



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE UN PÉPTIDO ALDEHÍDICO  
DE ORIGEN BACTERIANO EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

**PRESENTA:**

M. EN C. VIOLETA GUADARRAMA PÉREZ

**TUTORA PRINCIPAL:**

DRA. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA - UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR - UNAM

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA - UNAM

**CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO. MARZO, 2025**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Título abreviado: "Producción de un péptido aldehídico bacteriano en cultivos de células animales"

Este trabajo se realizó en el laboratorio 10, del grupo de investigación Palomares-Ramírez del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Laura A. Palomares.

Durante el desarrollo del presente trabajo se tuvo el apoyo económico de una beca CONAHCyT (CVU: 376432, becario: 244042) estudiando en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM (número de cuenta: 517024375).

El estudio fue financiado con recursos de los proyectos UNAM DGAPA PAPIIT IT200325 y del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

**Este estudio fue guiado por el Comité Tutor:**

Dra. Susana Castro Obregón (Instituto de Fisiología Celular - UNAM)

Dr. Enrique Merino Pérez (Instituto de Biotecnología - UNAM)

TUTORA PRINCIPAL: Dra. Laura A. Palomares Aguilera (Instituto de Biotecnología - UNAM)

**Índice general**

Índice general .....	4
Índice de figuras .....	6
Índice de tablas .....	9
Agradecimientos.....	11
Dedicatoria. ....	12
Resumen.....	13
Abstract .....	14
Abreviaturas y definiciones.....	15
1. Introducción .....	18
2. Antecedentes.....	20
2.1 Importancia de producir proteínas recombinantes.....	20
2.2 La proteólisis como problema al producir proteínas recombinantes en células CHO.....	20
2.3 Proteasas y su clasificación.....	24
2.4 Proteasas en la producción de r-proteínas y soluciones para contender con su presencia.....	27
2.5 Estrategias para abordar el problema de la actividad proteolítica.....	34
2.6 Propuesta: sistema lvp, NRPS que produce a la livipeptina, péptido aldehídico inhibidor de proteasas.....	36
2.7 Inhibidores de proteasas bacterianos como la livipeptin, péptidos aldehídicos pequeños.....	40
2.8 Expresión de otras rutas biosintéticas de tipo NRPS en sistemas no bacterianos.....	41
2.9 Proteólisis de dos proteínas recombinantes modelo: MAb y hSeAP.....	43
3. Hipótesis.....	47
4. Objetivos .....	47
4.1 Objetivo general.....	47
4.2 Objetivos específicos .....	47
5. Materiales y métodos .....	48
5.1 Producción de la livipeptina en cultivos bacterianos.....	48
5.1.1 Cepas bacterianas y plásmidos.....	48
5.1.2 Mantenimiento de cepas bacterianas y generación de bancos de glicerol para su preservación.....	48
5.1.3 Purificación de plásmidos de expresión bacteriana y su análisis.....	49
5.1.4 Cultivos bacterianos para la producción de la livipeptina.....	52
5.1.5 Ensayo de actividad proteolítica para la detección de livipeptina.....	53
5.1.6 Análisis de la expresión de los genes del sistema lvp que producen la livipeptina por RT-PCR punto final a partir de cultivos bacterianos.....	56
5.1.7 Identificación de la livipeptina por cromatografía en fase reversa HPLC.....	58
5.2 Producción <i>in vitro</i> de la livipeptina usando extractos bacterianos con el sistema lvp y extractos de células CHO.....	58
5.3 Producción de la livipeptina en cultivos de mamífero.....	59

5.3.1	Construcción de plásmidos.....	59
5.3.1.1	Generación de bacterias transformadas.....	63
5.3.1.2	Identificación de las construcciones plasmídicas por electroforesis de DNA en agarosa y secuenciación de DNA. ....	64
5.3.1.3	Amplificación y purificación de plásmidos para la transfección de células CHO .....	66
5.3.2	Líneas celulares y la expresión heteróloga del sistema lvp en células de mamífero. ....	66
5.3.2.1	Células CHO.....	66
5.3.2.2	Expresión transitoria del sistema lvp en células de mamífero CHO que expresan establemente a la hSeAP. ....	68
5.3.2.3	Expresión transitoria del sistema lvp en células de mamífero CHO que expresan establemente a un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. ....	70
5.3.3	Cuantificación de concentración celular, viabilidad celular y eficiencia de transfección. ....	71
5.3.4	Análisis de la expresión de los genes del sistema lvp por RT-PCR punto final en células CHO transfectadas.....	73
5.3.5	Identificación de la livipeptina por UPLC acoplado a masas.....	74
5.3.6	Cuantificación de las proteínas recombinantes hSeAP y MAb. ....	75
5.3.7	Análisis del MAb por electroforesis capilar.....	76
5.3.8	Cuantificación de proteína total.....	77
5.3.9	Inmunoensayos para la detección de la proteína recombinante y análisis densitométricos: identificación de fragmentos de la hSeAP y MAb. ....	78
6.	Resultados y discusión .....	79
6.1	Expresión del sistema lvp en <i>E. coli</i> .....	79
6.1.1	Primer reto para producir a la livipeptina en <i>E. coli</i> : importancia del promotor que controla la expresión del sistema lvp. ....	79
6.1.2	Segundo reto: Identificamos al inhibidor de proteasas pero es poco estable.....	83
6.1.3	Conclusiones parciales al trabajar con la expresión de lvp en <i>E. coli</i> para producir la livipeptina.....	88
6.2	Capacidad del sistema lvp de incluir tRNAs eucariotas para producir la livipeptina: experimentos <i>in vitro</i> .....	89
6.2.1	Conclusión sobre la producción <i>in vitro</i> de la livipeptina a partir de extractos bacterianos con el sistema lvp y extractos de células CHO .....	91
6.3	Expresión heteróloga del sistema productor de livipeptina en células de mamífero.....	91
6.3.1	Vectores construídos para entregar el sistema lvp para su expresión en células CHO. ....	92
6.3.2	Efecto de la expresión del sistema lvp en células CHO.....	95
6.3.3	Efecto de la expresión del sistema lvp en células CHO productoras de la hSeAP.....	98
6.3.3.1	Las células CHO-hSeAP que expresan el sistema lvp producen el inhibidor de proteasa sin comprometer la viabilidad celular. ....	98
6.3.3.2	La expresión del sistema lvp en células CHO-hSeAP aumentó la productividad específica de hSeAP al reducir su proteólisis.....	101
6.3.4	Efecto de la expresión del sistema lvp en células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal.....	105
6.3.5	Conclusión sobre la expresión del sistema lvp para la producción de la livipeptina en células CHO. ....	111

7.	Conclusiones globales.....	113
8.	Limitaciones y perspectivas.....	114
9.	Productos generados.....	116
9.1	Congresos y estancias.....	116
9.2	Otras actividades realizadas durante el doctorado.....	117
10.	Referencias.....	119
11.	Anexos.....	130
11.1	Plásmidos usados y generados.....	130
11.1.1	Tabla de plásmidos.....	130
11.1.2	Mapa de plásmidos.....	132
	pALVP.....	132
	pASK.....	133
	pUC57_lvp.....	134
	pVax1.0.....	135
	pVax_LVP1.....	136
	pVax_LVP2.....	137
	pVax_LVP3.....	138
	pVax_eGFP.....	139
11.2	Artículo generado a partir de la investigación doctoral.....	140

## Índice de figuras

Figura 1.	Esquema representativo y simplificado de la producción de proteínas recombinantes (r-proteínas).....	21
Figura 2.	Representación de las principales rutas proteolíticas intracelulares en células eucariotas.....	23
Figura 3.	Conceptos básicos sobre proteasas.....	25
Figura 4.	Ruta biosintética de la livipeptina (sistema lvp), un pequeño péptido aldehídico que inhibe a cisteín-proteasas del tipo papaína y serin-proteasas del tipo tripsina.....	37
Figura 5.	Similitud estructural entre livipeptina y leupeptina.....	38
Figura 6.	Análisis de sobrenadantes de cultivos de <i>E. coli</i> transformados con plásmidos que contienen el sistema lvp productor de la livipeptina.....	39
Figura 7.	Esquema de la estructura de un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 y sus posibles modificaciones durante su producción.....	44
Figura 8.	Perfil cromatográfico típico del anticuerpo monoclonal IDEC-C2B8 de tipo IgG1 después de la digestión con papaína.....	46

Figura 9. Esquema representativo del plásmido pALVP que contiene al sistema lvp productor de livipeptina.. .....	50
Figura 10. Representación del plásmido bacteriano pALVP que muestra la localización esperada en la secuencia de los oligonucleótidos usados para su secuenciación.....	51
Figura 11. Plásmidos generados a partir del vector pVax1 (plasmido vacío o pVax1.0) y la clonación de los genes lvp1, lvp2 y lvp3 que forman el sistema lvp productor de la livipeptina.. .....	62
Figura 12. Diseño experimental para la evaluación de la expresión del sistema lvp por co-transfecciones con lipofectamina en células de mamífero. ....	67
Figura 13. Metodología para la producción e identificación de la livipeptina mediante la expresión heteróloga del sistema LVP en cultivos bacterianos.. .....	80
Figura 14. Los sobrenadantes de un cultivo particular de <i>E. coli</i> pALVP no contienen el inhibidor de tripsina, no hay expresión del sistema lvp aun cuando pALVP cumple con el patrón de digestión esperado.. .....	82
Figura 15. El plásmido pALVP del cultivo que no produce el inhibidor de proteasas tiene una delección en su secuencia.....	83
Figura 16. La expresión heteróloga del sistema pALVP en <i>E. coli</i> no afecta negativamente el crecimiento celular y produce una molécula que inhibe la actividad de proteasas independientemente de la presencia del inductor.. .....	84
Figura 17. Pérdida de la actividad de inhibición presente en el sobrenadante del cultivo bacteriano que produce el inhibidor de proteasas después de 20 días y después de haber sido analizado por cromatografía en fase reversa por HPLC.. .....	87
Figura 18. El sistema lvp bacteriano produce una molécula inhibidora de papaína usando tRNAs eucariotas de las células CHO. ....	90
Figura 19. Experimentos de transfección realizados para obtener información sobre el efecto de producir el inhibidor livipeptina en células CHO.. .....	92
Figura 20. Generación de los plásmidos pVax_LVP1, pVax_LVP2 y pVax_LVP3 (pVax_LVPs).. .....	93
Figura 21. Los plásmidos construidos pVax_LPV1, pVax_LVP2 y pVax_LVP3 cumplen con el patrón de digestión que confirma su identidad. ....	94

Figura 22. La expresión del sistema lvp en células CHO no afecta la viabilidad celular después de 48 h post-transfección.....	96
Figura 23. La transfección con los plásmidos pVax aumentó la actividad de las proteasas intracelulares, la cual disminuyó al incrementar la concentración de los pVax_LVPs.....	97
Figura 24. Producción de livipeptina en células CHO-hSeAP transfectadas con el sistema lvp (pVax_LVPs)..	100
Figura 25. El pequeño aumento en la producción de hSeAP a las 48 h post-transfección en células transfectadas con el sistema lvp no se asoció con la fragmentación de hSeAP..	101
Figura 26. La concentración y viabilidad celular no se vieron afectadas por la expresión del sistema lvp (pVax_LVPs) en células CHO-hSeAP después de 144 h post-transfección. ....	102
Figura 27. La expresión del sistema lvp aumentó la productividad específica de la proteína hSeAP debido a la reducción de su fragmentación..	103
Figura 28. El crecimiento celular y la producción de MAb no se vieron afectados por la expresión del sistema lvp en células CHO-MAb. ....	105
Figura 29. La expresión del sistema lvp redujo la fragmentación de un MAb producido por células CHO-MAb.....	106
Figura 30. El MAb purificado que fue producido por células CHO-MAb que expresan el sistema lvp presenta menos fragmentos que el control con el plásmido vacío. ....	107
Figura 31. Las células CHO-MAb en presencia de livipeptina produjeron más MAb por célula a pesar del efecto negativo en el crecimiento celular.....	109
Figura en anexo: 1. Mapa del plásmido pALVP que contiene al sistema lvp, ruta biosintética que produce a la livipeptina .....	132
Figura en anexo: 2. Mapa del plásmido pASK, plásmido control .....	133
Figura en anexo: 3. Mapa del plásmido pUC57_lvp, plásmido de transferencia.....	134
Figura en anexo: 4. Mapa del plásmido pVax1.0, plásmido vacío.....	135
Figura en anexo: 5. Mapa del plásmido pVax_LVP1, plásmido que expresa a la sintasa de péptidos no-ribosomal LVP1 .....	136
Figura en anexo: 6. Mapa del plásmido pVax_LVP2, plásmido que expresa a la transferasa de Leu-Phe-tRNA LVP2 .....	137

Figura en anexo: 7. Mapa del plásmido pVax_LVP3, plásmido que expresa a la acetiltransferasa LVP3 .....	138
Figura en anexo: 8. Mapa del plásmido pVax_eGFP, plásmido reportero.....	139

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de proteasas (Jahn et al., 2012; Ryan & Henehan, 2017).....	26
Tabla 2. Proteínas recombinantes fragmentadas por proteasas y los cambios que se hicieron para contener con la fragmentación en determinadas etapas de su proceso de producción.....	28
Tabla 3. Ejemplos de algunos inhibidores de proteasas producidos por bacterias y sus proteasas blanco (Cruz-Morales et al., 2018).....	40
Tabla 4. Protocolo para la identificación de plásmidos pALVP y pASK mediante la digestión con enzimas de restricción.....	50
Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la secuenciación de pALVP.....	51
Tabla 6. Protocolo para el ensayo de actividad de inhibición de la tripsina (basado en Cruz-Morales et al., 2018).....	54
Tabla 7. Protocolo para el ensayo de actividad de inhibición de la papaína.....	55
Tabla 8. Oligonucleótidos usados para confirmar la expresión de los genes del sistema lvp por PCR punto final.....	57
Tabla 9. Oligonucleótidos usados para la amplificación y clonación de los genes del sistema lvp en el vector pVax1.0.....	60
Tabla 10. Protocolo para la amplificación de los genes del sistema lvp por PCR punto final.....	61
Tabla 11. Protocolo de doble digestión de productos de PCR y vector aceptor pVax1.0.....	61
Tabla 12. Protocolo de ligación de productos de PCR (genes del sistema lvp) digeridos ( <i>NheI/EcoRI</i> ) con el vector de expresión pVax1.0 digerido ( <i>NheI/EcoRI</i> ).....	62
Tabla 13. Protocolo para la identificación de plásmidos pVax_LVP1, pVax_LVP2 y pVax_LVP3 mediante la digestión con enzimas de restricción .....	65
Tabla 14. Oligonucleótidos usados para la identificación de los pVax_LVPs por secuenciación....	65
Tabla 15. Cantidad de plásmido usado para la expresión del sistema lvp en células CHO.....	68
Tabla 16. Protocolo para las reacciones de transfección de células CHO-hSeAP .....	69

Tabla 17. Protocolo para las reacciones de transfección de células CHO-MAb.....	71
Tabla 18. Protocolo para la cuantificación de proteína total por el método de Bradford. ....	77
Tabla 19. Actividad proteolítica extracelular e intracelular en cultivos de <i>E. coli</i> inducidos con anhidrotetraciclina representados en Figura 16 d. ....	85
Tabla 20. Producción específica de hSeAP en cultivos de CHO-hSeAP transfectados después de 144 h con los plásmidos indicados.....	104
Tabla 21. Producción específica del MAb en cultivos de CHO-MAb transfectados después de 168 h con los plásmidos indicados.....	108
Tabla 22. Actividades académicas cursadas y aprobadas durante el doctorado.....	117

## Agradecimientos.

### Académicos:

- Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a CONAHCyT por el apoyo financiero recibido (beca 244042).
- Grupo de investigación Palomares-Ramírez: A la Dra. Laura por la dirección de este estudio y su financiamiento. Al Dr. Octavio Tonatiuh por sus sugerencias al proyecto, ideas y financiamiento. Por el apoyo técnico, guía y asistencia en todo momento a la M. en C. Vanessa Hernández, M. en C. Ruth Pastor, y en especial a M. en C. Martha Contreras que me seguía más de cerca. Al apoyo técnico al Ing. Alberto Porras que fue mi apoyo constante para los análisis en HPLC, UPLC-masas, entre otros. A Larisa Campos y Karin Levy por el apoyo administrativo.
- A la comunidad del Instituto de Biotecnología que siempre me brindó su apoyo, en especial a los miembros de: la planta piloto, del LAMMB, la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, la Unidad de Bioinformática, la Unidad de Computo y la Unidad de Docencia.
- Al grupo de investigación de Langebio por las donaciones y la transferencia de material y de conocimiento: Dr. Francisco Barona, Dr. César Aguilar, M. en C. Hilda E. Ramos-Aboites, Dra. Karina Verdel-Aranda.
- A mi Comité Tutor: Dra. Laura Palomares, Dra. Susana Castro y Dr. Enrique Merino, por sus invaluable consejos en cada tutorial.

### Personales:

- A mi esposo, Jonathan Salazar León, por mucho: haberme apoyado con consejos experimentales y de vida, por su energía y por enseñarme a disfrutar del laboratorio y de la vida.
- A mi familia, -mis papas- Leticia Pérez Silva, Humberto Guadarrama Célis por darme ánimos y apoyarme en todo momento; -mi hermano y cuñada – Humberto Guadarrama Pérez y Graciela Ocampo por su humor y su ejemplo en trabajar duro. No sabía lo que tenía hasta que me mudé lejos de ustedes. A mi familia – la grande – tías, tíos, primos, primas, sobrinos, sobrinas, su presencia en las fiestas de los fines de semana me dieron ánimos e inspiración. A mis abuelitos – Elena Silva Guzmán con Faustino Pérez Flores e Isabel Celis con Rosalío Guadarrama, por ser ejemplo de fuerza, amor y resiliencia. Gracias a toda mi familia que me sostuvo y sin querer, me ayudó a salir adelante con su amor incondicional. Gracias por el privilegio que tengo de tenerlos como familia.
- A mis amigos, - de toda la vida – Enrique Medina Fitz y Juanjo Ramírez Espinosa, gracias por estar todavía dando lata; - de la vida en el laboratorio – Alberto, Lidia, Arturo, Bere, Esme, Estefanía, Ricardo, Paz, Jocelyn, Andrea Téllez, Iris, Elizabeth Carrasco, Martha, Larisa, Ruth, Vane, Karin; por sus pláticas jugosas, su asesoría y los momentos de complicidad.
- A mis mascotas, -Coco, Benny, Darwin, Luna, Mini, Bolacha, Princesa, Shadow, Lolita, Chikis, Pixie- que me enseñaron a cultivar el amor incondicional. Su presencia levantó mi espíritu.

### Dedicatoria.

Dedico este estudio a las personas que agradecí anteriormente, su presencia en mi vida ha sido fundamental en mi proceso académico y personal. Espero que el esfuerzo de varios años de estudio se vea reflejado en esta tesis y le haga justicia a todo el apoyo que recibí. Dedico este estudio a las personas, que por diferentes circunstancias, no pudieron culminar sus estudios de posgrado, viví en carne propia los desafíos de varias crisis académicas y existenciales, así que las veo y reconozco su valentía. Dedico este estudio al país de México, que este pequeño granito de arena contribuya con el conocimiento científico, soy afortunada por haber sido educada en las mejores escuelas públicas. Finalmente, dedico este esfuerzo a mí misma, porque este producto, la culminación de la tesis, representa una parte de mi vida en la que me transformé en una persona humilde, presente en lo que hace y que trata de tener una vida con significado.

**Resumen.**

Un problema importante durante la producción de proteínas recombinantes es la proteólisis. Una de las estrategias preventivas más comúnmente usadas es la adición de inhibidores de proteasa, lo cual tiene como inconvenientes su corta vida media y su elevado costo, así como una limitada prevención de la proteólisis extracelular. Las bacterias actinomicetos producen los inhibidores de proteasas más usados en la academia y en la industria, que son pequeños péptidos aldehídicos no ribosomales. Previamente, se demostró que una ruta biosintética sin precedentes que involucra una sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) sin un dominio de condensación y una enzima que utiliza tRNAs (tRUE), dirige la síntesis de uno de estos péptidos inhibidores de proteasas, la livipeptina. La livipeptina tiene una estructura de *N*-acetil-L-phenil-L-argininal que inhibe a cisteín-proteasas como la papaína. La inhibición se da mediante la unión reversible con la cisteína del sitio activo de la proteasa y el grupo aldehído del inhibidor. Existen pocos estudios sobre la expresión de otras NRPSs en células diferentes a las bacterias y archeas; sobre todo que el metabolito tenga una actividad de inhibidor de proteasas. En este estudio mostramos que la expresión de la ruta biosintética de livipeptina codificada por los genes *lvp* (sistema *lvp*) en células CHO dio como resultado la producción de la livipeptina con actividad inhibidora de cisteín-proteasa, lo que implica que el sistema *lvp* reconoció los tRNAs de mamíferos. Las células CHO que expresaron transitoriamente el sistema *lvp* produjeron livipeptina sin afectar su crecimiento o su viabilidad celular. La expresión del sistema *lvp* en dos líneas celulares de CHO que producen dos proteínas modelo, la fosfatasa alcalina secretada (hSeAP) y un anticuerpo monoclonal, dio como resultado una mayor productividad específica con una proteólisis reducida. En esta investigación mostramos por primera vez que la expresión de una NRPS bacteriana es funcional en las células CHO, lo que permite la posibilidad del desarrollo de plataformas celulares con la síntesis de bajo costo de un inhibidor de proteasa sin efectos adversos en las células CHO. Esto amplía el campo de la ingeniería metabólica de células de mamíferos al expresar una ruta biosintética de actinomicetos y abre una nueva opción para la inhibición de la proteólisis en la ingeniería de bioprocesos. Las limitaciones y las perspectivas del proyecto son reconocidas en la sección 8.

## Abstract

A significant problem during recombinant protein production is proteolysis. One of the most common preventive strategies is the addition of protease inhibitors, which has drawbacks, such as their short half-life and high cost, and their limited prevention of extracellular proteolysis. Actinomycetes produce the most commonly used inhibitors, which are non-ribosomal small aldehydic peptides. Previously, an unprecedented biosynthetic route involving a Condensation-minus non-ribosomal peptide synthetase (NRPSs) and a tRNA utilizing enzyme (tRUE) was shown to direct the synthesis of one of these inhibitor peptides, livipeptin. Here, we show that expression of the livipeptin biosynthetic pathway encoded by the *lvp* genes in CHO cells resulted in the production of this metabolite with cysteine protease inhibitory activity, implying that mammalian tRNAs were recruited by the *lvp* system. CHO cells transiently expressing the biosynthetic pathway produced livipeptin without affecting cell growth or viability. Expression of the *lvp* system in CHO cells producing two model proteins, secreted alkaline phosphatase (hSeAP) and a monoclonal antibody, resulted in higher specific productivity with reduced proteolysis. We show for the first time that the expression of a bacterial biosynthetic pathway is functional in CHO cells, resulting in the efficient, low-cost synthesis of a protease inhibitor without adverse effects on CHO cells. This expands the field of metabolic engineering of mammalian cells by expressing the overwhelming diversity of actinomycetes biosynthetic pathways and opens a new option for proteolysis inhibition in bioprocess engineering.

## Abreviaturas y definiciones

Abreviatura	Significado o definición
aa	Aminoácidos.
buffer	Palabra en inglés que significa solución amortiguadora de pH.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario, por sus siglas en inglés “complementary Deoxyribonucleic acid”.
Células CHO	Células de ovario de hámster chino (por sus siglas en inglés, <i>Chinese Hamster Ovary cells</i> ).
CRISPR-Cas9	Herramienta de edición de genes traducida como “Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas asociada a la proteína 9” (por sus siglas en inglés, <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated Cas9</i> ).
DEPC	Dietilpirocarbonato (por sus siglas en inglés, <i>Diethyl pyrocarbonate</i> ), reactivo usado para inactivar enzimas nucleasas en solución y en material de laboratorio (Leonard et al., 1970).
DNA	ADN o ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés, <i>Deoxyribonucleic acid</i> ).
dNTPs	Deoxinucleótido trifosfato, por sus siglas en inglés “Deoxynucleotide triphosphates”.
EC 3.4	Clasificación de las proteasas de acuerdo al número de la Comisión de Enzimas, por sus siglas en inglés, <i>Enzyme Commission number</i> . La clasificación está basada en las reacciones químicas que se catalizan (NC-IUBMB, 1992).
eGFP	proteína verde fluorescente mejorada (por sus siglas en inglés, <i>enhanced green fluorescent protein</i> ).
ERAD	Degradación de proteínas asociada con retículo endoplásmico (por sus siglas en inglés, <i>Endoplasmic reticulum-associated protein degradation</i> ).
FBS	Suero Fetal Bovino (por sus siglas en inglés FBS, <i>Fetal Bovine Serum</i> ).
GAPDH	Enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, por sus siglas en inglés “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”.
GPR	Grupo de investigación Palomares-Ramírez.
HCPs	Proteínas celulares del hospedero (por sus siglas en inglés, <i>host cell proteins</i> ).

Abreviatura	Significado o definición
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento (por sus siglas en inglés, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> ).
hSeAP	Fosfatasa alcalina humana sérica de forma secretada (por sus siglas en inglés, <i>human secreted embryonic alkaline phosphatase</i> ).
IBT	Instituto de Biotecnología.
IRS	Referencia interna estándar de 10 kDa para el análisis de electroforesis capilar (por sus siglas en inglés, <i>Internal reference standard of 10 kDa</i> ).
LC-MS/MS	Cromatografía líquida en tandem acoplada a espectrometría de masas (por sus siglas en inglés, <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> ).
m/v	Unidad de concentración en términos porcentuales, por ejemplo que indica unidades de masa sobre volumen. Por ejemplo: 0.8% (m/v) indica que hay 0.8 gramos por cada 100 mL de agua.
MAb	Anticuerpo monoclonal (por sus siglas en inglés, <i>monoclonal antibody</i> ).
MALDI-TOF MS	Espectrometría de masas MALDI-TOF-MS (por sus siglas en inglés, <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i> ).
mAU	Mili unidades de absorbancia a una longitud de onda determinada (por sus siglas en inglés, <i>milli-Absorbance Units</i> ).
MPM	Marcador de peso molecular.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero, por sus siglas en inglés "messenger Ribonucleic acid".
NEB	Fabricante New England Biolabs®.
NRPS	Sintetasa de péptidos no-ribosomales (por sus siglas en inglés, <i>Non-Ribosomal Peptide Synthetase</i> ).
NS	Sin significancia estadística (por sus siglas en inglés "Not significant").
OD <sub>600nm</sub>	Unidades de densidad óptica obtenidas en un espectrofotómetro leídas a una longitud de onda de 600 nm (por sus siglas en inglés, <i>optical density at 600 nm</i> ).
pb, kb	Pares de bases, kilopares de bases (1 x 10 <sup>3</sup> pares de bases), respectivamente.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos (por sus siglas en inglés, Phosphate-Buffered Saline)

Abreviatura	Significado o definición
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).
PNO o PNOs	Procedimiento normalizado de operación, procedimientos generados en el Grupo Palomares-Ramírez.
r-proteínas	Proteínas recombinantes, "proteínas producidas por cualquier ente biológico procarionte o eucariote al que se le introduce, por técnicas de ingeniería genética, una secuencia de ácido desoxirribonucleico que las codifica (RIS, 2021)".
rendimiento	Proporción entre el producto o el resultado obtenido y los medios utilizados (RAE, 2024; Shuler & Kargi, 2002).
RNA	ARN o ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés, <i>Ribonucleic acid</i> ).
RT	Enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa que sintetiza cDNA a partir de RNA.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa, por sus siglas en inglés "Reverse transcription-polymerase chain reaction".
Sistema lvp	Ruta biosintética formada por los genes lvp1(SLI0883), lvp2 (SLI0884) y lvp3 (SLI0885), que producen la livipeptina, inhibidor de cistein proteasas.
TALENs	Herramienta de edición de genes traducida como "Nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción"(por sus siglas en inglés, <i>transcription activator-like effector nucleases</i> ).
tRNAs	RNAs de transferencia (por sus siglas en inglés, <i>transfer RNA</i> ).
tRUE	Enzima que utiliza tRNAs (por sus siglas en inglés, <i>tRNA-utilizing enzyme</i> ).
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (por sus siglas en inglés, <i>Unfolded Protein Response</i> ).
Ultracongelación	Temperatura de -60 a -80°C.
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alto desempeño (por sus siglas en inglés, <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i> ).
USSDNA	Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del IBT.

## 1. Introducción

La fragmentación de las proteínas recombinantes por proteasas (proteólisis) es un problema que sucede al producir proteínas recombinantes (r-proteínas), ya que disminuye su productividad y afecta la calidad del producto final (Geng et al., 2024; Laux et al., 2018; Li et al., 2019; Robert et al., 2009). La producción por cultivo en lote puede provocar la degradación de proteínas ya que los tiempos de residencia pueden ser prolongados y se acumulan las proteasas del sistema celular (Park et al., 2017). También puede ocurrir proteólisis intracelular (Henry et al., 2018), un problema que se ha investigado poco. Las prácticas comunes para reducir la proteólisis, como la reducción de la temperatura o el uso de perfusión, pueden afectar negativamente a la tasa de crecimiento celular, la productividad y complicar el proceso de producción o aumentar su costo (Chakrabarti et al., 2016). La alternativa de eliminar las proteasas celulares (Kol et al., 2020; Laux et al., 2018; Li et al., 2019) puede no estar dirigida a proteasas relevantes, afectar procesos celulares importantes y requiere mucho tiempo para llevarse a cabo. La estrategia más común es la adición de inhibidores de proteasas durante la cosecha y/o purificación (Chakrabarti et al., 2016; Martensen & Justesen, 2001), lo que puede tener un costo considerable, ya que los inhibidores de proteasa son costosos e inestables y deben eliminarse durante la purificación.

Los inhibidores de proteasas utilizados con frecuencia, como leupeptina, quimostatina y antipaína, son péptidos aldehídicos producidos por bacterias Gram-positivas del género *Streptomyces*. Tienen pesos moleculares entre 313 y 856 Da, carecen de un grupo N-terminal, ya que está protegido por un grupo acilo de uno o dos carbonos, y tienen un aldehído en su carboxi-terminal, que es responsable de su actividad inhibidora de proteasas (Aoyagi et al., 1969; Maxson et al., 2016). El aldehído terminal interactúa con el sitio activo de una proteasa, formando un enlace covalente hemiacetal con el aminoácido catalítico, a menudo Ser o Cys, lo que impide la actividad de la proteasa (Brayer et al., 1979; LaLonde et al., 1998; Lewis & Wolfenden, 1977).

Los péptidos aldehídicos son sintetizados por una sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) y un dominio reductasa (Tietze et al., 2020). En 2013 se descubrió una ruta biosintética de 3 genes de tamaño inusual de 4.6 kbp (sistema *lvp*) en *Streptomyces lividans* 66 que produce un dipéptido aldehídico con actividad antiproteasa, primero identificado como livipeptina y luego reconocido como equivalente a la tiolstatina previamente reportada (Cruz-Morales et al., 2018, 2013; Murao

et al., 1985). El tamaño de la ruta biosintética la hace ideal para su expresión en otros sistemas biológicos. El sistema *lvp* está constituido por tres genes: *Lvp1*, la NRPS (SLI0883); *Lvp2*, una leucil/fenilalanil-tRNA transferasa (SLI0884); y *Lvp3*, una acetil-transferasa (SLI0885). *Lvp1* contiene un dominio de adenilación que reconoce una arginina, un dominio fosfopanteteinilo acarreador de péptidos y un dominio reductasa. *Lvp2* es una enzima que reconoce tRNAs y transfiere fenilalanina o leucina a la arginina unida a *Lvp1* y *Lvp3* agrega un grupo acetilo a la amina primaria del dipéptido. Finalmente, el dominio reductasa de *Lvp1* libera el dipéptido aldehídico (Cruz-Morales et al., 2018, 2013). La livipeptina tiene la misma estructura que la tiolstatina, encontrada en cultivos de *Bacillus cereus* e inhibe a la cisteín-proteasa papaína mejor que otras proteasas, entre ellas la tripsina (serin-proteasa) (Aguilar et al., 2023; Cruz-Morales et al., 2018; Murao et al., 1985).

Las NRPS se encuentran naturalmente en bacterias, arqueas y eucariotas inferiores. Hay pocos estudios sobre su expresión en sistemas no bacterianos (Müller et al., 2012; Siewers et al., 2009). Su expresión puede ser un desafío, ya que en general las NRPS son grandes megaenzimas multimodulares con genes de 10 kb a 100 kb de tamaño, con módulos que incorporan una unidad monomérica en un producto final (Huo et al., 2019). Además, una NRPS debe activarse postraduccionalmente a través de la fosfopanteteinilación por una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) (J. H. Kim et al., 2018; Lambalot et al., 1996; Schlumbohm et al., 1991).

En este tesis proponemos la expresión del sistema *lvp* en células CHO para la producción *in vivo* de un péptido aldehídico inhibidor de proteasas, livipeptina. Encontramos que las células CHO pueden producir el péptido no ribosomal a través de la expresión transitoria del sistema *lvp*, NRPS de origen bacteriano, sin la coexpresión de un activador de PPTasa. A través de la producción de livipeptina en células CHO, se redujo la proteólisis de dos proteínas modelo recombinantes, la fosfatasa alcalina humana sérica de forma secretada (hSeAP) y un anticuerpo monoclonal (MAb). Este estudio sienta las bases para utilizar este sistema para diferentes aplicaciones en el campo de la biotecnología.

## 2. Antecedentes.

### 2.1 Importancia de producir proteínas recombinantes.

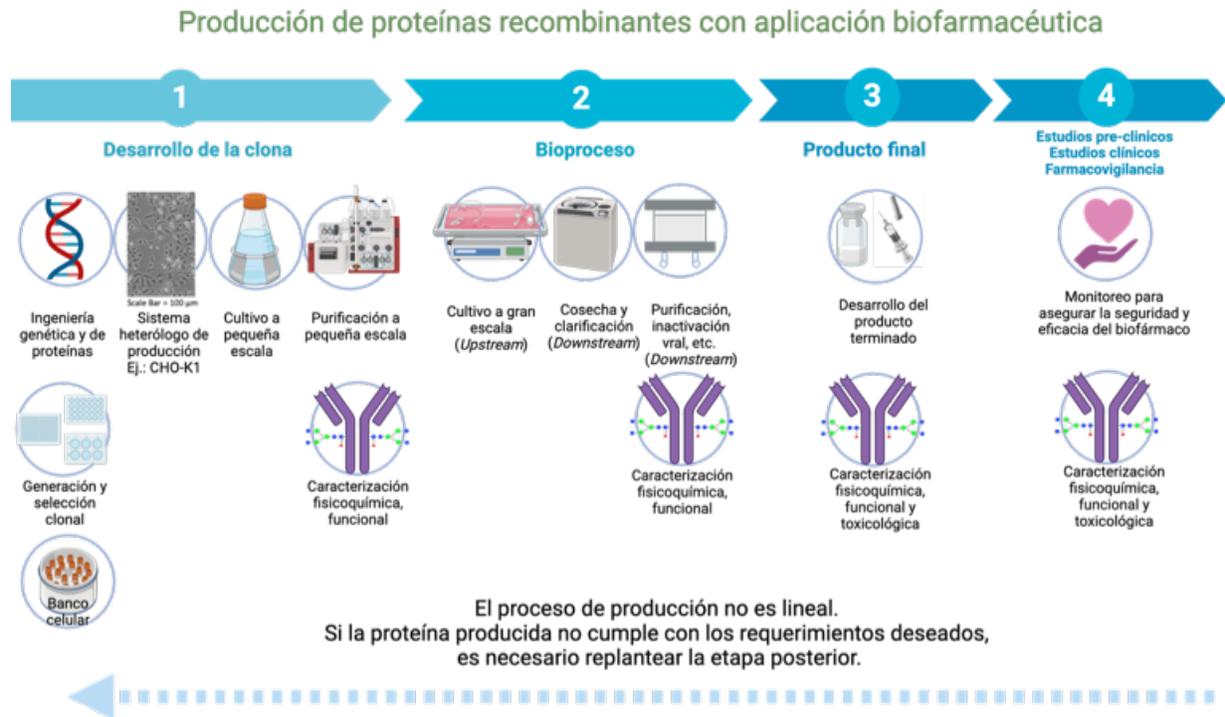
Las proteínas recombinantes (r-proteínas) tienen aplicaciones en distintos campos, como el médico-farmacéutico, alimentario, veterinario, agrónomo, investigación y desarrollo, entre otros (Assenberg et al., 2013; Palomares et al., 2002). Es por ello que su producción es un negocio redituable. En 2022, el mercado global de proteínas recombinantes se valió en \$2.78 USD billones y para el 2032 se espera que alcance los \$8.95 USD billones (Precedence Research, 2023). Esto ha sido posible ya que su producción atiende a diferentes necesidades de la población (Pohlscheidt et al., 2018; Puetz & Wurm, 2019). Por ejemplo, su aplicación ha ayudado al tratamiento de enfermedades complejas, crónicas, inflamatorias y autoinmunes contribuyendo a un mejor pronóstico de estas enfermedades y una mejor calidad de vida (Leader et al., 2008; Pavlou & Reichert, 2004).

Debido a la relevancia de su aplicación, la producción de r-proteínas se ha estudiado extensivamente desde un nivel molecular, su producción a gran escala, farmacocinética y farmacodinámica. Para alcanzar las demandas requeridas, es necesario producirlas mediante estrategias particulares de cultivo celular y de bioprocesos (Rudge & Ladisch, 2020). El proceso para producir r-proteínas es complejo e intervienen diferentes factores que afectan la cantidad y la calidad del producto final (Gronemeyer et al., 2014) (Figura 1). Dentro de estos factores, la proteólisis o fragmentación por proteasas afecta la producción y la calidad de proteínas susceptibles impidiendo su producción eficiente, reduciendo su productividad y su función biológica. Es importante aclarar que la fragmentación, corte y degradación de las r-proteínas puede suceder de forma enzimática mediada por proteasas, no enzimática (por ejemplo modificaciones químicas como desaminación, hidrólisis, oxidación, etc.) y otras. Aquí, nos enfocaremos solo a la degradación enzimática por proteasas y las medidas que se han estudiado para contrarrestar sus efectos.

### 2.2 La proteólisis como problema al producir proteínas recombinantes en células CHO.

La degradación de la proteína recombinante (r-proteína) es la pérdida o destrucción de su estructura e incluye términos como fragmentación, hidrólisis y corte (Geng et al., 2024). Esta es indeseable debido a que, al afectar a la estructura de la proteína, influye directamente en su

actividad biológica, eficacia, seguridad, farmacocinética y farmacodinámica (Torkashvand & Vaziri, 2017). La degradación de una proteína puede ser debida a procesos enzimáticos (proteólisis), no enzimáticos (causados por cambios físicos o químicos, por ejemplo: cambios en pH, presión osmótica y temperatura) o por otros factores (por ejemplo: cambios en parámetros del proceso afectan el pH) (Geng et al., 2024).



**Figura 1. Esquema representativo y simplificado de la producción de proteínas recombinantes (r-proteínas).** El proceso para producir proteínas recombinantes funcionales, de calidad en términos fisicoquímicos, y en cantidad suficiente es complejo. Desde el desarrollo de la cepa hasta llegar al paciente, es relevante realizar pruebas para asegurar la integridad, funcionalidad y seguridad de la r-proteína. Creado con información de Burg et al., 2023; Noh et al., 2018; Singh et al., 2023 y el software de BioRender.com.

La proteólisis es el proceso de degradación de proteínas en péptidos más pequeños y/o en residuos de aminoácidos individuales que se logra mediante una reacción de hidrólisis del enlace peptídico mediada por proteasas (Raju, 2019). Es un proceso biológico fundamental conservado en todos los reinos de la vida (Mashahreh et al., 2022; Minina et al., 2017). Al fragmentar proteínas en aminoácidos, se provee de precursores para la síntesis de nuevas proteínas, realizar el recambio de proteínas intracelulares, degradar proteínas mal plegadas y proteínas reconocidas como

extrañas (en el caso de infecciones), madurar precursores de proteínas, activar zimógenos (forma inactiva de proteasas) (Jahn et al., 2012). Algunos de los procesos biológicos en los que se requiere del corte del enlace peptídico para que ocurran son: a nivel celular - la división celular, apoptosis, regulación génica, procesos infecciosos, etc.; y a nivel sistémico - la coagulación, activación del complemento, desintegración y remodelamiento de tejidos, fertilización, invasión tumoral, etc. (Jahn et al., 2012; Raju, 2019; Ryan, 2011; Ryan & Henahan, 2013, 2017).

La proteólisis puede ser limitada o específica en cortar enlaces peptídicos de secuencias de aminoácidos particulares; o bien, no-limitada o inespecífica, donde la proteína o péptido es digerido en aminoácidos. La proteólisis que ocurre en procesos biológicos celulares está regulada (Jahn et al., 2012; Minina et al., 2017). La proteólisis se rige por un delicado equilibrio entre la velocidad de síntesis y de degradación de las proteínas. Cada proceso biológico que conlleva la acción de proteasas generalmente está regulado llevándose a cabo una proteólisis dirigida a proteínas particulares y sucede en compartimientos subcelulares específicos (ver Figura 2). Las vías principales de proteólisis son la degradación asociada con el retículo endoplásmico (ERAD), el sistema ubiquitina-proteasoma y vías autofágicas (macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas) (Geng et al., 2024). Por la importancia de las proteasas en la fisiología, pueden estar implicadas en el desarrollo de enfermedades como cáncer, enfermedad de Alzheimer, artritis, desordenes de la coagulación sanguínea, alergias, infecciones, entre otras (Bond, 2019; López-Otín & Bond, 2008; López-Otín & Matrisian, 2007; Turk, 2006).

