con 0.625 $\mu\text{L/mL}$, se observó que en las clonas P5-20 y P20-3 las muestras tenían mayor intensidad de banda con 1.25 $\mu\text{L/mL}$ de solución de transfección, y posiblemente mayor cantidad de proteína. En el caso de las clonas P15-12 y P15-36, se observó una intensidad de bandas similares entre ambos tratamientos (1.25 $\mu\text{L/mL}$ y 0.625 $\mu\text{L/mL}$). Sin embargo, la clona P15-36 resultó tener la mayor intensidad de bandas que las otras clonas. En los carriles se observaron bandas en los tamaños de 25, 55, 100 y 150 kDa, que son de interés pues podrían corresponder con los pesos de la cadena pesada, cadena ligera, dímeros de cadena pesada y el anticuerpo completo. Sin embargo, bandas similares se observaron en el carril de las células control. De ahí que se tratara de identificar el anticuerpo producido mediante Western blot usando el anticuerpo anti-humano IgG de ratón. Sin embargo, no se identificaron proteínas reconocidas por el anticuerpo.

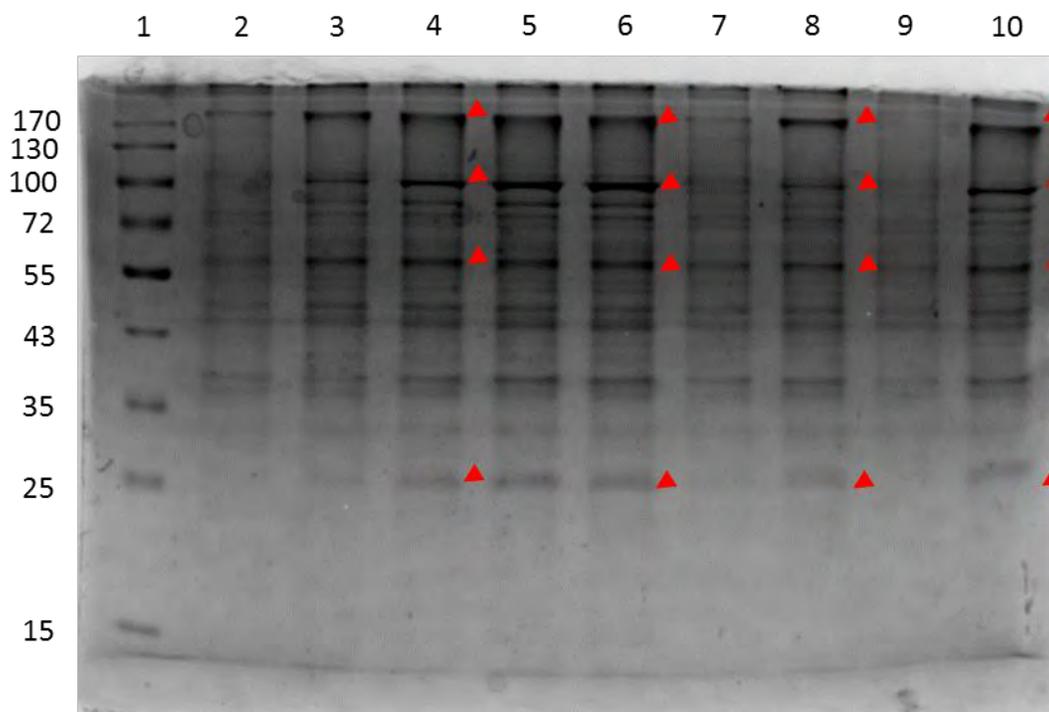


Figura 10. Gel SDS-PAGE reductor (12.5% de acrilamida) de los sobrenadantes del día 6 de las células transfectadas con plásmidos circularizados. Carriles: **1.** Marcador de peso PageRuler; **2.** Control negativo (células tratadas sin plásmidos); **3.** Clona P15-12 0.625 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **4.** Clona P15-12 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **5.** Clona P15-36 0.625 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **6.** Clona P15-36 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **7.** Clona P5-20 0.625 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **8.** Clona P5-20 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$; **9.** Clona P20-3 0.65 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y **10.** Clona P20-3 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. **P5-20:** plásmidos 5 LCI pV y 20 HCl pC. **P15-12:** plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC. **P20-3:** plásmidos 3 LC pV, y 20 HCl pC. **P15-36:** plásmidos 36 HC pV y 15 LC pC.

6.3. Transfección de células CHO DG44 estables y su crecimiento en medio selectivo

Con el objetivo de transfectar células de forma estable se probaron plásmidos linearizados con la enzima *Pvu I*. Las células usadas para la transformación fueron obtenidas de un vial descongelado distinto al usado en las transformaciones transitorias. En la figura 11A se observa que el cultivo alcanzó las 16×10^5 células/mL y la velocidad máxima alcanzada fue de 0.0329 h^{-1} en 70 h. La viabilidad celular alcanzó más del 80% a partir de las 100 h y aumentó hasta más del 90% a las 270 h (Figura 11B). Estas células fueron usadas para iniciar la transfección.

En un comienzo se utilizaron los plásmidos: 3 (LC pV) y 5 (LCI pV) para transformar las células CHO DG44, las cuales se encontraban con una viabilidad de 93.8% con una velocidad de crecimiento de 0.0329 h^{-1} (Figura 12). Se usaron 4 μg de plásmido linearizado para transformar 7 mL de cultivo a una concentración celular aproximada de 5×10^5 células/mL. Para cada transfección se tomaron 3.5 mL del mismo cultivo y se añadieron en diferentes frascos T25 más 3.5 mL de medio CD DG44 formulado (enriquecido con insulina 4 mM y glutamina 8 mM) (Invitrogen, 2007).

Cinética de células CHO DG44

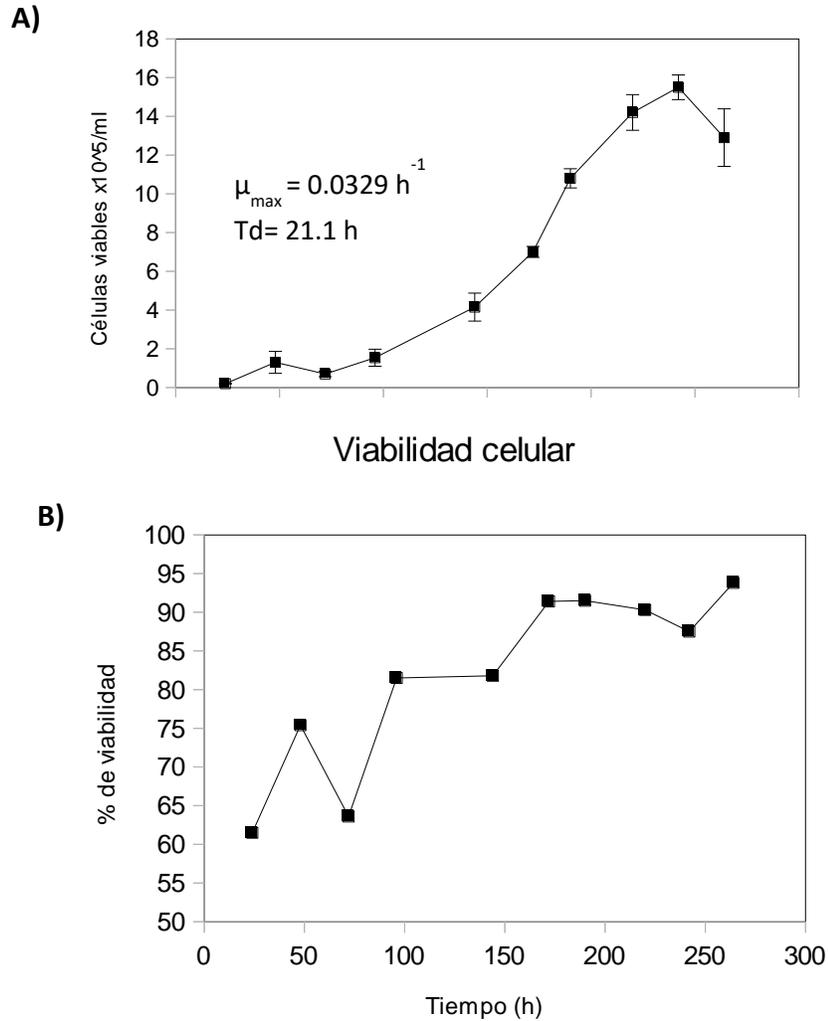


Figura 11. A) Cinética de las células CHO DG44 usadas para la transformación con los plásmidos P3 (pV LC) y P5 (pV LCI) incubadas a 37°C, 55 rpm y 5% de CO₂. B) Viabilidad de las células durante su adaptación para ser transformadas. La viabilidad final a la que se transformaron fue de 93.8% y alcanzaron un tiempo de duplicación de 21.1 h.

Después de la transfección de las células, se dio seguimiento a las cinéticas de las transformantes para cada plásmido (3 LC pV y 5 LCI pV), así como a su viabilidad (Figura 12). Después de 48 h, se removió el medio CD DG44 y se sustituyó por el medio de selección OptiCHO™ (insulina 4 mM, glutamina 8 mM), y cada tercer día se cambió la mitad del medio por medio nuevo (OptiCHO™) y 2% de SFB. Sin embargo, se observó que después de 100 h de transfección, la viabilidad de las clonas 3 LC y 5 LCI disminuyó hasta el 10 % y del 20 %, respectivamente.

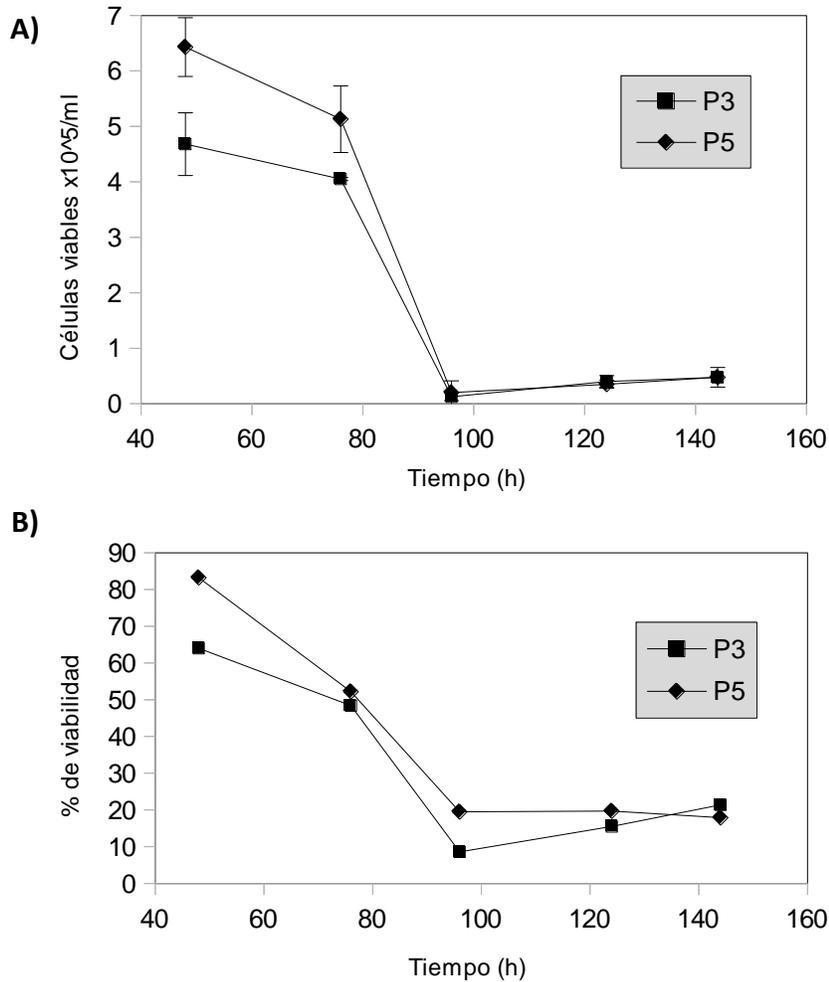


Figura 12. A) Células viables 3 LC y 5 LCI después del cambio de medio de CD DG44 (insulina 4 mM, glutamina 8 mM) a OptiCHO™ (insulina 4 mM, glutamina 8 mM) incubadas a 37°C, 55 rpm y 5% de CO₂, B) Viabilidad de las células transformantes 3 LC y 5 LCI durante el proceso de transfección. P3: plásmido 3 LC pV. P5: plásmido 5 LCI pV.