Por otra parte, cuando se desea trabajar con cultivos celulares para sobre-exresar una proteína recombinante (r-proteína), las circunstancias cambian. La sobre-expresión de r-proteínas puede alterar la fisiología celular y algunos procesos biológicos celulares. Por ejemplo, puede causar aumento en la carga metabólica, transporte o traslocación ineficiente; aumento en la expresión de proteínas relacionadas con el plegamiento de proteínas, en la respuesta a proteínas mal plegadas y de proteínas de la traducción, aumento en la producción de proteasas (Geng et al., 2024; Henry et al., 2018).

La proteólisis intracelular de proteínas recombinantes ha sido investigada poco. El mecanismo por el cual sucede es debido a que la sobreproducción proteica satura el procesamiento y el plegado de la proteína en el retículo endoplásmico, activando la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

y la respuesta ERAD, lo que induce la proteólisis vía ubiquitina-proteasoma para restaurar la homeostasis (Geng et al., 2024; Hussain et al., 2014; Nguyen & Zimmer, 2023; Pérez-Rodríguez et al., 2021). El proceso de proteólisis intracelular está modulado por los glicanos de una r-proteína glicosilada así como por glicosidasas (Dorai & Ganguly, 2014; Geng et al., 2024).

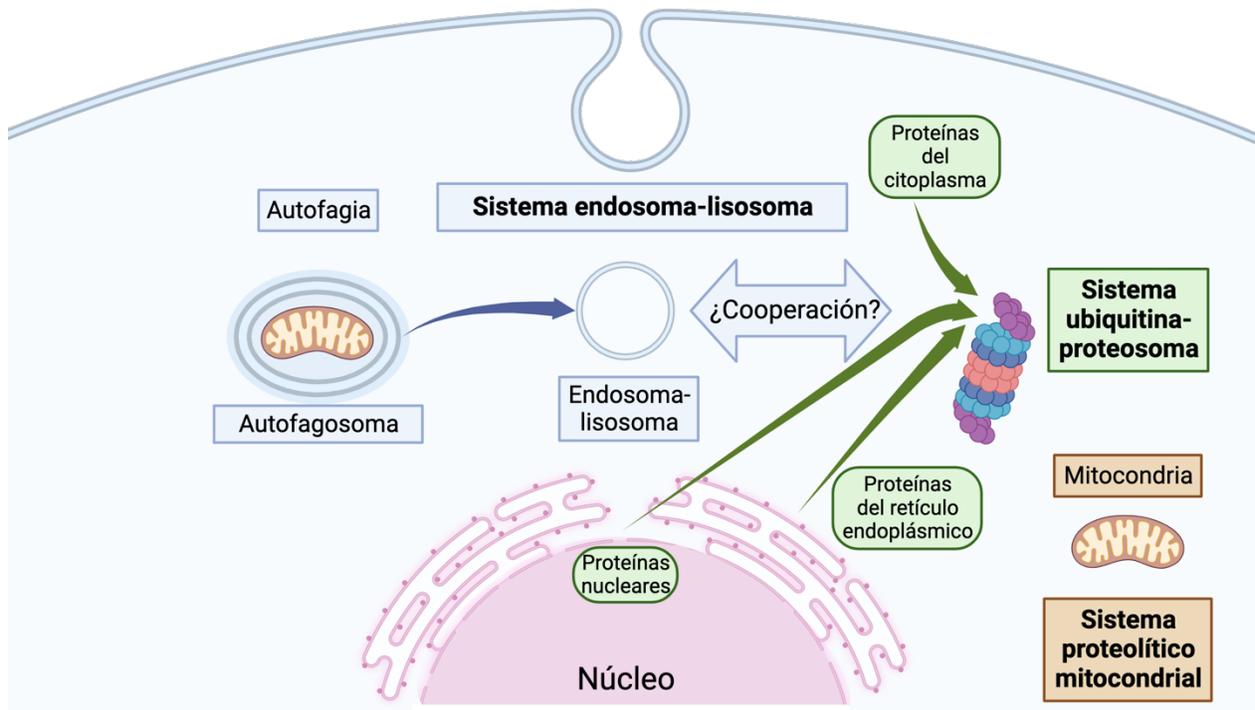


Figura 2. Representación de las principales rutas proteolíticas intracelulares en células eucariotas. Esquema modificado de (Mayer, 2000). Imagen realizada con Biorender.com

La degradación de r-proteínas también sucede por proteasas extracelulares (Henry et al., 2018). Los cultivos celulares con producción en modo lote se ha reportado la acumulación de proteasas de la célula hospedera de forma pasiva y de forma activa. A medida que las células van muriendo o son lisadas se liberan al medio proteasas celulares (pasiva) sobre todo en cultivos con tiempos de residencia largos (Park et al., 2017). Además, las proteasas y glicosidasas también pueden ser secretadas al medio extracelular de forma activa independiente de la viabilidad celular (Geng et al., 2024; Mols et al., 2005).

Estudiar la fragmentación de r-proteínas es relevante debido a sus implicaciones en la productividad y en la calidad del producto que se genera. Al disminuir la cantidad de producto

completo mediante su proteólisis, no solo baja el rendimiento sino también afecta su calidad (Geng et al., 2024). La calidad de una r-proteína está dada por las características estructurales y fisicoquímicas que hacen que tenga actividad biológica, tales como su tamaño, carga, plegamiento, perfil de glicosilación, agregación, entre otras dependiendo de la r-proteína (Chan, 2019). El problema es que la fragmentación puede dar lugar a la pérdida de su actividad biológica y a la formación de subproductos que contribuyen a efectos indeseados como activación del complemento y activación de la respuesta inmune (Alhuthali & Kontoravdi, 2022; Faraji et al., 2018; Hermeling et al., 2004). La degradación pone en riesgo características cruciales para la estabilidad, vida media, inmunogenicidad y función biológica de la r-proteína (Dorai & Ganguly, 2014; Torkashvand & Vaziri, 2017), al generar una mezcla heterogénea de isoformas con diferentes perfiles de glicosilación, carga y con tendencia a formar agregados (Geng et al., 2024).

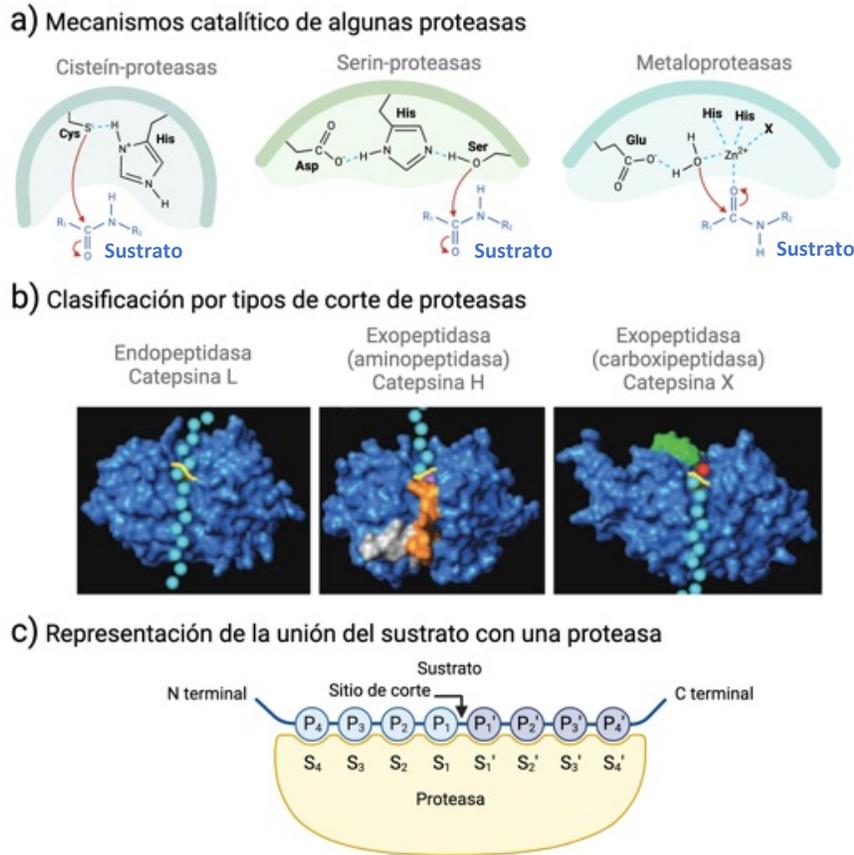
La heterogeneidad causada por la degradación de la r-proteína afecta directamente al rendimiento del producto pues su forma completa disminuye, pero también puede ser un reto para el proceso de purificación (Gilgunn et al., 2019). Los productos de degradación deben ser retirados durante el proceso de purificación ya que se debe comprobar que al final del proceso se obtenga un producto consistente (Dorai & Ganguly, 2014). Por lo anterior, controlar la proteólisis es clave para obtener un producto con los atributos de calidad de interés.

### 2.3 Proteasas y su clasificación.

Antes de describir las proteasas involucradas en la fragmentación de algunas r-proteínas, a continuación se presenta información básica y fundamental para la comprensión del funcionamiento de las proteasas.

Las proteasas son enzimas (clasificación EC 3.4) que rompen los enlaces peptídicos de su sustrato mediante una reacción de hidrólisis produciendo cadenas peptídicas o aminoácidos sencillos (López-Otín & Bond, 2008; Quesada et al., 2009; Turk, 2006). Las proteasas están clasificadas de acuerdo a su mecanismo catalítico, la localización y secuencia del corte que realicen (Figura 3). Según su mecanismo catalítico están agrupadas de acuerdo con el residuo de aminoácido o ion metal que participa (Figura 3a), las cuales son: cisteín-proteasas (ej. papaína), serin-proteasas (ej. tripsina, subtilisina), aspartato-proteasa (ej. plasmepsina), glutamato-proteasas (ej. glutamato carboxipeptidasa 2), treonin-proteasas (ej. TSP50 peptidasa), asparagina-proteasas (ej. MeTr

peptidasa), metaloproteasas (ej. adamalislina). De acuerdo al sitio de corte, se clasifican en exopeptidasas, que cortan en los extremos de la cadena polipeptídica, puede ser del extremo amino-terminal o carboxilo-terminal (ej. aminopeptidasas y carboxipeptidasas); y endopeptidasas, que hidrolizan los enlaces peptídicos internos en la proteína (ej. tripsina, quimiotripsina, pepsina y papaína) (Figura 3b).



**Figura 3. Conceptos básicos sobre proteasas.** a) Mecanismos de acción para la hidrólisis de proteínas por cisteín-proteasas, serín-proteasas y metaloproteasas. La ruptura del enlace peptídico se realiza por un ataque nucleofílico (flechas rojas) por parte de un átomo nucleófilo de la proteasa hacia el carbonilo de la proteína sustrato. El nucleófilo es generado por un grupo atractor de protones como la histidina, hacia el S de la cisteína en las cisteín-proteasas o al O de la serina del sitio activo de las serín-proteasas. En el caso de las metaloproteasas, el nucleófilo es una molécula de agua que es activada por un ácido glutámico, dos histidinas en presencia de  $Zn^{2+}$ . Esta molécula activada es la que ataca al carbonilo del enlace peptídico del sustrato para hidrolizarlo. b) Clasificación de proteasas de acuerdo al sitio de corte, dentro (endopeptidasas) o en los extremos (exopeptidasas). Modelos tridimensionales de catepsinas (cisteín-proteasas) con sus sustratos representados por círculos color cian. La línea amarilla es el sitio de corte, la zona naranja es una región con carga negativa que interactúa con el extremo amino-terminal del sustrato y la zona verde tiene carga positiva que interactúa con la carga negativa en el extremo carboxilo-terminal

de la carboxipeptidasa (punto rojo). c) Representación del subsitio donde sucede el corte de la proteasa condicionado a la interacción de los residuos de aminoácidos de la proteasa con el sustrato. Los círculos P1-Pn, P1' - Pn' y las letras S1 - Sn y S'1-Sn' son residuos de aminoácidos en el sustrato y en las proteasas, respectivamente. Figura modificada de Neitzel (2010) y Turk (2006). Imagen realizada en Biorender.com.

Para el caso de las endopeptidasas como la catepsina L, el sustrato peptídico recorre toda la longitud del sitio activo y se escinde en el interior de la molécula (Figura 3b). Es distinto para las exopeptidasas, donde el sitio de unión al sustrato está estructuralmente restringido y contiene otros elementos estructurales, como un ambiente con carga negativa para unirse al extremo amino terminal del sustrato (ej. catepsina H), o bien, una carga positiva para unirse al extremo carboxilo terminal (catepsina X), respectivamente (Figura 3b). La región de la proteasa que es afín a una cadena lateral de un residuo de sustrato se llama subsitio. Los subsitios se numeran S1-Sn hacia el extremo N-terminal del sustrato y son sitios que no priman. Se numeran S1'-Sn' hacia al extremo C terminal y son sitios que priman. Mientras que los residuos del sustrato que interactúan con la proteasa son numerados P1-Pn y P1'-Pn', respectivamente (Figura 3c) (Turk, 2006).

Las proteasas hidrolizan un enlace peptídico de un sustrato polipeptídico dependiendo de los aminoácidos presentes antes o después del sitio de corte (Tabla 1) (Jahn et al., 2012; Ryan & Hennehan, 2017).

**Tabla 1.** Clasificación de proteasas (Jahn et al., 2012; Ryan & Hennehan, 2017).

De acuerdo a la localización del corte			
Grupo	Número de subclase EC*	Acción	
		N-terminal	C-terminal
<b>Exopeptidasas</b>			
Aminopeptidasas	3.4.11	•- -•-•-•-•-•.....	
Dipeptidil-peptidasas	3.4.14	••- - -•-•-•-•-•.....	
Tripeptidil-peptidasas	3.4.14	•••- - - -•-•-•-•-•.....	
Carboxipeptidasas	3.4.16		-•.....•-•-•-•-•- -••
Peptidil-dipeptidasas	3.4.15		-•.....•-•-•-•-•- -•••
Dipeptidasas	3.4.13		•- -•
Omega peptidasas	3.4.19	☆-•- - -•-•-•-•-•.....	o .....•-•-•-•-•- - -•☆
<b>Endopeptidasas</b>	3.4.21 ... 3.4.24, 3.4.99		.....•-•-•-•-•- - -•-•-•-•-•.....

Símbolos: •: residuo de aminoácido. -: enlace peptídico. |: corte. ☆: residuo unido en enlace distinto al peptídico. ....: otros aminoácidos.

Continúa la tabla en la siguiente página

<b>De acuerdo a su especificidad en el corte</b>	
<b>Peptidasa (ejemplos)</b>	<b>Especificidad en el corte</b>
Tripsina	...Lys- -X... o ...Arg- -X...
Papaína	(hidrofóbico) -(Arg o Lys) - - (no Val)
Quimiotripsina	... hidrofóbico - -X...
Trombina	...Arg- -X
Endoproteínasa Glu-C de <i>Staphylococcus aureus</i> V8	...Glu- -X...or ...Asp- -X...
Asp-N-metalo-endoproteínasa de <i>Pseudomonas fragi</i>	...X- -Asp... or ...X- -ácido cisteico...
Factor de coagulación Xa	...Ile-Glu-Gly-Arg- -X
Enteropeptidasa (enteroquinasa)	...Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- -X...
Kexina (proteasa KEX2 de levadura)	...(Lys o Arg)-Arg- -X...

Símbolos: X: cualquier aminoácido. -: enlace peptídico. | : corte. ....: otros aminoácidos hidrofóbico: Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp o Tyr.

#### 2.4 Proteasas en la producción de r-proteínas y soluciones para contender con su presencia.

Los problemas de proteólisis de r-proteínas se han descrito en cualquier parte del proceso de producción, desde su desarrollo, purificación, hasta en el producto terminado. Hasta ahora, la proteólisis de r-proteínas no puede ser predicha a pesar de que se conocen algunas secuencias consenso de corte de proteasas (Rawlings et al., 2018). Esto sucede porque las secuencias de corte potencial no necesariamente son los sitios reales de corte debido a varios factores como el propio plegamiento que depende de las modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, y de las condiciones fisicoquímicas en las que se encuentre la r-proteína. Actualmente se han desarrollado ciertas herramientas informáticas que dan información sobre los posibles sitios proteolíticos (Duvaud et al., 2021; Matveev et al., 2023). Los factores principales que se asocian con la fragmentación de una r-proteína pueden ser: secuencia primaria (Zhi-Gang et al., 2005), complejidad estructural (Henry et al., 2018; Robert et al., 2009), glicosilación compleja (Li et al., 2019) y línea celular con alta actividad proteolítica intrínseca (Dorai et al., 2011).

En general lo que sucede es que primero se detecta la fragmentación de la r-proteína de interés en el laboratorio-industria en un determinado sistema heterólogo y luego, se establecen las estrategias para lidiar con el problema, entre ellas averiguar la proteasa causal.

En la Tabla 2 se presentan casos de algunas r-proteínas que durante su producción se observó fragmentación, si se investigó o no las proteasas involucradas, las estrategias que se implementaron para reducir o eliminar la fragmentación, así como información destacada de ese estudio.

**Tabla 2.** Proteínas recombinantes fragmentadas por proteasas y los cambios que se hicieron para contender con la fragmentación en determinadas etapas de su proceso de producción.

Proteína recombinante sobre-expresada (línea celular)	Proteasa que degrada	Parte del proceso de producción que se modificó	Relevancia o estrategias para abordar la proteólisis (referencia)
Proteína de fusión IIn-UK contra fibrina humana con uroquinasa de bajo peso molecular usando linker (G4S) <sub>3</sub> (células COS7 y células CHO)	No determinada	Optimización del vector - secuencia codificante	El cambio la secuencia del linker de fusión (G4S) <sub>3</sub> , se quitó dos sitios de corte proteolítico (Zhi-Gang et al., 2005).
Gp120 recombinante, proteína de envoltura del VIH (células CHO-S)	C1s, Componente 1s del complemento, serin-proteasa	Desarrollo de la línea celular	La delección del gen que codifica para C1s por CRISPR/Cas9 eliminó la actividad proteolítica contra la gp120 (Li et al., 2019).
Anticuerpo monoclonal (MAb) (células CHO)	Catepsina D (proteasa lisosomal) y otras HCPs	Desarrollo de la línea celular	Evaluación del efecto de la delección de grupos de genes de HCPs (6, 11 y 14 genes deletados, analizaron el secretoma). Tuvieron una reducción del 40-70% del contenido de HCP, observando mayor productividad y crecimiento celular (Kol et al., 2020).
Anticuerpo monoclonal (células CHO-K1)	Anexina A2 y catepsina D	Desarrollo de la línea celular	Uso de CRISPR/Cas9 para la delección de los genes <i>anxa2</i> y <i>ctsd</i> . Las clonas crecieron igual y con misma viabilidad que las silvestres (Fukuda et al., 2019).
Anticuerpo monoclonal (células CHO)	Matriptasa-1	Desarrollo de la línea celular	La línea celular deficiente de matriptasa-1 se desarrolló usando nuevas herramientas de ingeniería celular, tamizaje con secuenciación de siguiente generación. Se optimizó el rendimiento del MAb (Laux et al., 2018).
Proteína de fusión Fc (células CHO)	Similar a la Catepsina D y una metaloproteasa	Caracterización de proteasas durante el cultivo celular	Células viables en cultivo secretan la catepsina D. La calidad y estabilidad del producto final está asociado a parámetros del cultivo (Robert et al., 2009).
BMP-7 ( <i>Bone morphogenetic protein-7</i> ) (células CHO)	PCs (Proproteína convertasa, furina, PACE4, PC5/6 y PC7)	Desarrollo de la línea celular	En este caso si se necesita la actividad proteolítica para obtener la forma activa de BMP-7. La clona silvestre produjo 12% de BMP-7 madura, siendo la furina la causal. La clona que sobre-expresó

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Título abreviado: “Producción de un péptido aldehídico bacteriano en cultivos de células animales”

Proteína recombinante sobre-expresada (línea celular)	Proteasa que degrada	Parte del proceso de producción que se modificó	Relevancia o estrategias para abordar la proteólisis (referencia)
			PC5/6 fue la mejor para producir la proteína madura (Sathyamurthy et al., 2015).
gp120 recombinante (células CHO-S, HEK293)	C1s, Componente 1s del complemento, serin-proteasa	Desarrollo de la línea celular	La proteasa C1s se identificó como la responsable de la proteólisis. Se genera la clona deficiente de C1s mediante CRISPR/Cas9 demostrando la prevención de la proteólisis (Li et al., 2019).
Proteína de fusión -Fc y otra (células CHO-K1SV)	Proteasoma	Desarrollo de la línea celular	La presencia del inhibidor del proteasoma epoxomicina durante la generación del <i>pool</i> celular incrementa la productividad de la clona seleccionada (Knight et al., 2021).
Proteína de fusión IgG1-FC (CHO-K1SV)	Proteólisis en general	Desarrollo de la línea celular	El proceso de elongación de la traducción del mRNA de la r-proteína cuando sucede rápidamente resulta en baja fidelidad y un mal plegamiento generando regiones susceptibles a degradación por proteólisis. La manipulación de la velocidad de la traducción es un acercamiento para reducir la fragmentación por corte de proteínas de fusión (Knight et al., 2022).
MAB contra el factor de necrosis tumoral humano (células CHO-S)	Biogénesis de lisosomas	Desarrollo de la línea celular y bioproceso: adición de agente que arresta en la fase G0/G1 durante el cultivo.	La adición de apilimod redujo la biogénesis de lisosomas y la autofagia. Se observó un aumento de la productividad específica. Mantiene la densidad celular y aumenta la producción. Método potencial para desarrollar línea celular para la producción de r-proteínas (Lu et al., 2023).
gp120 recombinante y factor humano VIII (CHO-K1 cells)	C1s, Componente 1s del complemento, serin-proteasa	Desarrollo de la línea celular y bioproceso	La línea celular CHO-K1 deficiente de C1s y MGAT1 (glicosilación, limita glicosilación hacia manosa 5) funciona para producir proteínas completas. La r-gp120 generada con esta línea celular produce anticuerpos neutralizantes tras su inmunización (Li et al., 2020).
Proteína de fusión Fc (CHO cells)	Aumento en expresión de proteasas. No indica una proteasa en particular.	Caracterización de proteasas durante el cultivo celular	Bases sobre proteólisis intracelular y genes involucrados en el corte de proteína de fusión. Aumento de proteínas involucradas en el plegamiento, en la respuesta a proteínas mal plegadas, proteínas de la traducción y proteasas (Henry et al., 2018).

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Título abreviado: “Producción de un péptido aldehídico bacteriano en cultivos de células animales”

Proteína recombinante sobre-expresada (línea celular)	Proteasa que degrada	Parte del proceso de producción que se modificó	Relevancia o estrategias para abordar la proteólisis (referencia)
IFN- $\gamma$ recombinante secretado (células CHO-320)	Proteasa de tipo papaína	Medio de cultivo	El hidrolizado de proteína de arroz usado como suplemento del medio de cultivo fue la fuente de una cisteín proteasa de tipo papaína que degradaba a la proteína recombinante de interés. Importancia de la calidad de los suplementos de medios libres de suero (Mols et al., 2004).
IFN- $\gamma$ recombinante secretado (células CHO-320)	Metaloproteasas de la matriz de la superficie celular (proMMP-14 y MMP-14), y secretadas (proMMP-9)	Medio de cultivo	El INF- $\gamma$ secretado es protegido de la proteólisis extracelular por inhibidores endógenos como los zimógenos de las metaloproteasas e inhibidores como PAI-1; o exógenos como la adición de hidrolizados proteicos (Mols et al., 2005).
IFN- $\gamma$ recombinante humano (células CHO-320)	Serin-proteasas y metaloproteasas	Medio de cultivo	La adición de citrato de hierro al cultivo evitó la proteólisis (Clincke et al., 2011).
IFN- $\gamma$ (células CHO)	No identificada	Bioproceso: cultivo modo lote	El IFN- $\gamma$ cortado fue más prevalente de forma intracelular (Curling et al., 1990).
IFN- $\gamma$ recombinante humano (células CHO)	No identificada	Bioproceso: cultivo modo lote	El IFN- $\gamma$ se observó fragmentado en todas las etapas del cultivo usando MALDI-TOF MS (Goldman et al., 1997).
Proteína-4 recombinante humana morfogénica de hueso (rhBMP-4) (células CHO)	No identificada	Bioproceso: cultivo en lote repetido	La proteólisis fue mayor en la fase estacionaria. Los inhibidores EDTA y leupeptina fueron tóxicos. El modo de cultivo en lote repetido permitió alta viabilidad, cambiar el medio (C. L. Kim et al., 2016).
Proteína de fusión VEGFR1 (D1-D3)-Fc (células CHO-K1)	No identificada	Bioproceso: temperatura	La proteína se encontró cortada desde etapas tempranas del cultivo, incrementó su fragmentación a lo largo del cultivo y en el almacenamiento. La disminución de la temperatura de cultivo de 37°C a 30°C fue la mejor solución para reducir la proteólisis (Chakrabarti et al., 2016).
Anticuerpo ampliamente	No identificada	Bioproceso: adición del inhibidor AEBSF	La adición de AEBSF al cultivo permitió pasar de una fragmentación del 39% a 5-11% y mejorar su

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Título abreviado: “Producción de un péptido aldehídico bacteriano en cultivos de células animales”

Proteína recombinante sobre-expresada (línea celular)	Proteasa que degrada	Parte del proceso de producción que se modificó	Relevancia o estrategias para abordar la proteólisis (referencia)
neutralizante del VIH-1 (bNAB) (No se especifica)		durante el cultivo	potencia <i>in vitro</i> del 58% al 76-80% (Cai et al., 2019).
Proteína de fusión biespecífica conjugada (células CHO-K1)	No determinada	Bioproceso: cultivo en perfusión	Los niveles de corte de la r-proteína se redujeron con el cultivo en perfusión comparado con la estrategia en lote. El corte bajó del 4.9-8.7% para modo lote, al 0.6-1.5% con cultivo en perfusión. Se obtuvo un producto homogéneo en términos de glicosilación y variantes de carga (Bielser et al., 2019).
6 tipos de proteínas de fusión biespecífica no glicosilada (células CHO)	No determinada	Bioproceso: cultivo en perfusión intensificado.	Estudio con 6 líneas de células CHO, por 12 días en modo lote alimentado, 40 días en perfusión. El uso del modo de perfusión intensificado redujo agregados (72%), redujo las especies cortadas (75%), redujo variantes ácidas (76%), redujo el contenido de HCP (84%) respecto a un cultivo en lote alimentado (Gomez et al., 2020).
Anticuerpo biespecífico (células CHO-K1)	No determinada	Bioproceso: cultivo en perfusión	Se observó una disminución significativa de la agregación y la fragmentación, un producto más homogéneo en perfusión respecto al modo lote alimentado. La mejora de la calidad en el cultivo en perfusión puede estar atribuida a la corta retención del producto en el biorreactor (Qin et al., 2022).
Factor VIII recombinante (células CHO DG44N.Y)	Metaloproteasas (MMPs) MMP3, MMP10 y MMP12	Bioproceso: caracterización de proteasas en cultivo continuo	Durante el cultivo se encontraron distintos tipos de metaloproteasas. Primero una pro-enzima de >200 kDa que se auto-digiere y genera MMPs activas. La más pequeña de 19.4 kDa fue la más activa (Sandberg et al., 2006).
Proteína de fusión IgG4-Fc (células CHO)	Adam 19 y Furina	Purificación: adición de inhibidores de proteasas al clarificado	Mediante transcriptómica se analizaron cultivos de células que producían la r-proteína cortada en diferentes grados para conocer genes sobre-regulados. Adam 19 y Furina se encontraron relacionadas al corte de la r-proteína. La adición del inhibidor de furina al clarificado aumentó un 33-39% la presencia de la forma completa respecto a las muestras sin inhibidor (Clarke et al., 2019).

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Título abreviado: “Producción de un péptido aldehídico bacteriano en cultivos de células animales”

Proteína recombinante sobre-expresada (línea celular)	Proteasa que degrada	Parte del proceso de producción que se modificó	Relevancia o estrategias para abordar la proteólisis (referencia)
Proteína de fusión (glucagón-like-peptide-1-antibody fusión protein, GLP-1) (células CHO-S, CHO-K1, CHOK1SV, HEK293)	Serin-proteasas y treonin-proteasas	Purificación: adición de inhibidores de proteasas al clarificado	Caracterización de proteasas mediante métodos <i>in vitro</i> de proteólisis fluorescente, tamizaje con inhibidores de proteasas, y cromatografía por afinidad. Cada línea celular tiene su propio nivel de actividad proteolítica endógeno y de glicosilación, aunque no se correlaciona con el grado de fragmentación de la r-proteína (Dorai et al., 2011).
Proteína de fusión (células CHO)	Catepsina D	Purificación	Presencia de actividad proteolítica residual de lotes de producto después de la purificación hasta su almacenamiento en solución. Se aisló y caracterizó la proteasa y se agregó un paso de inactivación por calor después del proceso de purificación para inactivar a la catepsina D (Lim et al., 2018).
Varias: Fragmentos recombinantes de anticuerpo (Fabs), MAb, proteínas de fusión y anticuerpos biespecíficos (células CHO)	Catepsina L, cisteín-proteasa	Purificación	La catepsina L co-eluyó con la r-proteína usando cromatografías de intercambio iónico. No se detectó la proteasa usando cromatografía de afinidad pero no es eficiente. Se creó un modo mixto de purificación. Los inhibidores leupeptina y E64 que inhiben serin y cisteín-proteasas funcionaron para evitar la fragmentación del producto purificado (Luo et al., 2019).
Anticuerpo monoclonal IgG1 (células CHO-K1)	Catepsina D, aspártico-proteasa	Purificación: paso adicional	La catepsina D interacciona con el MAb y se co-purifican obteniendo partículas de MAb con fragmentos de la cadena pesada del extremo C-terminal. Durante la cromatografía de proteína A se incorporó un lavado extra con solución salina, a alto pH, con caprilato para romper la interacción de la proteasa con el MAb. Al final se obtuvo un producto con muy bajos niveles de HCP, actividad proteolítica no detectable y sin partículas (Bee et al., 2015).
Anticuerpo monoclonal (células CHO)	Catepsina D, aspártico-proteasa	Purificación	Fragmentación del MAb por catepsina D. Implementaron un lavado cromatográfico en la etapa de captura efectivo y escalable. Implementaron un método de espectrometría de masas para el monitoreo de la catepsina en tiempo real desde el cultivo hasta la purificación (Cui et al., 2019)

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Título abreviado: “Producción de un péptido aldehídico bacteriano en cultivos de células animales”

Proteína recombinante sobre-expresada (línea celular)	Proteasa que degrada	Parte del proceso de producción que se modificó	Relevancia o estrategias para abordar la proteólisis (referencia)
Anticuerpo bi-específico (bsAb) (células CHO)	Catepsina B, cisteín-proteasa	Purificación: adición de leupeptina	Se identificó a la catepsina B por el patrón de corte por LC-MS/MS y ensayos de inhibición de proteasas. La adición de leupeptina al eluido de la cromatografía de interacción hidrofóbica inhibe la actividad de la catepsina B, proteasa endógena de CHO responsable de la fragmentación del bsAb (Hu et al., 2022).
Anticuerpo bi-específico (bsAb) (células CHO)	Proteasas en general	Purificación: lavado con caprilato de sodio	La fragmentación del bsAb se debió a proteasas residuales después de su purificación. La adición de caprilato de sodio al buffer de lavado de la cromatografía de Proteína A ayudó a obtener menos degradación del bsAb, siendo una medida efectiva para remover HCPs y proteasas endógenas (Hu et al., 2021).
Anticuerpo monoclonal IgG4 (células CHO)	Proteasa ácida	Purificación: lavado con buffer con 0.05 M de TRIS con 0.5M de arginina pH 8.5.	La fragmentación se observó al incubar el MAb formulado con temperatura a pH ácido, siendo fragmentado en su región bisagra. La fragmentación se inhibió al agregar pepstatina A, inhibidor de proteasas ácidas. Se mejoró la cromatografía de afinidad de Proteína A usando un buffer con 0.05 M de TRIS con 0.5M de arginina pH 8.5. Con este buffer de lavado se eliminó la fragmentación del MAb (Yang et al., 2019).
Ninguna	Metaloproteasas 9 y 12 (MMP-9, -12)	Purificación: Desarrollo de perlas con termolisina impresa	Estas esferas con termolisina (otra MMP neutral) adsorbieron MMP-9 y MMP-12 de sobrenadantes de células CHO. Se espera un uso potencial en la purificación para eliminar esas y otros tipos de proteasas (Schauer et al., 2018).
Anticuerpo monoclonal de tipo IgG (células CHO-K1)	HCPs en general	Purificación: Desarrollo de resinas con péptidos sintéticos	El uso de resinas con péptidos ligandos de HCPs es efectivo para unir HCPs dejando fluir al IgG. Los péptidos tetraméricos multipolares tuvieron la mejor unión a las HCPs y menor pérdida de IgG. (Lavoie et al., 2019, 2020).
Anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 con alta pureza (células CHO)	Pepstatina A, proteasa ácida	Producto final	Después de 20 días a 40°C pH 4, se degradó 40% debido a una actividad proteolítica residual. A un pH 5, la degradación fue del 87%. El inhibidor usado para identificar a la proteasa acida como causante de la fragmentación fue la pepstatina A. Importancia de la calidad del material de formulación (Gao et al., 2011).

## 2.5 Estrategias para abordar el problema de la actividad proteolítica.

Las prácticas comunes para contender o lidiar con la fragmentación de una r-proteína que se describieron en la Tabla 2 se basan en los siguientes enfoques que no son mutuamente excluyentes (Geng et al., 2024):

- A nivel molecular:

1. Co-expresión de genes. Se refiere a cualquier gen que se exprese para contrarrestar la proteólisis como la expresión de genes relacionados con el plegamiento y la respuesta ERAD. Hay pocos estudios sobre la expresión de moléculas endógenas inhibitoras de proteasas (Mols et al., 2005).

2. Edición de genes. En general, esta estrategia se basa en la delección de genes de proteasas que han resultado sobre-expresadas y asociadas con la fragmentación de la r-proteína mediante un análisis transcriptómico y/o proteómico. Antes de realizar la mutación del o los genes de proteasas candidatas en el genoma de la célula, es necesario comprobar experimentalmente que la inhibición de estas proteasas previene la fragmentación deseada, ya sea desde el cultivo o con la proteína purificada (Fukuda et al., 2019; Kol et al., 2020; Laux et al., 2018; Li et al., 2020, 2019; Lim et al., 2018).

3. Optimización del vector. Se basa en modificar la secuencia de nucleótidos específica que codifica para un motivo de la proteína que pudiera ser degradado mediante la optimización de su secuencia, la mutación de bases, la delección de un fragmento y/o la fusión de un péptido o etiquetas en el extremo amino o carboxilo terminal (Chakrabarti et al., 2016; Dorai et al., 2011; Ebrahimi & Samanta, 2023; Knight et al., 2022; Robert et al., 2009; Strohl, 2018).

- A nivel bioproceso:

1. Suplementación del medio de cultivo. La adición de inhibidores de proteasas o de sustratos alternativos es otra manera de controlar la actividad proteolítica sobre todo durante el cultivo, que es cuando la proteína recombinante puede estar en contacto con las proteasas, ya sea por la lisis celular o por la secreción de proteasas de células vivas hacia el medio extracelular (Chakrabarti et al., 2016; Clarke et al., 2019; Clincke et al., 2011; Hishinuma et al., 2018; Hu et al., 2022; Knight et al., 2022, 2021; Lu et al., 2023). Como la presencia de fragmentos causa agregación,

también se suele agregar moléculas estabilizadoras de proteínas (más detalles en (Geng et al., 2024)).

2. Optimización del cultivo celular. Consiste en la modificación de parámetros del cultivo como el pH, la temperatura, la agitación, la presión osmótica para disminuir la fragmentación de r-proteínas y disminuir la heterogeneidad en el producto (Bryan et al., 2021; Chakrabarti et al., 2016; Clarke et al., 2019; Henry et al., 2018; Knight et al., 2022; Torres et al., 2021). Otros métodos para reducir la fragmentación incluye la optimización del medio de cultivo, del modo de cultivo, la cosecha en tiempos tempranos para reducir la cantidad de proteasas liberadas por células muertas y el tiempo de residencia (Bielser et al., 2019; Gomez et al., 2020; Qin et al., 2022). Es importante el monitoreo de la integridad y características fisicoquímicas de la r-proteína una vez que se cambio un parámetro del cultivo celular ya que afecta directamente el título, la calidad, el perfil de glicosilación, la agregación de la proteína y su carga (Paul et al., 2018; Xie et al., 2016).

3. Optimización de la purificación y del producto final. Se refiere a las estrategias usadas durante el proceso de purificación de r-proteínas ya que es indispensable que se elimine la actividad proteolítica mediante la remoción de HCPs para evitar la degradación de la proteína de interés. Las estrategias generales son incluir lavados con agentes químicos como el caprilato de sodio que favorecen la remoción de proteasas, agregar inhibidores de proteasa al eluato, y también el desarrollo de nuevas resinas cromatográficas (Cui et al., 2019; Hu et al., 2021; Lavoie et al., 2019; Luo et al., 2019; Schauer et al., 2018; Yang et al., 2019).

Cada estrategia para contender con la actividad proteolítica tiene sus limitantes. La alternativa de mutación de genes para eliminar proteasas (Kol et al., 2020; Laux et al., 2018; Li et al., 2019) ha sido posible gracias a la tecnología de edición de genomas como CRISPR-Cas9, TALENs, entre otras; además de secuenciación masiva para análisis transcriptómicos. Sin embargo, una incorrecta asociación de proteasas causales podría afectar procesos celulares críticos. Esta estrategia en particular puede tomar tiempo y recursos importantes para generar las clonas mutantes, las cuales tendrán que ser validadas.

Las prácticas comunes para reducir la proteólisis mediante la reducción de la temperatura o el uso de perfusión pueden reducir la tasa de crecimiento celular, la productividad y complicar el proceso de producción o aumentar su costo (Chakrabarti et al., 2016).

Una de las estrategias más comunes es la adición de inhibidores de proteasa durante la cosecha o la purificación (Chakrabarti et al., 2016; Martensen & Justesen, 2001), lo que puede tener un costo sustancial, ya que los inhibidores de proteasa son costosos e inestables y deben eliminarse durante la purificación. Por lo anterior, en este estudio proponemos la expresión del sistema *lvp*, una ruta biosintética que produce un péptido aldehído inhibidor de proteasas, en células CHO que ayude al desarrollo de una línea celular para contribuir al conocimiento sobre la producción de proteínas recombinantes.

### 2.6 Propuesta: sistema *lvp*, NRPS que produce a la livipeptina, péptido aldehídico inhibidor de proteasas.

En el 2013, se descubrió la ruta biosintética implicada en la producción de la livipeptina, un péptido aldehídico con actividad inhibitoria de proteasas encontrado en cultivos de *Streptomyces lividans* 66 (Aguilar et al., 2023; Cruz-Morales et al., 2013), el sistema *lvp*. Los genes implicados en la producción de livipeptina fueron descubiertos por el grupo de investigación del Dr. Francisco Barona mediante la búsqueda de moléculas con actividad biológica usando la genómica funcional evolutiva (Cruz-Morales et al., 2013). En este estudio se secuenció el genoma de diferentes especies de *Streptomyces*, entre ellas *S. lividans* 66, y mediante análisis bioinformáticos se determinó que los genes SLI0883 (*lvp1*), SLI0884 (*lvp2*) y SLI0885 (*lvp3*) estaban involucrados en la síntesis de péptidos no ribosomales. Cada componente del sistema *lvp* contiene características estructurales particulares para producir la livipeptina (Figura 4). La NRPS o sintetasa de péptidos no ribosomales LVP1 (producto del gen SLI0883), tiene un dominio de adenilación, un dominio acarreador de péptidos y un dominio reductasa. LVP1 es una NRPS inusual ya que carece del dominio de condensación C típico. Sin embargo, el sistema incluye el gen SLI0884 que codifica para la transferasa LVP2 de tipo tRUE (tRNA-Utilizing Enzyme) de la familia leucyl/phenylalanyl (L/F) transferase. Finalmente, el gen SLI0885 codifica para la enzima LVP3 encargada de adicionar un grupo acetilo a la amina primaria del dipéptido. Este sistema cataliza la transferencia de leucina o fenilalanina cargado a un t-RNA hacia un residuo de arginina o lisina produciendo un dipéptido que es acilado. El tamaño de esta ruta biosintética es inusualmente pequeño, 4.6 kb, y genera un dipéptido aldehídico acilado denominado livipeptina (Figura 4). La estructura propuesta de este péptido es similar a la leupeptina (Figura 5) y a la de otros inhibidores de proteasas, por lo que se

predijo su actividad inhibitoria de proteasas. Posteriormente, se logró identificar las condiciones en las que estos genes se expresan en cultivos de *S. lividans* y además se logró su expresión heteróloga en *E. coli* (Cruz-Morales et al., 2018). También se demostró que la expresión de los tres genes de la ruta biosintética de la livepeptina en *E. coli* era suficiente para la producción de la livepeptina y subproductos de bajo peso molecular capaces de inhibir a las proteasas tripsina (serin-proteasa) y papaína (cisteín-proteasa) (Figura 6). Aguilar et al., demostraron que LVP2 es dependiente de RNAs para poder producir la molécula con actividad de inhibición de proteasas (Aguilar et al., 2023). En este estudio se reconoce la dificultad de caracterizar químicamente a la livepeptina debido a su poca estabilidad. Se enfatiza en que el estudio ayuda a potenciar el descubrimiento de nuevos péptidos pequeños aldehídicos con actividad biológica mediante el estudio de los genes del sistema *lvp* para sintetizar variantes de la livepeptina con base en su estructura acetil-leu/phe-argininal (Aguilar et al., 2023).