Por otro lado, se realizaron 2 transfecciones con combinaciones de plásmidos diferentes: Clona P5-20 (20 HCl pC y 5 LCI pV); y clona P15-12 (15 LC pC y 12 HCl pV). Inicialmente, se cultivaron células CHO DG44 en 2 frascos T25 a una concentración de 8×10^5 células/mL con una viabilidad celular de 89% con un volumen de 5 mL, 24 h antes de la transfección, según las recomendaciones de Agrawal et al. (2013). La transfección se realizó usando células con una viabilidad de 94%, añadiéndose 3 μ g por plásmido, y la solución de transfección por mL de medio.

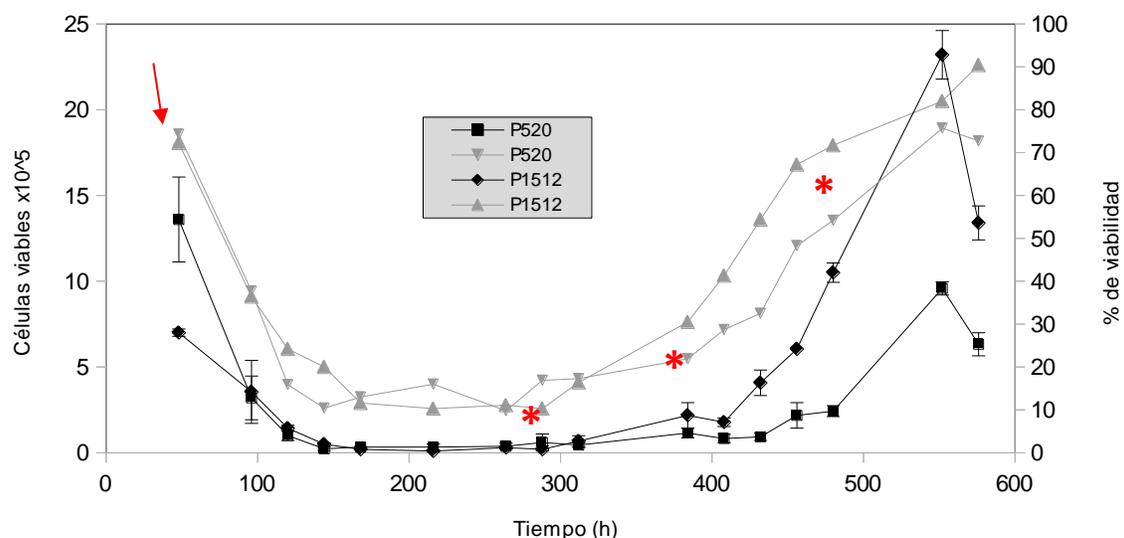


Figura 13. Cinética de las células transfectadas P5-20 y P15-12. Las líneas negras indican el número de células viables/mL, mientras las líneas grises indican el porcentaje de viabilidad. La cinética de transfección inició cuando se cambió el medio CD DG44 por medio de selección OptiCHO™ a las 48 h después de realizarse la transfección (indicado con flecha roja) y las células se incubaron a 37°C, 90 rpm y 5% de CO₂. P5-20: 20 HCl pC y 5 LCI pV. P15-12: 15 LC pC y 12 HCl pV. Los asteriscos indican las muestras tomadas para Western Blot y SDS-PAGE.

A las 48 h de transfección se removió el medio CD DG44 y se sustituyó por el medio de selección OptiCHO™ (insulina 4 mM, glutamina 8 mM). El medio CD DG44 gastado, fue guardado a 4°C con 1 µL de inhibidor de proteasas PMSF (Sigma-Aldrich). En los días 5, 7, 10 y 12 se tomó la mitad del medio y se añadió medio de selección nuevo OptiCHO™, el medio usado también fue guardado a 4°C con 1 µL de inhibidor de proteasas. La cinética de las células transfectadas se muestra en la figura 13. Se observó que, a partir de las 400 h, las células recuperaron el crecimiento con una velocidad de 0.017 h⁻¹ y con un tiempo de duplicación de 40.77 h para la clona P15-12 y 0.0175 h⁻¹ con un tiempo de duplicación de 39.61 h para la clona P5-20 (Figura 13). Particularmente, la clona P15-12 alcanzó una concentración máxima de 2.3 x 10⁶ células/mL y 90.4% de viabilidad para el día 26 después de la transfección, mientras que la clona P5-20 alcanzó una concentración máxima de 9.6 x 10⁵ células/mL y 75.7% de viabilidad.

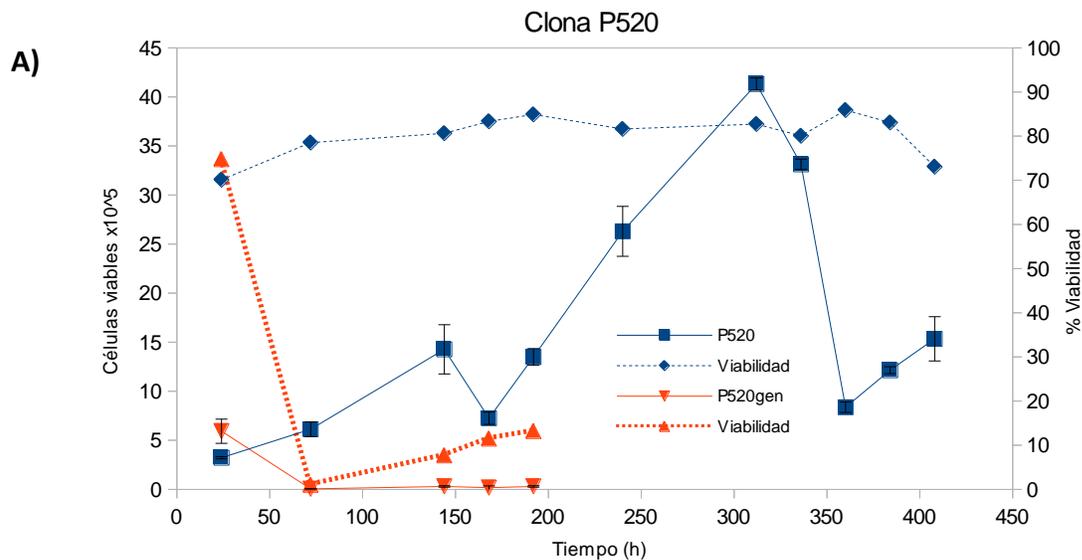
6.4. Selección clonal por geneticina y MTX

Las clonas obtenidas de la transfección estable se denominaron P5-20 (20 HCl pC y 5 LCI pV) y P15-12 (15 LC pC y 12 HCl pV), se generaron viales para congelar en nitrógeno líquido y al mismo tiempo se iniciaron nuevos cultivos de estas células con geneticina (250 µg/mL), para iniciar la selección de las células que tuvieran el segundo plásmido, y sin el antibiótico que sirvieron como control de crecimiento (Figura 14). En la cinética se observa como la viabilidad de las células P5-20 con geneticina disminuyó hasta 15% a las 60 h debido al efecto del antibiótico, mientras el número de células se mantiene por debajo de 30,000/mL hasta morir, en comparación las células P5-20 sin geneticina, las cuales mantuvieron una viabilidad constante a lo largo de la cinética (Figura 14A). Por lo tanto, el plásmido que se transfectó eficientemente fue el 5 LCI pV, ya que contiene el gen

dhfr para la supervivencia en el medio de selección OptiCHO™. Existen diferentes causas de la ineficiente transfección con plásmido 20 HCl pC, como: i) Que no haya transfectado la célula, ii) Que haya entrado a la célula, pero no se pueda expresar por insertarse en sitios del genoma con bajos niveles de transcripción (región de heterocromatina, por ejemplo) y iii) que el gen de resistencia se exprese en niveles bajos y que no pueda resistir la selección con geneticina.

Por otro lado, la viabilidad y concentración de las células P15-12 cultivadas con geneticina (250 ng/mL) cayeron de la misma manera que con la clona P5-20 a las 60 h. Sin embargo, éstas se recuperaron hasta alcanzar una concentración máxima de 3.6×10^6 células/mL y una viabilidad del 85%. A las 384 h, se duplicó la concentración de geneticina (500 µg/ml), sin causar cambios en la viabilidad celular (Figura 14B).

Las células P15-12 estables sobrevivieron a ambas condiciones de selección, lo que sugiere que ambos plásmidos transfectados entraron en las células CHO DG44 y se insertaron en su genoma. De ahí que se realizara un proceso de presión de selección usando diferentes concentraciones de MTX (desde 2 hasta 200 nM), que inhibe la DHFR y ha demostrado que permite la selección clonal al elevar la concentración de la enzima y obtener clones con mayor número de copias del gen *dhfr* (Pallavicini et. al, 1990). La selección acelerada comenzó con 2 nM de MTX y posteriormente se aumentó 10 veces (Figura 15). Sin embargo, la viabilidad y concentración celular cayeron a 20 % y 30,000 células/mL, respectivamente.



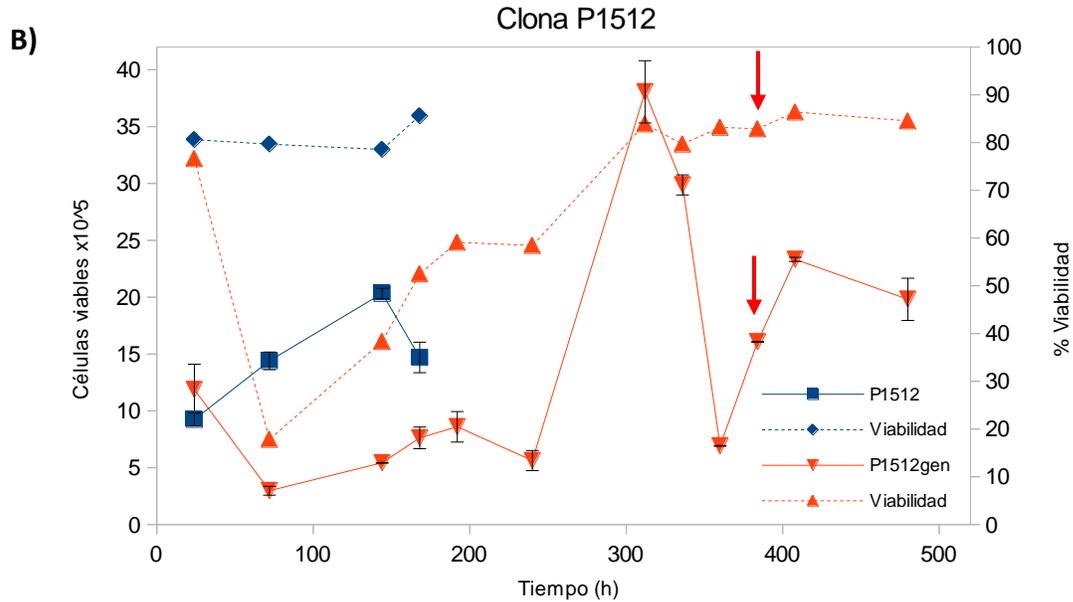


Figura 14. Cinética de las células transfectadas de forma estable con 2 plásmidos linealizados A) P5-20 y B) P15-12 con geneticina a 250 µg/mL (naranja) y sin geneticina (azul) en medio de selección OptiCHO™ que permite crecer a las células que posean el plásmido pV. Ambas cinéticas se realizaron a 37°C, 90 rpm y 5% de CO₂ e iniciaron cuando se añadió la geneticina (250 ng/mL). Las líneas sólidas representan las células viables x10⁵/mL, mientras que las punteadas indican la viabilidad. En la gráfica se indica con una flecha el tiempo en el que se cambió la concentración de geneticina de 250 a 500 µg/mL en el cultivo de la clona P15-12. P5-20: plásmidos 20 HCl pC y 5 LCI pV. P15-12: plásmidos 15 LC pC y 12 HCl pV.

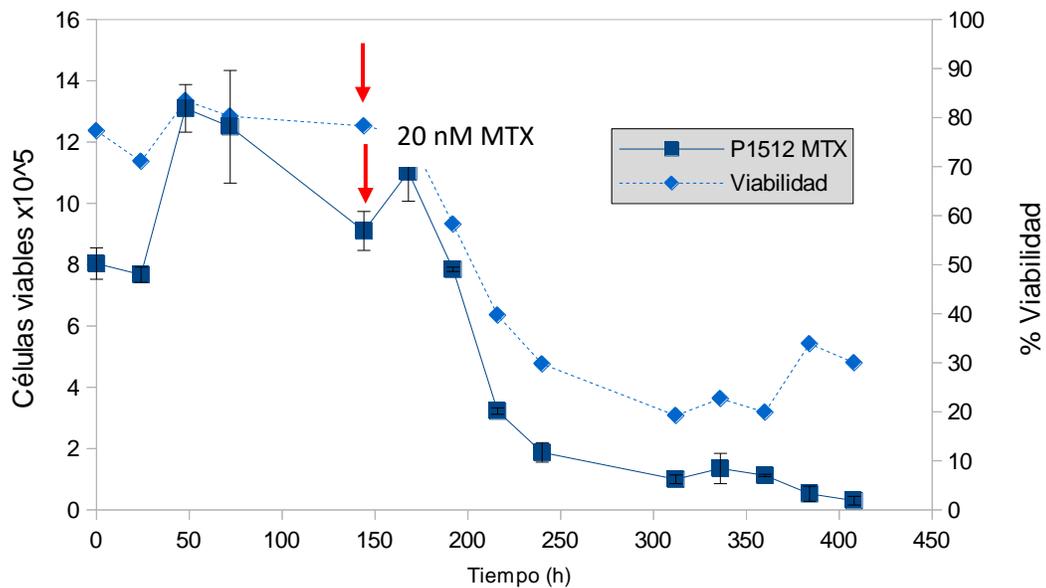


Figura 15. Cinética de las células P15-12 en medio de selección OptiCHO™ adicionado con Geneticina (500 µg/mL) y MTX (2nM), se aumentó la concentración de MTX a 20 nM en el momento indicado por la flecha (selección acelerada). La cinética se realizó a 37°C, 90 rpm y 5% de CO₂. Las líneas sólidas son células viables x 10⁵/mL, mientras que las punteadas indican el porcentaje de viabilidad. P15-12: plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC.

Después de esto se optó por una selección progresiva (aumento gradual del MTX), usando concentraciones de 5, 10 y 20 nM (Figura 16). Se observó que las células P15-12 se mantuvieron a una viabilidad baja por casi 15 días a una concentración de 5 nM. Cuando la viabilidad alcanzó 53 % y 5×10^5 células/mL, se aumentó la concentración a 10 nM de MTX. Las células mantuvieron su crecimiento, alcanzando una velocidad máxima de 0.0176 h^{-1} , con un tiempo de duplicación de 39.5 h y una concentración celular máxima de 3.9×10^6 células/mL, en presencia de 20 nM de MTX.

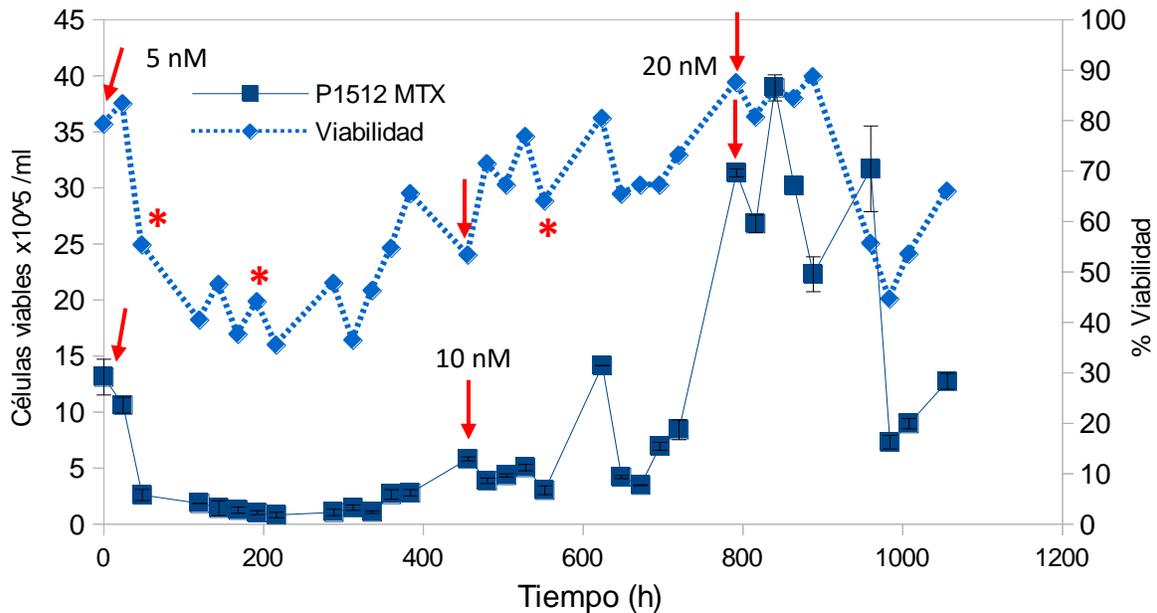


Figura 16. Cinética de las células P15-12 en medio de selección OptiCHO™ adicionado con Geneticina ($500 \mu\text{g}/\text{mL}$) y MTX (2nM) después con un aumento gradual de la concentración (5 nM , 10 nM y 20nM) indicado por la flecha. La cinética se realizó a 37°C , 90 rpm y 5% de CO_2 . Las líneas sólidas son células viables $\times 10^5/\text{ml}$, mientras que las punteadas indican el porcentaje de viabilidad. P15-12: plásmidos y 15 LC pC y 12 HCl pV . Los asteriscos rojos indican las muestras tomadas para Western Blot y SDS Page.

Posteriormente las células P15-12 se sometieron a concentraciones crecientes de MTX 50 , 100 , 150 y 200 nM usando el medio completo (OptiCHO™) con geneticina ($500 \text{ ng}/\text{mL}$) (Figura 17). Al alcanzar 200 nM de MTX se obtuvo una concentración celular de 1.4×10^6 células/mL con una viabilidad aproximada del 83% , logrando la selección de la clona P15-12.

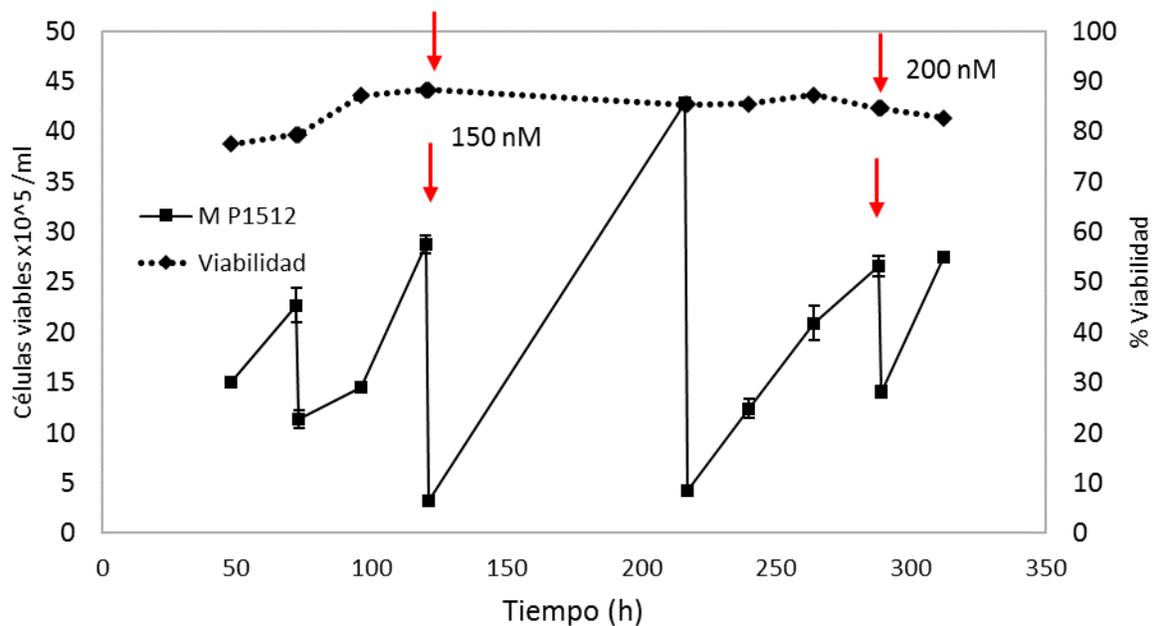


Figura 17. Cinética de las células P15-12 en medio de selección OptiCHO™ adicionado con 500 µg/mL de geneticina y 100 nM de MTX, después se adicionó 150 nM y 200 nM de MTX (indicado por las flechas). La cinética se realizó en frasco T-25 a 37°C, 110 rpm y 5% de CO₂. Las líneas sólidas representan las células viables x 10⁵/mL y las punteadas indican el porcentaje de viabilidad. P15-12: plásmidos 15 LC pC y 12 HCl pV.

6.5. Identificación de los mRNAs de la cadena pesada y ligera en la clona P15-12

Para confirmar la transformación y transcripción de los genes codificantes para la cadena ligera y pesada del anticuerpo anti-esfingomielinasa D codificada en los plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC transformados en la clona P15-12 se realizó una extracción de mRNA y generación de cDNA usando un primer poliT₁₈. A partir del cDNA obtenido, se amplificó por PCR con los primers específicos “forward” y “reverse” de cada cadena.

Para la cadena ligera se realizó una PCR anidada para lograr obtener un amplicón, debido a que en la primera reacción de amplificación con los oligonucleótidos específicos no se obtuvo ninguna banda. De ahí que se optara por la amplificación inicial con el primer *forward* y hexámeros al azar, para posteriormente usar los oligos específicos denominados *forward* y *reverse* (C y D). Mientras que para la cadena pesada solo fue necesario una reacción de amplificación con los oligos específicos (Figura 18).

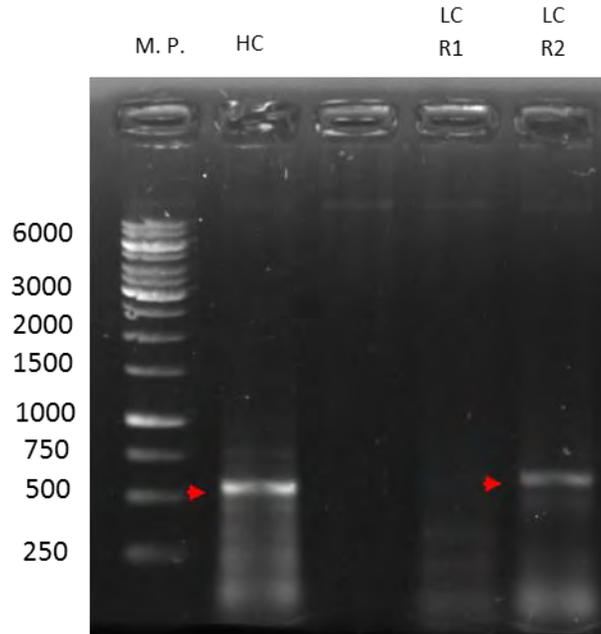


Figura 18. Obtención de amplicones a partir del cDNA obtenido de la clona P15-12: **M.P:** Marcador de peso molecular Gene O'Ruler 1 kb; **HC:** Producto de PCR directa del cDNA de la cadena pesada amplificado con los primers A y B; **LC R1:** Producto de la primera reacción de PCR anidada del cDNA de la cadena ligera amplificado con los primers C y h́exameros random; **LC R2:** Producto de la segunda reacción de PCR anidada del cDNA de la cadena ligera amplificado con los primers C y D. Se señalan las bandas de interés con flechas rojas. Los productos esperados de HC10 y LC10 deben de presentar un tamaño de 551 y 594 pb respectivamente.