Por lo anterior, resulta interesante determinar si la livepeptina puede producirse y ser funcional en un contexto donde se produzca simultáneamente con una proteína recombinante. Este estudio tiene el propósito de expresar de forma heteróloga, en bacterias y en células de mamífero, el conjunto de genes de la ruta biosintética de la livepeptina (sistema *lvp*), y evaluar el efecto de su producción en el crecimiento y en la productividad de dos proteínas recombinantes, la fosfatasa alcalina humana secretada (hSeAP) y un anticuerpo monoclonal (MAb) (sección 2.9).

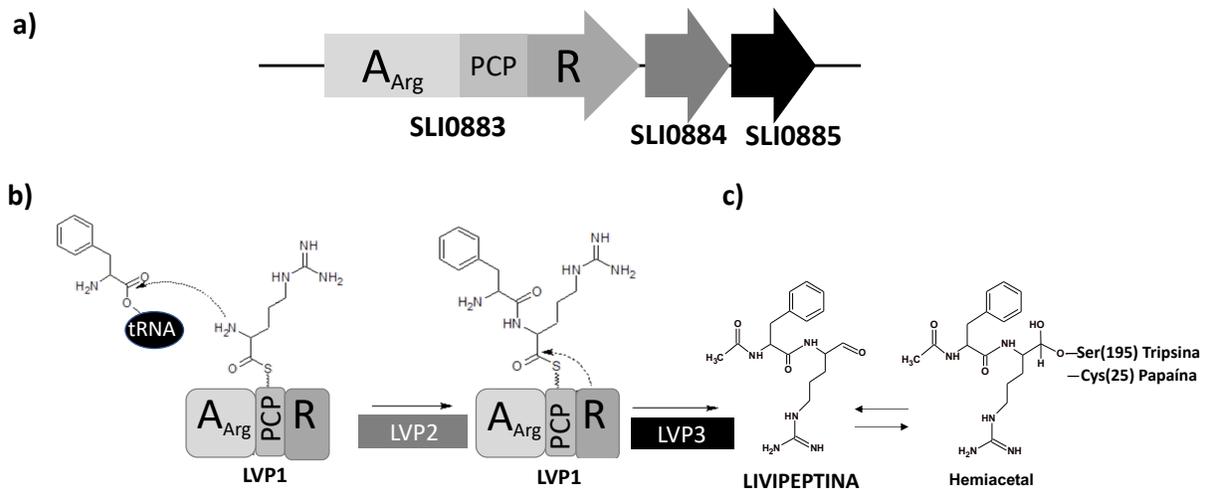
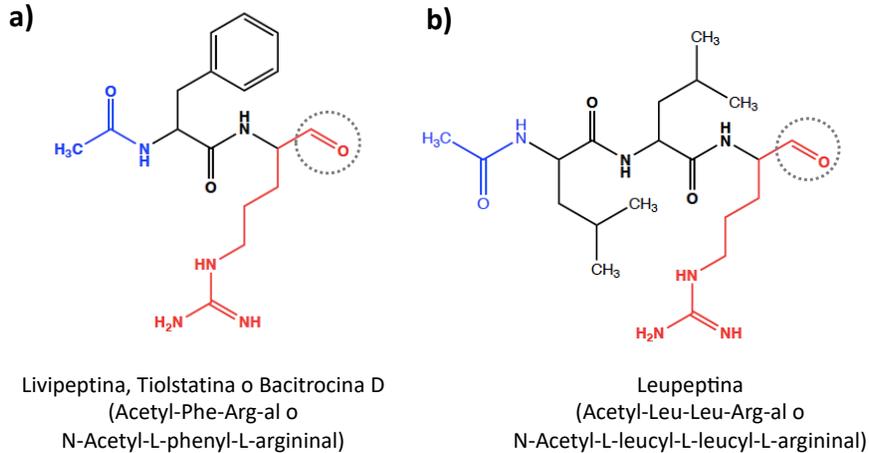


Figura 4. Ruta biosintética de la livepeptina (sistema *lvp*), un pequeño péptido aldehídico que inhibe a cisteín-proteasas del tipo papaína y serin-proteasas del tipo tripsina. A) El sistema *lvp* tiene una longitud de 4531 pb y contiene tres genes, SLI0883 (2966 pb, codifica para la sintetasa

de péptidos no ribosomales LVP1), SLI0884 (783 pb, codifica para la transferasa de Leu-Phe-tRNA LVP2) y SLI0885 (782 pb, codifica para la acetiltransferasa LVP3). B) Mecanismo de producción de la livipeptina por el sistema *lvp*. C) La inhibición de las cisteín-proteasas y serin-proteasas es debida a la formación de una estructura hemiacetal entre el grupo aldehído de la livipeptina y el residuo de la serina y/o cisteína de las proteasas, respectivamente.



**Figura 5. Similitud estructural entre livipeptina y leupeptina.** Las estructuras moleculares de la livipeptina y la leupeptina son similares porque están conformadas por una arginina y un aldehído (argininal), y ambas pertenecen a los compuestos denominados aldehídos de arginina (del inglés "*arginine aldehyde*") (en rojo), siendo el grupo aldehído (en círculo) el grupo activo para inhibir a cisteín-proteasas y serin-proteasas; así como el extremo amino-terminal acetilado (en azul). Por otra parte, la livipeptina contiene un residuo de fenilalanina, mientras que la leupeptina, dos de leucina. La livipeptina se encontró en cultivos de *Bacillus cereus*, y se le llamó thiolstatin o bacitrocina D (Murao et al., 1985), mientras que la leupeptina se aisló de cultivos de *Streptomyces* de diferentes especies (Aoyagi et al., 1969). Las estructuras moleculares se hicieron con el programa ChemDraw® de PerkinElmer (versión 22.0.022).

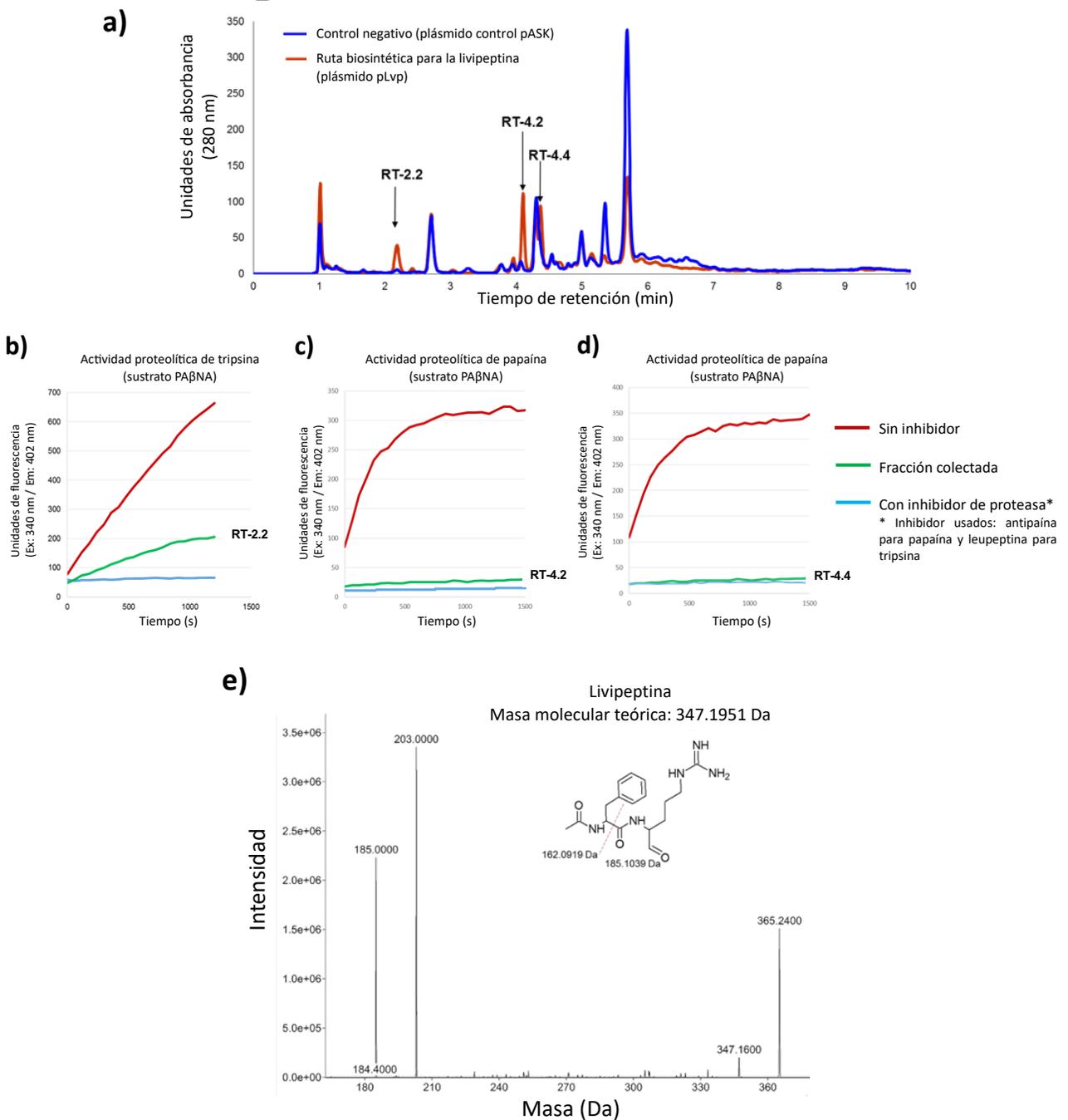


Figura 6. Análisis de sobrenadantes de cultivos de *E. coli* transformados con plásmidos que contienen el sistema *lvp* productor de la livipeptina. (a) Perfiles cromatográficos obtenidos por cromatografía en fase reversa de sobrenadantes de los cultivos de *E. coli* que expresa el casete de la ruta biosintética de la livipeptina (línea roja) respecto al control que no la expresa (línea azul). Las flechas indican las fracciones colectadas con tiempo de retención de 2.2, 4.2 y 4.4 min (RT-2.2, RT-4.2 y RT-4.4) para determinar su actividad de inhibición de tripsina y papaína así como su masa molecular. b), c) y d) Ensayos de inhibición de tripsina y papaína realizados a las fracciones

colectadas. El análisis por espectrometría de masas de cada fracción mostró que son moléculas con diferente bajo peso molecular, siendo la RT-4.4, la livipeptina (Cruz-Morales et al., 2018). e) Perfil de masa molecular de la livipeptina producida en *Streptomyces lividans*. La masa teórica de la livipeptina es 347.1951 Da, por lo que el resultado sugiere que la molécula podría estar monohidratada ( $347 + 18$  del agua = 365 Da) (Cruz-Morales et al., 2018).

### 2.7 Inhibidores de proteasas bacterianos como la livipeptin, péptidos aldehídicos pequeños.

El género bacteriano *Streptomyces* se caracteriza por producir metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas que se encuentran disponibles comercialmente, tales como bactericidas (Daptomicina producido por *S. roseosporus*), fungicidas (Nistatina producido por *S. noursei*), herbicidas (Glufosinato, producido por *S. viridochromogenes*) e inhibidores de proteasas (Leupeptina, producido por *S. roseus*) (Marinelli, 2009). Los inhibidores de proteasas producidos por *Streptomyces* son los más utilizados tanto en la industria como en la investigación, debido a su capacidad para inhibir distintos tipos de proteasas (Tabla 3) (Ryan & Henehan, 2013; Wi et al., 2006).

**Tabla 3.** Ejemplos de algunos inhibidores de proteasas producidos por bacterias y sus proteasas blanco (Cruz-Morales et al., 2018).

Péptido aldehídico pequeño*	Cepa productora	Proteasa(s) blanco	Clase de proteasa	Referencia
<b>Leupeptin</b>	<i>Streptomyces roseus</i> MA839-A1	Tripsina, Plasmina, Papaína, Proteasoma 20S	Serin/cisteín/treonin-proteasas	(Aoyagi et al., 1969)
<b>Antipain</b>	<i>Streptomyces yokosukanensis</i> MC829-AS1, <i>Streptomyces mauvecolor</i>	Tripsina, Plasmina, Papaína	Serin/cisteín-proteasas	(Suda et al., 1972; Hamao Umezawa, 1973, 1976)
<b>Chimostatin</b>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> MC521-C8, <i>Streptomyces lavendulae</i> MC524-C1	Quimotripsina, Papaína	Serin/cisteín-proteasas	(H Umezawa et al., 1970)
<b>Elastatinal</b>	<i>Streptomyces griseoruber</i> MD 469-CG8	Elastasa	Serin-proteasas	(Okura et al., 1975; Hamao Umezawa, 1973)
<b>Flavopectin</b>	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL-F6652, <i>Streptomyces</i> f <i>lavogriseus</i> ATCC 33331	Papaína, Calpaína	Cisteín-proteasas	(Chen et al., 2013)
<b>Staccopin</b>	<i>Staphylococcus tanabeensis</i>	Calpaína, Papaína	Cisteín-proteasas	(Saito et al., 1987)
<b>Strepin</b>	<i>Streptomyces tanabeensis</i> (SAB934)	Tripsina, Papaína, Calpaína	Serin/cisteín-proteasas	(Ogura et al., 1985)
<b>Tyrostatin</b>	<i>Kitasatospora</i> cp. Cepa 55	Papaína, Ficaína y carboxil-proteínasas	Cisteín-proteasas y carboxil-peptidasas	(Oda et al., 1989)

Péptido aldehídico pequeño*	Cepa productora	Proteasa(s) blanco	Clase de proteasa	Referencia
Bacithrocin	<i>Bacillus cereus</i> EY-21	Trombina, Factor Xa, Tripsina y Papaína	Serin/cisteín-proteasas	(Kamiyama et al., 1994)
Thiolstatin	<i>Bacillus cereus</i> EY-21	Papaína, Tripsina	Serin/cisteín-proteasas	(Murao et al., 1985)
Acetyl-L-leucyl-L-argininal o Caricastatin	<i>Cepa BMG520-yF2</i>	Papaína, Dipeptidil aminopeptidasa III, Ficaína y Bromelina	Serin/cisteín-proteasas	(Ishikiori et al., 1984)

\*El nombre del péptido se escribió en inglés para evitar errores de traducción al español.

Los inhibidores de proteasa de uso frecuente, como la leupeptina, la quimostatina y el antipaína, son pequeños péptidos aldehídicos producidos por bacterias Gram positivas del género *Streptomyces*. Tienen pesos moleculares entre 313 y 856 Da, carecen de grupo N-terminal, ya que está protegido por un grupo acilo de uno o dos carbonos, y tienen un aldehído en su extremo carboxilo, el cual es el responsable de su actividad inhibidora de proteasas (Aoyagi et al., 1969; Maxson et al., 2016). El aldehído terminal interactúa con el sitio activo de una proteasa, formando un hemiacetal con el aminoácido catalítico, a menudo Ser o Cys, impidiendo la actividad de la proteasa (Brayer et al., 1979; LaLonde et al., 1998; Lewis & Wolfenden, 1977). Los péptidos aldehídicos pequeños normalmente se sintetizan mediante sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) con un dominio reductasa responsable de la formación del aldehído y la liberación del péptido naciente (Tietze et al., 2020).

A pesar de que estos inhibidores se han usado desde su descubrimiento en los años setenta, poco se sabe sobre los genes implicados en su biosíntesis, en parte debido a la complejidad del genoma de *Streptomyces*. Por análisis comparativos de su genoma con los de otras bacterias que se conocen mejor, se sabe que la mayoría de las regiones que incluyen genes involucrados en rutas biosintéticas de productos naturales tienen un tamaño que va desde las 10 kb hasta las 200 kb (Cruz-Morales et al., 2018).

### 2.8 Expresión de otras rutas biosintéticas de tipo NRPS en sistemas no bacterianos.

Las NRPS o sintetasas de péptidos no ribosomales, se encuentran expresadas naturalmente en bacterias, arqueas y eucariotas inferiores. Las NRPS son grandes megaenzimas multimodulares con genes que van desde 10 kb a 200 kb de tamaño, con módulos que incorporan una unidad monomérica en un producto final (Huo et al., 2019). Por lo anterior, su expresión heteróloga puede

ser desafiante en términos prácticos de clonación pero también por la compatibilidad entre células de diferentes reinos. Además, se sabe que una NRPS debe activarse postraduccionalmente mediante la fosfopantetenilación mediada por una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) (Kim et al., 2018; Lambalot et al., 1996; Schlumbohm et al., 1991).

Existen dos estudios sobre la expresión de NRPS en sistemas no bacterianos (Müller et al., 2012; Siewers et al., 2009). La expresión heteróloga de NRPS se ha reportado principalmente en células eucariotas inferiores como *Saccharomyces cerevisiae* (Siewers et al., 2009). En este estudio se produjo el péptido *d*-(*L*-*a*-aminoadipil)-*L*-cysteinil-*D*-valina (LLD-ACV), primer intermediario en la ruta biosintética de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como penicilinas y cefalosporinas. Para ello, se trabajó en la expresión de su sintetasa (gen *pcbAB* de *Penicillium chrysogenum*) y la coexpresión de un activador, 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa). Probaron tres tipos de PPTasas de diferentes bacterias, de *Aspergillus nidulans*, *P. chrysogenum* y *Bacillus subtilis*; y todas funcionaron para producir el LLD-ACV. De forma interesante concluyen que el número de copias de los genes de la sintetasa y la PPTasa son un factor limitante para la producción del ACV, ya que al integrarse al genoma de *S. cerevisiae*, las copias de los genes disminuyeron de la misma manera que la producción del ACV (6 veces en comparación con la expresión transitoria) (Siewers et al., 2009).

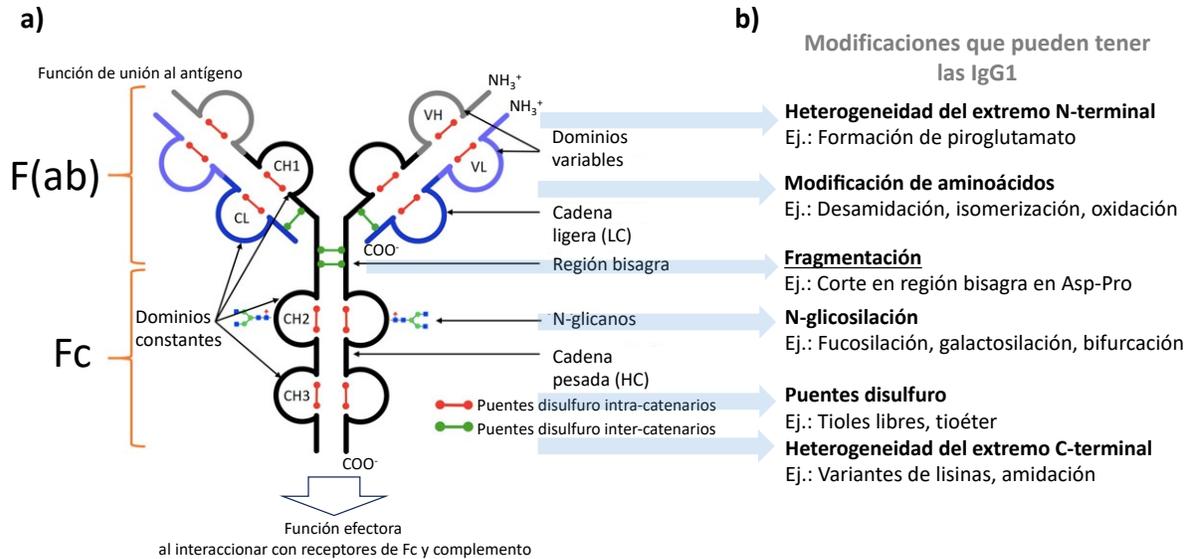
Respecto a la expresión de NRPS en células de mamífero, existe un estudio donde se produjo el péptido no-ribosomal 3,3'-bipyridyl keto-indigoidina (indigoidina) que es pigmento de color azul, pero también su forma reducida sin color y fluorescente. Ambos funcionan como moléculas reporteras (Müller et al., 2012). La indigoidina se produjo mediante la co-expresión de la NRPS *BpsA* de *Streptomyces lavendulae* y su PPTasa activadora *SVP* de *Streptomyces verticillus* en células HEK293-T, células FreeStyle293-F y células madre humanas (hMSC-TERT). Los autores aseguran que esta plataforma es un sistema reportero barato, confiable y versátil al funcionar en varios reinos (bacteriano y eucariota). Este estudio abre las puertas sobre la posibilidad de que células de mamífero produzcan péptidos no-ribosomales con actividades biológicas que puedan ofrecer tratamientos terapéuticos novedosos (Müller et al., 2012).

## 2.9 Proteólisis de dos proteínas recombinantes modelo: MAb y hSeAP.

La producción de la livipeptina mediante por la expresión de su ruta biosintética, el sistema lvp, se evaluó en dos líneas celulares que producen de forma estable e independiente un anticuerpo monoclonal recombinante humano de tipo IgG y la fosfatasa alcalina humana en su forma secretada.

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) son las proteínas recombinantes que se producen en mayor cantidad por sus diversas aplicaciones y demandas en el campo biofarmacéutico (O'Flaherty et al., 2020). Las células CHO son las células de mamífero no humanas de elección para producir MAbs y otras r-proteínas debido a su capacidad de generarlos similares a las humanas en términos de complejidad estructural, su capacidad de producción, costo, seguridad y eficacia. Las ventajas del cultivo de células CHO para producir r-proteínas son: son poco sensibles a infecciones con virus humanos, fácilmente adaptables a diferentes escalas de producción con medio libre de suero y crecimiento celular en suspensión, capacidad para expresar proteínas con modificaciones post-traduccionales completas similares a las de la proteína nativa, los genes de interés a sobre-expresar son fácilmente integrados a su genoma celular y muestran eficiente replicación y niveles de expresión. Actualmente, el uso del cultivo de células CHO se ha convertido en una plataforma poderosa de producción debido al éxito comercial de sus productos. Al 2020, ochenta MAbs se encuentran en el mercado y al 2024 se estima que los ingresos alcancen los \$ 252.6 miles de millones USD y se proyecta que para el 2029 alcance los \$497.5 miles de millones USD (Liang et al., 2023; Markets and Markets, 2024).

Los MAbs son glicoproteínas altamente complejas en términos estructurales que provienen de las inmunoglobulinas de clase G con pesos moleculares altos (150 kDa aprox.). Están formados por dos cadenas ligeras (LC, de 25 kDa aprox.) y dos cadenas pesadas (HC, de 50 kDa aprox.) unidas entre ellas mediante enlaces disulfuro inter-catenarios e interacciones no-covalentes y resultando en su forma característica de "Y" (Figura 7).



**Figura 7. Esquema de la estructura de un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 y sus posibles modificaciones durante su producción.** A la izquierda se muestra un esquema representativo que muestra en azul al exterior, las cadenas ligeras (LC, por sus siglas en inglés *light chain*). Al interior, en negro-gris, están las cadenas pesadas (CH, por sus siglas en inglés *heavy chain*). La región bisagra está en el centro, donde comienza la bifurcación de las cadenas pesadas y la unión con las cadenas ligeras mediante puentes disulfuro inter-catenarios (en verde). En la parte superior se señalan los dominios variables de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL), mientras que más abajo se señalan los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). En rojo se presentan los puentes disulfuro intra-catenarios. En el dominio CH2 de la región Fc se ubica el sitio de N-glicosilación en la Asn 297, conservada en las IgG1. Finalmente, la zona del anticuerpo de unión al antígeno es la región bifurcada o F(ab), mientras que la FC es la región con función efectora. A la derecha se enlistan las modificaciones que se ha observado que los Mabs pueden tener al producirse por cultivo celular. La fragmentación es la que se estudia en este trabajo. Modificada de (Dadouch et al., 2021; Eon-Duval et al., 2012; Higel et al., 2016).

Los puentes disulfuro intra-catenarios estabilizan el plegamiento de la estructura (16 por IgG1, 7 por cadena). Cada cadena pesada y ligera contiene diferentes dominios. Los dominios variables de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) contienen regiones hipervariables responsables de la especificidad de la unión al antígeno, mientras que el resto de los dominios son secuencias constantes llamadas regiones constante de la cadena ligera (CL) y pesada (CH1-3) (Higel et al., 2016). Los MABs son proteínas que se definen como complejas ya que durante su proceso de producción pueden contener modificaciones como diferentes perfiles de glicosilación, la formación de piroglutamato en el extremo N-terminal y el corte de la lisina en el extremo carboxilo

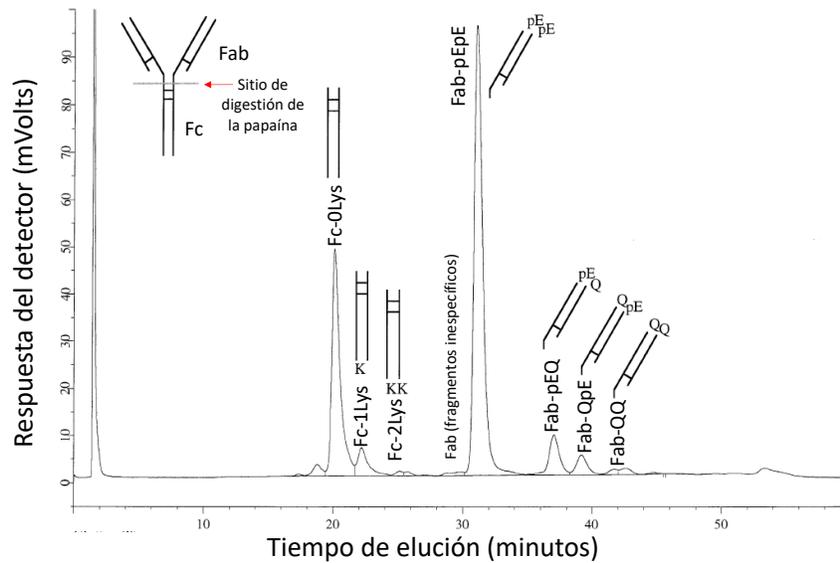
terminal, su degradación enzimática o no enzimática, entre otras. Estas características pueden generar un producto con micro-heterogeneidades que puede tener un efecto directo en la farmacogenética, farmacodinámica, tiempo de vida media, unión al antígeno, propiedades anti-inflamatorias o incrementar la inmunogenicidad del MAb (Dadouch et al., 2021; Eon-Duval et al., 2012).

La estructura conformacional de un anticuerpo es estable y resistente. Sin embargo, la fragmentación del anticuerpo puede suceder por procesos enzimáticos y no enzimáticos (Vlasak & Ionescu, 2011). La fragmentación no enzimática puede suceder debido a que ciertos sitios en la cadena de aminoácidos son más susceptibles en función de su secuencia de aminoácidos (ciertos residuos facilitan el corte, por ejemplo: Cys-Cys en IgG1 a pH 7-10, 45°C (Cohen et al., 2007)), la flexibilidad local de la estructura, junto con condiciones extremas del solvente (cambios en el pH, presión osmótica, temperatura) y la presencia de metales o radicales libres. Es por ello que cada mecanismo de degradación será específico para cada MAb, a pesar de que compartan una misma estructura general IgG, tienen cambios en la región constante de la cadena pesada en función de su isotipo IgG1, IgG2 y IgG4 (Geng et al., 2024; Tang et al., 2021; Vlasak & Ionescu, 2011). Este apartado estará enfocado en la fragmentación enzimática de MAbs mediada por enzimas proteasas.

La degradación enzimática de MAbs mediada por proteasas es un problema que debe ser tomado en cuenta al producirlos. Actualmente, se cuentan con varios ejemplos MAbs y MAbs fusionados sufren de fragmentación donde durante el proceso de producción, ya sea durante el cultivo celular y/o purificación (ver Tabla 2). La región conservada de los MAbs de la zona bisagra es sensible a corte enzimático y no-enzimático. Debido a esta característica, la proteólisis *in vitro* de los MAbs tiene aplicaciones particulares, como en la caracterización de las cadenas pesadas, ligeras y sus variantes (ver Figura 8) (Moorhouse et al., 1997) y en el desarrollo de métodos preparativos para generar fragmentos Fab o F(ab)'<sub>2</sub> a partir de IgGs usando proteasas como papaína o pepsina (Cheng-Gang et al., 1999; Kinman & Pompano, 2019; Zhang et al., 2023).

Los principales sitios de corte enzimáticos y no-enzimáticos de los MAbs tipo IgG se encuentran en la región flexible de la bisagra, dentro de los dominios constantes de la cadena pesada 1 y 2 (CH1

y CH2) y alrededor de las interfaces de los dominios (Eon-Duval et al., 2012; Vlasak & Ionescu, 2011).



**Figura 8.** Perfil cromatográfico típico del anticuerpo monoclonal IDEC-C2B8 de tipo IgG1 después de la digestión con papaína. La cromatografía es de intercambio iónico, lo que permite que los fragmentos del MAb se separen con base en su carga. La fragmentación con papaína permitió la resolución de variantes que surgen de la ciclación de la glutamina a piroglutamato en el extremo amino terminal de las cadenas ligera y pesada (Fab-pE/Q) de las variantes que resultan del procesamiento de los residuos de lisina carboxi-terminales de las cadenas pesadas (Fc-Lys). pE: piroglutamato. Q: glutamina. figura modificada de Moorhouse et al., 1997.

La otra proteína recombinante modelo que se co-producirá con el sistema lvp para evaluar su integridad es la fosfatasa alcalina humana sérica de forma secretada hSeAP (por sus siglas en inglés, *human secreted embryonic alkaline phosphatase*). La hSeAP es una proteína derivada de la fosfatasa alcalina placentaria humana PLAP (placental alkaline phosphatase, 513 aminoácidos). La hSeAP carece de la región de anclaje a membrana presente en el extremo carboxilo terminal del gen PLAP y su tamaño es de 489 aminoácidos (Berger et al., 1988). Este cambio de secuencia permite que sea secretada al medio extracelular, lo cual tiene como ventaja que su cuantificación sea fácil y rápida usando métodos colorimétricos basados en su actividad enzimática. La SEAP es una enzima reportera secretada de mamífero comúnmente usada debido a que sus niveles son directamente proporcionales a los niveles de mRNA intracelular y al número de células, por lo que se aprovecha en estudios de monitoreo de actividades celulares asociadas con la expresión genética, regulación

y transducción de señales (Tannous & Teng, 2011; Wang et al., 2023). Hasta donde investigamos, no está reportado su fragmentación por proteasas del hospedero más que para el estudio de la secreción de proteínas por el retículo endoplásmico (Praznik et al., 2022), debido a que el enfoque ha sido cuantificar a la enzima activa o completa a través de ensayos enzimáticos. Sin embargo, la SEAP tiene mayor estabilidad al calor que las fosfatasas endógenas (65°C) y es resistente al inhibidor L-homoarginina, lo que permite un pretratamiento para inhibir fosfatasas endógenas (Tannous & Teng, 2011). La SEAP es una proteína glicosilada, por lo que también puede ser empleada para el estudio de perfiles de glicosilación bajo determinadas condiciones (Olczak & Szulc, 2021).

### 3. Hipótesis

La producción de la livipeptina producida por células de ovario de hamster chino a través de la expresión de su ruta biosintética, sistema lvp, es inocua y disminuye la actividad proteolítica causando un aumento en la producción y la integridad de proteínas recombinantes modelo.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Analizar la posibilidad de producir la livipeptina mediante la expresión de su ruta biosintética en células bacterianas y animales, así como su efecto sobre la viabilidad, el crecimiento celular, la producción e integridad de proteínas recombinantes.

#### 4.2 Objetivos específicos

1. Establecer la metodología para la identificación y actividad de inhibición de proteasas del péptido aldehídico livipeptina mediante la expresión heteróloga de los genes de su ruta biosintética en cultivos bacterianos.
2. Establecer la estrategia para la expresión de los genes de la ruta biosintética del péptido aldehídico livipeptina, en células bacterianas y animales.
3. Evaluar y analizar el efecto de la expresión de los genes de la ruta biosintética del péptido aldehídico livipeptina, en el crecimiento y metabolismo celular, así como en la capacidad de la producción de la proteína de interés en células bacterianas y animales.

## 5. Materiales y métodos

La expresión del sistema *lvp* para producir la livipeptina se evaluó en células bacterianas y células de mamífero con la finalidad de investigar su efecto en el crecimiento y viabilidad celular, así como su aplicación como inhibidor de cisteín-proteasas de tipo papaína. A continuación se describen los métodos empleados.

### 5.1 Producción de la livipeptina en cultivos bacterianos.

#### 5.1.1 Cepas bacterianas y plásmidos

La producción del inhibidor de proteasas livipeptina es llevada a cabo por el *sistema lvp*, el cual está formado por el gen que codifica para la sintetasa de péptidos no ribosomales LVP1 (SLI0883 o *lvp1*), la transferasa de t-RNA cargado con Phe o Leu LVP2 (SLI0884 o *lvp2*) y la acetilasa LVP3 (SLI0885 o *lvp3*). Previamente, el grupo del Dr. Francisco Barona del LANGEBIO-CINVESTAV generó y nos compartió las cepas bacterianas usadas para la producción de la livipeptina en *E. coli*, proceso patentado por ellos mismos (Cruz-Morales et al., 2018). La cepa con la que se trabajó es la *E. coli* C41 pGROEL/ES que expresa el sistema de chaperonas GroEL-GroES y que asisten el plegamiento de proteínas heterólogas (Nishihara et al., 1998). La cepa está transformada con un plásmido para la expresión inducible con tetraciclina y contiene el sistema LVP productor de livipeptina, pALVP (Figura 9). También nos compartieron la cepa control que usaron transformada con el plásmido pASK, el cual tiene el mismo esqueleto del plásmido pALVP pero expresa a la acilfosfatasa 1 humana (ACYP1) como proteína de expresión irrelevante. La información detallada de los plásmidos se encuentra en la tabla de plásmidos en la sección 11.1.1.

#### 5.1.2 Mantenimiento de cepas bacterianas y generación de bancos de gliceroles para su preservación.

Las cepas que nos transfirieron de Langebio fueron resembradas a partir de placas a otras con medio LB con ampicilina (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1.5% agar, 100 µg/mL ampicilina, pH 7.0) para obtener colonias aisladas. Se incubaron a 37°C por 16-24 h. Posteriormente, se tomó una colonia, se inoculó 3 mL de medio LB líquido con 100 µg/mL ampicilina (de un stock 100 mg/mL; Sigma, A0166) y se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm durante 16-24 h. Después de la incubación, se midió la densidad óptica a 600 nm (Eppendorf, BioSpectrometer) y se usó este cultivo para purificar el plásmido y analizarlo, como pre-inóculo para la producción de livipeptina y para la generación de bancos, como se detalla más adelante.

Los bancos bacterianos se hicieron en crioviales de 2 mL etiquetados, transfiriendo 500  $\mu$ L del cultivo anterior (colonia inoculada en 3 mL de medio LB con ampicilina) con 500  $\mu$ L de glicerol al 50% estéril. La suspensión se congeló rápidamente poniendo en contacto el criovial con hielo seco con etanol. Estos bancos se almacenaron en ultracongelación en una caja de muestras etiquetada.

### 5.1.3 Purificación de plásmidos de expresión bacteriana y su análisis.

A partir de un cultivo en medio líquido incubado de 16-24 h a 37°C, se tomó de 1 a 3 mL y se purificó el plásmido a pequeña escala usando el Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, D4020) siguiendo el protocolo del fabricante. El plásmido purificado se analizó en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), para su cuantificación y análisis de pureza, siendo aceptable cuando la relación de las absorbancias 230/260 nm y 280/230 nm fueran de 1.6-2.0 y mayor a 1.6, respectivamente. Además, se analizó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (m/v) cargando 300 ng de DNA plasmídico y usando el agente de tinción de ácidos nucleicos *HydraGreen™* (Aaij & Borst, 1972; ACTGene, 2016). Un plásmido aceptable fue aquel en el que se observaran bandas definidas de las formas superenrollada, lineal y relajada del plásmido, así como DNA genómico no visible (banda de alto peso molecular >10 kb). Posteriormente, los plásmidos fueron digeridos con enzimas de restricción específicas (Tabla 4), de acuerdo con su secuencia teórica para confirmar su identidad (Figura 9). Una vez confirmada su identidad, el plásmido pALVP se secuenció usando oligonucleótidos específicos diseñados de acuerdo a su secuencia teórica considerando amplicones de 200-300 pb (las secuencias están en Guadarrama-Pérez, 2021). Éstos fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del IBT. La secuenciación se realizó de acuerdo a las instrucciones de la USSDNA a partir de 300 ng de DNA plasmídico y oligonucleótidos específicos (localización espacial en el plásmido: Figura 10; oligonucleótidos usados: Tabla 5). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias teóricas usando el software SnapGene versión 7.1.1.

**Tabla 4.** Protocolo para la identificación de plásmidos pALVP y pASK mediante la digestión con enzimas de restricción

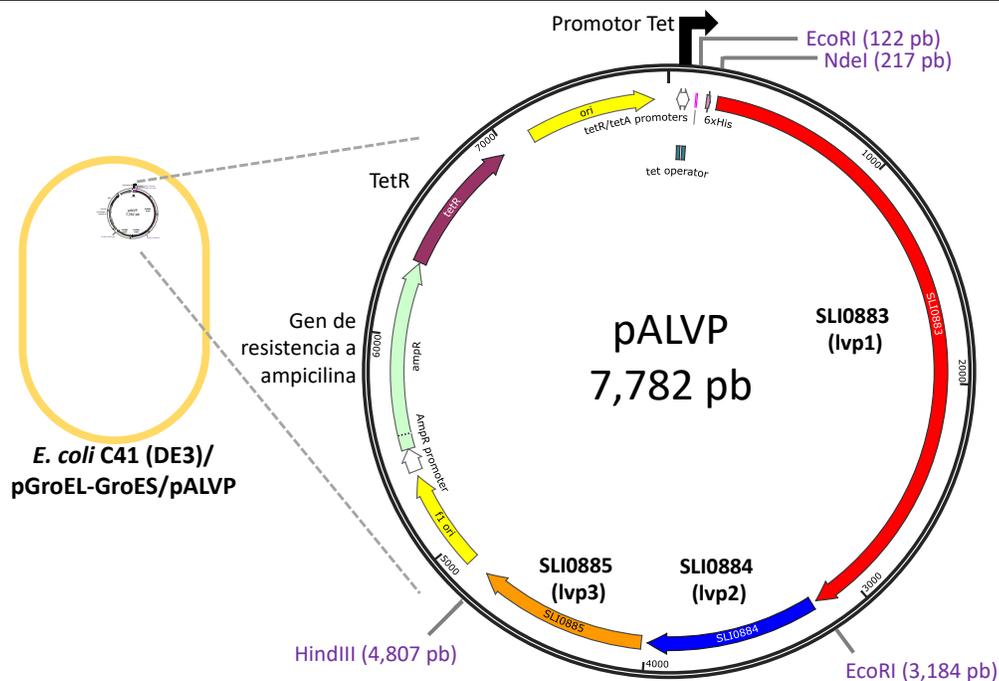
Orden	Componente	Cantidad, observaciones
3	Templado DNA plasmídico	300 ng
4	Enzimas de restricción	<i>NdeI</i> (R0111S, NEB) <i>HindIII</i> (R0104S, NEB) <i>EcoRI</i> (R0101S, NEB)
2	Buffer de reacción 10X (Buffer 2.1, NEB)	1 µL
1	Agua libre de nucleasas	Volumen para completar 10 µL
5	Condiciones de Reacción	37°C, 2 h
	Inactivación de enzimas	No fue necesario

1. Las digestiones se realizaron mezclando los componentes en el orden indicado en tubos de 600 µL nuevos y estériles. Se realizaron digestiones independientes con cada enzima, y también dobles digestiones mezclando *NdeI* + *HindIII* y *NdeI* + *EcoRI*, respectivamente.

2. Posteriormente se incubaron en las condiciones de reacción y al terminar se colocaron en hielo.

3. Finalmente, a cada tubo se le agregó 2 µL de buffer de carga para DNA 6X (azul de bromofenol 0.25% (m/v), glicerol 60% (v/v)) y se analizó toda la reacción por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8-1.2% (m/v) (Aaij & Borst, 1972).