6.6. Secuenciación de cDNA de la cadena ligera y la cadena pesada

De las bandas obtenidas de la amplificación se extrajo el DNA, se cuantificó y se secuenció en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. De la secuenciación automática se confirmó la presencia y expresión de un fragmento del gen de la cadena ligera en la clona P15-12 con una identidad del 97% en alineación contra la región VLJ de una cadena ligera tipo kappa de inmunoglobulina humana IGK y una identidad del 100% contra la secuencia esperada de la cadena ligera del mAb anti-esfingomielinasa D.

De la misma manera, la muestra secuenciada de la cadena pesada arrojó una identidad del 100% contra la secuencia del mAb anti-esfingomielinasa D y la secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la clona humana IP3764. Los datos obtendios sugieren la presencia de ambos mensajeros. Además, la presencia del gen codificante para la enzima DHFR río abajo de la cadena pesada, y su expresión determinada por la sobrevivencia de la clona a la presión selección también hace referencia a la correcta fase de la región codificante para la HC.

6.7. SDS-PAGE y Western Blot para identificar la cadena pesada y ligera del mAb 5C10 estable

Diferentes sobrenadantes de las células P15-12 obtenidos en los días 11 (D11), 16 (D16) y 20 (D20) (Figura 13), se evaluaron mediante cromatografía en gel SDS-PAGE y Western blot (Figura 19 y 20, respectivamente) En la figura 19A se observa la separación de las muestras obtenidas de la primera

fase de la transfección, es decir, las células se crecieron en medio de selección OptiCHO™, pero sin añadirles geneticina (Figura 13). En todos los carriles se observa una banda de alrededor de 50 kDa, mientras que únicamente el control positivo mostró una banda a aproximadamente 100 kDa. Al revelarse el Western blot (Figura 19B) con un anticuerpo de ratón anti-IgG humano (que reconoce la región Fc) únicamente se observó la banda a 100 kDa del control positivo. De cualquier forma, las bandas observadas en el SDS-PAGE que podrían pertenecer a dímeros de LC, fueron analizadas mediante espectrometría de masas, comprobándose que la banda pertenece a albúmina, probablemente debido al BSA 2% utilizado durante estos cultivos (Figura 19A).

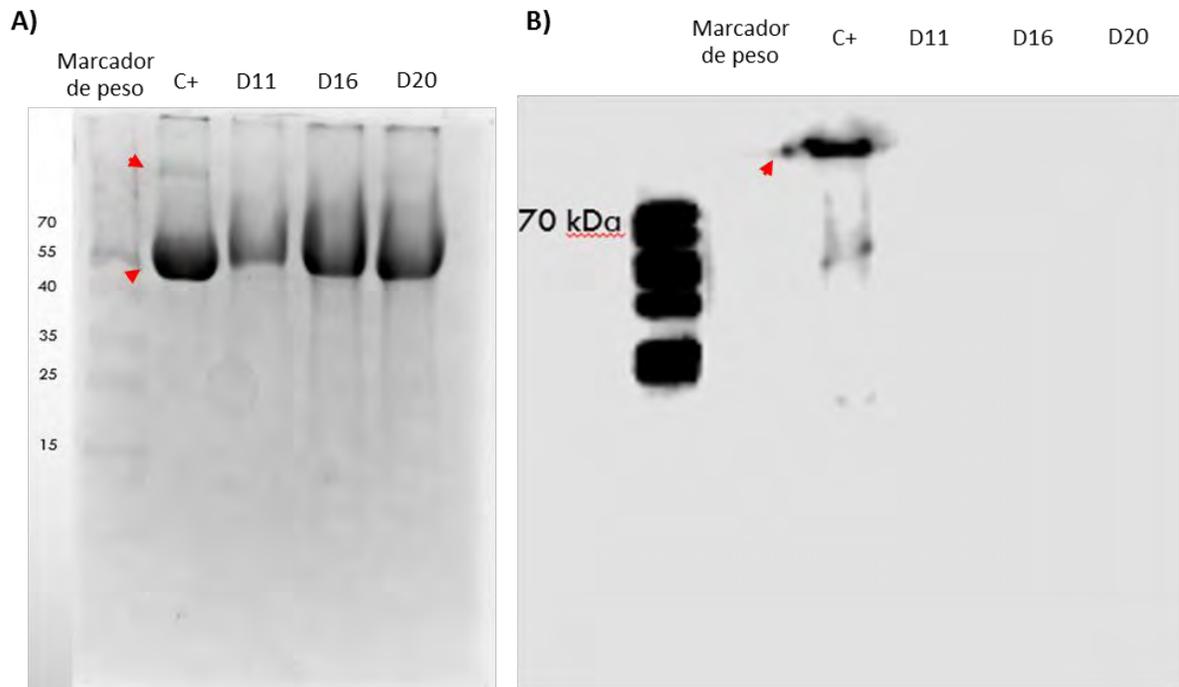


Figura 19. Análisis por A) SDS-PAGE y B) Western Blot de los sobrenadantes en condiciones desnaturalizantes a diferentes días del cultivo de la clona P15-12 en medio OptiCHO™ durante la primera etapa de selección clonal: C3: día 11, C4: día 16 y C5: día 20. El control positivo (C2) es un anticuerpo anti-humano IgG de ratón y como marcador de peso (M) PageRuler (Life-Technologies). Las flechas rojas indican posibles bandas de interés a 55 y 100 kDa. P15-12: plásmidos 15 LC pC y 12 HCl pV.

Se realizó un Western blot (Figura 20A) para las muestras pertenecientes a los cultivos crecidos con 500 µg/mL de geneticina sin MTX, así como muestras de cultivos durante la selección gradual por MTX (Figura 16). La inmunodetección se hizo a las mismas condiciones de corrida y revelado que en la figura 19A. Sin embargo, estas muestras tampoco mostraron bandas de interés. Por esto, la membrana se lavó mediante *stripping* para remover el anticuerpo secundario y se volvió a realizar el Western blot con diferentes condiciones de revelado (Figura 20B): Se aumentó el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario (3 horas) y se realizó una menor dilución del mismo (1:1500). Al revelarse la membrana se observó una nueva banda a 50 kDa en el carril del control positivo, así como una mancha a 100 kDa en el carril 9 (Clona P15-12 estable con MTX 5 nM)

indicando posiblemente la presencia de HC sencilla o dímeros de LC a 50 kDa y dímeros de HC a 100 kDa respectivamente.

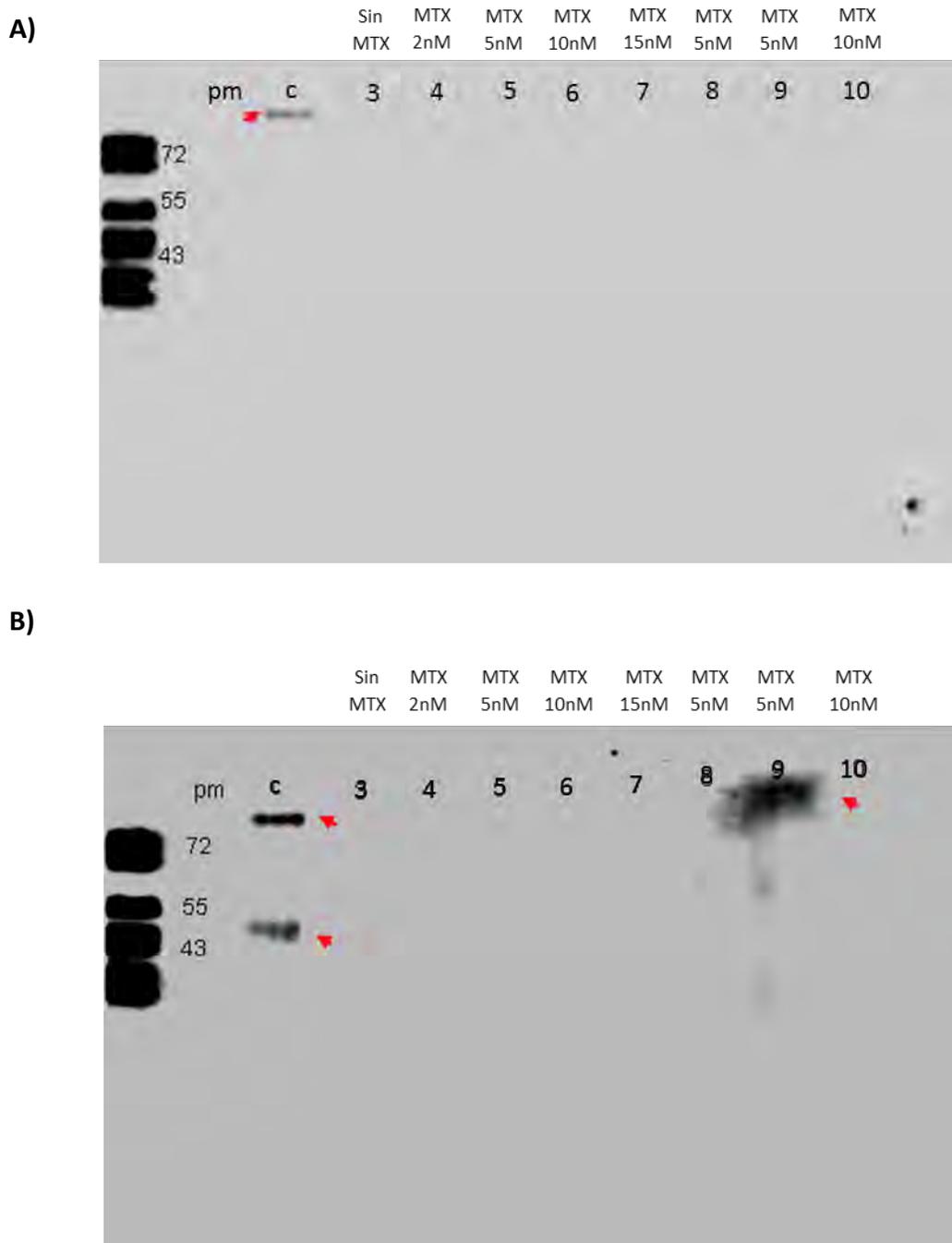


Figura 20. Western blot (A y B) de las muestras: carril C: control positivo mAb IgG; carril 3: genitocina 500 µg/mL sin MTX; carriles 4-7: Selección gradual con MTX: **C4** = 2 nM, **C5** = 5 nM, **C6** = 10n M y **C7** = 15 nM y carriles 8-10: Selección gradual con MTX: **C8** = 5 nM, **C9** = 5nM y **C10** = 10 nM. En la imagen A) la membrana se incubó con un anticuerpo de ratón anti-IgG humano a una dilución 1:2000 por 1.5 h a temperatura ambiente. En la imagen B) se desmarcó la membrana con

solución MILD stripping (protocolo obtenido de Abcam) y se re-incubó con anticuerpo de ratón anti-IgG humano (1:1500) por 3 h a temperatura ambiente. Las flechas rojas indican posibles bandas de interés a 50 y 100 kDa.

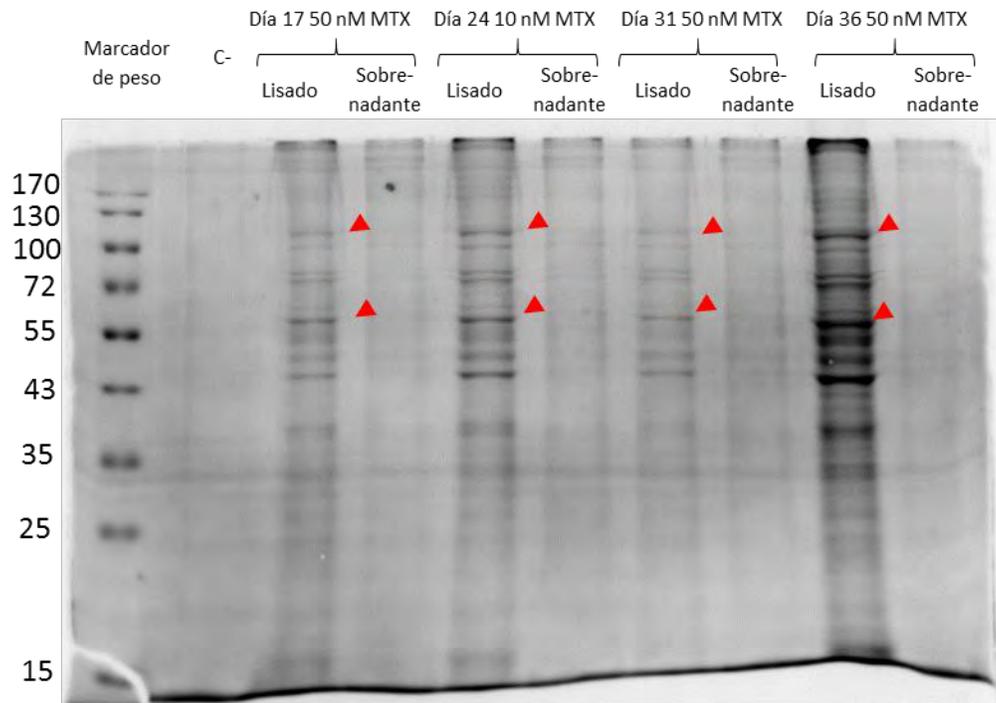


Figura 21. Gel SDS-PAGE (12.5% de acrilamida) de las muestras de lisis celular y sobrenadantes provenientes de la clona P15-12. Carriles: **1.** Marcador de peso molecular PageRuler; **2.** Control negativo (Medio OptiCHO™); **3, 5, 7 y 9.** Lisado celular de cultivos con MTX (datos no mostrados) en los días 17 con 50 nM, día 24 con 100 nM, día 31 con 100 nM y día 36 con 100 nM. **4, 6, 8 y 10.** Sobrenadantes de cultivos con MTX (datos no mostrados) en los días 17 con 50 nM, día 24 con 100 nM, día 31 con 100 nM y día 36 con 100 nM de MTX. **P15-12:** plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC.

Con la idea de que probablemente la cadena pesada y cadena ligera no estuvieran siendo secretadas correctamente, se evaluaron los lisados de la biomasa de las muestras de la clona P15-12, mediante SDS-PAGE (Figura 21). En el gel se cargaron las muestras de lisis de la clona P15-12 a los días 17, 24, 31 y 36 del cultivo con concentraciones de 50 nM (día 17) y 100 nM (días 24, 31 y 36) de MTX (carriles 3, 5, 7 y 9). Al lado derecho de cada muestra de la biomasa disgregada se cargó el sobrenadante respectivo (carriles 4, 6, 8 y 10). En las muestras de lisis se encontraron bandas similares a las observadas en la figura 10, que se marcan con flechas rojas, como aquellas de peso molecular de 55 y 100 kDa, que pueden pertenecer a dímeros de cadena ligera y pesada respectivamente.

En posteriores inmunodetecciones se buscó tanto la cadena pesada (Figura 22A) para células crecidas a 200 nM de MTX y las clonas transitorias P20-3, P5-20, P15-12 y P15-36; así como la cadena ligera (Figura 22B) de la clona P15-12 crecida con 200 nM MTX. Sin embargo, en ningún caso se observaron las bandas de interés. Únicamente se observó el control positivo. La cadena pesada se observó alrededor de los 100 kDa (Figura 22A) y la cadena ligera en 50 kDa y 25 kDa (Figura 22B) que corresponden a los dímeros y monómeros respectivamente. De forma interesante en los

carriles con la muestra MTX 200 nM para la cadena ligera (Figura 22B), se observaron dos bandas tenues cercanas a los 25 kDa que podrían indicar la presencia de la cadena ligera en éstas muestras.

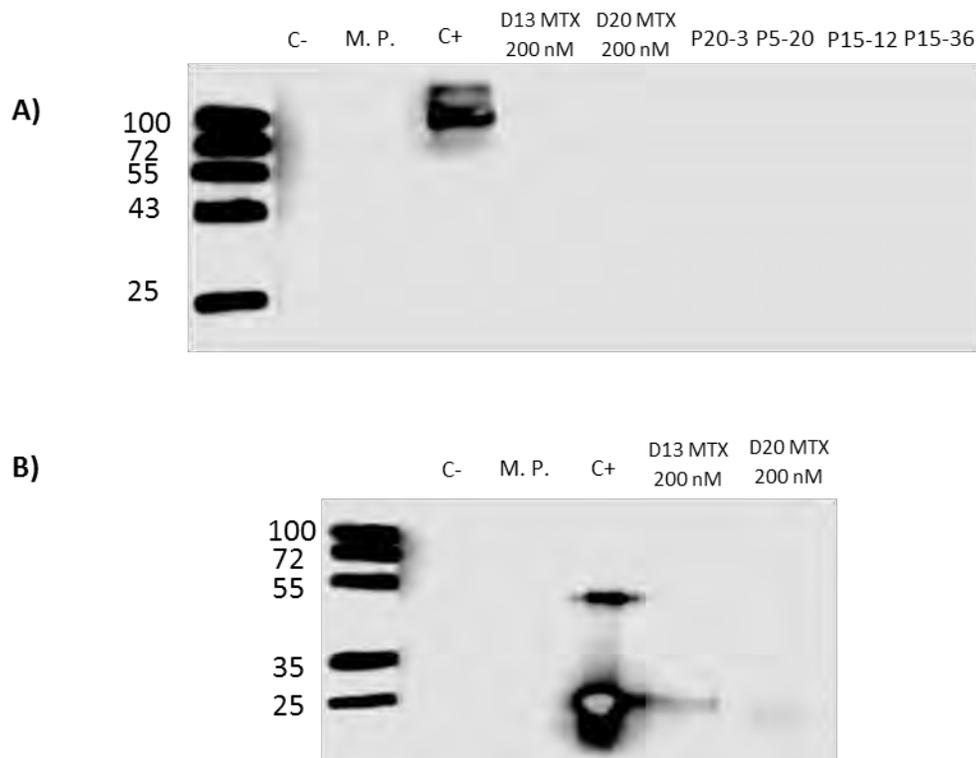


Figura 22. Western blot para detectar **A)** la cadena pesada y **B)** la cadena ligera del anticuerpo anti-SMD en muestras de sobrenadantes. **C-:** control negativo; **M.P.:** Marcador de peso PageRuler; **C+:** control positivo, de un anticuerpo anti-IL8; se corrieron 2 muestras de sobrenadante provenientes de la clona P15-12 estable con MTX 200 nM a los días 13 (D13) y 20 (D20) del cultivo; en la figura A se corrieron muestras del día 6 después de la transfección de las clonas transitorias P20-3, P5-20, P15-12 y P15-36. Las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-kappa humano para la cadena ligera y anti-FC humano para la cadena pesada a una dilución 1:10,000 por 1.5 h a temperatura ambiente.

6.8. Cuantificación mediante ELISA del anticuerpo anti-esfingomielinasa D.

Se realizó cuantificación por ELISA de los sobrenadantes de la clona P15-12, así como de los sobrenadantes de las células transfectadas transitorias (P20-3, P5-20, P15-12 y P15-36). La curva estándar con un $R^2=0.9994$ (Figura 23) arrojó que 2 muestras de sobrenadantes de la clona P15-12 estable de los días 24 y 31 (50 nM de MTX) tenían una señal detectable. Los valores obtenidos resultaron cercanos a los valores inferiores de la curva estándar (1.06 y 1.17 ng/mL respectivamente).

Muestra	Absorbancia
Medio (C-)	-0.015
C- (1 FS)	-0.01
t-203	-0.015
t-205	-0.014
t-1512	-0.015
t-1536	-0.012
E-D36	-0.011
E-D17	-0.005
E-D24*	0.026
E-D31*	0.029

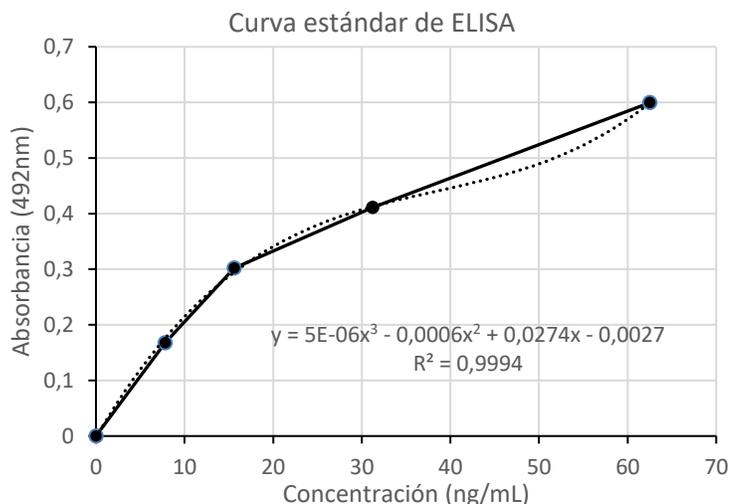


Figura 23. Lectura colorimétrica y curva estándar obtenidas de la cuantificación por ELISA para los sobrenadantes de la clona P15-12 transfectada con plásmidos linearizados (marcadas con E) en diferentes días de cultivo. Día 17 con 20 nM MTX (D17), día 24 con 50 nM MTX (D24), día 31 con 50 nM MTX (D31) y día 36 con 50 nM MTX (D36) y de las clonas P20-3, P5-20, P15-12 y P15-36 transfectadas con plásmidos circularizados (marcadas con t) al día 6 después de la transfección. **P5-20:** plásmidos 5 LCI pV, y 20 HCl pC. **P15-12:** plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC. **P20-3:** plásmidos 3 LC pV, y 20 HCl pC. **P15-36:** plásmidos 36 HC pV y 15 LC pC. Se resaltaron los valores positivos con un *.

Debido a la baja absorbancia obtenida en las muestras, se modificó el protocolo usado. Primero se cambió la curva estándar reduciendo el intervalo de 500 ng/mL - 7.8 ng/mL a 125 ng/mL - 1.95 ng/mL, y se aumentaron los tiempos de incubación de las muestras/curva estándar a 2 h y con el anticuerpo de detección a 1.5 h. Con esto se obtuvo mayor absorbancia en la curva estándar (Figura 24) comparada con la de la figura 23. Las muestras usadas se liofilizaron para disminuir el volumen y aumentar la concentración del anticuerpo en la muestra, lo cual se vio reflejado en las concentraciones finales obtenidas. El sobrenadante liofilizado de la clona P15-12 transitoria (T-1512) mostró la mayor lectura y concentración, seguida por el liofilizado de la clona P15-12 estable al día 24 (E-D24) y al día 36 (E-D36) del cultivo.

Muestras	Concentración (ng/mL)
E-D36	1.852
E-D31	0.451
E-D24	2.370
E-D17	0.009
t-20-5	-
t-15-12	5.009

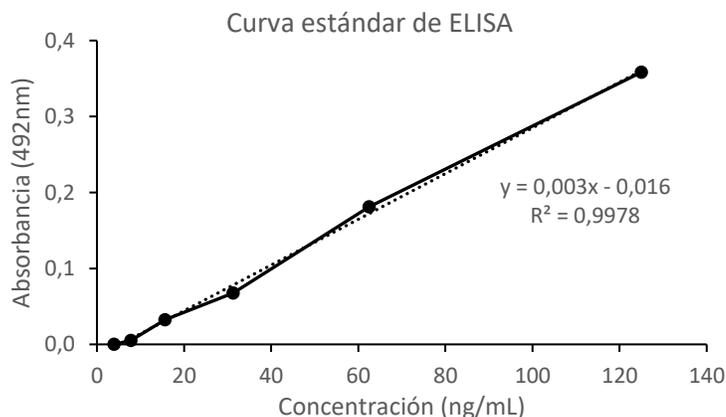


Figura 24. Lectura colorimétrica y curva estándar obtenidas de la cuantificación por ELISA para los liofilizados de las clonas transitorias P5-20 y P15-12 (marcadas con t) y la clona estable P15-12 a los días 17 (20 nM MTX), 24 (50 nM MTX), 31 (50 nM MTX) y 36 (50 nM MTX) (marcadas con E). **P5-20:** plásmidos 5 LCI pV, y 20 HCl pC. **P15-12:** plásmidos 12 HCl pV y 15 LC pC.