4. Si no se analizaba en el momento, la reacción se congelaba a -20°C.



**Figura 9.** Esquema representativo del plásmido pALVP que contiene al sistema lvp productor de livepeptina. La cepa bacteriana *E. coli* C41 (DE3)/ pGroEL-GroES/pALVP está transformada con el plásmido pALVP. El mapa de pALVP muestra los sitios de reconocimiento enzimático con los que fue digerido para analizar su identidad: *EcoRI*, *NdeI* y *HindIII*. La expresión de los genes del sistema lvp (SLI0883 o lvp1, SLI0884 o lvp2, SLI0885 o lvp3) está controlada por el promotor *tet* que responde al inductor tetraciclina y anhidrotetraciclina.

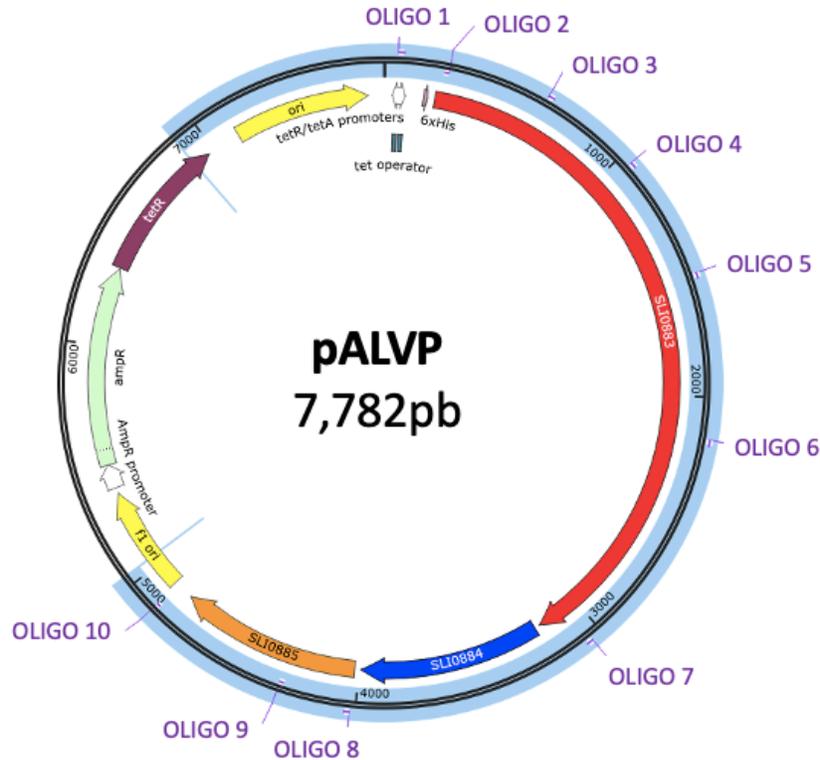


Figura 10. Representación del plásmido bacteriano pALVP que muestra la localización esperada en la secuencia de los oligonucleótidos usados para su secuenciación. Plásmido de expresión inducida con tetraciclina para la expresión del sistema lvp formado por los genes SLI0883 (gen rojo), SLI0884 (gen azul) y SLI0885 (gen naranja) y que produce la livipeptina. En azul se muestra la cobertura de la secuenciación y la ubicación de los oligonucleótidos (OLIGO) usados. La región secuenciada inicia en 6,900 pb y termina en 5,424 pb, se secuenció el 70% del plásmido ((5,424 pb/7,782 pb)\*100%). Los detalles de los oligonucleótidos están en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la secuenciación de pALVP.

Oligo (según Figura 10)	Clave de oligo sintetizado (año)*	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Sitio donde prima	Dirección (sentido o antisentido)
1	9299 (2017)	pASK Fw	GAGTTATTTTACCACTCCCT	57 -> 76	Sentido
2	9263 (2018)	OR_pASK_238-s	CAGTTCCGTGTAGTCGATGC	238 <- 257	Antisentido
3	1738 (2018)	OF_LVP1_1144-s	GTGTCCAGGTCAGCCATTCA	649 -> 668	Sentido
4	9264 (2018)	OF_LVP1_1048-s	CGGAAACGACCATCACTTCG	1048 -> 1067	Sentido
5	7073 (2017)	LVP1 1308fw	AGCTCACTTCCAATCACGGG	1526 -> 1545	Sentido

Oligo (según Figura 10)	Clave de oligo sintetizado (año)*	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Sitio donde prima	Dirección (sentido o antisentido)
6	1741 (2018)	OF_LVP1_2657-s	TCGGACACAAAGGATGCGAA	2163 -> 2182	Sentido
7	1743 (2018)	OF_LVP1_3542-s	CTCGAGACCACCTTTCCAC	3048 -> 3067	Sentido
8	5424 (2017)	LVP3 cDNA fw	TCTCACCAGCACCGATCT	4023 -> 4040	Sentido
9	5425 (2017)	LVP3 cDNA rv271	CATACGTATCTGTGAGGCACTG	4288 <- 4309	Antisentido
10	9300 (2017)	pASK Rv	CGCAGTAGCGGTAAACG	4864 <- 4880	Antisentido

\*Este número es la clave interna asignada por la USSDNA del IBT y que está en su base de datos.

#### 5.1.4 Cultivos bacterianos para la producción de la livipeptina.

Se preparó un pre-inóculo como se indicó en la sección anterior a partir del banco (glicerol en criovial) de la *E. coli* pALVP (que contiene el sistema lvp que produce la livipeptina) y su control, la *E. coli* pASK. Después, se preparó un inóculo agregando 1 mL del pre-inóculo anterior a 30 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina en un matraz de 150 mL y se incubó toda la noche a 37°C a 200 rpm. Para la producción de livipeptina se usó medio M9 suplementado con arginina y fenilalanina para asegurar que los nutrientes no fueran limitantes para su producción. Para preparar un litro de medio M9 suplementado con 0.5 g/L de Arg y 0.5 g/L de Phe, se agregaron los siguientes componentes a un contenedor de 2 L en condiciones asepticas en una campana de flujo laminar: 700 mL de agua ultrafiltrada, 100 mL de sales M9 10X (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 33.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22.0 mM, NaCl 8.55 mM, NH<sub>4</sub>Cl 9.35 mM), 0.5 g de L-Arg, 0.5 g de L-Phe, 20 mL de glucosa al 20%, 2 mL de MgSO<sub>4</sub> 1M. La mezcla se disolvió y se agregaron 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 1M (cuidadosamente, gota por gota para evitar la precipitación de sales, y se aforó a 1 L con agua estéril). El cultivo para producir livipeptina se realizó inoculando 100 mL de cultivo M9 suplementado con Arg y Phe con un volumen suficiente de inóculo (de 30 mL de medio LB con ampicilina) para tener una OD<sub>600nm</sub> de 0.1. Se incubó a 250 rpm a 30°C hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.6, momento en el cual se agregó el inductor anhidrotetraciclina (Sigma, 37919-100MG-R) de 0-200 ng/mL (stock de 0.4 mg/mL disuelto en etanol al 100%). El cultivo se incubó a 200 rpm a 30°C y se cosechó de 18 a 24 h post-inducción. La OD<sub>600 nm</sub> se monitoréó cada hora durante 12 h usando un espectrofotómetro

(Eppendorf, BioSpectrometer). Los datos de la densidad óptica fueron graficados respecto al tiempo para identificar las fases típicas del crecimiento bacteriano, entre ellas la logarítmica, en la que se tomó muestra para el análisis de la expresión de los transgenes de interés. Del cultivo cosechado, la biomasa se separó mediante centrifugación (8,228 x g, 10 min, temperatura ambiente) y el sobrenadante fue congelado (con ayuda de un baño con hielo seco y etanol se forma una capa fina alrededor del recipiente que lo contiene), almacenado por 12 h a -70°C y liofilizado (liofilizadora 4.5, Labconco). El liofilizado se resuspendió en un volumen 10 veces menor (SN 10X). Posteriormente se filtró con una membrana de celulosa con poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (SLG033SB, Merck Millipore), se almacenó en alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  en ultracongelación hasta su análisis. La biomasa fue resuspendida en 250  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40 mM, EDTA-Na 40 mM, sacarosa 20% (m/v), pH 7.4) por cada 0.5  $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ . Posteriormente, se lisó por sonicación (6 ciclos en agua con hielo, con 90% amplitud, 2 min de proceso, 20 s ON, 20 s OFF, equipo QSonica, Sonicators) y se centrifugó a 9,600 x g por 30 min a 10°C. Se separó el sobrenadante o fracción soluble de los restos subcelulares y se almacenó en ultracongelación hasta su análisis. El sobrenadante 10X y la fracción soluble concentrada fueron analizados para identificar la presencia del inhibidor de proteasas mediante un ensayo de evaluación de actividad proteolítica y mediante cromatografía en fase reversa en un sistema HPLC. Del análisis por HPLC, se volvió a correr otra muestra para coleccionar las fracciones de interés, se concentraron con la ayuda de un concentrador por vacío (Savant) y se evaluó su actividad proteolítica.

#### 5.1.5 Ensayo de actividad proteolítica para la detección de livipeptina.

Los sobrenadantes de cultivos, fracciones solubles de pellets de cultivos bacterianos y de células animales, así como las fracciones coleccionadas mediante cromatografía en fase reversa por HPLC, fueron analizados para evaluar la presencia del inhibidor livipeptina, usando dos tipos de proteasas, la tripsina y la papaína como modelos de los tipos serin-proteasa y cisteín-proteasa, respectivamente. El ensayo consistió en preparar reacciones que tuvieran la proteasa (tripsina o papaína), un sustrato que al ser cortado produce una molécula cromófora (BAPNA o Pa $\beta$ NA), la muestra problema y el buffer de reacción. En las Tabla 6 y Tabla 7 se indican los componentes de las reacciones preparadas. Es importante que el sustrato sea el último componente que se agregue a la reacción con ayuda de una pipeta multicanal; se resuspende y se realiza la medición de la

absorbancia o fluorescencia inmediatamente, según corresponda. Las reacciones se prepararon en placas de 96 pozos negras de fondo negro y se leyeron con dos equipos lectores de microplacas. En Langebio se leyó en un lector de microplacas TECAN, M1000, y en el Instituto de Biotecnología en el equipo del GPR FLUOstar Omega de BMG y en Biotek, Synergy H1 (grupo del Dr. Enrique Merino). Las reacciones enzimáticas se siguieron adquiriendo la absorbancia o fluorescencia cada minuto durante 30 min, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron graficados respecto al tiempo y se calculó la velocidad inicial de reacción mediante una regresión lineal usando el software GraphPad Prism® (versión 6.0c). Las velocidades iniciales de reacción fueron comparadas asignando el 100% de actividad a la reacción con enzima y sustrato; 0% de actividad al control sin enzima y con sustrato; y 100% de inhibición a la reacción con enzima, sustrato e inhibidor comercial (leupeptina). Se realizó una curva de inhibición usando las concentraciones de leupeptina y antipaína que se indican en las Tabla 6 y Tabla 7. Los resultados se analizaron estadísticamente usando el software GraphPad Prism® (versión 6.0c) usando la prueba ANOVA de una vía, donde se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p fue  $\leq 0.01$ .

**Tabla 6.** Protocolo para el ensayo de actividad de inhibición de la tripsina (basado en Cruz-Morales et al., 2018).

Orden	Reactivos	Blanco 1: buffer + sustrato	Blanco 2: buffer	Control (-) sin inhibidor	Control (+) con inhibidor conocido (curva)	Muestra problema
1	Buffer Tris-HCl 0.1M pH 8 (T3253, Sigma)	130 $\mu$ L	150 $\mu$ L	110 $\mu$ L	90 $\mu$ L	90 $\mu$ L
2	Tripsina (0.025 mg/ml) (T1426, Sigma)	---	---	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
3	Leupeptina (L2884, Sigma) (0.01 $\mu$ g/mL, 0.02 $\mu$ g/mL, 0.05 $\mu$ g/mL, 0.1 $\mu$ g/mL, and 0.2 $\mu$ g/mL)	---	---	---	20 $\mu$ L por cada concentración por pozo	---
4	Muestra problema	---	---	---	---	20 $\mu$ L
5	BAPNA (N $\alpha$ -Benzoyl-DL- arginine 4-nitroanilide hydrochloride)(sustrato, 0.1 mg/ml) (B4875, Sigma)	20 $\mu$ L	---	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
	Volumen final	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se mezcló en el orden indicado los componentes anteriores en una placa de 96 pozos de fondo claro.</li> <li>2. Se siguió la reacción en un lector de absorbancia adecuado para placas de 96 pozos (FLUOstar Omega, BMG) a 405 nm.</li> </ol>						

**Tabla 7.** Protocolo para el ensayo de actividad de inhibición de la papaína.

Orden	Reactivos	Blanco 1: buffer + sustrato	Blanco 2: buffer	Control (-) sin inhibidor	Control (+) con inhibidor conocido (curva)	Muestra problema
2	Buffer 20x NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 500 mM pH 6 (3818-01, J.T.Baker)	8 µL	8 µL	8 µL	8 µL	8 µL
3	EDTA disódico 60 mM (8993-01, J.K. Baker)	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
4	DTT 100 mM (D5545, Sigma)	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
5	Papaína (0.005 mg/ml) (P4762, Sigma)	---	---	20 µL	20 µL	20 µL
6	Leupeptina (L2884- 5MG, Sigma) o Antipapaína (A6191-5MG, Sigma) (0.01 µg/mL, 0.02 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.1 µg/mL, and 0.2 µg/mL)	---	---	---	20 µL por cada concentración	---
7	Muestra problema	---	---	---	---	20 µL
1	Agua ultrafiltrada	122 µL	142 µL	102 µL	82 µL	102 µL
8*	PABN (fenil-arginil-β- naftalamida) (sustrato, 0.01 mg/ml) (P4157, Sigma)	20 µL	---	20 µL	20 µL	20 µL
	Volumen final	160 µL	160 µL	160 µL	160 µL	160 µL
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se mezcló en el orden indicado los componentes anteriores en una placa de 96 pozos de fondo claro y lados oscuros (para medir fluorescencia).</li> <li>2. Se siguió la reacción en un lector de fluorescencia adecuado para placas de 96 pozos (FLUOstar Omega, BMG o Biotek, Synergy H1) a 340 nm exc. / 402 nm emis..</li> </ol>						

\* Para mejor repetibilidad entre réplicas, se preparó una mezcla de reacción considerando el agua, buffer, EDTA, DTT y papaína, de acuerdo al número total de reacciones a ejecutar en el experimento. Después, se agregó lo correspondiente a cada pozo (100 µL) y se completó con cada componente de acuerdo a la reacción de interés (inhibidor o muestra). El sustrato se preparó de acuerdo al número de reacciones a analizar (de 4 a 10 mL) y se agregó a la placa con una pipeta multicanal. Antes de agregar el sustrato, se preparó el equipo para leer la fluorescencia y su protocolo.

### 5.1.6 Análisis de la expresión de los genes del sistema lvp que producen la livipeptina por RT-PCR punto final a partir de cultivos bacterianos.

Para analizar la expresión de los tres genes del sistema lvp a partir de cultivos bacterianos, es importante usar muestras de cultivo que se encuentren en la etapa logarítmica de la fase de crecimiento, debido al alto nivel de expresión de todos los genes. Para ello, se partió de un cultivo bacteriano con las condiciones necesarias para la producción de la livipeptina que se detalla en el protocolo del punto 5.1.4. Se tomó 500  $\mu$ L de muestra de cultivo y se mezcló con 1000  $\mu$ L de estabilizador de RNA (RNAprotect Bacteria Reagent, Qiagen). Se mezcló con un vórtex por 5 s y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Después, se separó el sobrenadante del pellet por centrifugación a 5,000 x g por 10 min, descartando el sobrenadante y almacenando el pellet para extraer el RNA bacteriano. El pellet se puede almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2 semanas o en ultracongelación por un mes. Posteriormente se realizó la extracción de RNA total siguiendo el protocolo de lisis enzimática con lisozima recomendado por el fabricante (QIAGEN, 2015), junto con el kit de extracción de RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen). La extracción del RNA se realizó de acuerdo a instrucciones del fabricante del kit en una campana de flujo laminar, con material libre de nucleasas y usando RNaseZap™ (AM9780, Invitrogen) para inactivar las nucleasas presentes en cualquier superficie del material. El RNA extraído se muestreó para su cuantificación usando el espectrofotómetro (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), y el análisis de su integridad por electroforesis en gel de agarosa de acuerdo al protocolo de Aranda et al. (2012). Una vez que se confirmó que el RNA estuviera íntegro (dos bandas claras por los RNA ribosomales 23S y 16S) (Doug et al., 2022), se procedió a limpiar las muestras de cualquier rastro de DNA genómico o plasmídico, usando DNasa de acuerdo al protocolo del fabricante (AM1907, Invitrogen). Posteriormente, con este RNA total limpio e íntegro, se sintetizó cDNA mediante retrotranscripción *in vitro* usando el kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (K1631, Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después, la amplificación de los genes lvp1, lvp2 y lvp3 fue realizada por PCR usando como templado el cDNA anterior y oligonucleótidos específicos. La PCR se realizó usando la Taq polimerasa, los dNTPs y el buffer 10X de NEB (M0273L), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en un termociclador (T100, Bio-Rad). Los oligos y las temperaturas de alineamiento están listadas en la Tabla 8. Como control para comprobar la función de la retrotranscriptasa, se amplificó el mRNA de GAPDH usando RNA y

oligonucleótidos del kit. El control de expresión interna o gen endógeno fue una proteína hipotética a partir del cual se diseñaron oligonucleótidos específicos (diseñados por el Dr. Karim Jaen). Las reacciones de la RT-PCR fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (m/v) (BIO-41025, Bioline) en buffer TAE 1X y teñido con HydraGreen™ (ACTGene, USA) de acuerdo a Aaij & Borst (1972). Las imágenes de los geles fueron tomadas con el equipo ChemiDoc™ XRS+ y analizadas con el programa ImageLab 4.1™ (Bio-Rad).

**Tabla 8.** Oligonucleótidos usados para confirmar la expresión de los genes del sistema lvp por PCR punto final.

Gen	Oligonucleótido (número IBT-año)	Secuencia (5'→3')	Tamaño (nt)	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño del amplicón (bp)
<b>lvp1 (SLI0883)</b>	Sentido (7073-2017)	AGCTCACTTCCAATCACGG G	20	56.2	656
	Anti-sentido (7074-2017)	TTCGCATCCTTTGTGTCCGA	20		
<b>lvp2 (SLI0884)</b>	Sentido (6441-2015)	GATATAGCTAGCATGGTCC GAACGCAGGATCGAG	34	60.3	750
	Anti-sentido (6442-2015)	GATATAGAATTCCTCGGTG AGCCGCCT	27		
<b>lvp3 (SLI0885)</b>	Sentido (5424-2017)	TCTCACCAGCACCGATCT	18	52.6	703
	Anti-sentido (5426-2017)	CACCGCGTAGTCGTGCT	17		
<b>GAPDH<sup>1</sup></b>	Sentido (K1631, Thermo Scientific)	CAAGGTCATCCATGACAAC TTTG	23	58.0	496
	Anti-sentido (K1631, Thermo Scientific)	GTCCACCACCTGTTGCTGT AG	22		
<b>Proteína hipotética<sup>2</sup></b>	Sentido (3331-2018)	AGGTAATCGAAATCCCAGG AGC	22	57	281
	Anti-sentido (3332-2018)	ATCTACGTTTAGTTAACGAG GTTAGC	26		
<b>β-actina<sup>3</sup></b>	Sentido (3831-)	AGCTGAGAGGGAAATTGTG CG	21	56.2	100
	Anti-sentido (3832-)	AGGAAGAGGATGCAGCAG TG	20		

<sup>1</sup> Oligonucleótidos usados como control de función de la retro-transcriptasa del kit.

<sup>2</sup> Oligonucleótidos usados para analizar la expresión en muestras de cultivos bacterianos.

<sup>3</sup> Oligonucleótidos usados para analizar la expresión en muestras de células de CHO.

### 5.1.7 Identificación de la livipeptina por cromatografía en fase reversa HPLC.

Las muestras de sobrenadante de cultivos bacterianos se analizaron mediante cromatografía en fase reversa HPLC con la finalidad de identificar a la livipeptina. Las reacciones se filtraron antes de analizarse (filtro del 0.22  $\mu\text{m}$ , Millex-GS, SLG033SB, Merck Millipore). Las condiciones cromatográficas usadas fueron: HPLC con bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos a una temperatura de trabajo de 25°C (Agilent 1200). La separación de los componentes de la muestra se realizó mediante una columna Discovery® HS F5-5, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , 15 cm de largo, 4.6 mm de diámetro interno (567516-U, Supelco). Los parámetros cromatográficos generales fueron: fase A, agua ultrafiltrada y fase B, metanol al 100%; modo de gradiente de 0 a 5 min de 0% a 10% de fase B, modo de gradiente de 5 min a 35 min de 10% a 100% de fase B; luego se cambia a fase A al 100%, manteniéndola durante 10 min. La detección se realizó adquiriendo la absorbancia a 257 nm y 280 nm. Durante la corrida, se colectaron dos fracciones (F-1 de 3.7-4.2 min y F-2 de 4.25-4.8 min), se concentraron en un concentrador de vacío y se resuspendieron en agua ultrafiltrada. Estas fracciones fueron analizadas para evaluar su actividad proteolítica para identificar la presencia del inhibidor usando el método de la sección anterior.

### 5.2 Producción *in vitro* de la livipeptina usando extractos bacterianos con el sistema lvp y extractos de células CHO.

Los aminoacil-tRNAs Leu/Phe-tRNA son usados por el sistema de sintetasa de péptidos no-ribosomal bacteriano (sistema lvp) para la síntesis del péptido no ribosomal livipeptina. Para corroborar que el sistema lvp reconociera los aminoacil-tRNAs eucariotas, se realizó este experimento *in vitro*, en el que se reconstituyó su actividad usando extractos de células de mamífero CHO y de bacterias que expresan el sistema lvp. El ensayo consistió en preparar extractos de *E. coli* pALVP, plásmido de expresión controlada con anhidrotetraciclina que contiene el sistema lvp. Se prepararon cultivos bacterianos de 50 mL con medio Luria-Bertani (triptona 10 g/L (211705, BD), extracto de levadura 5 g/L (212750, BD), NaCl 10 g/L (3624-01, J.T. Baker)) a 37°C, se indujo la expresión del sistema lvp a una OD<sub>600nm</sub> de 0.5 con 20 ng/mL de anhidrotetraciclina (37919, Sigma) para después ser incubado en agitación a 120 rpm a 20°C durante 12 h. Posteriormente, se separó la biomasa por centrifugación a 4,629 x g por 10 min a 4°C y el pellet fue lavado tres veces con buffer S30 (buffer Tris-acetato 10 mM pH 8.2, acetato de magnesio 14 mM (M5661, Sigma),

acetato de potasio 60 mM (291201, J.T. Baker), DTT 1 mM (D5545, Sigma), EDTA 0.3 mM (8993-01, J.K. Baker), cloruro de magnesio 0.3 mM (M8266, Sigma) y centrifugado a 4,629 x g por 10 min a 4°C. El pellet fue resuspendido en 1 mL de buffer S30 por gramo de biomasa húmeda y se lisó por sonicación. El lisado celular fue centrifugado dos veces a 17,949 x g por 45 min a 4°C y el sobrenadante fue dializado cuatro veces contra 50 volúmenes de buffer S30 sin DTT usando tubos para diálisis con corte de 10 kDa (4314483, Corning). Finalmente el extracto celular fue centrifugado a 1699 x g por 10 min, 4°C; el sobrenadante se congeló y almacenó a -80°C para después continuar con el ensayo *in vitro*.

Primero, la degradación de los tRNAs bacterianos fue realizada mediante la siguiente reacción: a 30 µL de la preparación de extractos bacterianos se agregó 0.1 µL de RNAsa (20 mg/mL) (EN0531, ThermoFisher) y CaCl<sub>2</sub> 100 µM (C-7902, Sigma), dejando incubar por 30 min a 37°C, después se inactivó agregando 0.1% (v/v) de DEPC (D5758, Sigma) y se incubó por 2 h a 37°C. Enseguida se tomaron 36 µL del extracto anterior y se incubó con 30 µL de extractos de lisados de células CHO, los cuales contienen tRNAs eucariotas. A esta reacción se le agregaron los siguientes cofactores esenciales para reconstituir la actividad del sistema *lvp*: HEPES 100 mM pH 7.5 (G0750, Sigma), DTT 1 mM (D5545, Sigma), L-lisina 10 mM (M-9171, Sigma), L-leucina 10 mM (M2893, Sigma), L-arginina 10 mM (A-3109, Sigma), L-fenilalanina 10 mM (P5030, Sigma), MgCl<sub>2</sub> 10 mM (M8266, Sigma), KCl 10 mM (P9541, Sigma), ATP 5 mM (A-7699, Sigma) y NADPH 5 mM (10107824001, Merck), en un volumen final de 200 µL. Posteriormente, se incubó por 5 h a 37°C, se centrifugó a 9,600 x g para quitar cualquier precipitado, y el sobrenadante se concentró con un concentrador por vacío (Savant), hasta un volumen de 100 µL aproximadamente y se analizó por cromatografía en fase reversa como en la sección anterior.

### 5.3 Producción de la livipeptina en cultivos de mamífero.

#### 5.3.1 Construcción de plásmidos.

Para lograr la expresión heteróloga de los genes del sistema *lvp* en células animales, se generaron construcciones plasmídicas con cada uno de los transgenes SLI0883, SLI0884 y SLI0885, que codifican para las proteínas LVP1, LVP2 y LVP3, necesarias para la síntesis de la livipeptina (Figura 4). Cada transgen se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos de la Tabla 9 y el protocolo de la Tabla 10, donde el DNA templado fue el plásmido pUC57\_*lvp* (ver anexo, 11.1). Este plásmido

fue donado por el grupo de investigación del Dr. Francisco Barona (Langebio, Cinvestav). El producto de PCR se purificó a partir de banda de su electroforesis en gel de agarosa al 1% (16500500, Invitrogen) usando el kit Invisorb Spin DNA Extraction (1020110200, Invitex). Posteriormente, cada inserto y el vector aceptor pVax1.0 (pVax1) fueron digeridos mediante una doble digestión con *NheI* (R0131S, NEB) y *EcoRI* (R0101S, NEB) de acuerdo con el protocolo de la Tabla 11. Los insertos y el vector fueron ligados mediante el protocolo de la Tabla 12 para dar lugar a tres plásmidos independientes pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 (en conjunto pVax\_LVPs, Figura 11), cada uno conteniendo uno de los genes del sistema *lvp*. El plásmido donde se clonaron los genes de interés del sistema *lvp*, pVax1.0, es un vector de expresión para eucariontes que contiene el promotor del CMV, bajo el cual se clonó cada gen. Éste plásmido está optimizado por contener los elementos genéticos mínimos para poder lograr la expresión del transgen, y además, está aprobado por la FDA como un plásmido seguro para terapia de DNA (Invitrogen, 2012; Zhou et al., 2011).

**Tabla 9.** Oligonucleótidos usados para la amplificación y clonación de los genes del sistema *lvp* en el vector pVax1.0.

Gen a amplificar	Clave IBT (año)	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tamaño (nt)	Producto esperado (pb)	TM en PCR (°C)
LVP1 (SLI0883)	6439 (2015)	Lvp1 <i>NheI</i> Fw (oligo sentido)	GATATAGCTAGCATGGAGC ACGACGGTC	28	2988	56.9
	6440 (2015)	Lvp1 <i>EcoRI</i> Rv (oligo antisentido)	GATATAGAATTCAGGAAG TCGATGGACGTCAGA	34		
LVP2 (SLI0884)	6441 (2015)	Lvp2 <i>NheI</i> fw (oligo sentido)	GATATAGCTAGCATGGTCC GAACGCAGGATCGAG	34	804	53
	6442 (2015)	Lvp2 <i>EcoRI</i> rev (oligo antisentido)	GATATAGAATTCCTCGGTG AGCCGCCT	27		
LVP3 (SLI0885)	6443 (2015)	Lvp3 <i>NheI</i> fw (oligo sentido)	GATATAGCTAGCATGGCTC TCACCAGCACCGA	32	804	53
	6444 (2015)	Lvp3 <i>EcoRI</i> rev (oligo antisentido)	GATATAGAATTCACGGAG TTCTCCTGTGCGGTGG	35		

En rojo se destacan los sitios de restricción enzimática de *NheI* y *EcoRI*, respectivamente.

**Tabla 10.** Protocolo para la amplificación de los genes del sistema lvp por PCR punto final.

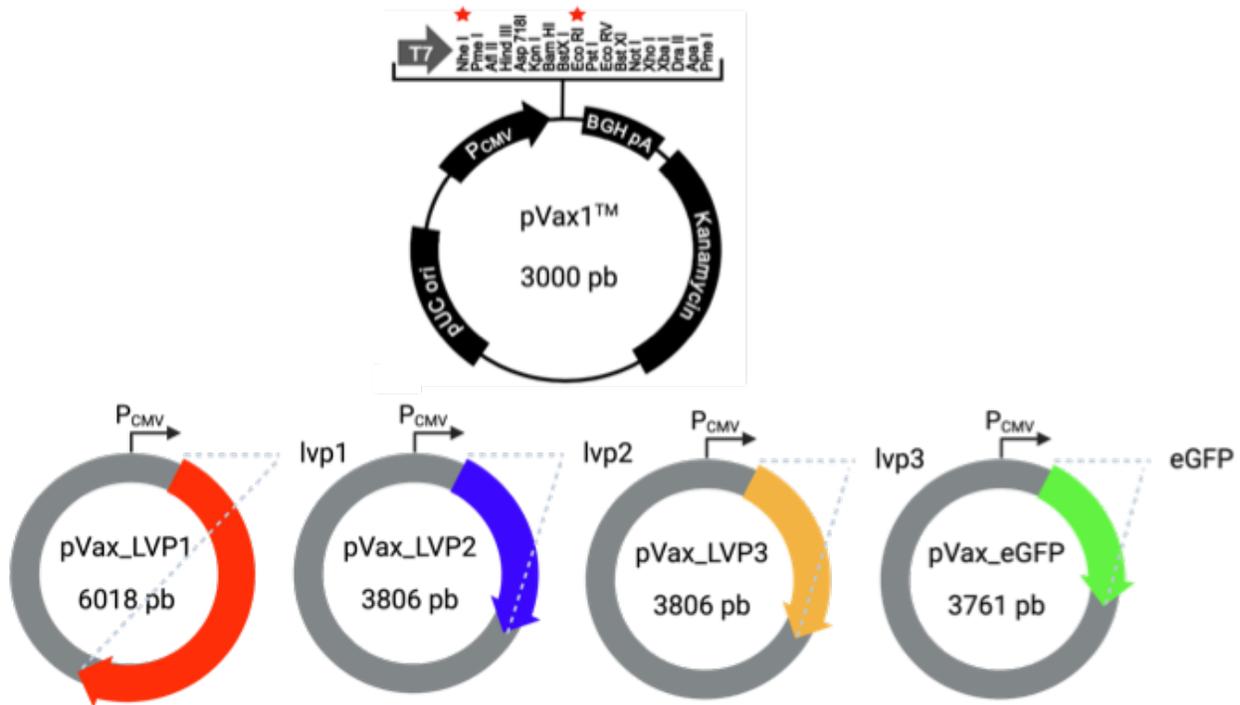
Reactivos	Volumen para una reacción (µL)			
1. Buffer 5X de polimerasa Phusion	4			
2. dNTPs 10 mM	0.4			
3. Oligonucleótido sentido (10 pmol/µL)	1.0			
4. Oligonucleótido antisentido (10 pmol/µL)	1.0			
5. Polimerasa Phusion (2 U/µL, M0530L, NEB)	0.2			
6. DNA templado pUC57_lvp (15 ng/µL)	1.0			
7. Agua grado biología molecular	11.8			
8. Volumen total	20			
	<b>lvp1</b>		<b>lvp2 y lvp3</b>	
Programa de PCR (termociclador Biorad)	(°C)	Tiempo (s)	(°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	98	30	98	30
Desnaturalización	98	10	98	10
Alineamiento	56.9	20	53	20
Extensión	72	90	72	24
Extensión final	72	10 min	72	10 min
Fin	12	∞	12	∞

**Tabla 11.** Protocolo de doble digestión de productos de PCR y vector aceptor pVax1.0.

<b>1. Se preparó la mezcla de reacción</b>	Templado:	250-500 µg de producto de PCR	1-2 µg de vector aceptor (pVax1.0)
	Enzima de restricción (doble digestión simultánea):	<i>NheI</i> (R0131, NEB): 10 unidades <i>EcoRI</i> -HF (R3101S, NEB): 10 unidades	<i>NheI</i> (R0131, NEB): 10 unidades <i>EcoRI</i> -HF (R3101S, NEB): 10 unidades
	Buffer de reacción 10X (NEBuffer™ 2.1)	5 µL	5 µL
	Agua libre de nucleasas:	Volumen para completar 50 µL	Volumen para completar 50 µL
<b>2. Se incubó la reacción</b>	Condiciones de reacción:	37°C por 1 h	37°C por 1 h
<b>3. Se inactivó la enzima de restricción</b>	Condiciones:	65°C por 20 min	65°C por 20 min
<b>4. Se limpió el DNA digerido</b>	Condiciones:	Kit MSB® Spin PCRapace (1020220300, Stratec molecular)	Elución: 30 µL de agua libre de nucleasas, 10 min incubación

**Tabla 12.** Protocolo de ligación de productos de PCR (genes del sistema lvp) digeridos (*NheI/EcoRI*) con el vector de expresión pVax1.0 digerido (*NheI/EcoRI*)

1. Se preparó la mezcla de reacción	Vector linearizado:	50 ng
	Inserto (relación molar inserto:vector linearizado)	3:1, 5:1
	Buffer de ligación 10X	2 $\mu$ L
	T4 DNA ligasa (400 U/ $\mu$ L) (M0202, NEB)	1 $\mu$ L
	Agua libre de nucleasas	Volumen para completar 20 $\mu$ L
2. Se incubó de acuerdo a actividad de la ligasa	Condiciones de reacción	Incubar a temperatura ambiente por 30 min
3. Se inactivó la ligasa	Inactivación de enzima	Incubar a 65°C por 10 min
4. Se mantuvo en hielo y se transformó por choque térmico (detalles en la siguiente sección)		



**Figura 11.** Plásmidos generados a partir del vector pVax1 (plásmido vacío o pVax1.0) y la clonación de los genes *lvp1*, *lvp2* y *lvp3* que forman el sistema lvp productor de la livipeptina. Cada transgen fue clonado usando los sitios *NheI* y *EcoRI* señalados en el esquema del pVax1. Al conjunto de plásmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 se le nombró pVax\_LVPs. El plásmido pVax\_eGFP fue previamente construido por en nuestro grupo de investigación por Mabel Rodríguez (Rodríguez, 2014).

### 5.3.1.1 Generación de bacterias transformadas

Las reacciones de ligación generadas en la Tabla 12 fueron enfriadas en hielo y se usaron 5  $\mu$ L para transformar bacterias competentes. Previamente, se realizó la preparación de bacterias quimio-competentes con base en el método de Inoue et al. (1990). Todo el procedimiento se realizó en una campana con flujo laminar en condiciones de esterilidad siguiendo las siguientes instrucciones: se inocularon 3 mL de medio LB sin antibiótico con una asada de colonia de *E. coli* DH5- $\alpha$  y se incubó en agitación a 37°C toda la noche (12-16 h). Se inocularon 250 mL de medio LB sin antibiótico con 2.5 mL del cultivo anterior en un matraz de 2 L y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.6 - 0.7. Posteriormente, se incubó el cultivo en hielo por 10 min para detener el crecimiento bacteriano. Se centrifugó el cultivo a 2,500 x g por 10 min en refrigeración (4 - 8°C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 75 mL de buffer TB frío y se incubó 10 minutos en hielo. La receta del buffer TB es: PIPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM. Se disolvió todo excepto el MnCl<sub>2</sub>, se ajustó el pH a 6.7 con HCl y se agregó el MnCl<sub>2</sub>, se aforó y se filtró con una membrana de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro). Se centrifugó a 2,500 x g, 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet cuidadosamente en 20 mL de buffer TB frío. Se agregó 1.4 mL de DMSO (7% (v/v) final). Inmediatamente se incubó en hielo 10 minutos ya que el DMSO es un compuesto tóxico para las células a temperatura ambiente. Se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ L, se congelaron en un baño de hielo seco con alcohol y se almacenaron a -70°C.

Posteriormente se realizó la transformación de estas bacterias competentes siguiendo el siguiente protocolo: se descongeló en hielo una alícuota de células quimiocompetentes, en condiciones de esterilidad, se pasaron 100  $\mu$ L de células a un tubo de polipropileno pre-enfriados y se agregaron 5  $\mu$ L de la mezcla de ligación. Se mezcló la suspensión pipeteando un par de veces y se incubó 30 minutos en hielo. Posteriormente se dió un pulso de 45 s a 42°C sin agitación; un mayor tiempo baja la eficiencia. Se dejó en hielo y se agregaron 200  $\mu$ L de medio LB. Se incubó 1 h a 37°C en agitación. Se sembró en medio selectivo (medio LB-agar con kanamicina 50  $\mu$ g/mL) y se incubó a 37°C toda la noche.

### 5.3.1.2 Identificación de las construcciones plasmídicas por electroforesis de DNA en agarosa y secuenciación de DNA.

La búsqueda de clonas bacterianas con la construcción de interés se realizó mediante la amplificación de los genes de interés (lvp1, lvp2 y lvp3) usando la técnica de PCR de colonia. Ésta consistió en tomar una asada del cultivo en placa (células transformadas en sección anterior) y resuspender la biomasa en 200  $\mu$ L de buffer Tris-EDTA (20  $\mu$ L NaCl 10 mM más 180  $\mu$ L Buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA•Na<sub>2</sub> 1mM, pH 8.0)). Posteriormente, se incubó a 95°C por 10 min, se centrifugó a 9,600 x g por 2 min y se tomaron 10  $\mu$ L del sobrenadante para usarlo como templado para el PCR. Después, se realizó el PCR para la amplificación de los genes de interés con los oligonucléotidos de la Tabla 9 y el protocolo de la Tabla 10. Posteriormente, las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% (m/v) (0.8 g de agarosa grado molecular en 100 mL de buffer TAE 1X), se usaron 10  $\mu$ L de la reacción de PCR, se mezcló con 2  $\mu$ L de buffer de carga para DNA 6X (azul de bromofenol 0.25% (m/v), glicerol 60% (v/v)) y se cargó en un pozo del gel. Como control positivo de la electroforesis se cargó un marcador de peso molecular de DNA. Como control positivo de la PCR se usó una reacción con un plásmido pALVP o pUC57\_lvp. El control negativo fue una reacción sin DNA plasmídico. La identificación de los plásmidos también se corroboró por un análisis de digestión enzimática realizado con enzimas específicas y el protocolo de la Tabla 13. Para confirmar su identidad, los plásmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 se secuenciaron usando los oligonucléotidos de la Tabla 14 contemplando cubrir el 100% del gen de interés a ser expresado. Éstos fueron sintetizados por la USSDNA del IBT. La secuenciación se realizó de acuerdo a las instrucciones de la USSDNA a partir de 300 ng de DNA plasmídico. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias teóricas usando el software SnapGene versión 7.1.1.

**Tabla 13.** Protocolo para la identificación de plásmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 mediante la digestión con enzimas de restricción

Orden	Componente	Cantidad, observaciones
3	Templado DNA plasmídico	300 ng
4	Enzimas de restricción	<i>EcoRI</i> (R0101S, NEB) <i>NheI</i> (R3131), NEB) <i>HindIII</i> (R0104S, NEB)
2	Buffer de reacción 10X (Buffer 2.1, NEB)	1 µL
1	Agua libre de nucleasas	Volumen para completar 10 µL
5	Condiciones de Reacción	37°C, 2 h
	Inactivación de enzimas	No fue necesario.

Las digestiones se realizaron mezclando los componentes en el orden indicado en tubos de 600 µL nuevos y estériles. Se realizaron digestiones independientes con cada enzima, y también dobles digestiones mezclando *EcoRI* + *NheI*.

Posteriormente se incubaron en las condiciones de reacción y al terminar se colocaron en hielo.

Finalmente, a cada tubo se le agregaron 2 µL de buffer de carga para DNA 6X (azul de bromofenol 0.25% (m/v), glicerol 60% (v/v)) y se analizó toda la reacción por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8-1.2% (m/v) (Aaij & Borst, 1972).

Si no se analizó en el momento, la reacción se congeló a -20°C.