Se ajustó la curva una vez más para obtener mayores valores de absorbancia, esta vez incrementando la concentración del anticuerpo conjugado con HRP a 1: 20,000 (el protocolo anterior se realizó con 1: 200,000). Los valores usados para la curva fueron de 7 hasta 250 ng/mL más el blanco. Sin embargo, se encontró que la curva se saturó a partir de 125 ng/mL (Figura 25A) por lo que se ajustó la curva hasta 62.5 ng/mL (Figura 25B).

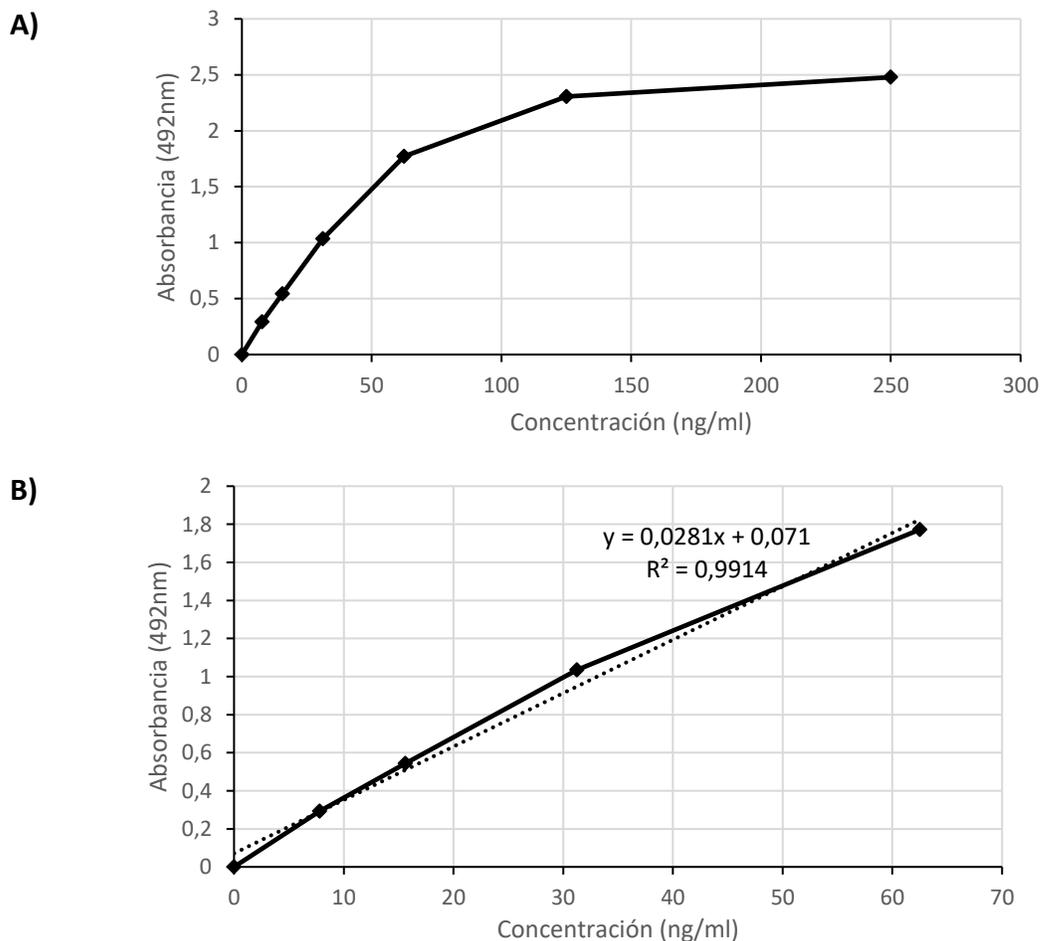


Figura 25. A) Curva de absorbancia del protocolo modificado de ELISA usando un anticuerpo conjugado con HRP anti-IgG humano diluido 1: 20,000. B) Se ajustó la curva para obtener la línea recta de la ELISA.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para diferentes muestras de la clona P15-12 estable, leídas con la prueba de ELISA modificada (Figura 28), donde se encontró que ningún sobrenadante tenía suficiente concentración de anticuerpo anti-esfingomielinasa D para ser detectado por la prueba.

Tabla 3. Resultados obtenidos para diferentes muestras de sobrenadante de la clona P15-12 estable a diferentes concentraciones de MTX en la prueba de ELISA. Las muestras se procesaron con la ELISA modificada y se compararon contra un anticuerpo anti-IL8 producido en células CHO.

Muestras	Concentración (ng/mL)
C+	2,659
5 nM	-0,0415
2 nM	-0,049
100 nM	-0,0145
200 nM	-0,042
200 nM	-0,0145
200 nM	-0,001

7. Discusión

Para realizar la transfección de células CHO DG44 con lipofectamina se pueden usar plásmidos linearizados para generar células estables, o plásmidos circularizados para generar células transitorias (Davies et al., 2011; Ho et al., 2012; Koh et al., 2013). Se encontró que la viabilidad celular disminuyó drásticamente cuando se cambia el medio CD DG44 por el medio de selección OptiCHO™, alcanzando viabilidades entre 10-20% después de las 100 h de la transfección tanto con el plásmido linearizado (Figura 12 y Figura 13), como con el plásmido circularizado (datos no mostrados).

La transfección de las células CHO DG44 tanto estables como transitorias, es poco eficiente, y es por esto necesario encontrar un protocolo que permita mejorar las condiciones para obtener cultivos o líneas celulares capaces de producir un anticuerpo monoclonal con altas productividades. Por ejemplo, ajustar la relación de concentraciones de ADN/agente de transfección para que sea óptima para lograr la transformación (Liu et al., 2008; Masotti et al., 2009).

Por ejemplo, Liu et al. (2008) comparan diferentes relaciones de volumen de FreeStyle Max contra el volumen de medio siendo la relación óptima 1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para transfección transitoria, así como Saifudin et al. (2011) compararon diferentes cantidades de plásmido contra volumen de diferentes lipofectaminas y encuentran que la relación óptima de plásmido vs lipofectamina LTX es de 1:6 μg de ADN contra mL de lipofectamina para transformación estables. Aquí se propuso utilizar 0.625, 1 y 1.25 μL de agente de transfección/mL de medio y una relación 2:1 de lipofectamina contra plásmido (en sentido con Liu et al., 2008; Saifuin et al., 2011; Agrawal et al., 2013). Usando la estrategia de 1.25 μL de agente de transfección/mL se obtuvo una clona seleccionable (medio OptiCHO™, geneticina 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y MTX 200 nM), llamada P15-12. Mientras que la clona denominada P5-20 solo sobrevivió en el medio selectivo OptiCHO™ (Figura 14).

Las células transfectadas con plásmidos linearizados (P15-12 y P5-20) pudieron sobrevivir al medio selectivo OptiCHO™ carente de hipoxantina y timidina, indicando que los plásmidos 12 HCl pV y 5 LCI pV pudieron transfectar las clonas respectivas. La clona P15-12 sobrevivió a una concentración de geneticina de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figura 15B). Por otro lado, la clona P5-20 no fue capaz de sobrevivir en presencia del antibiótico, lo que parece indicar que solo fue transfectada por el plásmido 5 pV.

La clona P15-12 fue sometida a 2 rondas de selección usando diferentes concentraciones de MTX. Al inicio se realizó un protocolo aumentando el MTX de 2 nM hasta 20 nM. Sin embargo, el número de células viables se redujo más del 90%. De ahí que se realizara una selección incrementando gradualmente la concentración de MTX: 2, 10, 50, 100 y 200 nM, hasta 400 nM (datos no mostrados). Concentraciones similares de MTX fueron usadas por Chusainow et al. (2008) y Kim et al. (2001) encontrando altas productividades de anticuerpos (500 y 320 nM de MTX, respectivamente). Sin embargo, también observaron que el aumento gradual de MTX tiene un límite para las líneas celulares que expresan anticuerpos y al llegar a concentraciones de 750 o 1000 nM de MTX las clonas

pueden experimentar defectos por el reacomodo genómico de los genes del anticuerpo causado por la presión selectiva y menores productividades del anticuerpo.

En el mismo sentido se corroboró la correcta transfección de la clona P15-12 con ambos plásmidos linearizados (12 HCl pV y 15 LC pC) y seleccionada con MTX, mediante la búsqueda de mRNA codificante para ambas cadenas. Esto usando como templado cDNA generado a partir de mRNA total. Se dedujo que el transcrito codificante para la cadena ligera se encuentra en menor proporción comparado con el de la cadena pesada, ya que requirió de una PCR anidada para ser detectada. La secuenciación de los amplicones obtenidos confirmó la presencia de ambos transcritos en la clona P15-12. Para conocer la relación precisa entre los mensajeros codificantes para cada cadena deberá realizarse una PCR cuantitativa, similar al trabajo realizado por Chusainow et al. (2008) y Davies et al. (2011).

Aunque se determinó que la clona P15-12 creció en medio selectivo, en presencia de geneticina y MTX, aunado con los análisis de rtPCR y secuenciación, que sugieren que se producen mRNAs codificantes para la cadena ligera y pesada, no se detectó el anticuerpo completo por ELISA. Debiendo mencionar que se detectó una proteína por Western blot que sugiere la producción de la cadena ligera o un fragmento de la misma (Figura 22B).

Es probable que durante la síntesis de proteína existan limitaciones o una producción muy baja anticuerpo.

Este fenómeno se puede explicar de diferentes maneras: I) Resistencia o escape del sistema *dhfr* (Flintoff y Essani, 1980); II) Expresión irregular de la cadena pesada y ligera (Schlatter et al., 2005); III) Factores y parámetros de crecimiento de la clona (Chusainow et al., 2008). Particularmente la expresión irregular de las cadenas del anticuerpo se ha asociado a una baja productividad. Schlatter et al. (2005) encontraron que la dosis óptima para los genes de la cadena pesada y la cadena ligera era de 3:2, esto se debe principalmente a que la velocidad de transcripción y traducción de la cadena ligera es mayor que la de la cadena pesada. Por lo tanto, la relación de HC:LC disminuye post-traduccionalmente. Otros autores (Haas y Wabl, 1983; Hendershot et al., 1987; Lilie et al., 1993; Feige et al., 2009), han demostrado de igual manera que el plegamiento de la cadena HC, especialmente la región C_H1, es un paso limitante para la producción de un anticuerpo, porque requiere asociarse a la cadena LC para plegarse. Por ejemplo, en las células estables productoras de anticuerpo que poseen mayor cantidad de cadena ligera intracelular, se mejora el plegamiento de HC disminuyendo la degradación de esta por el proteasoma (Borth et al., 2005) debido a que existe un mayor número de LC disponible para asociarse con HC y así completar el proceso de plegamiento del anticuerpo.

Un factor importante a considerar en cultivos con baja o nula producción de anticuerpos, es el *locus* de inserción de los genes transfectados, que de acuerdo con Barnett et al (1995) y Lattenmayer (2006) debe de corresponder a sitios de alto nivel de transcripción, y no solo eso, también se deben de evaluar *loci* cercanos a regiones de heterocromatina, pues en cultivos de larga duración estos *loci* pueden ser silenciados por modificaciones epigenéticas (Mariati et al., 2014; Veith et al., 2016). A nivel genómico tanto la clona P15-12 como la clona P5-20 pudieron toparse con limitaciones para

la transcripción de la cadena pesada y la cadena ligera, especialmente considerando que la inserción de los plásmidos en el ADN de las células CHO DG44 puede ser en regiones de baja expresión como la heterocromatina o regiones cercanas. En el caso de la clona P15-12, y de acuerdo con los resultados observados de la rtPCR, se sabe que la clona insertó ambos plásmidos en su genoma, siendo posible su incorporación en regiones de heterocromatina. Además, es probable algún error en la transferencia de información a partir del plásmido pC que contiene la información codificante para LC separada de la construcción promotor-gen codificante para la fosfotransfera aminoglucosídica y que confiere resistencia a la geneticina.