**Tabla 14.** Oligonucléotidos usados para la identificación de los pVax\_LVPs por secuenciación.

Oligo	Clave de oligo sintetizado (año)*	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Dirección (sentido o antisentido)	Plásmido secuenciado con ese oligo
1	1737 (2018)	OF_pVax_633-s	AGAACCCACTGCTTACTGGC	Sentido	pVax_LVP1 pVax_LVP2 pVax_LVP3
2	1738 (2018)	OF_LVP1_1144-s	GTGTCCAGGTCAGCCATTCA	Sentido	pVax_LVP1
3	1739 (2018)	OR_pVax_1621-s	GGGCAAACAACAGATGGCTG	Antisentido	pVax_LVP1 pVax_LVP2 pVax_LVP3
4	1740 (2018)	OR_LVP1_2350-s	AGGCCCGTACTTTTGAGAGC	Antisentido	pVax_LVP1
5	1741 (2018)	OF_LVP1_2657-s	TCGGACACAAAGGATGCGAA	Sentido	pVax_LVP1
6	1742 (2018)	OR_LVP1_2925-s	GTCGAATGATTCGCGGGTG	Antisentido	pVax_LVP1
7	1743 (2018)	OF_LVP1_3542-s	CTCGAGACCACCTTCCCAC	Sentido	pVax_LVP1

### 5.3.1.3 Amplificación y purificación de plásmidos para la transfección de células CHO

Los plasmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2, pVax\_LVP3, pVax1.0 y pVax\_eGFP fueron producidos en cantidad suficiente para las transfecciones de cultivos de células de mamífero. Primeramente se partió de glicerol que contenían cultivos de *E. coli* transformadas con cada uno de los plásmidos de forma independiente. Se preparó un inóculo en tubos de ensayo con 3 mL de medio LB y una asada de glicerol de la bacteria transformada con un plásmido de interés y kanamicina (50 µg/mL). Se incubó 8 h a 37°C a 250-300 rpm. Este inóculo sirvió para inocular 250 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/mL), en matraces bafleados de 1 L y se incubó de 12-18 h a 37°C a 250 rpm. Los plásmidos se purificaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de purificación de plásmidos (QIAfilter Plasmid Kits 12263, Qiagen). El procedimiento de purificación se realizó en un gabinete de bioseguridad para obtener un plásmido en condiciones de asepsia necesarias para la transfección de células CHO.

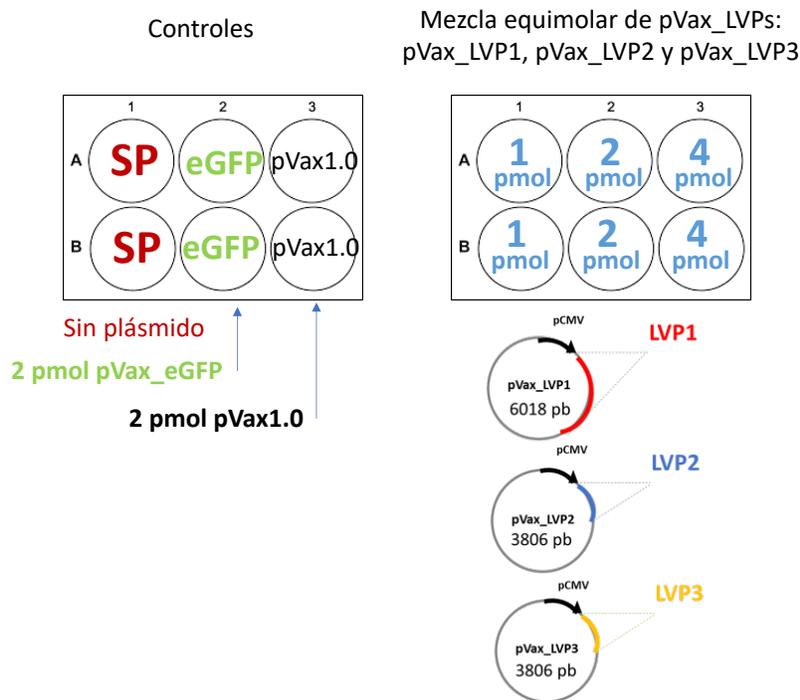
### 5.3.2 Líneas celulares y la expresión heteróloga del sistema lvp en células de mamífero.

#### 5.3.2.1 Células CHO

El efecto de la expresión por células CHO del sistema lvp, que produce la livipeptina, se evaluó mediante su expresión transitoria. La línea celular usada fue la CHO-S, que crece en suspensión. Se realizaron ensayos de transfección con la mezcla equimolar de los plásmidos que contienen los genes del sistema lvp, pVax\_LVPs (Figura 11). Las células fueron mantenidas y amplificadas en cultivo en suspensión en matraces con medio FortiCHO, suplementado con 8 mM de L-glutamina en una atmósfera al 8% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Los ensayos de transfección se hicieron sembrando 1 millón de células CHO por pozo en placas de 6 pozos para cultivo celular (Corning™, 3506) y se incubaron sin agitación por 6 h en una incubadora con atmósfera al 8% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Mientras tanto, se realizaron mezclas de los plásmidos con la lipofectamina LTX de acuerdo con las instrucciones del fabricante (15338-100, Invitrogen) usando las cantidades de plásmido mostradas en la Tabla 15. Se prepararon mezclas equimolares de los plásmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 de 1 pmol (0.33 pmol de cada uno), 2 pmol (0.66 pmol de cada uno) y 4 pmol (1.3 pmol de cada uno). Como control de expresión, se realizó la transfección independiente de 2 pmol del plásmido vacío pVax1.0 y 2 pmol del plásmido reportero pVax\_eGFP (ver Figura 12).

Las reacciones de transfección se incubaron a temperatura ambiente por 15 min para permitir la formación del complejo de ADN plasmídico-lipofectamina y se agregó por goteo a cada pozo según

correspondiera. Las células transfectadas se incubaron a 37°C en una atmósfera al 8% de CO<sub>2</sub>, sin agitación. 48 h después se observó su morfología celular, se cuantificaron las células fluorescentes para determinar la eficiencia de transfección, se cosecharon por pipeteo (micropipeta de 1000 µL) y se midió la viabilidad usando la técnica de exclusión del azul de tripano (azul de tripano al 20% v/v, cámara de Neubauer (717810, Brand)). Se separó el sobrenadante de la biomasa mediante centrifugación a 956 x g por 10 min y se almacenaron a -70°C para el posterior análisis de actividad inhibitoria de proteasas, cromatografía en fase reversa por HPLC, SDS-PAGE y RT-PCR punto final.



**Figura 12. Diseño experimental para la evaluación de la expresión del sistema lvp por co-transfecciones con lipofectamina en células de mamífero.** Las células CHO fueron sembradas en placas de seis pozos y fueron transfectadas con los plásmidos controles pVax1.0 (vacío) o con pVax\_eGFP (expresa la eGFP), así como con las mezclas equimolares de los tres plásmidos independientes que contienen los genes del sistema lvp pVax\_LVPs: pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3.

**Tabla 15.** Cantidad de plásmido usado para la expresión del sistema lvp en células CHO.

Plásmido	Gen expresado	Tamaño (pb)	1	2	6	0.33	0.66	1.33	2
			pmol† (µg)						
						1 pmol	2 pmol	4 pmol	6 pmol
pVax1.0	Vacío	2999	2	4	12	-	-	-	-
pVax_eGFP	eGFP	3761	2.5	5	15	-	-	-	-
pVax_LVP1	lvp1 (SLI0883)	6018		-		1.3	2.6	5.3	7.9
pVax_LVP2	lvp2 (SLI0884)	3806		-		0.8	1.7	3.3	5
pVax_LVP3	lvp3 (SLI0885)	3806		-		0.8	1.7	3.3	5

†Se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g DNA} = \text{pmol DNA} \left( \frac{660 \text{ pg}}{\text{pmol}} \right) \left( \frac{1 \mu\text{g}}{10^6 \text{ pg}} \right) N$$

N es el tamaño del plásmido y la relación 660 pg/pmol es el promedio de la masa molecular de un par de nucleótidos.

### 5.3.2.2 Expresión transitoria del sistema lvp en células de mamífero CHO que expresan establemente a la hSeAP.

La evaluación de la co-producción de la livipeptina con un modelo de proteína recombinante se realizó en una línea celular CHO que expresa de forma estable la fosfatasa alcalina humana sérica de forma secretada (hSeAP). La co-producción del sistema lvp se evaluó en placas de 6 pozos, en las cuales se sembraron 750,000 células CHO-hSeAP por pozo y se transfectaron por lipofección usando la metodología descrita para la transfección de CHO en la sección anterior. Se evaluó 1 pmol y 2 pmol de la mezcla equimolar de los plásmidos que contienen el sistema lvp usando las cantidades de la Tabla 15. También se evaluaron los controles de transfección usando el plásmido vacío pVax1.0 y el plásmido reportero pVax\_eGFP; sin plásmido (solo con lipofectamina) y sin tratamiento. Las células transfectadas se incubaron a 37°C en una atmósfera al 8% de CO<sub>2</sub>, sin agitación. Las células se cosecharon a las 48 h pos-transfección, se observó su morfología celular, se cuantificaron las células fluorescentes para determinar la eficiencia de transfección, y se midió la viabilidad usando la técnica de exclusión del azul de tripano (azul de tripano al 20% v/v, cámara de Neubauer (717810, Brand). Se separó el sobrenadante de la biomasa mediante centrifugación

a 956 x g por 10 min, los cuales fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis de actividad inhibitoria de proteasas, cromatografía en fase reversa (HPLC), SDS-PAGE y RT-PCR punto final. La hSeAP fue cuantificada a partir del sobrenadante como se describe en el siguiente apartado.

Por otra parte, la evaluación de la expresión del sistema lvp se evaluó también después de 48 h post-transfección usando el lípido catiónico FreeStyle™ (16447-100, Gibco), las mismas condiciones de transfección que el experimento anterior e incubando las placas de 6 pozos en agitación. El protocolo que se siguió fue de acuerdo al fabricante y a la Tabla 16.

**Tabla 16.** Protocolo para las reacciones de transfección de células CHO-hSeAP

Etapa	Componente	Control sin plásmido	Control plásmido vacío	Control plásmido reportero	Muestra problema
Un día antes se preparó un cultivo con $0.5-0.6 \times 10^6$ células/mL	Células en suspensión	$1 \times 10^6$ células/mL en 10 mL	$1 \times 10^6$ células/mL en 10 mL	$1 \times 10^6$ células/mL en 10 mL	$1 \times 10^6$ células/mL
Dilución de DNA plasmídico	Medio Opti-MEM® (31985-070, Gibco)	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
	Plásmido	--	1 y 2 pmol pVax1.0	2 pmol pVax_eGFP	1 y 2 pmol de mezcla equimolar de pVax_LVP1, pVax_LVP2 y pVax_LVP3
Dilución lipofectamina en tubos independientes por condición (no hacer mix de reacción)	Medio Opti-PRO® SFM (12309-050)	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
	FreeStyle™ (16447-100, Gibco)	12.5 $\mu\text{L}$	12.5 $\mu\text{L}$	12.5 $\mu\text{L}$	12.5 $\mu\text{L}$
Se mezclaron las soluciones y se incubaron por 25 min a temperatura ambiente	Total DNA diluido (con el reactivo PLUS™)	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
	Total de FreeStyle® diluída	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
	Volumen del complejo	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$

### 5.3.2.3 Expresión transitoria del sistema lvp en células de mamífero CHO que expresan establemente a un anticuerpo monoclonal de tipo IgG.

La evaluación de la coproducción de la livipeptina con otro modelo de proteína recombinante se realizó en una línea celular CHO que expresa de forma estable un anticuerpo monoclonal de tipo IgG (CHO-MAb). La clona celular fue proporcionada en abril de 2021 por el IBT Edgar A. García (Aseguramiento de Calidad de GPR). La identidad de la clona es confidencial, es material en colaboración con la empresa Liomont y no es una clona superproductora. La coproducción del sistema lvp se evaluó en matraces de 50 mL, partiendo de una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL de células CHO-MAb por matraz con un volumen de trabajo de 15 y 20 mL usando medio libre de suero (FBS) (CD FortiCHO™, Thermo Fisher). Se transfectaron por lipofección usando la metodología descrita en la Tabla 17. En este experimento se evaluaron 12.5 µg de DNA plasmídico (6 pmol) para el plásmido vacío pVax1.0, para el reportero pVax\_eGFP y la mezcla equimolar de pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 (pVax\_LVPs, 2 pmol de cada uno). También se evaluó un control sin plásmido (SP) y un control de inhibición de proteasas al que se le agregó leupeptina esteril (L2884, Sigma; se resuspendió en agua y luego se filtró con filtros de 0.22 µm de diámetro de poro) cada 24 h. Las células transfectadas se incubaron a 37°C en una atmósfera al 8% de CO<sub>2</sub> a 130 rpm. Las células se monitorearon cada 24 h, cuantificando las células fluorescentes para determinar la eficiencia de transfección, la concentración de células totales, la viabilidad y la concentración de células viables como se detalla en la sección 5.3.3. Se tomó muestra de 500 µL cada 24 h y el sobrenadante se separó de la biomasa mediante centrifugación a 956 x g por 10 min. El material se almacenó a -80°C para su posterior análisis de actividad inhibitoria de proteasas, cromatografía de fase reversa (HPLC), SDS-PAGE y RT-PCR punto final. El MAb producido fue cuantificado y analizado como se describe en los apartados 5.3.6 y 5.3.7.

**Tabla 17.** Protocolo para las reacciones de transfección de células CHO-MAB

Etapa	Componente	Control sin plásmido	Control plásmido vacío	Control plásmido reportero	Muestra problema
Un día antes se preparó un cultivo con $0.5-0.6 \times 10^6$ células/mL	Células en suspensión	$1 \times 10^6$ células/mL en 10 mL	$1 \times 10^6$ células/mL en 10 mL	$1 \times 10^6$ células/mL en 10 mL	$1 \times 10^6$ células/mL
Dilución de DNA plasmídico	Medio Opti-MEM® (31985-070, Gibco)	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
	Plásmido <sup>1</sup>	--	6 pmol pVax1.0	6 pmol pVax_eGFP	6 pmol mezcla equimolar de pVax_LVP1, pVax_LVP2 y pVax_LVP3
Dilución lipofectamina en tubos independientes por condición (no hacer mix de reacción)	Medio libre de suero Opti-PRO™ SFM (12309-050, Gibco)	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
	FreeStyle™ (16447-100, Gibco)	12.5 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L
Se mezclaron las soluciones y se incubaron 25 min a temperatura ambiente	Total DNA diluido (con el reactivo PLUS™)	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
	Total de FreeStyle® diluida	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
	Volumen del complejo	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L

<sup>1</sup> Las equivalencias en  $\mu$ g se muestran en la Tabla 15.

### 5.3.3 Cuantificación de concentración celular, viabilidad celular y eficiencia de transfección.

La cuantificación de la concentración celular se realizó para subcultivar y mantener las células CHO así como para la ejecución y evaluación de los diferentes experimentos de expresión transitoria del sistema lvp en células CHO, CHO-hSeAP y CHO-MAB. Para ello, se tomó una alícuota de 20 a 100  $\mu$ L del cultivo resuspendido y se analizó en el equipo de conteo celular (Coulter Counter Multisizer 3, Beckman Coulter) de acuerdo al principio de Coulter (Rhyner et al., 2024). Primero, se preparó una dilución de la muestra con isotón 1X filtrado en una cubeta especial del equipo y

se midió directamente en el equipo. El equipo mostró un histograma con la población de las partículas que contó respecto a su tamaño en  $\mu\text{m}$ . Con el cursor, se seleccionó el intervalo más prevalente y se presionó la opción "STAT" para obtener los datos sobre número y tamaño de partícula. El número total de partículas o células totales se obtiene mediante la siguiente ecuación:

*Concentración de células totales:*

$$X \text{ (células/mL)} = (\text{número de partículas detectadas}) \times (10,000)$$

Nota: Se multiplica por 10,000 por ser el factor de dilución al preparar la muestra en un volumen final de 10 mL.

El equipo contador Cell Coulter Counter no discrimina entre células muertas y vivas, por lo que la viabilidad se cuantificó mediante la técnica de exclusión del colorante azul de tripano (MilliporeSigma, 2024). Primero, se preparó una dilución de la muestra con una solución de azul de tripano al 0.4% (v/v) en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mM, pH 7.4) y ésta se cargó en una cámara de Neubauer (717810, Brand). Después, la cámara con la muestra se observó bajo el microscopio óptico. Se contaron las células observadas por cada cuadrante (4 cuadrantes en cada cuadrícula de la cámara), donde las células teñidas de azul son células muertas y las claras están viables. La viabilidad y el número de células viables por mL se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Células viables}}{\text{Células viables} + \text{Células muertas}} \times 100$$

*Concentración de células viables:*

$$Xv \text{ (célula/mL)} = (\text{Células totales por mL}) \times (\text{Viabilidad})$$

La eficiencia de transfección se calculó a partir de células transfectadas con el plásmido que expresa en células de mamífero la proteína reportera eGFP, pVax\_eGFP. Se tomó una muestra de cultivo transfectado con pVax\_eGFP y se cargaron 20  $\mu\text{L}$  aprox. directamente en un porta-objetos y se cubrió con un cubre-objetos. La muestra preparada se colocó en el microscopio invertido (TE 300, Nikon y accesorios con lámpara de fluorescencia) y se enfocó la muestra en campo claro para luego encender la lámpara de fluorescencia, colocar el filtro para observar luz verde y observar. Se tomaron cinco fotografías de cada condición, en campo claro y campo oscuro. Las células se contaron visualmente para calcular la eficiencia de transfección con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de transfección (\%)} = \frac{\text{células verdes en campo oscuro}}{\text{células en campo claro}} \times 100$$

Nota: No se usó la cámara de Neubauer para el cálculo de la eficiencia de transfección debido a que era complicado visualizar las células verdes al estar trabajando con un microscopio invertido. El grosor de la cámara filtraba la luz del laser dificultando ver las células fluorescentes. La morfología celular se observó en el mismo microscopio y se tomaron fotos. El tamaño de las células fue analizado con el software ImageJ versión 1.53.

Finalmente, para evaluar el efecto de la expresión del sistema *lvp* en la concentración de células totales, células viables, viabilidad y eficiencia de transfección, se graficó cada variable en función del tiempo de cultivo.

#### 5.3.4 Análisis de la expresión de los genes del sistema *lvp* por RT-PCR punto final en células CHO transfectadas.

El análisis de la expresión transitoria de los genes del sistema *lvp* se realizó a partir de pellets de células CHO, CHO-hSeAP y CHO-Mab de los experimentos descritos en las secciones 5.3.2.1, 5.3.2.2 y 5.3.2.3. Los pellets se mantuvieron en ultracongelación. Después, el RNA total se extrajo de acuerdo las instrucciones del kit de extracción de RNeasy Mini Kit (Qiagen, 2019) en una campana de flujo laminar, con material libre de nucleasas y usando RNaseZap™ (AM9780, Invitrogen) para inactivar las nucleasas presentes en cualquier superficie del material. El RNA extraído se muestreó para su cuantificación usando el espectrofotómetro (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), y el análisis de su integridad por electroforesis en gel de agarosa de acuerdo a Aranda et al. (2012). Una vez que se confirmó que el RNA estuviera íntegro (dos bandas claras por los RNA ribosomales 23S y 16S), se procedió a limpiar las muestras de cualquier rastro de DNA genómico o plasmídico, usando DNase de acuerdo al protocolo del fabricante (AM1907, Invitrogen). Posteriormente, con este RNA total limpio e íntegro, se sintetizó cDNA mediante retro-transcripción *in vitro* usando el kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (K1631, Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después, la amplificación de los genes *lvp1*, *lvp2* y *lvp3* fue realizada por PCR usando como templado el cDNA anterior y oligonucleótidos específicos. La PCR se realizó usando la Taq polimerasa, los dNTPs y el buffer 10X de NEB (M0273L), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y en un termociclador (T100, Bio-

Rad). Los oligonucleótidos y las temperaturas de alineamiento están listadas en la Tabla 8. Los controles positivos fueron reacciones usando como DNA templado a los plásmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 o pVax\_LVP3, así como el pUC57\_LVP. Como control para comprobar la función de la retrotranscriptasa, se usó el material para amplificar a GAPDH (RNA y oligonucleótidos). El control de expresión interna o gen endógeno fue el gen de  $\beta$ -actina, para el cuál se diseñaron oligonucleótidos específicos (diseñados por la Dra. Dubhe Bulté). Las reacciones de la RT-PCR fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (m/v) (BIO-41025, Bionline) en buffer TAE 1X y teñido con HydraGreen™ (ACTGene, USA) de acuerdo a Aaij & Borst (1972). Las imágenes de los gels fueron tomadas con el equipo ChemiDoc™ XRS+ y analizadas con el programa ImageLab 4.1™ (Bio-Rad).

### 5.3.5 Identificación de la livipeptina por UPLC acoplado a masas.

Los sobrenadantes y las fracciones solubles de pellets de ensayos de transfección con el sistema lvp fueron analizados por cromatografía líquida de ultra alto desempeño (UPLC) en fase reversa acoplado a masas para la identificación de la livipeptina de forma extracelular e intracelular (respectivamente). La fracción soluble de pellet se obtuvo de una muestra de cultivo separando el sobrenadante del pellet mediante centrifugación. El pellet fue disuelto en 100  $\mu$ L de buffer de lisis ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40 mM, EDTA-Na 40 mM, sacarosa al 20% (m/v), pH 7.4) y lisado mediante sonicación en un baño de agua fría (6 ciclos con 90% de amplitud. 2 min de proceso, 20 s on, 20 s off, QSonica, Sonicators). Posteriormente, la suspensión se centrifugó 30 min a 9,600 x g en una centrifuga refrigerada, separando la fracción soluble (sobrenadante) de la insoluble. Cada muestra de fracción soluble se preparó con 5% (v/v) de acetonitrilo y 0.1% (v/v) de ácido fórmico para precipitar todas las proteínas. Luego se centrifugaron a 9,600 x g durante 10 min. Las muestras se analizaron en un equipo UPLC acoplado a un detector de masas (Waters) usando la columna Acquity UPLC peptide BEH C18, 300 Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm X 100 mm (Waters). El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L y el método de fase reversa fue isocrático con 97% (v/v) de ácido fórmico y 3% (v/v) de acetonitrilo.

### 5.3.6 Cuantificación de las proteínas recombinantes hSeAP y MAb.

El método de cuantificación de la hSeAP al ser una fosfatasa, consistió en evaluar la cinética de aparición del producto p-nitrofenol (PNP) que se genera como resultado de la hidrólisis del sustrato p-nitrofenol fosfato (PNPP). La metodología usada está reportada en Bulté et al., (2020). Previo al ensayo enzimático, se realizó una curva de concentración estándar de PNP determinando su absorbancia a 405 nm mediante el lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG). La hSeAP se cuantificó preparando cada reacción con 100  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción (dietanolamina 1 M,  $\text{MgCl}_2$  0.5 mM, pH 9.8), 20  $\mu\text{L}$  del sustrato PNPP 120 mM y 100  $\mu\text{L}$  de muestra de sobrenadante. Las reacciones se cargaron en una placa de 96 pozos añadiendo al final el sustrato e inmediatamente se leyó la absorbancia a 405 nm en intervalos de 5 s durante un minuto. La concentración de la hSeAP se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[hSEAP] = (m1)(m2)(factor\ de\ conversi3n)(Vol.\ por\ pozo)(fracci3n\ de\ muestra)(diluci3n)$$

$$[hSEAP] = \left(\frac{A_{405\ nm}}{min}\right) \left(0.192 \frac{mmol\ PNP}{L\ A_{405\ nm}}\right) \left(\frac{1000\ \mu mol\ PNP}{1\ mmol\ PNP}\right) (0.00022\ L) \left(\frac{1}{0.1\ mL}\right) (diluci3n)$$

Donde m1 es la pendiente de regresión de la reacción enzimática y m2 es la pendiente de la curva estándar del PNP.

El resultado de la ecuación anterior queda con las siguientes unidades:

$$[hSEAP] = \frac{\mu mol\ PNP}{mL\ min}$$

Si se considera que por cada mol de PNPP se genera un mol de PNP, y que por definición 1 unidad internacional (UI) de hSeAP hidroliza a 1  $\mu\text{mol}$  PNPP/min a pH 9.8 a 37°C, se puede asumir lo siguiente:

$$[hSEAP] = \frac{UI}{mL}$$

Posteriormente para obtener la producción volumétrica o concentración de la enzima en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se consideró que 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hSeAP es igual a 0.73 UI/mL (Davis et al., 1992). La producción específica ( $q_{hSeAP}$ ,  $\text{pg}/[\text{cell}\cdot\text{h}]$ ) se calculó dividiendo la concentración de la proteína recombinante entre el área bajo la curva de la cinética hasta las 144 h de cultivo.

Respecto al anticuerpo monoclonal (MAb, anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG1), también se cuantificó a partir de sobrenadantes de cultivos de células que lo producían de forma estable

(CHO-MAb). El MAb se cuantificó mediante cromatografía de afinidad en HPLC con una bomba cuaternaria acoplada a un detector de arreglo de diodos (Alliance, Waters) usando una columna de proteína A MAbPac™ (4 x 35 mm, Thermo Scientific™). Las fases móviles para llevar a cabo la separación del MAb fueron: fase A o tampón de equilibrio (buffer de fosfato de sodio 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5) y fase B o tampón de elución (buffer de fosfato de sodio 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 2.5). El flujo fue de 1 mL/min, la temperatura de la columna fue de 25°C y el volumen de inyección fue de 50 µL. La cuantificación o producción volumétrica (mg/mL) se realizó interpolando el resultado de cada muestra en una curva de calibración que previamente se corrió en el HPLC bajo las mismas condiciones cromatográficas con 2, 4, 6, 8 y 10 µg de un anticuerpo monoclonal de referencia interno de tipo IgG. Este análisis se realizó usando el software *Empower*. Los resultados se graficaron en función del tiempo de cultivo. La producción específica del MAb (qMAb, pg/[célula·h]) se calculó dividiendo la concentración de la proteína recombinante sobre el área bajo la curva de la cinética de crecimiento hasta las 168 h de cultivo.

### 5.3.7 Análisis del MAb por electroforesis capilar.

El MAb se purificó por cromatografía de afinidad preparativa a partir de los sobrenadantes de cultivo. Para ello se usó la resina de proteína A KANEKA KanCapATM (D55, PALL), se equilibró con 10 volúmenes de columna de buffer de equilibrio (PBS con NaCl 0.3 M), se incubó con muestras durante 2 h a temperatura ambiente con agitación y se empacó en una columna preparativa. Posteriormente, la columna se lavó con 10 volúmenes de buffer de equilibrio y luego se eluyó con buffer de elución (glicina 0.1 M, pH 3.0). El pH de las eluciones se neutralizó inmediatamente con buffer de neutralización (Tris-base 1.0 M, pH 9.0) para evitar la degradación del MAb. Las muestras de MAb purificadas se concentraron a 0.1 mg/mL utilizando concentradores con una membrana de corte de 10 kDa (431483, Corning) y se analizaron mediante electroforesis capilar en condiciones no reductoras desnaturizantes en gel-SDS (A10663, Sciex). El área relativa de cada especie se calculó como porcentaje del área total determinada por el software (*Empower*™ 3). Se graficaron los valores del área relativa respecto a la condición de cultivo.

### 5.3.8 Cuantificación de proteína total.

La cantidad de proteína total en muestras de pellet y de sobrenadante se cuantificó usando el método de Bradford (Bradford, 1976) en una placa de 96 pozos (9017, Costar). Se preparó una mezcla de reacción de acuerdo al número de muestras totales de interés y una curva de concentración usando como referencia a la albúmina bovina sérica (BSA). Las muestras problema y las muestras de la curva de concentración se prepararon por triplicado considerando el protocolo que se observa en la siguiente tabla:

**Tabla 18.** Protocolo para la cuantificación de proteína total por el método de Bradford.

<ol style="list-style-type: none"> <li>Se consideró el número total de las muestras a analizar y el número de puntos de la curva de concentración de BSA por triplicado.</li> <li>Se preparó una mezcla de reacción del reactivo de Bradford en agua considerando el volumen por reacción que se indica abajo multiplicado por el número total de muestras a leer más una reacción extra. Se preparó una curva de concentración de BSA como se indica abajo a partir de una solución de 210 µg/mL de BSA.</li> </ol>					
Reactivo	Volumen por reacción/pozo (µL)		Curva de concentración de BSA (µg/mL)	Volumen de stock BSA 210 µg/mL (µL)	Volumen de agua para 10 µL (µL)
1. Reactivo de Bradford	40		0.5	0.5	9.5
2. Agua grado milliQ	160		1	1	9
3. Muestra problema o solución con BSA (curva de concentración)	10		2	2	8
			4	4	6
			8	8	12
<ol style="list-style-type: none"> <li>Se agregó el reactivo de Bradford (100 uL) a cada pozo y adicionar la muestra o bien el punto de la curva de concentración de BSA que se preparó como en el punto anterior.</li> <li>Se agregó la muestra al reactivo de Bradford, homogenizar e incubar de 3 a 5 min a temperatura ambiente.</li> <li>Se leyó la absorbancia a 595 nm usando un lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMG).</li> <li>Se graficaron los puntos de absorbancia a 595 nm respecto a la concentración de BSA de la curva de concentración. Se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y el valor de <math>R^2</math>, el cual debió ser cercano a 1.</li> <li>Se calculó la concentración de proteína estimada en cada muestra mediante la interpolación de los datos de absorbancia obtenidos por el lector de microplacas (valor de y) en la ecuación de la línea recta de la curva de concentración (<math>y=mx+b</math>, donde x es el valor de interés, la concentración de la proteína; y, es el valor obtenido de absorbancia, m es el valor de pendiente de la recta y b es el punto de intersección en el eje de las ordenadas).</li> </ol>					

### 5.3.9 Inmunoensayos para la detección de la proteína recombinante y análisis densitométricos: identificación de fragmentos de la hSeAP y MAb.

La detección de la hSeAP y el MAb fue realizada por Western blot a partir de sobrenadantes de cultivos de CHO-hSeAP y CHO-MAb, respectivamente, en diferentes condiciones, con el objetivo de evaluar la prevención de la proteólisis debida a la expresión del sistema lvp.

Primeramente se cuantificó la proteína total de las muestras como se indica en 5.3.8. Después, las muestras de sobrenadante se concentraron mediante la precipitación de proteínas con acetona (grado reactivo) agregando un volumen igual al de la muestra. Los sobrenadantes de los cultivos de CHO-hSeAP se resuspendieron en buffer de muestra Laemmli 5X (Laemmli, 1970) y se hirvieron durante 7 minutos a 99°C. Los sobrenadantes de los cultivos de CHO-MAb se resuspendieron en buffer de muestra nativo 4X (SDS al 8% (m/v), azul de bromofenol al 0.4% (m/v) y glicerol al 40% (v/v)) y se hirvieron durante 7 minutos a 99°C. Las proteínas de CHO-hSeAP se separaron en geles de SDS-PAGE al 10% por duplicado, y las proteínas de CHO-MAb en geles de SDS-PAGE al 8% a 60 mA por duplicado. Uno de los geles se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-250 (B0149, Sigma) de acuerdo a Brunelle & Green (2014). El otro gel se procesó para el análisis de Western blot como se describe a continuación. Las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de PVDF (membrana de PVDF Immobilon®-P, IPVH304F0, Millipore) utilizando un sistema de electrotransferencia húmeda (Bio-Rad). Para detectar a la hSeAP, se usó como anticuerpo primario una solución 1:500 en PBS-Tween (PBS al 0.1% (v/v) de Tween 20 (M147-1L, Amresco) del anticuerpo monoclonal PLAP de ratón anti-fosfatasa alcalina (SC-271431, Santa Cruz) y como anticuerpo secundario una solución de 1:5,000 en PBS-Tween de un IgG-HRP anti-ratón. Para la detección del MAb, se utilizó una solución 1:20,000 en PBS-Tween del IgG-HRP antihumano de cabra (109-035-003, Jackson). Las imágenes de gel, las membranas transferidas y los análisis densitométricos se realizaron en un sistema ChemiDoc™ XRS+ con el software ImageLab 4.1™ (Bio-Rad). La abundancia relativa de las bandas de proteínas o el análisis densitométrico de hSeAP, MAb y sus fragmentos se calcularon en términos de porcentaje para cada carril y se graficaron en función del tiempo de cultivo o de la condición de cultivo. No se utilizó ninguna proteína de control interno para los Western blots de sobrenadantes de cultivos, ya que no hay ninguna proteína celular adecuada que permanezca en una concentración constante entre condiciones.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Expresión del sistema *lvp* en *E. coli*

Previamente, el grupo del Dr. Francisco Barona descubrió la ruta biosintética en *Streptomyces lividans* 66, que expresa tres genes que codifican para el sistema de NRPS (sistema *lvp*) que produce el dipéptido livipeptina (Figura 4) (Aguilar et al., 2023). También lograron la expresión del sistema *lvp* y producir la livipeptina en cultivos de *E. coli* (Figura 6). Para ello, sintetizaron la secuencia genética del sistema *lvp* teniendo en cuenta el uso de codones en *E. coli* (servicio de *Genescript*), y lo clonaron en un plásmido produciendo el plásmido pALVP o pLVP (Figura 9). Este es un plásmido de expresión génica inducida con tetraciclina basada en el represor Tet (regulación tet) en *E. coli*. Ellos generaron bacterias transformadas con este plásmido, que se cultivaron en condiciones particulares para la producción del inhibidor de proteasas de interés, la livipeptina (Cruz-Morales et al., 2018). Nos compartieron las cepas bacterianas, plásmidos e información valiosa y fundamental para el desarrollo de este proyecto.

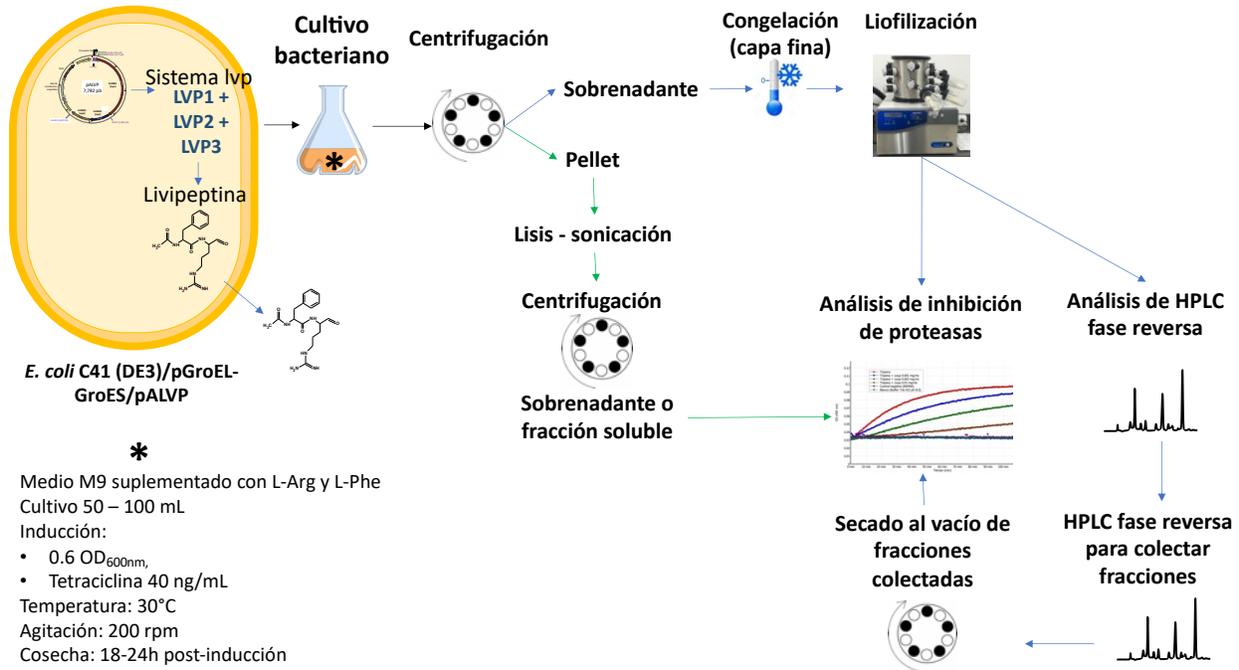
La producción de la livipeptina en bacterias (Figura 13) supuso retos importantes. Primeramente, nos enfrentamos a la dificultad de lograr producirla, y luego de identificarla.

#### 6.1.1 Primer reto para producir a la livipeptina en *E. coli*: importancia del promotor que controla la expresión del sistema *lvp*.

Al principio, no logramos producir la livipeptina debido a que la cepa con la que estábamos trabajando contaba con un plásmido con el promotor *tet* mutado. Primero, al realizar el proceso de producción de acuerdo a nuestros colaboradores (Cruz-Morales et al., 2018) descrito en la Figura 6, encontramos que no se producía el inhibidor de proteasas (Figura 14 a), no había expresión de los tres genes del sistema *lvp* (Figura 14 b) a pesar de que el plásmido pALVP si correspondía al teórico de acuerdo a su perfil de digestión enzimática (Figura 14 c) y secuenciación del sistema *lvp*.

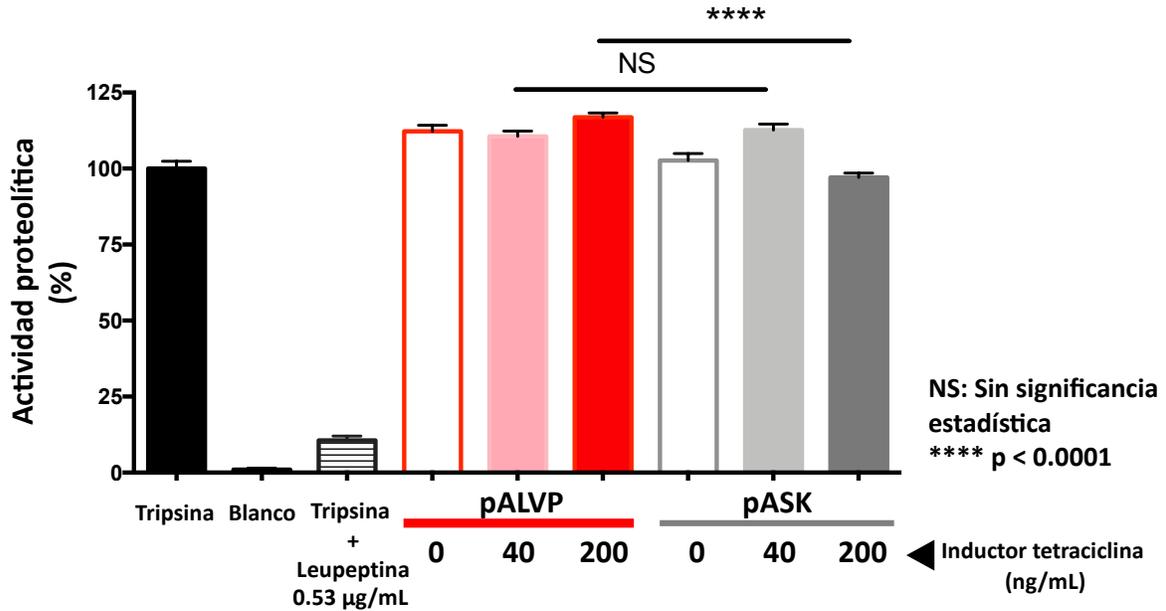
Después de varios intentos donde nos aseguramos que cada variable del proceso fuera la adecuada de acuerdo a nuestros colaboradores, encontramos que la secuencia del promotor *tet* estaba incompleta, particularmente con una delección en el operador 2 (Figura 15). La falta del operador 2 (*tetO*<sub>2</sub>, Figura 15) del promotor *tet*, afecta tanto la unión del represor *TetR* (presente en el plásmido pALVP, Figura 9) como la unión del complejo para la iniciación de la transcripción de los

genes, particularmente la unión del factor  $\delta$  de la RNA polimerasa evitando la transcripción (Bertram & Hillen, 2008; Bolintineanu et al., 2014). Después de este hallazgo, nuestros colaboradores nos donaron otro banco bacteriano y nos aseguramos de estar trabajando con la cepa que tuviera el plásmido completo mediante secuenciación de Sanger. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

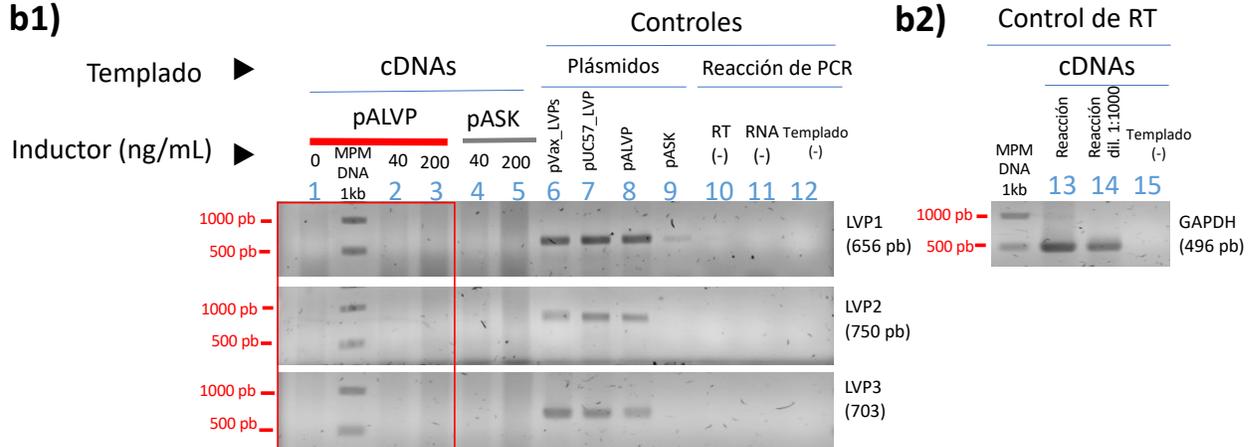


**Figura 13. Metodología para la producción e identificación de la livipeptina mediante la expresión heteróloga del sistema LVP en cultivos bacterianos.** Esquema general para producir la livipeptina que inicia al cultivar la cepa bacteriana con el plásmido pALVP que contiene el sistema lvp bajo las condiciones que se indican (\*). Simultáneamente se cultivó la cepa control con el plásmido pASK que no contiene el sistema lvp. Una vez cosechado el cultivo se separó el sobrenadante del pellet. El sobrenadante se congeló en forma de capa fina para aumentar su superficie de contacto y luego se liofilizó. El liofilizado fue analizado para evaluar la presencia de la molécula que inhibe a papaína o tripsina y por HPLC. El cromatograma arrojado en el análisis de HPLC se analiza para conocer los picos distintos respecto al cultivo con el plásmido control pASK. Se volvió a correr otro análisis de HPLC para coleccionar las fracciones de interés, se secaron con la ayuda de un savant y se analizó su capacidad de inhibir tripsina o papaína. Respecto al pellet, éste se resuspendió en un buffer (ver métodos 5.1.4) y se lisó por sonicación. Después se separó la fracción soluble de la insoluble. Finalmente se analizó la presencia del inhibidor en la fracción soluble con el ensayo de inhibición de proteasas.

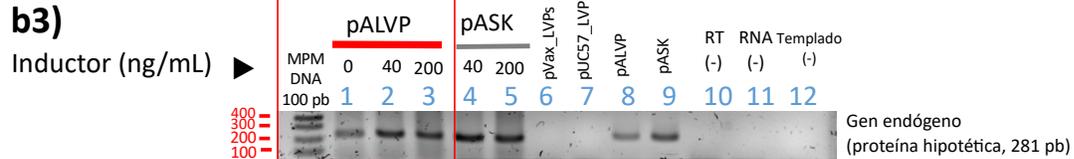
a)



b1)

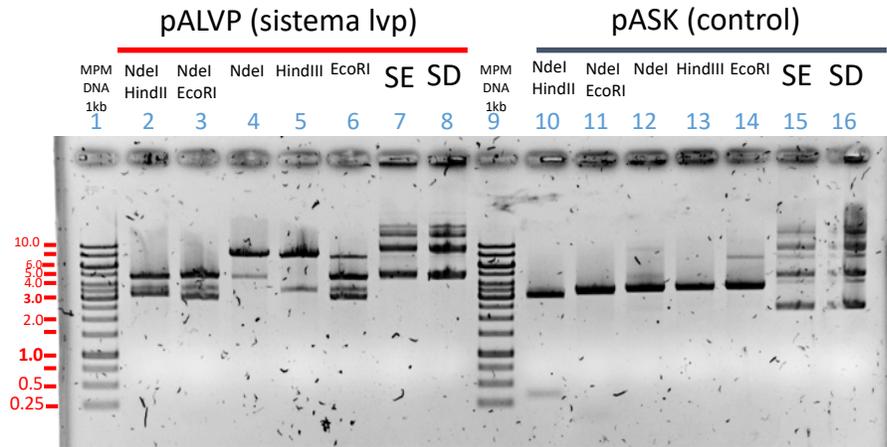


b3)



MPM: Marcador de peso molecular. RT (-): Sin retrotranscriptasa. RNA (-): Sin RNA. Templado (-): Sin templado. RT: retrotranscriptasa.

c1)



SE: Sin enzima. SD: Sin digerir. MPM: Marcador de peso molecular. kb: kilobase

c2)

Enzimas	pALVP (sistema lvp)		pASK (control)	
	Bandas esperadas (kb)	¿Se observa banda en el gel? (comparado con MPM)	Bandas esperadas (kb)	¿Se observa banda en el gel? (comparado con MPM)
<i>NdeI/HindII:</i>	4.590 3.192	Si (entre 4-5 kb) Si (entre 3-4 kb)	3.191 0.353	Si (entre 3-4 kb) Si (entre 0.25-0.5 kb)
<i>Nde/EcoRI:</i>	4.720 2.967 95 pb	Si (entre 4-5 kb) Si (entre 3-4 kb) No detectable	3.449 95 pb	Si (entre 3-4 kb) Ligeramente (menor a 0.25 kb)
<i>NdeI</i>	7.782 (lineal)	Si (entre 8-6kb)	3.544 (lineal)	Si (entre 3-4 kb)
<i>HindIII</i>	7.782 (lineal)	Si (entre 8-6kb)	3.544 (lineal)	Si (entre 3-4 kb)
<i>EcoRI</i>	4.720 3.062	Si (entre 4-5 kb) Si (entre 3-4 kb)	3.544 (lineal)	Si (entre 3-4 kb)

Figura 14. Los sobrenadantes de un cultivo particular de *E. coli* pALVP no contienen el inhibidor de tripsina, no hay expresión del sistema lvp aun cuando pALVP cumple con el patrón de digestión esperado. a) Ensayo *in vitro* de la actividad de proteasas donde la adición de sobrenadantes de cultivos inducidos con tetraciclina no produce una molécula que disminuya o inhiba la actividad proteolítica de la tripsina en comparación con el control sin inductor y sin el sistema lvp (pASK, vector control que no contiene el sistema lvp). b1) PCR de punto final donde las cepas de *E. coli* pALVP inducidos con tetraciclina, no expresan los genes del sistema lvp (*lvp1*, *lvp2* y *lvp3*). Se comprobó la validéz de este resultado con los siguientes controles: b2) Control positivo que demuestra que la retrotranscriptasa usada en el experimento es funcional. Se usó RNA total de una de las muestras experimentales, oligonucleótidos aleatorios para la síntesis del cDNA, y para el PCR, oligonucleóticos específicos para amplificar al gen GAPDH; b3) Control positivo de expresión de un gen endógeno que comprueba la presencia de un gen hipotético expresado en las muestras. c1) Patrón de digestión enzimática de los plásmidos bacterianos pALVP que contiene el sistema lvp, y su control, pASK, que muestran bandas de DNA de igual peso molecular al esperado que se explica en c2. c2) Tabla comparativa del tamaño de las bandas de DNA generadas por la digestión de cada plásmido. Se muestra que las bandas esperadas después del corte con cada enzima(s) de restricción si se observaron experimentalmente (gel de agarosa en c1).

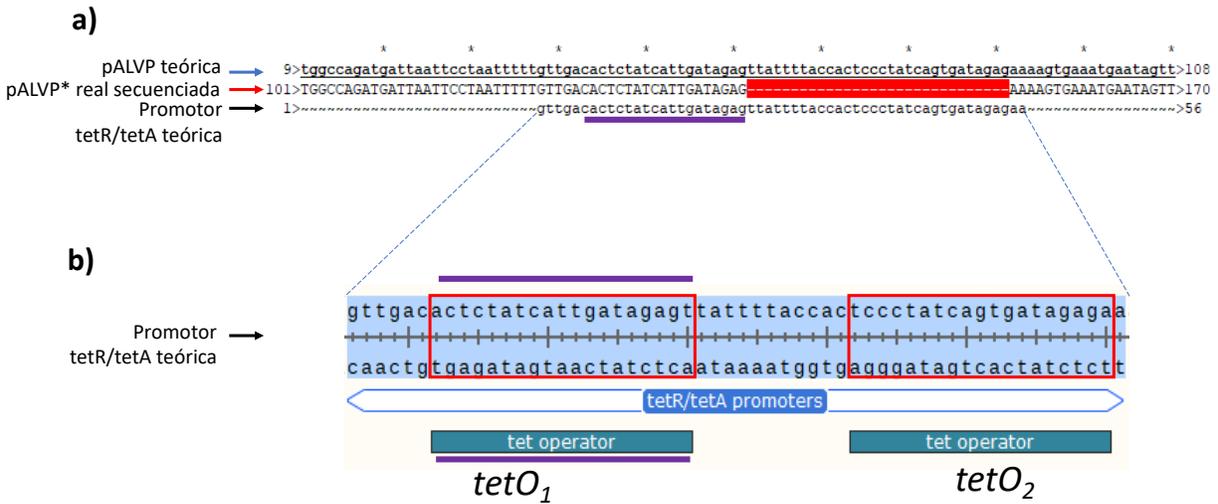
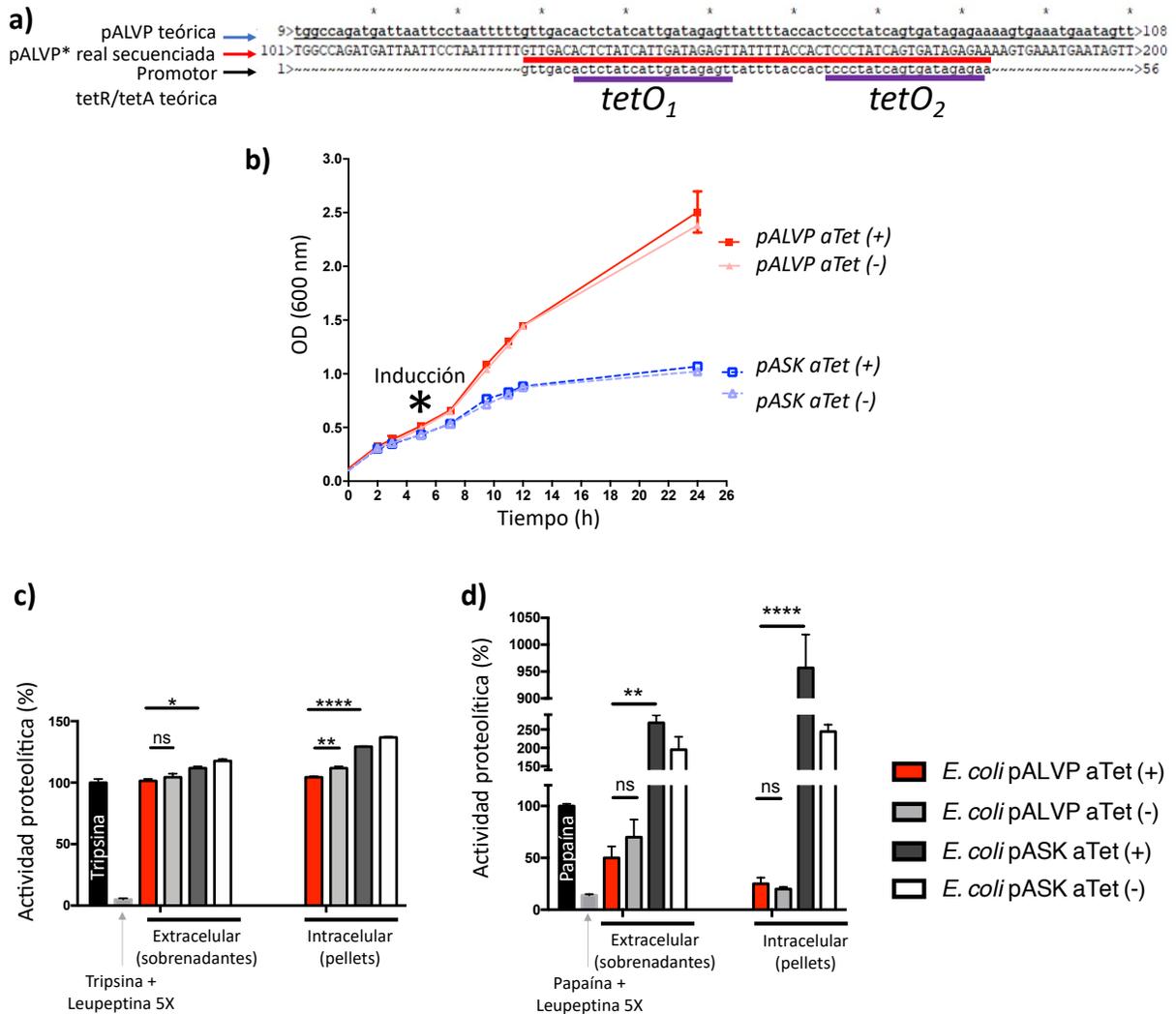


Figura 15. El plásmido pALVP del cultivo que no produce el inhibidor de proteasas tiene una **deleción en su secuencia**. a) Alineamiento múltiple de la secuencia teórica del plásmido pALVP (pALVP teórica), la secuencia real de la cepa cultivada que no expresa los transgenes ni produce la livipeptina como se muestra en la Figura 14 (pALVP\* real secuenciada) y la secuencia teórica del promotor tet (Promotor tetR/tetA) (Bertram & Hillen, 2008). En rojo y con guiones está indicada la región que falta del promotor. b) Magnificación de la secuencia teórica del promotor tet donde se observa a detalle su secuencia completa. La línea subraya la secuencia del operador *tetO<sub>1</sub>* como referencia.

### 6.1.2 Segundo reto: Identificamos al inhibidor de proteasas pero es poco estable.

Comenzamos a trabajar con otro banco bacteriano asegurándonos que la cepa tuviera el plásmido completo y pudimos detectar la presencia de una molécula que inhibe la actividad de papaína (Figura 16 a y d).

Al monitorear el crecimiento celular de estos cultivos pudimos observar que la expresión del sistema *lvp* no afecta de forma negativa al crecimiento de la bacteria (Figura 16 b). Al contrario, la cepa con el sistema *lvp* (pALVP) creció 2.5 veces más que la cepa control (pASK) sugiriendo que se favorece su crecimiento o bien el plásmido control pASK afecta negativamente al crecimiento celular. El cultivo de una cepa sin el plásmido pALVP ni pASK, podría darnos más información sobre el efecto de la expresión de los genes presentes en estos plásmidos.



**Figura 16.** La expresión heteróloga del sistema pALVP en *E. coli* no afecta negativamente el crecimiento celular y produce una molécula que inhibe la actividad de proteasas independientemente de la presencia del inductor. a) Alineamiento múltiple de la secuencia teórica del plásmido pALVP (pALVP teórica), la secuencia real de la cepa cultivada en b) (pALVP\* real secuenciada) y la secuencia teórica del promotor tet (Promotor tetR/tetA). En rojo se indica la secuencia completa del promotor tetR/tetA presente en una cepa con la que se trabajó y en morado se indican los operadores *tetO*<sub>1</sub> y *tetO*<sub>2</sub>. b) Cinética de crecimiento de *E. coli* pALVP y el plásmido control, pASK, inducidas con anhidrotetraciclina (aTet (+)) y sus controles sin inducción (aTet (-)). El cultivo se indujo a una OD<sub>600nm</sub> de 0.6 con anhidrotetraciclina. c) Actividad enzimática de la tripsina al agregar sobrenadantes (extracelular) o fracción soluble del pellet (intracelular) de los cultivos en b). d) Actividad enzimática de la papaína al agregar sobrenadantes (extracelular) o fracción soluble del pellet (intracelular) de los cultivos en b). Las barras de error corresponden a la diferencia entre dos valores para b), y a la desviación estándar, N=3 para c) y d). \*\*\*\*: p < 0.0001. ns: no significancia estadística. Para ambos ensayos enzimáticos se agregó leupeptina 5X (0.05 µg/mL) como control de inhibición.

**Tabla 19.** Actividad proteolítica extracelular e intracelular en cultivos de *E. coli* inducidos con anhidrotetraciclina representados en Figura 16 d.

	Actividad proteolítica	
	Intracelular o pellet (%)	Extracelular o sobrenadante (%)
<i>E. coli</i> pASK (control)	957	268
<i>E. coli</i> pALVP (sistema lvp)	25	50
<b>Disminución (control vs pALVP)</b>	<b>Número de veces: 38.3</b>	<b>Número de veces: 5.4</b>

Es notable ver que el inductor anhidrotetraciclina no tiene efecto alguno en el crecimiento, e inclusive detectamos la presencia del inhibidor de proteasas en los cultivos no inducidos (Figura 16 d, comparar cultivos inducidos (aTet +) vs no inducidos (aTet -)). Este resultado sugiere que no se está controlando la expresión del sistema lvp. No indagamos sobre la causa de la falta de control del sistema *tet* en la expresión de los genes de interés. La falta de control por el represor en el sistema *tet* es inusual, ya que el represor tiene alta afinidad por el promotor *tet* (Bertram & Hillen, 2008). Este resultado podría sugerir que el represor no está funcionando. Sin embargo, se requieren más pruebas para confirmarlo, tales como medir los niveles de expresión del represor o ensayos de interacción proteína-promotor para determinar su expresión y/o determinar si se está uniendo a su promotor, respectivamente, pero esta investigación no está dentro del alcance de este trabajo.

Por otra parte, también pudimos observar la presencia del inhibidor de proteasas tanto extracelular, en los sobrenadantes, como intracelular, en la fracción soluble del pellet. La disminución de la actividad proteolítica en cultivos de la cepa productora de livepeptina (*E. coli* pALVP) respecto a la cepa control (*E. coli* pASK), usando a la tripsina como modelo fue modesta, comparada con la disminución observada usando a la papaína como modelo (Figura 16 c vs d). Este resultado indica que la livepeptina puede inhibir mejor a la papaína que a la tripsina, lo cual

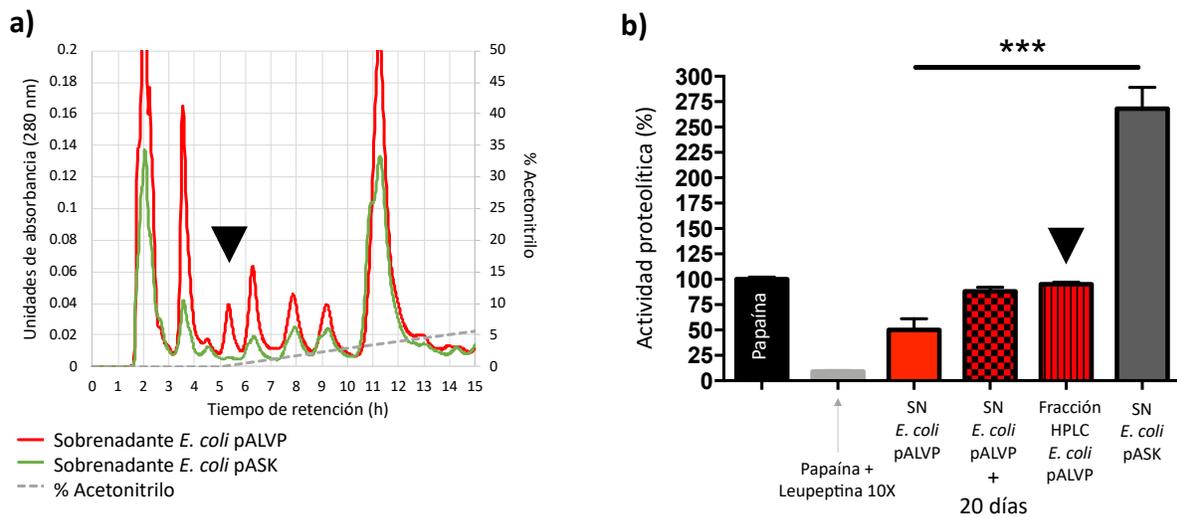
concuera con lo encontrado para la thiolstatina (thiolstatin, misma estructura molecular que la livipeptina) por Murao et al., (1985), donde encuentran una menor  $ID_{50}$  con la papaína respecto a la tripsina (0.84  $\mu\text{g}$  vs 3.8  $\mu\text{g}$ , respectivamente). Por lo anterior, este método enzimático que usa a la papaína como modelo para evaluar la presencia del inhibidor livipeptina, se convirtió en el método principal para detectarlo durante todos los experimentos posteriores.

Respecto a la actividad proteolítica de las cepas productoras de la livipeptina, esperábamos encontrar mayor inhibición en el sobrenadante que en el espacio intracelular (fracción soluble del pellet) como consecuencia de su posible acumulación en el espacio extracelular después de 18-24 h de cultivo. Sin embargo, observamos una mayor disminución de la actividad proteolítica en el contenido intracelular (Figura 16 d, comparación indicada (con \*) en extracelular vs intracelular). La actividad proteolítica en el contenido intracelular fue 38.3 veces menor, mientras que la extracelular 5.4 veces, comparando la cepa control (pASK) respecto a la productora de livipeptina (pALVP) (Tabla 19). Este resultado podría indicar que hay una mayor concentración del inhibidor en el interior celular que en el sobrenadante al final del cultivo, lo cual además sugiere que el inhibidor se esté degradando en el sobrenadante o bien pueda ser internalizado en caso de que sea permeable a la membrana, como lo es la leupeptina (Haspel et al., 2011).

Algo relevante que notamos sobre la livipeptina producida en *E. coli* es que es poco estable, al igual que la leupeptina, lo cual esperábamos al ser estructuralmente similares (Figura 5). Después de 20 días de almacenamiento en congelación su actividad de inhibición se perdía (Figura 17 b). Además, aunque identificamos por HPLC una fracción diferencial respecto al cultivo control (Figura 17 a), que presuntamente podría ser la livipeptina, al ser colectada y procesada, perdía su actividad de inhibición (Figura 17 b). De acuerdo con la experiencia de nuestros colaboradores en Langebio y lo que pudimos notar experimentalmente, la livipeptina podría ser poco estable. Esto concuerda con lo reportado para la leupeptina, ya que soluciones de 10-100  $\mu\text{M}$  son estables por pocas horas, una solución de 10 mM por una semana en refrigeración (4°C), y la misma, un mes en congelación (-20 °C) (Sigma-Aldrich, 2022; Ulab360, n.d.). Al igual que la leupeptina, la razón de la baja estabilidad de la livipeptina podría ser por la tendencia a cambiar su conformación estructural activa del grupo L-argininal, a la inactiva D-argininal (Sigma-Aldrich, 2022; Hamao Umezawa, 1973), la cual pudiera aumentar con la temperatura (Ali et al., 2007). Por lo anterior, se tomaron medidas

lógicas para evitarlo tales como trabajar con muestras recientes de cultivos, procesarlas rápidamente y en hielo. Sin embargo, es necesario reconocer que se presentaron dificultades técnicas que contribuyeron a la pérdida de su actividad tales como:

- Almacenamiento de muestras de sobrenadante a una temperatura mayor que ultracongelación, oscilando entre 10 °C y -70 °C.
- Ciclos de congelación y descongelación de las muestras de los sobrenadantes de los cultivos.
- Tiempos extendidos de operación como el secado al vacío que además se llevó a cabo a una temperatura > 28°C aproximadamente.



**Figura 17. Pérdida de la actividad de inhibición presente en el sobrenadante del cultivo bacteriano que produce el inhibidor de proteasas después de 20 días y después de haber sido analizado por cromatografía en fase reversa por HPLC.** a) Cromatograma del análisis por cromatografía en fase reversa por HPLC del sobrenadante del cultivo de *E. coli* productora del sistema lvp (*E. coli* pALVP) respecto al cultivo de la cepa control *E. coli* pASK. La flecha señala la fracción colectada únicamente presente en la cepa con el sistema lvp pALVP. b) Ensayo de actividad de la papaína al agregar sobrenadantes de cultivo para producir la livipeptina o la fracción colectada en a). Pérdida de la actividad de inhibición de la papaína al analizar el sobrenadante que si tenía actividad de inhibición (barra roja vs barra cuadriculada). La fracción colectada tampoco inhibe la actividad de la papaína (flecha).

### 6.1.3 Conclusiones parciales al trabajar con la expresión de *lvp* en *E. coli* para producir la livipeptina.

La expresión heteróloga del sistema *lvp* en *E. coli* con las cepas donadas por el grupo de Langebio, ayudó a confirmar la producción del inhibidor de proteasas. Los cultivos para producir a la livipeptina fueron útiles para el desarrollo de metodologías analíticas para identificar a la fracción que se ha reportado como livipeptina (HPLC fase reversa) así como para analizar la inhibición de la papaína (cisteín-proteasa). Nosotros no encontramos actividad de inhibición contra tripsina (serin-proteasa).

La mayor inhibición de la actividad se encontró de forma intracelular, en la fracción soluble del pellet de los cultivos de la cepa productora (*E. coli* pALVP), aunque es posible que la livipeptina presente en el sobrenadante se haya degradado o inclusive internalizado. Sin embargo, se necesitan más pruebas para asegurarlo.

La livipeptina se encontró tanto en cultivos con el inductor anhidrotetraciclina como en su ausencia, por lo que sugiere que el sistema de represión *tet* no está controlando la expresión a nivel del represor *TetR*. No se investigó más sobre la causa. Como cualquier función de un promotor de expresión genético, la secuencia completa del promotor *tet* es vital para expresar los genes del sistema *lvp* y producir la livipeptina.

Confirmamos la poca estabilidad de la livipeptina. Para poder identificar al inhibidor de papaína fue importante que el procesamiento de la muestra fuera continuo o con el menor tiempo de almacenamiento (-70°C).

Finalmente, aprendimos que trabajar con un proyecto en colaboración con otros investigadores requiere de comunicación clara, honesta y respetuosa de ambos lados. Es relevante analizar el material que se transfiere de una entidad a otra mediante varias técnicas analíticas que aseguren las características de interés.

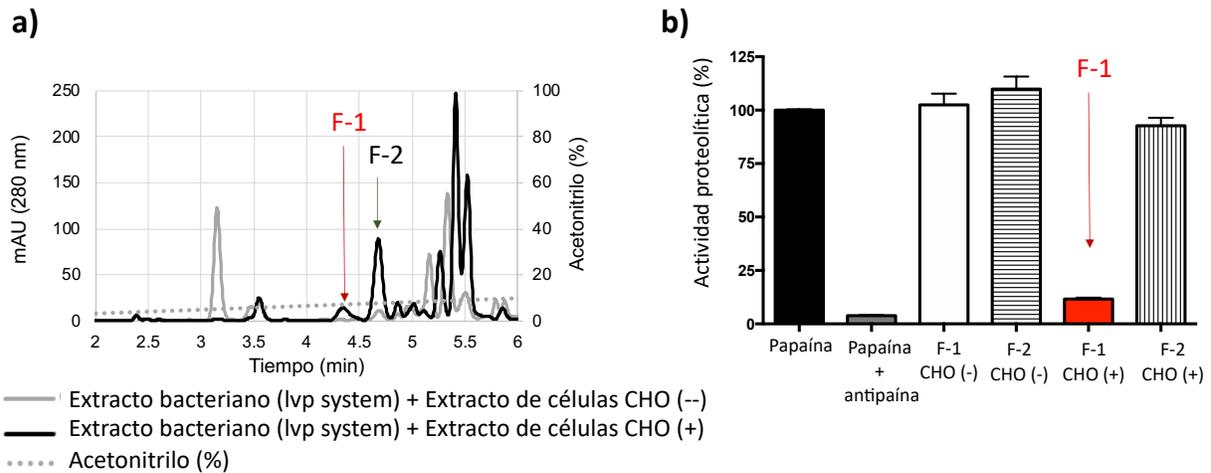
## 6.2 Capacidad del sistema *lvp* de incluir tRNAs eucariotas para producir la livipeptina: experimentos *in vitro*

El sistema *lvp* que produce la livipeptina de interés está compuesto por la sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) LVP1, la transferasa de Leu/Phe LVP2 y la acetilasa LVP3 (Figura 4). La producción de la livipeptina requiere de precursores como tRNAs. LVP2 reconoce Leu/Phe tRNAs para transferirlos a la arginina que se encuentra unida a LVP1. LVP2 es una enzima que utiliza tRNAs (tRUE, por sus siglas en inglés "tRNA-utilizing enzyme") que pertenece a la familia de las leucil/fenilalanil transferasa (Aguilar et al., 2023).

La posibilidad de que el sistema *lvp* bacteriano no reconozca tRNAs eucariotas es posible a pesar de su alta similitud estructural comparado con los bacterianos y altamente conservados en todos los reinos (Katz et al., 2016). Sabemos que la expresión nativa del sistema *lvp* se da en cultivos de *Streptomyces lividans* y de forma heteróloga, ya se probó su función en cultivos de *Escherichia coli* (Cruz-Morales et al., 2018). La expresión heteróloga de otro tipo de NRPS se ha explorado poco (Müller et al., 2012; Siewers et al., 2009) y hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se trata de producir un péptido no ribosomal en células CHO (Guadarrama-Pérez et al., 2024). No obstante, se especula que el dominio de reconocimiento de aminoácidos de las NRPS (dominio de adenilación) y el de aminoacil-tRNA sintetasa de eucariotas superiores son homólogos (Tiburzi et al., 2007). Al ser potencialmente similares, es posible que LVP2 de origen bacteriano expresado en una célula eucariota pueda reconocer a los tRNAs eucariotas. Por lo anterior, antes de evaluar su expresión heteróloga en células CHO, quisimos averiguar experimentalmente la capacidad del sistema *lvp* bacteriano para utilizar tRNAs eucariotas.

Para contestar la pregunta ¿el sistema podrá producir la livipeptina usando aminoacil-tRNAs eucarióticos de células CHO?, realizamos un ensayo *in vitro* que consistió en producir la livipeptina a partir de extractos bacterianos que contenían el sistema *lvp* sin tRNAs, adicionando extractos de células CHO. Se usó la metodología establecida por los colaboradores de Langebio. Para ello, se generaron extractos de bacterias *E. coli* que expresan cada componente del sistema *lvp*, a los cuales se eliminó los tRNA bacterianos mediante incubación con RNasa. Posteriormente, la RNasa se inactivó con 0.1% de DEPC y se incubó con extractos de células CHO, que contienen tRNAs eucariotas. La incubación se hizo agregando cofactores esenciales para reconstituir la actividad del

sistema lvp, tales como aminoácidos (L-Leu, L-Lis, L-Arg, L-Phe), cofactores ( $MgCl_2$ , KCl), moléculas con poder reductor como (ATP, NADPH, DTT) y una temperatura de  $37^\circ C$  (detalles en sección 5.2). El producto de esta reacción se analizó por HPLC en fase reversa obteniendo el cromatograma presentado en la Figura 18a, y se colectaron las dos fracciones señaladas (F-1 y F-2). La fracción F-1 del extracto de células CHO que expresa el sistema lvp inhibió el 90.8% de la actividad de la papaína ( $102.5\% \pm 5.3$  vs  $11.7\% \pm 0.6$ , F-1 CHO (-) vs F-1 CHO (+), respectivamente), de forma similar al control positivo con antipapaína (Figura 18 b, papaína + antipapaína). Este resultado sugiere que el sistema bacteriano lvp puede utilizar tRNAs eucariotas para producir livipeptina. Hasta donde sabemos, este es el primer caso registrado de síntesis de péptidos bacterianos no ribosomales utilizando tRNA eucariotas.



**Figura 18.** El sistema lvp bacteriano produce una molécula inhibidora de papaína usando tRNAs eucariotas de las células CHO. Análisis del experimento *in vitro* donde se incubaron extractos bacterianos con el sistema lvp más extractos de células CHO. Los tRNAs del extracto bacteriano fueron eliminados previamente mediante una incubación con RNAsa. a) Análisis por HPLC de fase reversa de extractos bacterianos que expresan el sistema lvp con extractos de células CHO (línea negra) y sin extractos de células CHO (línea gris). Las fracciones colectadas del análisis de HPLC (F-1 y F-2) se colectaron y se analizaron mediante un ensayo de actividad de proteasa. b) Ensayo de actividad de inhibición de la papaína. La fracción uno con extracto de células CHO (barra roja, F-1 CHO (+)) inhibe la actividad de la papaína. La antipapaína se usó como control de inhibición de la papaína (barra gris, Papaína + antipapaína). Las barras de error corresponden a desviaciones estándar. N = 3.

### 6.2.1 Conclusión sobre la producción *in vitro* de la livipeptina a partir de extractos bacterianos con el sistema lvp y extractos de células CHO

El sistema lvp bacteriano es capaz de reconocer aminoacil-tRNAs de células CHO para generar su producto que tiene actividad de inhibición de la proteasa papaína.

### 6.3 Expresión heteróloga del sistema productor de livipeptina en células de mamífero.

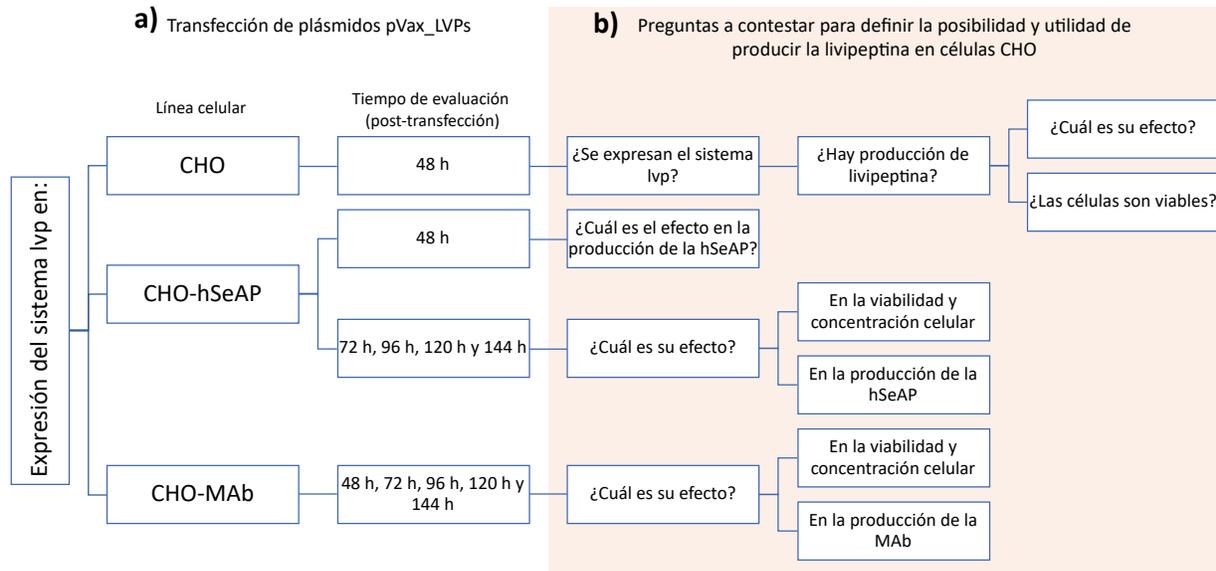
La proteólisis de una proteína recombinante continúa siendo un problema que no solo genera bajos rendimientos sino afecta la calidad del producto lo cual podría reducir su función biológica y/o generar especies potencialmente inmunogénicas (Chakrabarti et al., 2016; Clincke et al., 2011; Geng et al., 2024; Kol et al., 2020; Laux et al., 2018; Luo et al., 2019; Martensen & Justesen, 2001). En este estudio, el problema de la proteólisis se abordó mediante una estrategia nueva en la que las células CHO producen un inhibidor de proteasas de origen bacteriano mediante la expresión de su ruta biosintética o sistema lvp. La expresión de rutas biosintéticas bacterianas o sintetetas de péptidos no-ribosomales (NRPS) que producen péptidos con actividad biológica en células de mamíferos se ha estudiado poco. El presente estudio es el primero que explora la expresión de una NRPS que produce un péptido no ribosomal inhibidor de proteasas en células CHO. La expresión heteróloga de NRPSs se ha reportado principalmente en células eucariotas inferiores y hongos (Siewers et al., 2009). Solo hay un estudio en el que se expresa una NRPS en células de mamífero (Müller et al., 2012). En este estudio, se produjo el péptido no ribosomal indigoidina mediante la co-expresión de la NRPS BpsA de *Streptomyces lavendulae* y su activador SVP de *Streptomyces verticillus*, la cual es una 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) en células HEK293-T, células FreeStyle293-F y células madre humanas (hMSC-TERT).

Por lo anterior, quisimos abordar varias preguntas como la capacidad del sistema lvp para utilizar tRNA de mamíferos (experimento *in vitro*) y la capacidad de las células de mamíferos para activar postraduccionalmente el NRPS bacteriano mediante fosfopantetenilación, como lo habían realizado Müller et al., (2012).

En nuestro estudio encontramos que el péptido no ribosomal livipeptina se produjo expresando solo el sistema NRPS lvp, sin coexpresión de una PPTasa auxiliar, lo que sugiere que el sistema reconoce a los tRNAs eucariotas y que la presencia de una PPTasa endógena en las células CHO es

capaz de activarlo. De hecho, se sabe que las PPTasas están conservadas en todos los reinos debido a su papel fundamental en el metabolismo de los ácidos grasos (Beld et al., 2014).

En los siguientes apartados, se presentan los hallazgos más importantes sobre la expresión del sistema lvp para producir la livipeptina y su efecto en células CHO sin producir alguna proteína recombinante y en dos tipos de células CHO productoras de proteínas recombinantes, hSeAP y MAb (ver Figura 19).



**Figura 19. Experimentos de transfección realizados para obtener información sobre el efecto de producir el inhibidor livipeptina en células CHO.** a) Experimentos de transfección con los pVax\_LVPs (pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3) realizados a diferentes líneas celulares de CHO y sus tiempos de incubación después de la transfección. b) Preguntas que quisimos contestar al hacer los experimentos de transfección en distintas líneas celulares. CHO: Célula CHO-S que no expresa proteína recombinante. CHO-hSeAP: célula productora de la hSeAP. CHO-MAb: célula productora de un MAb.

### 6.3.1 Vectores construidos para entregar el sistema lvp para su expresión en células CHO.

Para lograr la expresión en células de mamífero del sistema lvp, cada uno de los genes que lo componen se clonaron en plásmidos de expresión, lvp1, lvp2 y lvp3 (pVax\_LVPs, Figura 11) y posteriormente se evaluó su transfección para contestar distintas preguntas (Figura 19). La identidad de cada plásmido se comprobó mediante amplificación por PCR de cada inserto, análisis de restricción enzimática y secuenciación de Sanger (realizada por la USSDNA). Para cada análisis

se cumplió con el resultado esperado. Los productos de PCR fueron del tamaño esperado (Figura 20, perfil de digestión de acuerdo con el teórico (Figura 21), así como una secuencia 100% idéntica para cada transgen (datos no mostrados).

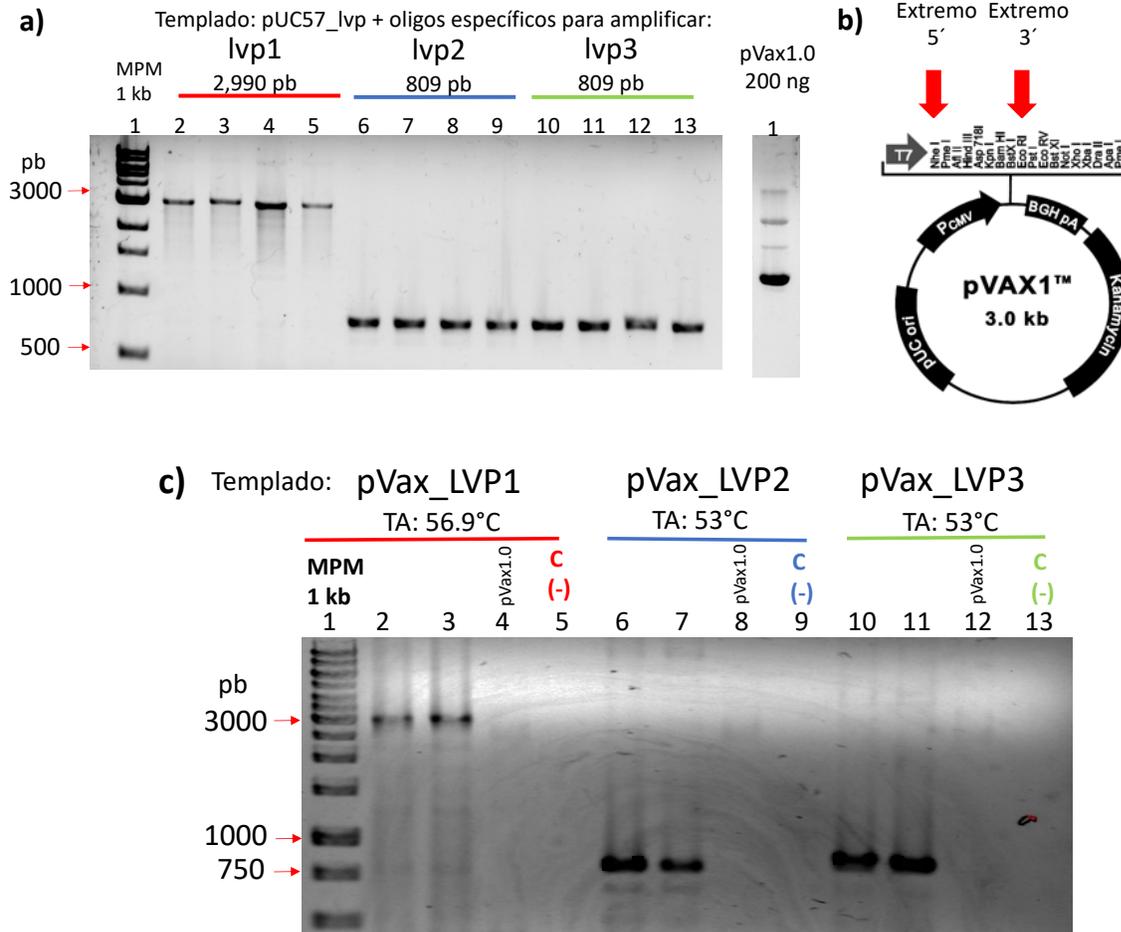


Figura 20. Generación de los plásmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 (pVax\_LVPs). a) Productos de amplificación por PCR de los genes lvp1, lvp2 y lvp3 usando oligonucleótidos específicos con sitio de restricción *NheI* (5') y *EcoRI* (3') así como el plásmido pUC57\_lvp. Los oligonucleótidos usados están listados en la Tabla 9. b) Esquema representativo del vector de expresión en células de mamífero pVax1.0 y los sitios de restricción usados y donde se clonó cada gen de forma independiente. Después de su amplificación, cada producto de PCR se purificó de banda y se digirió para generar extremos cohesivos con sus enzimas de restricción *NheI* (5') y *EcoRI* (3'). El plásmido pVax1.0 también se digirió y se ligó con cada producto de PCR de forma independiente. c) Confirmación de la identidad de los plásmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 por PCR usando como templado las construcciones purificadas de bacterias transformadas, respectivamente. MPM: marcador de peso molecular. Se cargó varias veces la misma muestra en algunos carriles. C (-): Control negativo, reacción sin templado.