A partir de que la clona P15-12 tiene la construcción con la cadena HC en tandem con la región IRES de *c-myc* y el gen codificante para la DHFR, aunado con la amplificación gradual con MTX, se propone que se favoreció la expresión de esta cadena, mientras que la selección con geneticina, solo apunta a la transferencia de la resistencia, pero no a la producción significativa de la cadena ligera.

Dado que el mRNA de HC se expresa en mayor concentración que el mRNA de LC, la clona tendría una proporción mayor de HC:LC de lo que mencionan varios autores para la producción de un anticuerpo (Schlatter et al., 2005; Chusainow et al., 2008; Davies et al., 2011, Ho^b et al., 2013) lo cual podría activar el proteasoma (Borth et al., 2005) para degradar las HCs que no se plegaron al no haber suficientes cadenas LCs, aunque se hayan podido observar en una banda en la figura 22B.

8. Conclusiones

En el presente trabajo se presentaron estudios que se realizaron de transformación de plásmidos que contienen de forma independiente genes codificantes para la cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti esfingomielinasa-D. Se abordaron dos estrategias: la transfección estable y la transitoria. Siendo muy importante para lograr la transfección la determinación de la cantidad de plásmido y la solución de transfección.

De la transfección estable de células CHO-DG44 se obtuvieron dos clonas que pudieron sobrevivir al proceso de selección. Particularmente se obtuvo una clona estable denominada P15-12 que sobrevivió al medio selectivo carente de glicina, hipoxantina y timidina, así como a la geneticina y diferentes concentraciones de MTX.

A partir de RNA total se demostró que dicha clona produjo mRNA cuyas secuencias contiene fragmentos nucleotídicos con alta similitud a los codificantes para la cadena ligera y la cadena pesada. Siendo congruente la expresión del mRNA codificante para la cadena pesada que se correlaciona con la expresión del gen *dhfr* codificante para la enzima DHFR capaz de producir los nucleótidos carentes en el medio de selección, ya que ambos se encuentran en fase. Además de la sobrevivencia de la clona P15-12 a los diferentes pases de selección con diferentes concentraciones de MTX, el cual es un inhibidor específico de la DHFR.

Con la técnica usada mediante ELISA no se detectó el anticuerpo anti-esfingomielinasa-D completo. Sin embargo, se detectó mediante Western blot una banda que podría corresponder a un fragmento o a la cadena ligera del anticuerpo. La falta de presencia del anticuerpo completo puede ser debido a su degradación en función de que en la clona P15-12 el gen HC se encuentra río abajo de una región IRES. Mientras que la cadena ligera no contiene ningún elemento IRES que facilite su traducción, aumentando la relación HC:LC a nivel de retículo endoplásmico, lo que a su vez podría activar el proteasoma para su degradación.

Los resultados presentados dejan clara la necesidad de hacer más transformaciones, así como la implementación de mejoras para lograr la correcta transfección, traducción, estructuración y secreción del anticuerpo requerido. Así como la intensificación de la selección clonal para encontrar una clona que produzca dicho anticuerpo.

9. Perspectivas

- Determinar la relación de HC:LC en la clona P15-12, mediante una PCR cuantitativa para conocer en que proporción exacta se encuentran ambas cadenas a nivel traduccional.
- De acuerdo con la proporción en que se encuentren las cadenas del mAb anti-SMD en la clona P15-12, re-transfectar con el gen que sea limitante para la producción del anticuerpo monoclonal.
- Modificar variables de cultivo (como la disminución de temperatura) o aumentar los factores selección (concentración de MTX o genética) en la clona P15-12 estable para determinar si alguno de estos cambios favorece la producción del mAb o de alguna de sus subunidades.
- En caso de haber limitación en la producción del mAb por la localización de los genes en sitios de bajo nivel transcripcional, una re-transfección podría favorecer producción del anticuerpo tanto en la clona P15-12 como en la clona P5-20.
- Usar otras estrategias de transfección como plásmidos tricistrónicos para disminuir el número de variables durante el proceso de selección en las células a transformar.
- Realizar cultivos de una célula por dilución, provenientes de la clona P15-12, y determinar cuales producen el anticuerpo anti-SMD o incluso si tienen mejores productividades.

10.Referencias

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillav S (2008). Inmunología celular y molecular. Elsevier, España. 566 pp.
- Abcam (2014). Stripping for reprobng. *Abcam.com/technical*. Recuperado el 21 de noviembre del 2014 de: <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/stripping%20for%20reprobng.pdf>.
- Agrawal V, Slivac I, Perret S, Bisson L, St-Laurent G, Murad Y, Zhang J, Durocher Y. Stable Expression of Chimeric Heavy Chain Antibodies in CHO Cells. *Methods Mol Biol* 2012, 911:287-303.
- Agrawal V, Yu B, Pagila R, Yang B, Simonsen C, Beske O. A High-Yielding, CHO-K1–Based Transient Transfection System: Rapid Production for Therapeutic Protein Development. *BioProcess International* 2013; 11 (1): 28-35.
- Akbarzadeh-Sharbat S, Yakhchali B, Minuchehr Z, Shokrgozar MA, Zeinali S. Expression Enhancement in Trastuzumab Therapeutic Monoclonal Antibody Production using Genomic Amplification with Methotrexate. *Avicenna J Med Biotechnol* 2013; 5 (2): 87-95.
- Alagón AC. Anticuerpos seguros y eficaces: La revolución de los nuevos antivenenos. *Revista de la Universidad Autónoma de México* 2002: 617.
- Alagón AC. Antivenenos. *Presentado en Reunión General de la AMC: Ciencia y Humanismo*. 2012; Cuernavaca, Morelos.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, and Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* 2006, 22:195-201.
- Assaraf YG, Schimke RT. Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluoresceinated methotrexate and flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84 (20): 7154-8.
- Assur Z, Hendrickson WA, Mancina F. Tools for Co-expressing Multiple Proteins in Mammalian Cells. *Methods Mol Bio* 2012; 801: 173–187.
- Balvay L, Soto-Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T. Structural and functional diversity of viral IREs. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1789 (9-10): 542-57.
- Barnett RS, Limoli KL, Huynh TB, Ople EA, Reff ME. Antibody production in Chinese Hamster ovary cells using an impaired selectable marker. En Wang HY, Imanaka T. (1995). *Antibody expression and engineering*. Washington, DC: American Chemical Society.
- De Alba M, CE. Picaduras y mordeduras. En Aguilar CS, Chevolve RJ, Saucedo J, Kaplan SM, Díaz A, et al. (1997). *Manual de Terapéutica Médica y Procedimientos de Urgencias*. México: McGraw–Hill Interamericana; 2835 pp.

- Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58 (5-6): 671-85.
- Boder ET, Jiang W. Engineering antibodies for cancer therapy. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2011; 2: 53-75.
- Borth N, Mattanovich D, Kunert R, Katinger H. Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol Prog* 2005; 21 (1): 106-11.
- Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 71-99.
- Campos E. Producción y plegamiento de un fragmento (Fab) recombinante de un anticuerpo monoclonal que neutraliza el efecto tóxico del veneno de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*. Tesis profesional de licenciatura. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos 2010. 61 pp.
- Chamond N, Deforges J, Ulryck N, Sargueil B. 40S recruitment in the absence of eIF4G/4A by EMCV IRES refines the model for translation initiation on the archetype of Type II IRESs. *Nucleic Acids Res* 2014; 42 (16): 10373-84.
- Chaudhuri J, Alt FW. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* 2004 Jul; 4 (7): 541-52.
- Chusainow J, Yang YS, Yeo JH, Toh PC, Asvadi P, Wong NS, Yap MG. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnol Bioeng* 2009; 102 (4): 1182-96.
- Clincke MF, Mölleryd C, Zhang Y, Lindskog E, Walsh K, Chotteau V. Very High Density of CHO Cells in Perfusion by ATF or TFF in WAVE Bioreactor™ - Part I. Effect of the Cell Density on the Process. *Biotechnol Prog* 2013; 29 (3): 754-67.
- Cobbold LC, Wilson LA, Sawicka K, King HA, Kondrashov AV, Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. Upregulated c-myc expression in multiple myeloma by internal ribosome entry results from increased interactions with and expression of PTB-1 and YB-1. *Oncogene* 2010; 29 (19): 2884-91.
- Dalton AC, Barton WA. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci* 2014; 23 (5): 517-525.
- Davies SL, O'Callaghan PM, McLeod J, Pybus LP, Sung YH, Rance J, Wilkinson SJ, Racher AJ, Young RJ, James DC. Impact of gene vector design on the control of recombinant monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog* 2011; 27 (6): 1689-99.
- De Alba M, CE. Picaduras y mordeduras. En Aguilar CS, Chevolle RJ, Saucedo J, Kaplan SM, Díaz A, et al. (1997). *Manual de Terapéutica Médica y Procedimientos de Urgencias*. México: McGraw-Hill Interamericana; 2835 pp.

De Jesus M, Wurm FM. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 78 (2): 184-8.

De Roodt AR, García S, et al. Antitoxinas y antivenenos para uso terapéutico. *Acta Toxicol Argent* 2004; 12 (2): 2941.

De Roodt Ar, Esstévez J, Litwin S, Magaña P, Olvera A, et al. Toxicity of two North American *Loxosceles* (brown recluse spiders) venoms and their neutralization by antivenoms. *Clin Toxicol (Phila)* 2007; 45 (6): 678-87.

Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 2009, 20:700–707.

Edelman GM. Dissociation of γ -globulin. *J Am Chem Soc* 1959; 81: 3155.

Edelman GM, Poulik MD. Studies on structural units of the gamma-globulins. *J Exp Med* 1961; 113: 861-84.

Elgert KD (1998). *Immunology: Understanding the Immune System*. Jon Wiley and Sons. 468 pp.

Elvin JG, Couston RG, van der Walle CF. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* 2013; 440 (1): 83-98.

Falkman T, Fäldt E, Vitina A, Annerén C (2012). GE Healthcare Bio-sciences AB. Efficient and controlled expansion of IgG1 producing CHO-DG44 cells using the ActiCHO Media System and WAVE Bioreactor™.

Feige MJ, Groscurth S, et al. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol Cell* 2009; 34 (5): 569-79.

Feige MJ, Hendershot LM, Buchner J. How antibodies fold. *Trends Biochem Sci* 2010; 35 (4): 189-98.

Feitosa L, Gremski W, Veiga SS, Elias MCQB, Graner E, et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 1998; 36: 1039-1051.

Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T, Pavlakis GN. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci* 1989. 86: 1495–1499.

Fernandes MF, de Azevedo JI, de Andrade RM, van den Berg CW, Ramos CR, et al. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298 (5): 638-45.

Flintoff WF, Essani K. Methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells contain a dihydrofolate reductase with an altered affinity for methotrexate. *Biochemistry* 1980; 19 (18): 4321-7.

Flintoff WF, Davidson SV, Siminovitch L. Isolation and partial characterization of three methotrexate-resistant phenotypes from Chinese hamster ovary cells. *Somatic Cell Genet* 1976; 2 (3): 245-61.

Foelix RF (1996). *Biology of spiders*. Oxford Thieme. USA. 330 p.

Franca FO, Barbaro KC, Abdulkader RC. Rhabdomyolysis in presumed viscero-cutaneous loxoscelism: report of two cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (3): 287-90.

Gatt S, Dinur T, Barenholz Y. A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta* 1978; 530 (3): 503-507.

Geren CR, Chan TK, Howell DE, Odell GV. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). *Arch Biochem Biophys* 1976; 174 (1): 90-9.

Gertsch WJ, Ennik F. The spider Genus *Loxosceles* in North America, Central America and the West Indie (Araneae, Loxoscelidae). *Bulletin American Museum of Natural History USA* 1983; 175: 264-360.

Goedhart J, van Weeren L, Adjobo-Hermans MJ, Elzenaar I, Hink MA, Gadella TW Jr. Quantitative co-expression of proteins at the single cell level--application to a multimeric FRET sensor. *PLoS One* 2011; 6 (11): e27321.