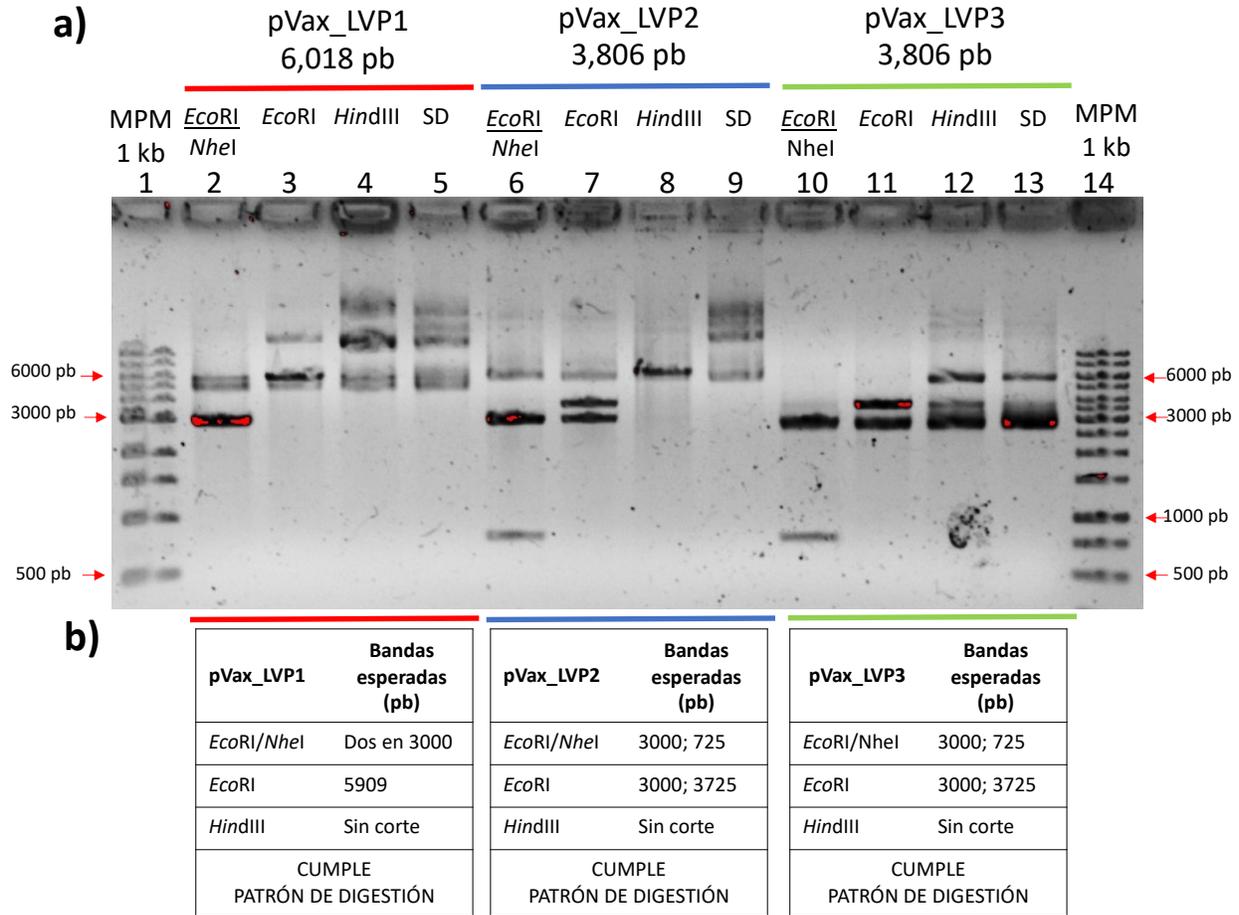


Figura 21. Los plásmidos construidos pVax\_LPV1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 cumplen con el patrón de digestión que confirma su identidad. a) Patrón de bandas de DNA plasmídico digerido con las enzimas de restricción *EcoRI/NheI* (doble digestión para liberar cada transgén del plásmido), *EcoRI* y *HindIII* (linealizar el plásmido vacío), vistas en un gel de agarosa al 0.8%. b) Tamaño de bandas esperadas de acuerdo a la secuencia teórica de cada plásmido y el sitio de restricción cortado. MPM: Marcador de peso molecular. SD: Sin digerir.

Una vez generadas las construcciones que expresan cada uno de los genes del sistema lvp, evaluamos en células CHO la expresión del sistema lvp una vez transfectadas por los plásmidos pVax\_LVPs, donde la expresión está controlada por el promotor fuerte del citomegalovirus. Después, comprobamos la producción del péptido aldehídico inhibidor de proteasas y finalmente, observamos que su producción fue inocua para la célula (sección próxima 6.3.2).

Para probar la hipótesis de que la producción del inhibidor de proteasas livipeptina disminuye la proteólisis, previniendo la fragmentación de una proteína recombinante, continuamos con la

evaluación en células CHO-hSeAP y CHO-MAb. En ambos casos, evaluamos el efecto de la transfección del sistema *lvp* en el crecimiento celular, viabilidad, en la producción e integridad de las proteínas recombinantes. Los detalles se describen en las secciones 6.3.3 y 6.3.4.

### 6.3.2 Efecto de la expresión del sistema *lvp* en células CHO.

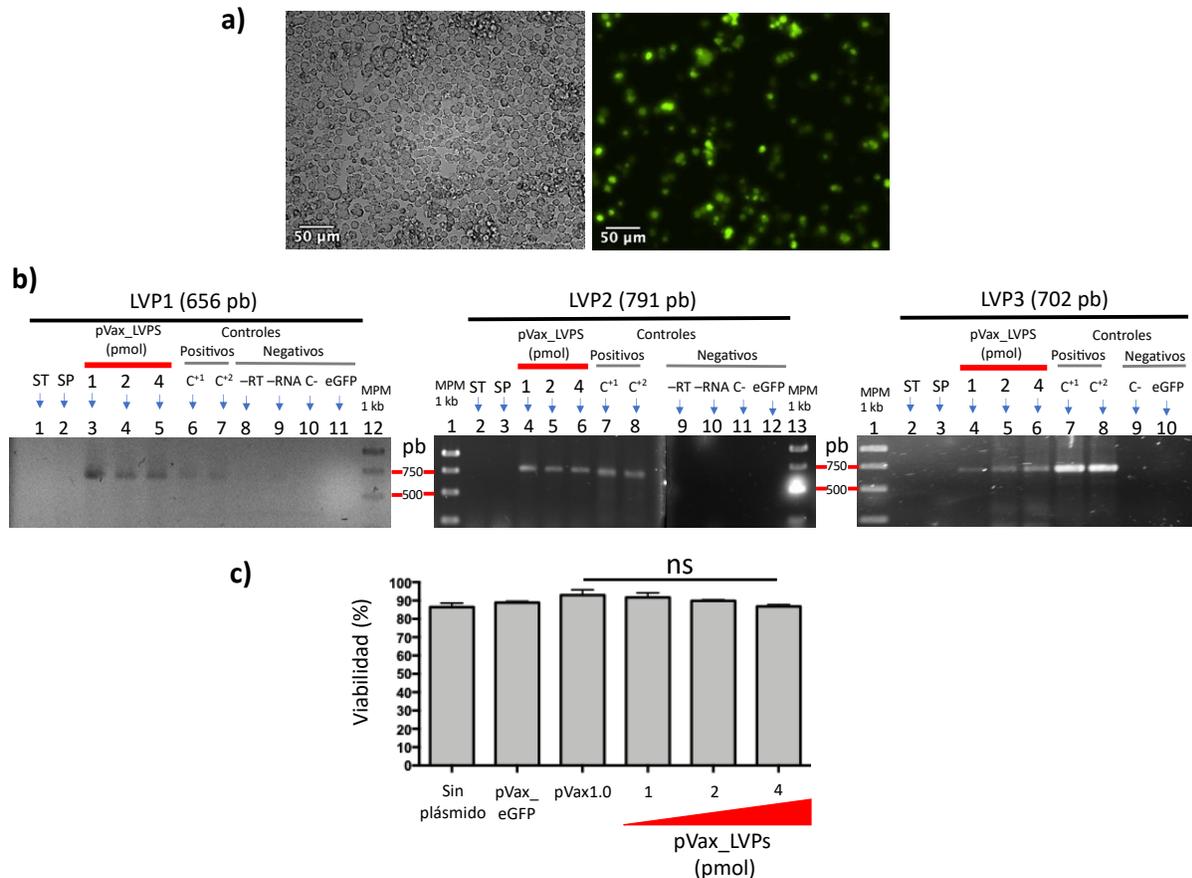
Ya que los plásmidos pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 (en conjunto pVax\_LVPs), que contienen la ruta biosintética de la livipeptina, fueron construidos, comprobamos su función y efecto en células CHO. El objetivo principal era probar que los plásmidos funcionaran para expresar los genes del sistema *lvp*, y evaluar su efecto en células CHO que no produjeran ninguna proteína recombinante.

Para lograr la expresión en células CHO, el método que usamos para internalizar los plásmidos fue por transfección usando el agente catiónico lipofectamina. Primeramente, se prepararon mezclas equimolares de 1, 2 y 4 pmol de los plásmidos pVax\_LVPs y se mezclaron con la lipofectamina, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (LTX, Invitrogen). Cada plásmido se encuentra en la misma proporción en una mezcla homogénea, por lo que es probable que mezcla contenga una proporción homogénea de complejo lípido-DNA plasmídico y se internalicen los tres plásmidos para entregar los tres genes al interior del núcleo celular.

Después de 48 h del proceso de transfección, la lipo-transfección tuvo una eficiencia de 20-30% usando 2 pmol del plásmido reportero pVax\_eGFP (Figura 22 a), valor típico reportado para la lipofectamina LTX (Taghavi et al., 2021). Confirmamos que las células transfectadas expresaron los genes del sistema *lvp* a nivel transcripcional, concluyendo que las construcciones funcionan para la expresión del sistema *lvp* (Figura 22 b). Además, observamos que esta expresión no tuvo efecto en la viabilidad celular conforme aumentó la concentración de los plásmidos (Figura 22 c).

Una vez que comprobamos la expresión del sistema *lvp*, investigamos la presencia de la livipeptina la cual se produce como consecuencia de la expresión proteica del sistema *lvp* por ser su ruta biosintética (Figura 4). Para ello medimos la actividad proteolítica extracelular en sobrenadantes y la intracelular en el pellet celular de cultivos transfectados.

En este experimento no se encontró la presencia del inhibidor en los sobrenadantes de cultivos transfectados con los pVax\_LVPs (datos no mostrados).

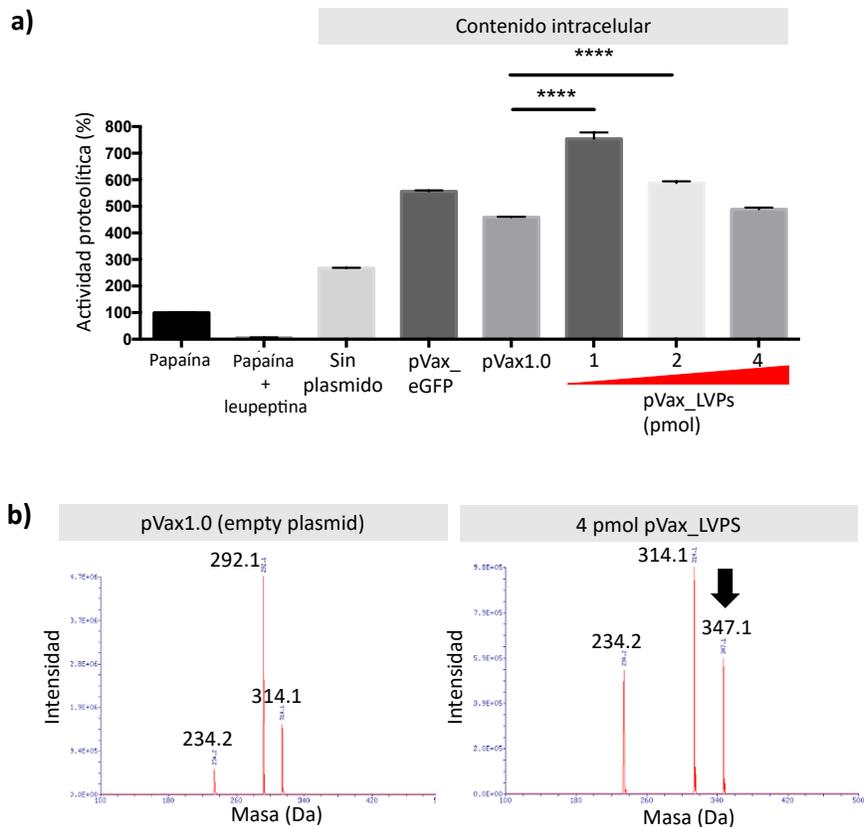


**Figura 22. La expresión del sistema *lvp* en células CHO no afecta la viabilidad celular después de 48 h post-transfección.** a) Las células CHO transfectadas con pVax\_eGFP usando como agente de transfección lipofectamina expresan eGFP alcanzando una eficiencia del 30% aprox. Imágenes adquiridas con un aumento de 10×. Izquierda: campo claro. Derecha: campo oscuro. Barra de escala de 50 µm. b) Los genes *lvp1*, *lvp2* y *lvp3* se expresan en las células transfectadas con la mezcla de 1, 2 y 4 pmol de pVax\_LVPS. Los controles de transfección fueron: sin transfección (ST), sin plásmido con lipofectamina (SP) y con el reportero pVax\_eGFP (eGFP). Los controles de PCR y de retrotranscripción fueron: C<sup>+1</sup>: pVax\_LVP1 o 2 o 3, según corresponda; C<sup>+2</sup>: pUC57\_LVP; -RT: sin retrotranscriptasa; -RNA: sin RNA; C-: sin DNA templado. MPM: Marcador de peso molecular. (c) La viabilidad celular de las células CHO no se afecta después de 48h post-transfección con la mezcla equimolar de los plásmidos que contiene el sistema *lvp*, pVax\_LVPS.

Por otra parte, observamos que la actividad proteolítica intracelular en las células transfectadas con 1 pmol de pVax\_LVPS incrementó respecto al plásmido vacío pVax1.0 (Figura 23 a,  $p < 0.0001$ ). Esto indica la activación de proteasas intracelulares, probablemente debido a la expresión del sistema *lvp* como sucede con la sobreexpresión de una r-proteína (Geng et al., 2024; Henry et al.,

2018). De forma interesante, también se observó que la actividad proteolítica disminuyó conforme aumentó la concentración de pVax\_LVPs. De hecho, al analizar por UPLC esta muestra, pudimos detectar la presencia de una molécula con masa molecular de 347.1 Da (Figura 23 b), la cual fue idéntica a la teórica para la liveipeptina (Figura 6 e).

Por lo anterior, hasta ahora podemos concluir que los plásmidos pVax\_LVPs funcionan para la expresión del sistema lvp en células CHO, que las células transfectadas son capaces de producir la molécula que inhibe la actividad proteolítica y esta producción no tiene efecto en la viabilidad celular después de 48 h post-transfección. La activación de proteasas debida a la transfección con los pVax\_LVPs queda por ser investigada en otros estudios.



**Figura 23.** La transfección con los plásmidos pVax aumentó la actividad de las proteasas intracelulares, la cual disminuyó al incrementar la concentración de los pVax\_LVPs. a) Ensayo de actividad proteolítica presente en el contenido intracelular de células CHO transfectadas con 1, 2 y 4 pmol de pVax\_LVPs. Los controles son células transfectadas con el plásmido vacío (pVax1.0), con el reportero (pVax\_eGFP) y sin plásmido. La leupeptina se usó como control de inhibición de la papaína. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar. N = 3. b) Detección de una molécula con masa idéntica a la liveipeptina de 347.1 Da presente de forma intracelular de células CHO transfectadas con 4 pmol de pVax\_LVPs. \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

### 6.3.3 Efecto de la expresión del sistema lvp en células CHO productoras de la hSeAP.

Una vez que se evaluó la expresión del sistema lvp en células CHO, confirmando la producción del inhibidor livipeptina y su inocuidad, continuamos probando el sistema lvp en células CHO que produjeran de forma estable una proteína recombinante modelo, la fosfatasa alcalina humana sérica secretada, hSeAP por sus siglas en inglés. La hSeAP es una proteína recombinante modelo ideal debido a que es secretada al medio extracelular, se cuantifica mediante métodos enzimáticos sencillos y al ser glicosilada, es útil para evaluar su perfil de glicosilación (en este estudio no se investigó) (Berger et al., 1988; Lipscomb et al., 2005). A continuación, se presentan los resultados obtenidos al coproducir el sistema lvp y la hSeAP en células CHO.

#### 6.3.3.1 Las células CHO-hSeAP que expresan el sistema lvp producen el inhibidor de proteasa sin comprometer la viabilidad celular.

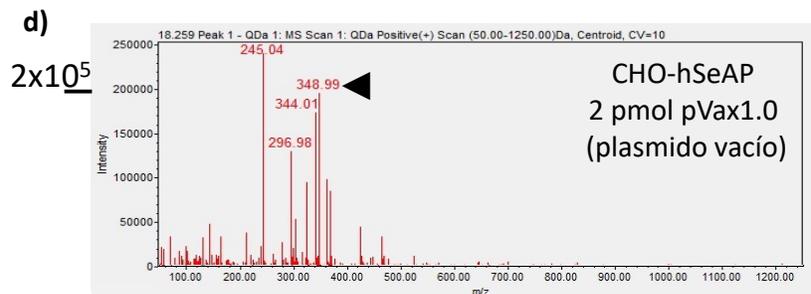
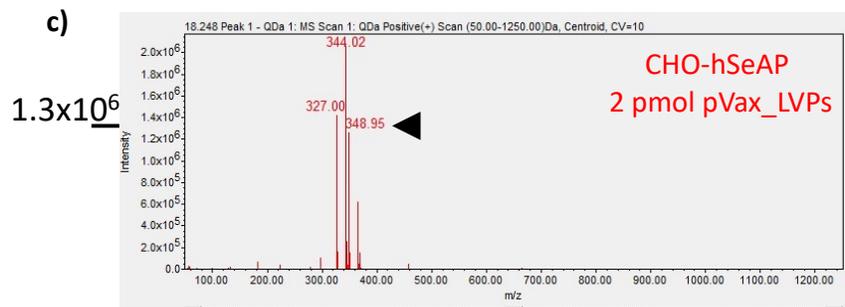
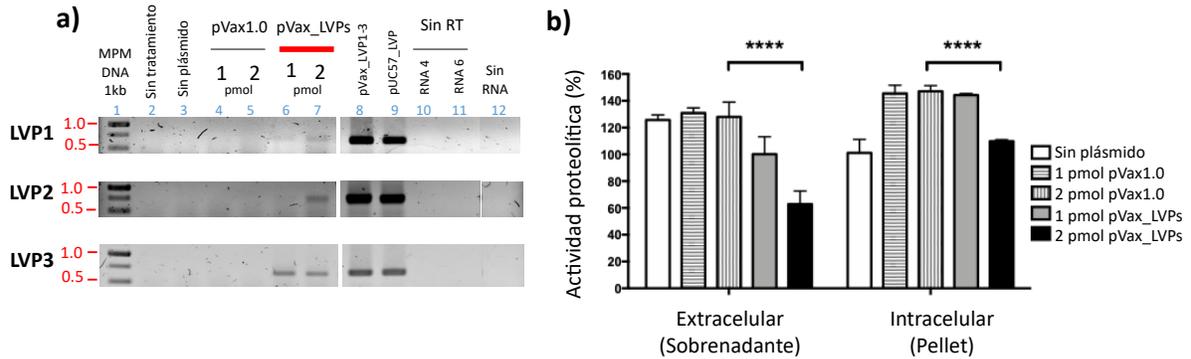
El sistema lvp se expresó transitoriamente en células CHO-hSeAP, donde se compararon concentraciones equimolares de un pmol y dos pmol de los tres plásmidos que contienen el sistema lvp (pVax\_LVPs, Figura 12). La transfección del sistema lvp funcionó para la expresión de los tres genes, que se observó en ambas condiciones después de 48 h post-transfección (Figura 24 a).

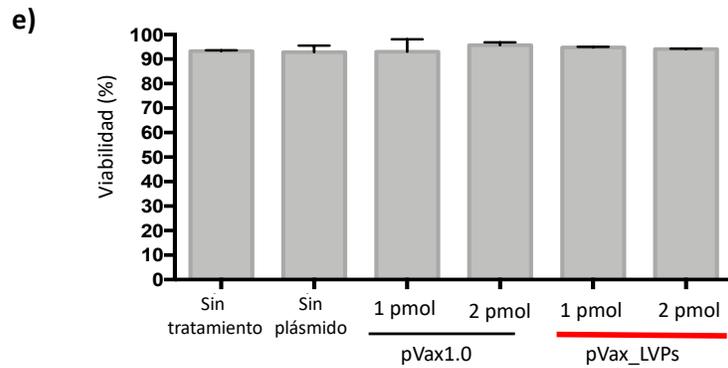
La presencia extracelular e intracelular del inhibidor de proteasa se evaluó tanto en los sobrenadantes como en las fracciones solubles de pellets de células transfectadas mediante un ensayo de actividad de proteasa *in vitro*. Observamos una reducción de la actividad de la proteasa en ambas condiciones, en comparación con la transfección con el plásmido vacío pVax1.0 (Figura 24 b). Los sobrenadantes de células CHO transfectadas con 2 pmol de pVax\_LVPs inhibieron el 65% de la actividad de la proteasa, en comparación con el plásmido vacío pVax1.0 (Figura 24 b, actividades de proteasa:  $62.90\% \pm 9.76$  con pVax\_LVPs vs  $128.04\% \pm 10.97$  con el plásmido vacío). Además, se detectó una molécula con un patrón de ionización de 348.2 m/z idéntica a la livipeptina, mediante un análisis de UPLC acoplado a espectrometría de masas. La señal obtenida en 348.9 m/z para la condición con el sistema lvp fue 6.5 veces mayor que con el control del plásmido vacío (Figura 24 c-d).

Hasta ahora, los resultados muestran que al igual que en células CHO silvestres, la expresión del sistema lvp en células CHO-hSeAP no comprometió su viabilidad celular a las 48 h post-transfección

(Figura 24 e). Este resultado confirma la producción inocua del péptido bacteriano no ribosómico con actividad inhibidora de proteasas en células de mamíferos.

La livipeptina se encontró tanto de forma intracelular como extracelular. El encontrar actividad de inhibición de proteasas en los sobrenadantes de cultivo de células hSeAP-CHO que expresan el sistema lvp implica que la livipeptina fue secretada mediante un mecanismo que aún debe identificarse en estudios futuros. Esto es una ventaja para prevenir la proteólisis de proteínas recombinantes secretadas, que se acumulan en el medio extracelular y son susceptibles a la degradación proteolítica debido a la presencia de proteasas extracelulares y largos tiempos de residencia (Chakrabarti et al., 2016; Clincke et al., 2011; Kol et al., 2020; Laux et al., 2018; Li et al., 2019).





**Figura 24. Producción de livipeptina en células CHO-hSeAP transfectadas con el sistema lvp (pVax\_LVPs).** Células CHO que expresan de manera estable la hSeAP (CHO-hSeAP) fueron transfectadas con 1 o 2 pmol de pVax\_LVP (mezcla equimolar) y después de 48 h, se evaluó lo siguiente: a) La expresión transcripcional de los tres genes lvp debida a la transfección con pVax\_LVPs. MPM: marcador de peso molecular. Sin RT: sin transcriptasa inversa. Sin RNA: sin RNA como templado. b) Inhibición significativa de la actividad proteolítica en sobrenadantes y fracciones solubles de pellets de células transfectadas con 2 pmol de pVax\_LVP. c-d) Detección de livipeptina mediante UPLC acoplado a masas. Se señala un pico con la masa molecular esperada para la livipeptina en 348 m/z (347 Da) con intensidad 6.5 veces mayor en células CHO transfectadas con pVax\_LVPs ( $1.3 \times 10^6$ ) en comparación con el plásmido vacío ( $0.2 \times 10^6$ ). e) Viabilidad celular no afectada en células CHO-hSeAP transfectadas con pVax\_LVPs. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar. N = 3.  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 6.3.3.2 La expresión del sistema *lvp* en células CHO-hSeAP aumentó la productividad específica de hSeAP al reducir su proteólisis.

Observamos que la transfección afectó negativamente la producción de la proteína recombinante de interés hSeAP después de 48 h post-transfección (Figura 25 a). No se observaron cambios relevantes a las 24 h en la productividad de hSeAP en células que expresaron el sistema *lvp* mediante la transfección de pVax\_LVPs (Figura 25 b). Es por ello que evaluamos su efecto después de 48 h post-transfección.

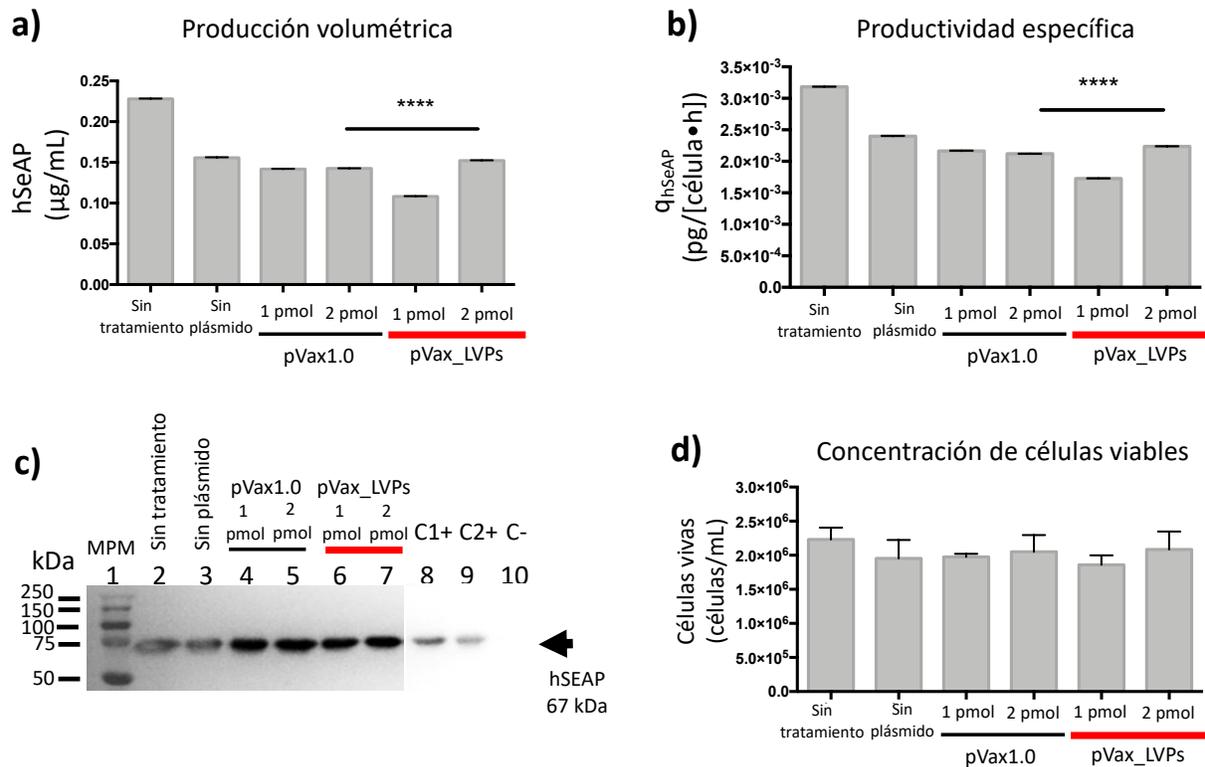
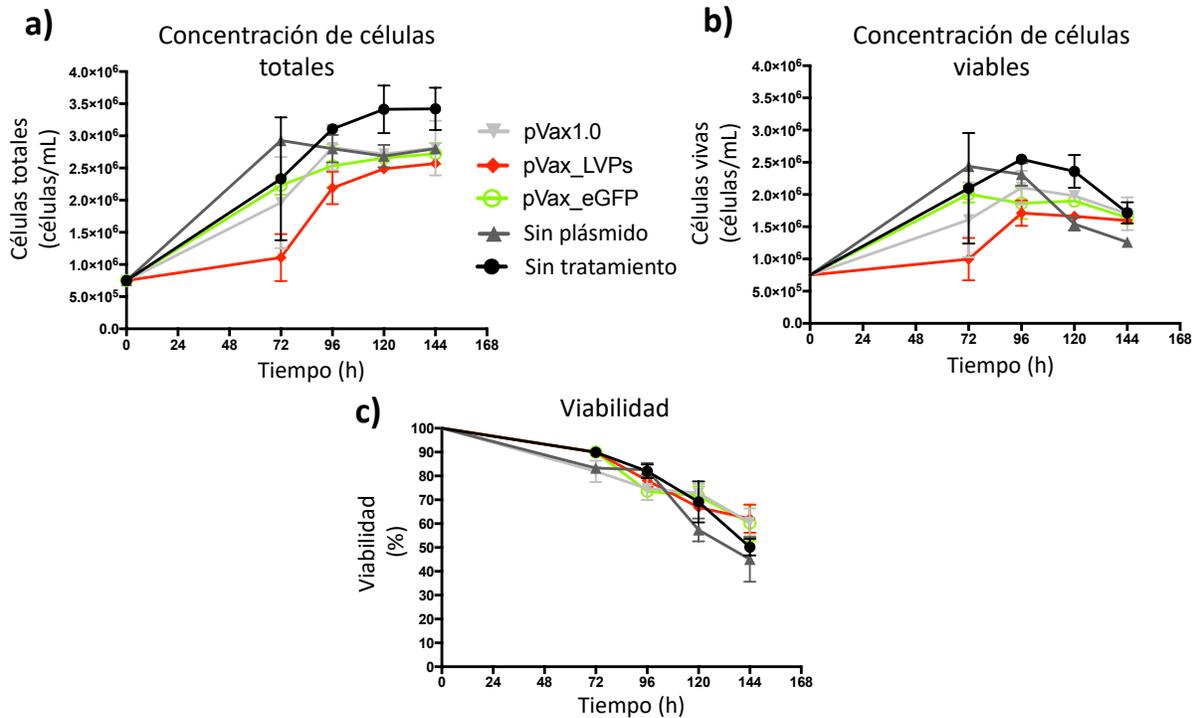


Figura 25. El pequeño aumento en la producción de hSeAP a las 48 h post-transfección en células transfectadas con el sistema *lvp* no se asoció con la fragmentación de hSeAP. Se transfectaron células CHO que expresan de manera estable la hSeAP con mezclas equimolares de 1 y 2 pmol de plásmidos pVax\_LVPs. Después de 48 h evaluamos: a) Producción volumétrica de hSeAP. b) Productividad específica de hSeAP. c) Análisis de integridad de hSeAP por Western blot a partir de sobrenadantes. (d) Concentración de células viables. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar. N = 3,  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

A las 72 h después de la transfección, las células transfectadas con el sistema *lvp* crecieron solo la mitad que las células con el plásmido vacío o con el plásmido reportero eGFP, pero sin afectar la viabilidad celular (Figura 26). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Después de las

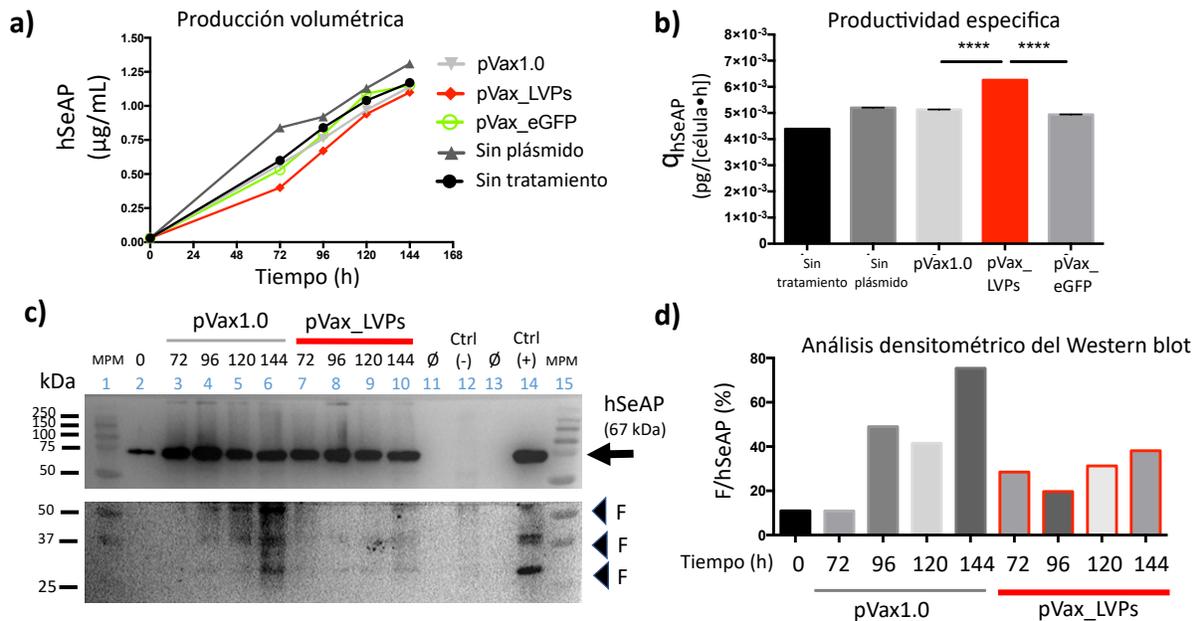
72 h, se restableció el crecimiento celular y en el momento de la cosecha (144 h), la transfección redujo la concentración de células independientemente del tipo de plásmido transfectado (Figura 26 a y b). Es importante destacar que la viabilidad de las células transfectadas con pVax\_LVP se mantuvo igual que en cualquier otra condición (Figura 26 c). Este resultado sugiere que la expresión del sistema *lvp* fue inocuo para las células CHO-hSeaP después de las 72 h post-transfección.



**Figura 26.** La concentración y viabilidad celular no se vieron afectadas por la expresión del sistema *lvp* (pVax\_LVPs) en células CHO-hSeaP después de 144 h post-transfección. Las células CHO-hSeaP fueron transfectadas con una  $\blacklozenge$  mezcla equimolar de 2 pmol pVax\_LVPs (pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3),  $\blacktriangledown$  plásmido vacío pVax1.0,  $\circ$  plásmido reportero pVax\_eGFP,  $\blacktriangle$  sin plásmido solo con FreeStyle™ y  $\bullet$  sin tratamiento (sin plásmido, sin lípido catiónico). No se observó diferencia significativa entre el crecimiento o la viabilidad de las células transfectadas. Las barras de error muestran las desviaciones estándar. N = 4. a) Células totales por mililitro de cultivo. b) Células viables por mililitro de cultivo. c) Viabilidad celular.

Al analizar la producción de hSeaP después de 48 h, no observamos diferencia en la producción volumétrica pero sí una diferencia significativa en la producción específica en células transfectadas con el sistema *lvp* (Figura 27 a y b). Las células transfectadas con pVax\_LVP tuvieron una tasa de

producción específica significativamente mayor (129%) que las células transfectadas con el reportero o el plásmido vacío (Figura 27 b, Tabla 20). De forma interesante, el análisis de la integridad de hSeAP mediante Western blot mostró una reducción en los fragmentos de hSeAP en los sobrenadantes de las células transfectadas con el sistema *lvp*, en comparación con las transfectadas con el plásmido vacío (Figura 27 c y d). Este resultado sugiere que la prevención de la fragmentación de hSeAP podría estar asociado a una mayor productividad específica por parte de las células que expresan el sistema *lvp*.



**Figura 27. La expresión del sistema *lvp* aumentó la productividad específica de la proteína hSeAP debido a la reducción de su fragmentación.** Células CHO que expresan establemente hSeAP se transfectaron con una mezcla equimolar de 2 pmol de pVax\_LVPs. Después de 48 h post-transfección, evaluamos: a) Producción volumétrica de la hSeAP. CHO-hSeAP transfectadas con 2 pmol de: ▼ plásmido vacío pVax1.0, ◆ mezcla equimolar de pVax\_LVPs, o plásmido reportero pVax\_eGFP, ▲ sin plásmido solo con FreeStyle™ y ● sin tratamiento (sin plásmido, sin lípido catiónico). b) Producción específica de hSeAP a las 144 h post-transfección. c) Integridad de hSeAP mediante Western blot de sobrenadantes de cultivo 72-144 h. Para observar los fragmentos de hSeAP y evitar la sobreexposición de su forma completa (67 kDa), la membrana se cortó, se incubó de forma independiente y se trató en las mismas condiciones con tiempos de exposición más prolongados. ◀ F: fragmentos de hSeAP. ←: forma completa de hSeAP. ∅: pozo vacío. MPM: Marcador de peso molecular. Ctrl (-): sobrenadante de células CHO que no expresan hSeAP. Ctrl (+): sobrenadante del cultivo CHO-hSeAP. d) Análisis densitométrico de c). F/hSeAP se refiere a la relación entre la abundancia de los fragmentos de hSeAP respecto a su forma completa. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar. N = 3, p<0.0001 (\*\*\*\*).

**Tabla 20.** Producción específica de hSeAP en cultivos de CHO-hSeAP transfectados después de 144 h con los plásmidos indicados.

	<b>pVax1.0</b> (plásmido vacío)	<b>pVax_eGFP</b> (plásmido reportero)	<b>pVax_LVPs</b> (sistema lvp)
<b>qhSeAP</b> (pg/cell.h)	$5.1 \times 10^{-3} \pm 2.6 \times 10^{-6}$	$4.9 \times 10^{-3} \pm 3.2 \times 10^{-6}$	$6.3 \times 10^{-3} \pm 3.7 \times 10^{-6}$
<b>Cambio</b>	104%	100%	129%****

\*\*\*\* p&lt; 0.01

### 6.3.4 Efecto de la expresión del sistema lvp en células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal

La expresión transitoria del sistema lvp mediante la transfección de los plásmidos pVax\_LVPs se evaluó en células CHO que expresan de manera estable un anticuerpo monoclonal IgG1 humano (CHO-MAb). Las transfecciones se realizaron en cultivos en suspensión celular. No se observó algún efecto en el crecimiento celular, la viabilidad o la producción volumétrica del MAb después de la transfección de cultivos en suspensión de células CHO-MAb (Figura 28), a diferencia de lo observado con las células CHO-hSeAP (Figura 26 y Figura 27).