Gupta RS, Flintoff WF, Siminovitch L. Purification and properties of dihydrofolate reductase from methotrexate-sensitive and methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells. *Can J Biochem* 1977; 55 (4): 445-52.

Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 1983; 306 (5941): 387-9.

Hajela K. Structure and function of Fc receptors. *Biochemical education* 1991; 19 (2): 50-57.

Hartenbach S, Fussenegger M. A Novel Synthetic Mammalian Promoter Derived from an Internal Ribosome Entry Site. *Biotechnol Bioeng* 2006; 95 (4): 547-59.

Hellen CU, Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 2001; 15: 1593-1612.

Hendershot L, Bole D, Köhler G, Kearney JF. Assembly and secretion of heavy chains that do not associate post-translationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J Cell Biol* 1987; 104 (3): 761-7.

Hidalgo MR. Estudio transcripcional de las vías de N-glicosilación en células de ovario de hámster chino (CHO) cultivadas en condiciones de hipotermia moderada (30 y 32°C). Tesis profesional de maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos 2009. 64 pp.

High S. Protein translocation at the membrane of the endoplasmic reticulum. *Prog Biophys Mol Biol* 1995; 63: 233-50.

Hintersteiner B, Lingg N, Janzek E, Mutschlechner O, Loibner H, Jungbauer A. Microheterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies is governed by changes in the surface charge of the protein. *Biotechnol J* 2016; 11 (12): 1617-1627.

Ho SC, Bardor M, Feng H, Mariati, Tong YW, Song Z, Yap MG, Yang Y. IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. *J Biotechnol* 2012; 157 (1): 130-9.

Ho^a SC, Bardor M, Li B, Lee JJ, Song Z, Tong YW, Goh LT, Yang Y. Comparison of internal ribosome entry site (IRES) and Furin-2A (F2A) for monoclonal antibody expression level and quality in CHO cells. *PLoS One* 2013; 8 (5): e63247.

Ho^b SC, Koh EY, van Beers M, Mueller M, Wan C, Teo G, Song Z, Tong YW, Bardor M, Yang Y. Control of IgG LC:HC ratio in stably transfected CHO cells and study of the impact on expression, aggregation, glycosylation and conformational stability. *J Biotechnol* 2013; 165 (3-4): 157-66.

Hoffman A. Relación bibliográfica de las arañas de México (Arachnida: Araneae). Instituto de Biología, UNAM. Publicaciones especiales 1976; 3: 21-23.

Hung F, Deng L, Ravnikar P, Condon R, Li B, Do L, Saha D, Tsao YS, Merchant A, Liu Z, Shi S. mRNA stability and antibody production in CHO cells: improvement through gene optimization. *Biotechnol J* 2010; 5 (4): 393-401.

Jang SK, Davies MV, Kaufman RJ, Wimmer E. Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J Virol* 1989; 63 (4): 1651-1660.

Jessop CE, Watkins RH, Simmons JJ, Tasab M, Bulleid NJ. Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. *J Cell Sci* 2009; 122 (Pt 23): 4287-95.

Jefferis R. Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol Prog* 2005; 21: 11-16.

Jiménez L. Neutralización de esfingomielinasa D recombinante de *Loxosceles boneti* con varias preparaciones derivadas de suero hiperinmune de caballo. Tesis profesional de licenciatura. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. UNAM, México, D.F., 2009. 105 pp.

Kaufman RJ, Wasley LC, Spiliotes AJ, Gossels SD, Latt SA, et al. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 1985, 5 (7):1750-9.

Kaufman RJ, Murtha P, Davies MV. Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells. *EMBO J* 1987; 6 (1): 187-193.

Kaufman RJ, Davies MV, Wasley LC, Michnick D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 (16): 4485–4490.

Kelley B. Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *MAbs* 2009; 1 (5): 443-52.

Kieft JS. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in Biochemical Sciences* 2008; 33 (6): 274-283.

Kim NS, Byun TH, Lee GM. Key determinants in the occurrence of clonal variation in humanized antibody expression of cho cells during dihydrofolate reductase mediated gene amplification. *Biotechnol Prog* 2001; 17 (1): 69-75.

Kim SJ, Kim NS, Ryu CJ, Hong HJ, Lee GM. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* 1998; 58 (1): 73-84.

Kindt T, Osborne B, Goldsby R (2006). Kuby Immunology. Capítulo 4 Antibodies: Structure and Function. 6ta edición. W. H. Freeman, UK. 574 pp.

Koh EY, Ho SC, Mariati, Song Z, Bi X, Bardor M, Yang Y. An internal ribosome entry site (IRES) mutant library for tuning expression level of multiple genes in mammalian cells. *PLoS One* 2013; 8 (12): e82100.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256 (5517): 495-7.

Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 1976; 6 (7): 511-9.

Komar AA, Hatzoglou M. Cellular IRES-mediated translation: The war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 2011; 10 (2): 229-240.

Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today* 2015; 20 (7): 838-47.

Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol* 1991, 115(4):887-903.

Lattenmayer C, Loeschel M, Steinfeldner W, Trummer E, Mueller D, Schriebl K, Vorauer-Uhl K, Katinger H, Kunert R. Identification of transgene integration loci of different highly expressing recombinant CHO cell lines by FISH. *Cytotechnology* 2006; 51 (3): 171–182.

Lilie H, Lang K, Rudolph R, Buchner J. Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein Sci* 1993; 2 (9): 1490–1496.

- Lilie H, Rudolph R, Buchner J. Association of antibody chains at different stages of folding: Prolyl Isomerization occurs after formation of quaternary structure. *J Mol Biol* 1995; 248: 190-201.
- Liu C, Dalby B, Chen W, Kilzer JM, Chiou HC. Transient Transfection Factors for High-Level Recombinant Protein Production in Suspension Cultured Mammalian Cells. *Mol Biotechnol* 2008; 39: 141-153.
- Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and fc-fusion proteins. *J Pharm Sci* 2015; 104 (6): 1866-84.
- Mariati, Koh EY, Yeo JH, Ho SC, Yang Y. Toward stable gene expression in CHO cells. *Bioengineered* 2014; 5 (5): 340-5.
- Masotti A, Mossa G, Cametti C, Ortaggi G, Bianco A, Grosso ND, Malizia D, Esposito C. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009; 68 (2): 136-44.
- Meier J, White J (1995). Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC Press. USA.
- Melnick J, Dul JL, Argon Y. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 1994; 370 (6488): 373-5.
- Miller RA, Levy R. Response of cutaneous T cell lymphoma to therapy with hybridoma monoclonal antibody. *Lancet* 1981; 2 (8240): 226-30.
- Miller RA, Maloney DG, McKillop J, Levy R. In vivo effects of murine hybridoma monoclonal antibody in a patient with T-cell leukemia. *Blood* 1981; 58 (1): 78-86.
- Moctezuma C. Producción de un fragmento de anticuerpo recombinante quimérico anti esfingomielinasa D contra la mordedura de la araña *Loxosceles*. Tesis profesional de maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos 2008. 53 pp.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains Proc Natl Acad Sci U S A 1984; 81 (21): 6851-5.
- Nolan O, O'Kennedy R. Bifunctional antibodies: concept, production and applications. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1040 (1): 1-11.
- Pallavicini MG, DeTeresa PS, Rosette C, Gray JW, Wurm FM. Effects of methotrexate on transfected DNA stability in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1990; 10 (1): 401-4.
- Porter RR. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 1959; 73(1): 119-127.

Pybus LP, Dean G, West NR, Smith A, Daramola O, Field R, Wilkinson SJ, James DC. Model-directed engineering of "difficult-to-express" monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 2014; 111 (2): 372-85.

Quintana JC, Otero RP. Envenenamiento aracnídico en las Américas. *Medunab* 2002; 5 (13): 14-22.

Ramos BM, Olvera A, Odell GV, Zamudio F, Paniagua-Solís J, et al. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* 2004; 44(5): 507-14.

Ramos RH, Vázquez IR. Arañismo ocasionado por especies del género *Loxosceles*. Apartado Urgencias Médico-Quirúrgicas. *Revista Educativa para la Salud* 2000: 25-34.

Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 2002; 40: 225-254.

Rees RS, Nanney LB, Yates RA, King LE Jr. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: The Inciting mechanism? *J Invest Dermatol* 1984; 83(4): 270-275.

Reichert JM. Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 2012; 4 (3): 413-5.

Reinhart D, Damjanovic L, Kaisermayer C, Kunert R. Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99 (11): 4645-57.

Ribatti D. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: an historical reappraisal. *Immunol Lett* 2014; 161 (1): 96-9.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332 (6162): 323-7.

Roth RA, Pierce SB. In vivo cross-linking of protein disulfide isomerase to immunoglobulins. *Biochemistry* 1987; 26 (14): 4179-82.

Saifudin N, Ibrahim N, Anuar N. Optimization in Transfection and Stable Production of β -galactosidase in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology* 2011; 10 (1): 86-93.

Sampaio VS, Gomes AA, Silva IM, Sachett J, Lima LC, Oliveira S, Sabidò M, Chalkidis H, Barbosa MG, Salinas JL, Wen FH, Guimarães MV, Monteiro WM. Low Health System Performance, Indigenous Status and Antivenom Underdosage Correlate with Spider Envenoming Severity in the Remote Brazilian Amazon. *PLoS One* 2016; 11(5).

Schenone H, Saavedra T, Rojas A, Villarroel F. Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1989; 31 (6): 403-15.

Schlatter S, Stansfield SH, Dinnis DM, Racher AJ, Birch JR, et al. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnol Prog* 2005, 21: 122–133.

- Shade KC, Anthony RM. Antibody Glycosylation and Inflammation. *Antibodies* 2013, 2: 392-414.
- SINAVE (2011). Información Epidemiológica de Morbilidad. Anuario 2011. Versión Ejecutiva. *Secretaría de Salud México*: 193 pp.
- Stoneley M, Subkhankulova T, Le Quesne JPC, Coldwell MK, Jopling CL, et al. Analysis of the *c-myc* IRES: a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(3):687-94.
- Tambourghi DV, Magnoli FC, et al. Incorporation of a 35kDa purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *J Immunol* 1995; 155 (9): 4459-4466.
- Tambourghi DV, Magnoli FC, et al. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent haemolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 251: 366-373.
- Tambourghi DV, Paixão-Cavalcante D, et al. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. *J Invest Dermatol* 2005; 124 (4): 725-31.
- Underhill MF, Smales CM, Naylor LH, Birch JR, James DC. Transient gene expression levels from multigene expression vectors. *Biotechnol Prog* 2007; 23 (2): 435-43.
- Urlaub G, Chasin LA. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77 (7): 4216-20.
- Veiga SS, da Silveira RB, Dreyfuss JL, Haoach J, Pereira AM, et al. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 2000; 38: 825-839.
- Veith N, Ziehr H, MacLeod RA, Reamon-Buettner SM. Mechanisms underlying epigenetic and transcriptional heterogeneity in Chinese hamster ovary (CHO) cell lines. *BMC Biotechnol* 2016; 16: 6.
- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol* 2014; 32 (10): 992-1000.
- World Health Organization (1981). Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *WHO Offset publication* 58 (6).
- Xia X, Holcik M. Strong Eukaryotic IRESs Have Weak Secondary Structure. *PLoS One* 2009; 4(1): e4136.
- Young AR, Pincus SJ. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotizing arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* 2001; 39: 391-400.

Yu M, Hu Z, Pacis E, Vijayasankaran N, Shen A, Li F. Understanding the intracellular effect of enhanced nutrient feeding toward high titer antibody production process. *Biotechnol Bioeng* 2011; 108 (5): 1078-88.

Zavala JT, Díaz JG. Picaduras de alacranes y arañas ponzoñas de México. *Rev Fac Med Unam* 2004; 47: 6-12.

Zaboikin M, Srinivasakumar N, Schuening F. Gene therapy with drug resistance genes. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(4): 335-345.

Zheng K, Bantog C, Bayer R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *mAbs* 2011; 3 (6): 568-576.