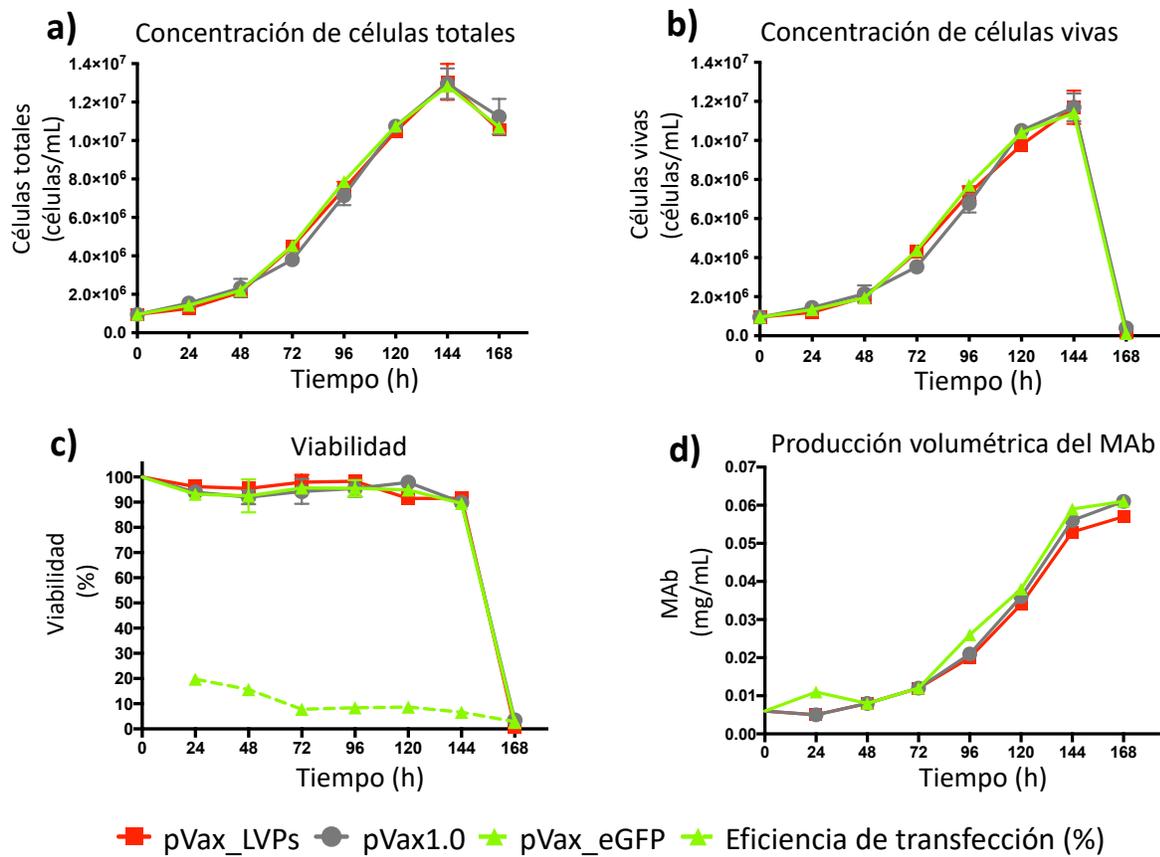
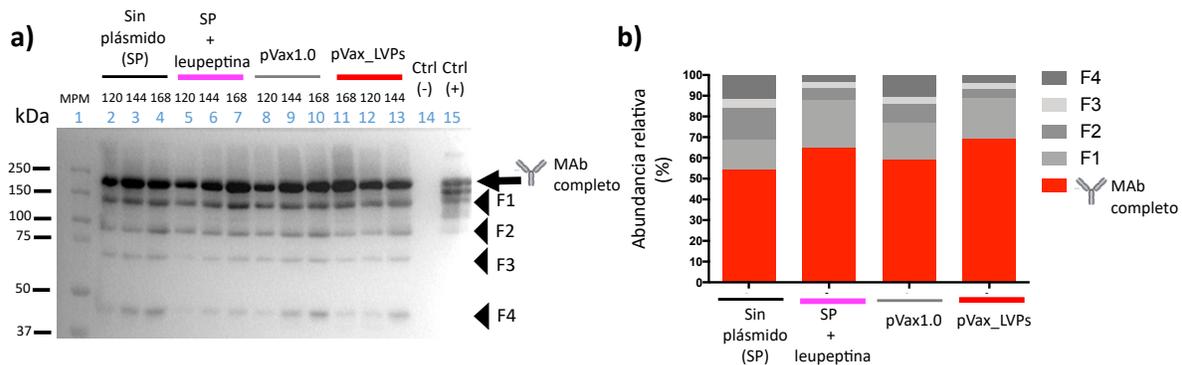


Figura 28. El crecimiento celular y la producción de MAb no se vieron afectados por la expresión del sistema lvp en células CHO-MAb. Se transfectaron células CHO que expresan establemente un anticuerpo monoclonal (MAb) recombinante con una mezcla equimolar de 2 pmol de plásmidos pVax\_LVPs. Los símbolos corresponden a CHO-MAb transfectados con 6 pmol de los plásmidos: ■ pVax\_LVPs, ● vacío pVax1.0, ▲ reportero pVax\_eGFP, ▲ (con línea discontinua) eficiencia de transfección. a) Concentración de células totales. b) Concentración de células viables. c) Viabilidad celular. d) Concentración de MAb.

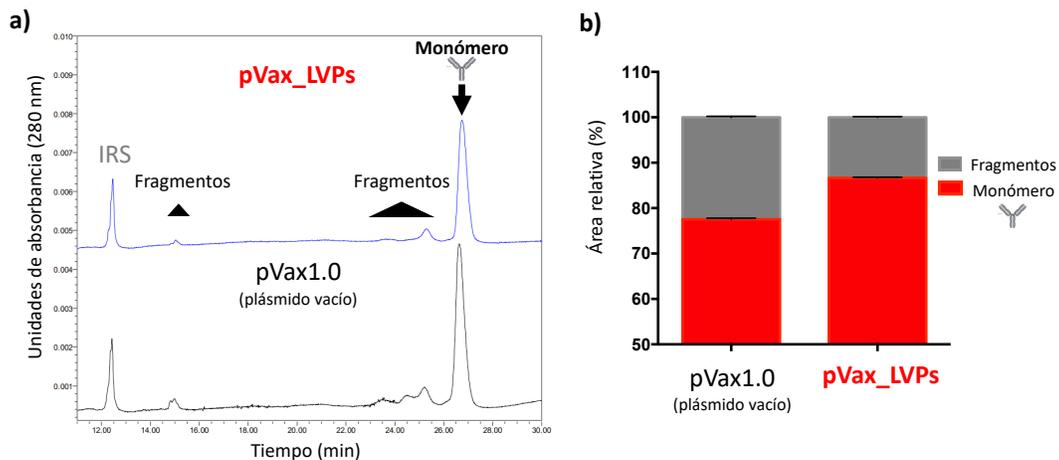
A pesar de no observar diferencias en la producción del MAb (Figura 28 d), sí hubo diferencias en su integridad. El análisis del MAb mediante Western blot no reductor mostró que la forma completa del anticuerpo fue un 10.2% más abundante en las células que expresaban el sistema *lvp*, en comparación con el plásmido vacío (69.3% frente a 59.1%, respectivamente) (Figura 29). De hecho, el patrón de fragmentación de anticuerpos fue similar al obtenido con el control de inhibición, es decir, cuando se añadió leupeptina a los cultivos cada 24 h (Figura 29, condición de “SP + leupeptina” respecto a “pVax\_LVPs”).



**Figura 29. La expresión del sistema *lvp* redujo la fragmentación de un MAb producido por células CHO-MAb.** a) Integridad del MAb mediante Western blot en condiciones no reductoras de sobrenadantes de cultivos de 120 h -168 h después de la transfección. Se analizó el sobrenadante de cultivos transfectados con 6 pmol de los plásmidos pVax\_LVPs o con el plásmido vacío pVax1.0. Los controles fueron sobrenadantes de células transfectadas sin plásmido (SP, solo con Freestyle™), así como sobrenadante de cultivos a los que se adicionó leupeptina cada 24 h (SP + leupeptina). (b) Abundancia relativa del análisis densitométrico de a) de las bandas de MAb a las 168 h después de la transfección. ◀: fragmentos de MAb. ←: forma completa del MAb. MPM: Marcador de peso molecular. Ctrl (-): sobrenadante de células CHO sin expresar MAb. Ctrl (+): 2 µg de MAb estándar.

La prevención de la fragmentación del MAb fue confirmada al analizar el MAb purificado por electroforesis capilar. La forma completa del MAb fue un 10% más abundante en las células que expresaban el sistema *lvp* respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío ( $86.8\% \pm 0.2$  frente a  $77.1\% \pm 0.3$ , respectivamente) (Figura 30). Este resultado muestra que la transfección con el sistema *lvp* resulta en la producción del inhibidor de proteasas, que contribuye a obtener un producto con una porción mayor de la forma completa del MAb.

Respecto a la producción volumétrica y específica del MAb, no se observó ningún cambio significativo entre las células que expresaron el sistema *lvp* y las células con el plásmido vacío o el plásmido reportero (Figura 28 d y Figura 31, respectivamente). Sin embargo, se debe considerar que la eficiencia de transfección fue del 20%. A pesar de la baja eficiencia de transfección, se observaron cambios en la integridad del producto MAb. La expresión del sistema *lvp* disminuyó significativamente la fragmentación del MAb, de hecho, este resultado fue similar al observado con el control de inhibición (adición de leupeptina cada 24 h, Figura 29).



**Figura 30. El MAb purificado que fue producido por células CHO-MAb que expresan el sistema *lvp* presenta menos fragmentos que el control con el plásmido vacío.** a) Integridad del MAb purificado mediante cromatografía de afinidad y analizado por electroforesis capilar (168 h después de la transfección). b) Análisis del área relativa de la señal de MAb de a). IRS: Estándar interno de referencia de 10 kDa. ▲: fragmentos de MAb. ↓: forma completa del MAb. Las barras de error corresponden a la diferencia entre duplicados. N = 2.

Un resultado notable fue que la adición de leupeptina al medio cada 24 h aumentó la productividad específica considerablemente respecto al control sin leupeptina. Como se puede observar en la Figura 31, la adición de leupeptina disminuyó el crecimiento celular respecto al control, sin afectar la viabilidad. De forma interesante, la concentración de MAb no se vio afectada, lo que resultó en una mayor productividad específica respecto al control sin plásmido (151%, Tabla 21) (Figura 31 e).

**Tabla 21.** Producción específica del MAb en cultivos de CHO-MAb transfectados después de 168 h con los plásmidos indicados

	Sin plásmido	Sin plásmido + leupeptina*	pVax1.0 (plásmido vacío)	pVax_eGFP (plásmido reportero)	pVax_LVPs (sistema lvp)
qhMAb (pg/cell.h)	$7.3 \times 10^{-2} \pm 3e-3$	$11 \times 10^{-2} \pm 6.6e-3$	$6.7 \times 10^{-2} \pm 4.7e-3$	$6.8 \times 10^{-2} \pm 0.8e-3$	$6.5 \times 10^{-2} \pm 0.8e-3$
Cambio	100%	151%	91.8%	93.1%	89%

\*adicionada al cultivo cada 24 h.

Este resultado sugiere que la leupeptina contribuye a que la célula produzca más proteína. En este estudio no se indagó más sobre el mecanismo por el cual sucede este aumento. Sin embargo, podríamos especular que la leupeptina podría inhibir serin-proteasas y cisteín-proteasas intracelulares involucradas en blancos celulares que contribuyan al anabolismo, tales como la catepsina L y la catepsina B, las cuales participan en el recambio proteico (Libby & Goldberg, 1978; Monti et al., 1998; Nishimura et al., 1995). Más estudios se tienen que realizar para comprobar esta hipótesis, como analizar la expresión de proteínas endógenas para comprobar que también se aumenta su producción específica, entre otras pruebas. Además, la leupeptina podría tener un papel indirecto en el aumento de la productividad específica, ya que se ha observado que otras señales como estrés celular por limitación de CO<sub>2</sub>, cambio en el pH, hipotermia, arresto celular y condiciones hiperosmóticas están asociadas con un aumento de la productividad, y de hecho, forman parte de las estrategias para aumentar la producción de r-proteínas (Kumar et al., 2007; Schellenberg et al., 2022).

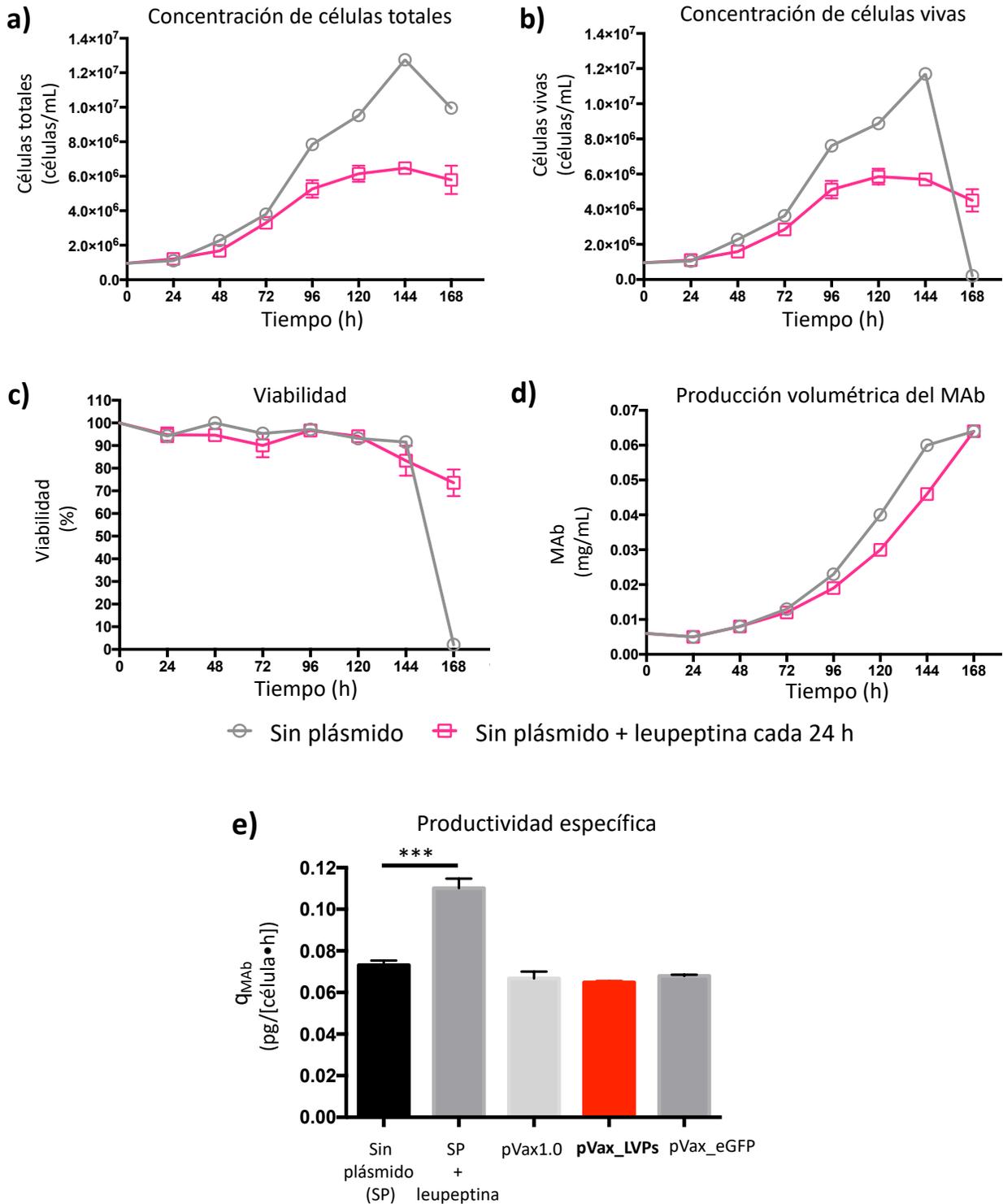


Figura 31. Las células CHO-MAb en presencia de livepeptina produjeron más MAb por célula a pesar del efecto negativo en el crecimiento celular. Los símbolos corresponden a células cultivadas sin plásmido, solo con FreeStyle™ al inicio de la cinética (o) y con la adición de

leupeptina cada 24 h (□). a) Concentración de células totales. b) Concentración de células viables. c) Viabilidad celular. d) Concentración de MAb.

Respecto a los efectos celulares que un inhibidor de proteasas pueda tener, observamos que tanto la adición de la leupeptina al medio de cultivo como la producción de la livipeptina desde el interior de la célula, no afectaron la viabilidad celular. Ambos péptidos aldehídicos son inhibidores de cisteín-proteasas y podrían haber inhibido proteasas blanco esenciales en procesos biológicos, como el recambio proteico (inhibición de proteasas a nivel lisosomal) y la apoptosis (caspasas) afectando directamente a la viabilidad. La ausencia de cambios en la viabilidad celular a las 144 h de adición de leupeptina o después de la transfección con el sistema lvp, muestra que la célula puede contener con su presencia. La livipeptina contiene un grupo aldehído que puede participar en otras reacciones químicas además de la unión con cisteín-proteasas. Sin embargo, se sabe que las células de mamífero pueden neutralizar los aldehídos mediante el sistema de glutatión (Fritz & Petersen, 2013). Es interesante notar que, incluso cuando la integridad de la livipeptina pudiera haberse reducido por el sistema celular endógeno redox-glutatión, los resultados observados demuestran que el inhibidor permanece funcional, tanto de forma intracelular, como extracelular. De hecho, no hay estudios que aseguren que la inhibición de cisteín-proteasas sea letal o afecte la viabilidad. El uso de varios inhibidores de cisteín-proteasas en cultivos de células HEPG2, entre ellos la leupeptina, no afectó el procesamiento lisosomal al haber una diversidad de otras proteasas que no fueron inhibidas (Peppard & Knap, 1999). La inhibición de catepsina B y L en los lisosomas de células de cáncer de riñón por péptidos de tipo fluorometil-cetona afectó la migración celular y la organización en colonias aumentando su adhesión pero no afectó su viabilidad ni a las proteasas involucradas en apoptosis (Rudzinska et al., 2020). Otras evidencias de la inocuidad de la inhibición de cistein proteasas es el estudio en el que suplementaron cultivos de *Tetrahymena thermophila* (ciliado) con el inhibidor E-64 (5  $\mu$ M) y no se observa efecto letal, previene la fragmentación de r-proteínas secretadas, incrementando la eficiencia de su producción (Orhan et al., 2024); y otro estudio donde la adición de leupeptina a cultivos neuronales granulares del cerebelo no fue tóxico, pero alteró la morfología celular (Monti et al., 1998).

En la literatura, ha sido poco reportada la producción de un inhibidor de proteasas intracelular como estrategia para contener con la actividad proteolítica. Para evitar efectos negativos en las

células, es importante que el inhibidor intracelular no sea de amplio espectro, de esta manera, la célula tiene otras proteasas que pueden contender con la función que cumplían las proteasas inhibidas. Hasta ahora, el único estudio donde se sobreexpresa un inhibidor endógeno es al investigar la proteólisis del interferon- $\gamma$  recombinante, sin causar efectos en la viabilidad celular (Mols et al., 2005). Es importante reconocer que una limitación de este estudio es que la expresión del sistema lvp fue transitoria con una eficiencia de transfección de alrededor del 30%. Por lo tanto, la expresión del sistema lvp y la producción de livipeptina se podrían perder gradualmente como se ha demostrado con la expresión transitoria (Cervera et al., 2014). Pero es relevante decir que este estudio contribuye con la generación de conocimiento sobre la producción de un inhibidor de cisteín-proteasas de forma intracelular en células CHO y también abre la posibilidad de investigar la generación de una línea celular estable como alternativa de producción estable de la livipeptina así como evaluar sus efectos.

### 6.3.5 Conclusión sobre la expresión del sistema lvp para la producción de la livipeptina en células CHO.

Las construcciones genéticas para entregar los genes al interior de la célula CHO y expresar el sistema lvp funcionaron para expresar los tres genes lvp1, lvp2 y lvp3 y producir la livipeptina. La livipeptina producida se encontró de forma intracelular y extracelular. La transfección con el sistema lvp no afectó la viabilidad ni el crecimiento celular.

La expresión del sistema lvp en células CHO-hSeAP funcionó para la expresión del sistema lvp y la producción de la livipeptina. Después de 144 h de la transfección con el sistema lvp, las células CHO-hSeAP tuvieron un aumento del 129% en la producción específica de la hSeAP respecto al control, lo que estuvo asociado con la reducción de su fragmentación (Tabla 29, Figura 27).

Al probar la expresión del sistema lvp en células CHO-MAb, después de 168 h, no se observaron cambios en la concentración celular, ni en la producción del anticuerpo, probablemente debido a que la eficiencia de transfección fue del 20% después de 24 h. Sin embargo, el MAb que se obtuvo al expresar el sistema lvp tuvo una proporción mayor de su forma completa y menos fragmentos

que el control con el plásmido vacío y sin plásmido. Inclusive, el producto obtenido fue similar al obtenido cuando se adicionó al cultivo leupeptina cada 24 h como control de inhibición (Figura 29). Este control fue interesante debido a que la leupeptina afectó el crecimiento celular pero aumentó 151% la producción específica (Tabla 21), un resultado similar al obtenido en los cultivos de CHO-hSEAP productores de livipeptina. Los efectos de ambos inhibidores de cisteín-proteasas, leupeptina y livipeptina, no están estudiados aún. Por ahora, podemos concluir que el sistema lvp funciona para la obtener proteínas en su forma completa mediante la producción del inhibidor de cisteín-proteasas de tipo papaína, la livipeptina.

## 7. Conclusiones globales.

Nuestros resultados muestran que la expresión de la vía bacteriana, sistema lvp, en células CHO es posible, y que resultó en la producción *in vivo* de un inhibidor de la proteólisis, un péptido aldehídico, protegiendo de la fragmentación a dos proteínas recombinantes modelo. Nuestro trabajo amplía la posibilidad de expresar vías biosintéticas bacterianas útiles en células de mamíferos.

En nuestro estudio encontramos que el péptido no ribosómico livipeptina se produjo expresando solo el sistema NRPS lvp, sin coexpresión de una PPTasa auxiliar, lo que sugiere la presencia de una PPTasa endógena en las células CHO capaz de activarlo.

La prevención de la fragmentación proteolítica de hSeAP y una mayor abundancia de la forma completa de un anticuerpo monoclonal demuestran la utilidad de expresar el sistema lvp bacteriano para reducir la proteólisis de forma fácil y económica en cultivos de células de mamíferos.

Una limitación de este estudio es que la expresión del sistema lvp fue transitoria, con una eficiencia de transfección de alrededor del 20-30%. Por lo tanto, la expresión del sistema lvp y la producción de livipeptina se pierden gradualmente. Queda por investigar la generación de una línea celular estable como alternativa a la producción.

## 8. Limitaciones y perspectivas.

Las limitaciones de este estudio son:

- Eficiencia de transfección con lipofectamina LTX y FreeStyle. Aunque alcanzamos la eficiencia de transfección reportada para estos dos agentes catiónicos (20-30%, Taghavi et al., 2021), la baja eficiencia significa que solo esa proporción de células expresaron el sistema lvp y produjeron la livipeptina, por lo que el efecto de la livipeptina puede estar diluido por la mayoría de las células que no fueron transfectadas. Esto sugiere que la generación de células que expresen de forma estable el sistema no necesariamente presenten los mismos efectos que observamos respecto a la viabilidad intacta y el aumento de la productividad específica, se tendrá que investigar nuevamente sus efectos.
- Nivel de expresión del sistema lvp. Las NRPS funcionan en forma co-lineal con módulos que incorporan una unidad monomérica en un producto final (Huo et al., 2019). En este estudio, no se cuantificó la expresión de los tres genes ni de sus productos proteicos. Analizarlos daría información sobre la producción de la livipeptina y decidir sobre la mejora de su producción, por ejemplo, usando una estrategia de expresión diferente como un plásmido con los genes en *tandem* con promotores particulares.
- Cuantificación de metabolitos. Por razones técnicas, de tiempo y prioridades, no se realizó el análisis de metabolitos consumidos, como la glucosa y glutamina; y generados, como el lactato y amonio. Ahora con los resultados vistos de forma integral, el análisis de estos metabolitos indicaría qué tan activo se encuentra el metabolismo (Coulet et al., 2022) y podría explicar el aumento de la productividad específica en cultivos con livipeptina o leupeptina (control de inhibición). El metabolismo tendría que estar más activo en las células con los inhibidores de proteasas, ya que se observó un aumento de la producción de r-proteína por célula por hora respecto a los controles sin inhibidor de proteasas.
- Línea estable. La creación de una línea celular estable expresando el sistema lvp para producir la livipeptina establemente promete ser una atractiva alternativa para la producción de r-proteínas sensibles a degradación por cisteín-proteasas (por lo menos similares a la papaína). Sin embargo, también abre la discusión sobre los efectos que pueda tener, si es posible controlar la producción del inhibidor vía el uso de promotores con diferente fuerza, entre otras estrategias.
- Más sobre la livipeptina. En la sección 2.6 se describe lo que hasta ahora se sabe sobre la livipeptina como nuevo inhibidor de cisteín-proteasas. La livipeptina, a pesar de su similitud con la leupeptina, inhibió a la papaína (cistein-proteasa), mientras que la leupeptina inhibe también serín-proteasas como la tripsina. La caracterización del espectro de inhibición de la livipeptina ayudaría a entender más sobre los blancos a los que inhibe, sobre todo entre proteasas humanas y de hámster (por la investigación en células CHO). Murao et al.

realizaron un barrido probando la tiolstatina con diferentes proteasas, la cual tiene la misma estructura que la livipeptina, pero fue encontrada en cultivos de *B. cereus*. En el estudio, es claro que la livipeptina inhibe mejor a la papaína que a la tripsina (ID<sub>50</sub> papaína: 0.71 µg vs ID<sub>50</sub> tripsina: 3.7 µg) (Muraio et al., 1985).

## 9. Productos generados

Se publicó el siguiente artículo con resultados experimentales que cubren más del 90 por ciento de la tesis (ver anexo 11.2):

- Guadarrama-Pérez, V., Aguilar, C., Porras-Sanjuanico, A., Merino, E., Ramírez, O. T., Barona-Gómez, F., & Palomares, L. A. (2024). Expression in CHO cells of a bacterial biosynthetic pathway producing a small non-ribosomal peptide aldehyde prevents proteolysis of recombinant proteins. *Metabolic Engineering*, 82, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2024.01.005>

La experiencia de haber ejecutado diferentes métodos de análisis durante este proyecto, ayudó a la actualización de Procedimientos Normalizados de Operación (PNOs) del laboratorio GPR, los cuales son útiles para la labor científica de nuestro grupo de investigación. Los PNOs en los que se trabajó fueron (su consulta está restringida para miembros autorizados del GPR):

- Guadarrama, V., Gutiérrez, M., & García, E. A. (2022a). PNO-BM-005. Extracción y purificación de RNA total de células de mamífero (células CHO). *Grupo de Investigación Palomares-Ramírez. IBt-UNAM*, 1–12.
- Guadarrama, V., Gutiérrez, M., & García, E. A. (2022b). PNO-BM-006. Limpieza de RNA usando el kit Turbo DNA Free™. *Grupo de Investigación Palomares-Ramírez. IBt-UNAM*, 1–10.
- Guadarrama, V., Gutiérrez, M., & García, E. A. (2022c). PNO-BM-009. Síntesis de cDNA a partir de RNA total. *Grupo de Investigación Palomares-Ramírez. IBt-UNAM*, 1–16.
- Guadarrama, V., Pastor, A. R., & García, E. A. (2022a). PNO-BM-001. Cuantificación de ácidos nucleicos mediante Nanodrop. *Grupo de Investigación Palomares-Ramírez. IBt-UNAM*, 1–8.
- Guadarrama, V., Pastor, A. R., & García, E. A. (2022b). PNO-BM-002. Electroforesis-ADN-geles-agarosa. *Grupo de Investigación Palomares-Ramírez. IBt-UNAM*, 1–16.
- Guadarrama, V., Pastor, A. R., & García, E. A. (2022c). PNO-BM-007. Electroforesis desnaturante de RNA en gel de agarosa al 1.2%. *Grupo de Investigación Palomares-Ramírez. IBt-UNAM*, 1–16.
- Guadarrama, V., Pastor, A. R., & García, E. A. (2022d). PNO-BM-021. Electroforesis desnaturante de agarosa al 1.2% con hipoclorito de sodio al 1.0% para analizar la integridad del RNA. *Grupo de Investigación Palomares-Ramírez. IBt-UNAM*, 1–13.
- Pérez, A. U., Pastor, F. A. R., & García, E. A. (2022). PNO-PRD-028. Uso del microscopio NIKON TE300 y adquisición de imágenes digitales de campo claro y de epifluorescencia. *Grupo de Investigación Palomares-Ramírez. IBt-UNAM*, 1–13.

### 9.1 Congresos y estancias.

- Estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Francisco Barona de Evolución de la Diversidad Metabólica del Cinvestav UGA-Langebio, Irapuato, Mex. Agosto del 2017 y agosto-noviembre del 2019.

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Título abreviado: “Producción de un péptido aldehídico bacteriano en cultivos de células animales”

- Asistencia y participación en el Curso y Taller “Cell and animal models for drug discovery” en el Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay del 16 al 27 de octubre del 2017 con el trabajo “Production of a small peptide aldehyde of bacterial origin”.
- Asistencia y participación en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en León Guanajuato, Méx. Del 23 al 28 de junio de 2019 con el trabajo “Diseño de una estrategia para la producción de un péptido inhibidor de proteasas en cultivos bacterianos”.
- Asistencia y participación en el XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en modo virtual, del 27 al 1 de octubre de 2021 con el trabajo “La expresión de una ruta biosintética bacteriana en células CHO produce un péptido no-ribosomal que previene la proteólisis de una proteína recombinante”.

9.2 Otras actividades realizadas durante el doctorado.

Se cumplieron con 8 actividades académicas obligatorias para el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, las cuales se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 22. Actividades académicas cursadas y aprobadas durante el doctorado.

Semestre	Actividad	Cede o lugar	Responsable
Primero	Biología molecular	IBt – UNAM	Dr. Víctor Bustamante
Segundo	Unix y R para principiantes	CCG – UNAM	M. en C. Romualdo Sayas
Tercero	Biología sintética	CCG – UNAM	Dr. José Utrilla
Cuarto	Escritura de artículo de revisión	Trabajo independiente – vía remota	Dra. Norma Valdez y Dr. Víctor Bermúdez
Quinto	Fisiología bacteriana	CCG – UNAM	Dr. Michael Dunn
Sexto	Estancia de investigación de 3 meses en Langebio	Langebio, Cinvestav. Irapuato	Dr. Francisco Barona
Séptimo	Curso de R para bioinformática	IBt – vía remota	Dra. Leticia Vega
Octavo	Curso de escritura académica “Academic writing”, para escribir el artículo experimental a publicar	Instituto de Investigaciones Biomédicas – vía remota-	Dra. Martha Legorreta

También se realizaron otras actividades académicas como:

- 2018. Asesoramiento y guía de la estancia de verano del Ing. Jorge Gaxiola del Instituto Tecnológico de Sonora durante el 9 de julio al 23 de agosto de 2018.
- Participación eventos científicos:
  - 2018. Participación como voluntario en evento de "Puertas abiertas del IBt-UNAM".
  - 2019 y 2022. Evaluación de proyectos científicos de nivel primaria-secundaria-preparatoria del programa adopta un talento (feria presencial de ciencias PAUTA).
  - 2018 y 2019. Participación como ponente en talleres de divulgación científica sobre "Virus y vacunas" impartido a niños de primaria y secundaria, y padres de familia. 2018 y 2019.
- 2016, 2018, 2021 y 2023. Participación como ponente en el diplomado virtual para la actualización y entrenamiento de la Facultad de Farmacia de la UAEM con el tópico "Control de calidad de productos biotecnológicos".
- 2021-2022. Participación en el grupo de apoyo para la salud mental, "Héroes Universitarios – IBt- UNAM". Se escribió y publicó el artículo por Guadarrama-Pérez et al., (2022).
- 2021-2022. Participación en proyectos de investigación relacionados con la industria donde se colaboró:
  - Auditando, editando y rescribiendo PNOs del área de biología molecular.
  - En la producción y caracterización de proteínas virales.

## 10. Referencias

- Aaij, C., & Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 269(2), 192–200. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(72\)90426-1](https://doi.org/10.1016/0005-2787(72)90426-1)
- ACTGene, I. (2016). *HydraGreen™ Safe DNA Dye, 20,000X in Water*. <http://actgene.com/wp-content/uploads/2017/09/HydrGreen-Protocol-2016.pdf>
- Aguilar, C., Verdel-Aranda, K., Ramos-Aboites, H. E., Licona-Cassani, C., & Barona-Gómez, F. (2023). Streptomyces lividans 66 produces a protease inhibitor via a tRNA-utilizing enzyme interacting with a C-minus NRPS. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 50(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad021>
- Alhuthali, S., & Kontoravdi, C. (2022). Population balance modelling captures host cell protein dynamics in CHO cell cultures. *PLoS ONE*, 17(3), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265886>
- Ali, I., Gupta, V. K., Aboul-Enein, H. Y., Singh, P., & Sharma, B. (2007). Role of racemization in optically active drugs development. *Chirality*, 19(6), 453–463. <https://doi.org/10.1002/chir.20397>
- Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K., Kondo, S., Hamada, M., Maeda, K., & Umezawa, H. (1969). Leupeptins, new protease inhibitors from actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 22(6), 283–286. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.22.283>
- Aranda, P. S., Lajoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *NIH Public Access*, 33(2), 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Assenberg, R., Wan, P. T., Geisse, S., & Mayr, L. M. (2013). Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.03.008>
- Bee, J. S., Tie, L., Johnson, D., Dimitrova, M. N., Jusino, K. C., & Afdahl, C. D. (2015). Trace levels of the CHO host cell protease cathepsin D caused particle formation in a monoclonal antibody product. *Biotechnology Progress*, 31(5), 1360–1369. <https://doi.org/10.1002/btpr.2150>
- Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R., & Cullen, B. R. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*, 66(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90219-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90219-3)
- Bertram, R., & Hillen, W. (2008). The application of Tet repressor in prokaryotic gene regulation and expression. *Microbial Biotechnology*, 1(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00001.x>
- Bielser, J.-M., Chappuis, L., Xiao, Y., Souquet, J., Broly, H., & Morbidelli, M. (2019). Perfusion cell culture for the production of conjugated recombinant fusion proteins reduces clipping and quality heterogeneity compared to batch-mode processes. *Journal of Biotechnology*, 302, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.06.006>
- Bolinteanu, D. S., Volzing, K., Vivcharuk, V., Sayyed-Ahmad, A., Srivastava, P., & Kaznessis, Y. N. (2014). Investigation of changes in tetracycline repressor binding upon mutations in the tetracycline operator. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 59(10), 3167–3176. <https://doi.org/10.1021/jc500225x>
- Bond, J. S. (2019). Proteases: history, discovery, and roles in health and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 294(5), 1643–1651. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004156>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brayer, G. D., Delbaere, L. T. J., James, M. N. G., Bauer, C.-A., & Thompson, R. C. (1979). Crystallographic and kinetic investigations of the covalent complex formed by a specific tetrapeptide aldehyde and the serine protease from Streptomyces griseus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 96–100. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.96>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Chapter Thirteen - Coomassie Blue Staining. *Methods in Enzymology*, 541, 161–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6>
- Bryan, L., Henry, M., Kelly, R. M., Frye, C. C., Osborne, M. D., Clynes, M., & Meleady, P. (2021). Mapping the molecular basis for growth related phenotypes in industrial producer CHO cell lines using differential proteomic analysis. *BMC Biotechnology*, 21(43), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00704-8>

- Bulté, D. B., Palomares, L. A., Parra, C. G., Martínez, J. A., Contreras, M. A., Noriega, L. G., & Ramírez, O. T. (2020). Overexpression of the mitochondrial pyruvate carrier reduces lactate production and increases recombinant protein productivity in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *117*(9), 2633–2647. <https://doi.org/10.1002/bit.27439>
- Cai, C. X., Schneck, N. A., Zhao, W., Blackstock, D., Cai, J., Harris, D., Ivleva, V. B., Gollapudi, D., Horwitz, J., Arnold, F. J., Cooper, J. W., & Lei, Q. P. (2019). Characterization of AEBSF-antibody modifications for a protease inhibitor supplementation strategy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(23), 6111–6118. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01995-9>
- Cervera, L., Gutiérrez-Granados, S., Berrow, N. S., Segura, M. M., & Gòdia, F. (2014). Extended gene expression by medium exchange and repeated transient transfection for recombinant protein production enhancement. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(5), 934–936. <https://doi.org/10.1002/bit.25503>
- Chakrabarti, S., Barrow, C. J., Kanwar, R. K., Ramana, V., & Kanwar, J. R. (2016). Studies to prevent degradation of recombinant Fc-fusion protein expressed in mammalian cell line and protein characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(903), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms17060913>
- Chan, C. P. (2019). *Critical quality attributes assessment and testing strategy for biotherapeutics development*. American Pharmaceutical Review. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/359768-Critical-Quality-Attributes-Assessment-and-Testing-Strategy-for-Biotherapeutics-Development/>
- Chen, Y., McClure, R. A., Zheng, Y., Thomson, R. J., & Kelleher, N. L. (2013). Proteomics guided discovery of flavopeptins: anti-proliferative aldehydes synthesized by a reductase domain-containing non-ribosomal peptide synthetase. *Journal of the American Chemical Society*, *135*, 10449–10456. <https://doi.org/10.1021/ja4031193>
- Cheng-Gang, L., Mei-cai, Z., & Zhi-nan, C. (1999). Preparation and purification of F(ab')<sub>2</sub> fragment from anti hepatoma mouse IgG1 mAb. *World Journal of Gastroenterology*, *5*(6), 522–524. <https://doi.org/10.3748/wjg.v5.i6.522>
- Clarke, C., Gallagher, C., Kelly, R. M., Henry, M., Meleady, P., Frye, C. C., Osborne, M. D., Brady, C. P., Barron, N., & Clynes, M. (2019). Transcriptomic analysis of IgG4 Fc-fusion protein degradation in a panel of clonally-derived CHO cell lines using RNASeq. *Biotechnology and Bioengineering*, *116*(6), 1556–1562. <https://doi.org/10.1002/bit.26958>
- Clincke, M., Guedon, E., Yen, F. T., Ogier, V., & Goergen, J. (2011). Characterization of metalloprotease and serine protease activities in batch CHO cell cultures: control of human recombinant IFN- $\gamma$  proteolysis by addition of iron citrate. *BMC Proceedings*, *5*(Suppl 8), P115. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P115>
- Cohen, S. L., Price, C., & Vlasak, J. (2007).  $\beta$ -Elimination and peptide bond hydrolysis: two distinct mechanisms of human IgG1 hinge fragmentation upon storage. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(22), 6976–6977. <https://doi.org/10.1021/ja0705994>
- Coulet, M., Kepp, O., Kroemer, G., & Basmaciogullari, S. (2022). Metabolic profiling of CHO cells during the production of biotherapeutics. *Cells*, *11*(1929), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cells11121929>
- Cruz-Morales, P., Barona-Gómez, F., & Ramos-Aboites, H. (2018). *Genetic system for producing a proteases inhibitor of a small peptide aldehyde type* (Patent No. US20180265545A1). <https://patents.google.com/patent/US20180265545A1/en>
- Cruz-Morales, P., Vijgenboom, E., Iruegas-Bocardo, F., Girard, G., Yáñez-Guerra, L. A., Ramos-Aboites, H. E., Pernodet, J.-L., Anné, J., Van Wezel, G. P., & Barona-Gómez, F. (2013). The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. *Genome Biology and Evolution*, *5*(6), 1165–1175. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt082>
- Cui, T., Chi, B., Thompson, J. H., Kasali, T., Sellick, C., & Turner, R. (2019). Cathepsin D: Removal strategy on protein A chromatography, near real time monitoring and characterisation during monoclonal antibody production. *Journal of Biotechnology*, *305*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.08.013>
- Curling, E. M. A., Hayter, P. M., Baines, A. J., Bull, A. T., Gull, K., Strange, P. G., & Jenkins, N. (1990). Recombinant human interferon-gamma. Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture. *Biochemical Journal*, *272*, 333–337. <https://doi.org/10.1042/bj2720333>

- Dadouch, M., Ladner, Y., & Perrin, C. (2021). Analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis: sample preparation, separation, and detection. *Separation*, 8(4), 1–30. <https://doi.org/10.3390/separations8010004>
- Davis, T. R., Trotter, K. M., Granados, R. R., & Wood, H. A. (1992). Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. *Bio/Technology*, 10(10), 1148–1150. <https://doi.org/10.1038/nbt1092-1148>
- Dorai, H., & Ganguly, S. (2014). Mammalian cell-produced therapeutic proteins: heterogeneity derived from protein degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.07.007>
- Dorai, H., Santiago, A., Campbell, M., Tang, Q. M., Lewis, J. M., Wang, Y., Lu, Q.-Z., Wu, S.-L., & Hancock, W. (2011). Characterization of the proteases involved in the N-terminal clipping of glucagon-like-peptide-1-antibody fusion proteins. *Biotechnology Progress*, 27(1), 220–231. <https://doi.org/10.1002/btpr.537>
- Doug, W., Delauriere, L., & Schagat, T. (2022). *Methods of RNA Quality Assessment*. Promega Corporation. <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/#abstract>
- Duvaud, S., Gabella, C., Lisacek, F., Stockinger, H., Ioannidis, V., & Durinx, C. (2021). Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W216–W227. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab225>
- Ebrahimi, S. B., & Samanta, D. (2023). Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design. *Nature Communications*, 14(1), 2411. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38039-x>
- Eon-Duval, A., Broly, H., & Gleixner, R. (2012). Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnology Progress*, 28(3), 608–622. <https://doi.org/10.1002/btpr.1548>
- Faraji, F., Karjoo, Z., Moghaddam, M. V., Heidari, S., Eameh, R. Z., & Falak, R. (2018). Challenges related to the immunogenicity of parenteral recombinant proteins: underlying mechanisms and new approaches to overcome it. *International Reviews of Immunology*, 37(6), 301–315. <https://doi.org/10.1080/08830185.2018.1471139>
- Fritz, K. S., & Petersen, D. R. (2013). An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 59, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.025>
- Fukuda, N., Senga, Y., & Honda, S. (2019). Anxa2- and Ctsd-knockout CHO cell lines to diminish the risk of contamination with host cell proteins. *Biotechnology Progress*, 35(4), e2820. <https://doi.org/10.1002/btpr.2820>
- Gao, S. X., Zhang, Y., Stansberry-Perkins, K., Buko, A., Bai, S., Nguyen, V., & Brader, M. L. (2011). Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 977–982. <https://doi.org/10.1002/bit.22982>
- Geng, S. L., Zhao, X.-J., Zhang, X., Zhang, J. H., Mi, C. L., & Wang, T. Y. (2024). Recombinant therapeutic proteins degradation and overcoming strategies in CHO cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(182), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13008-6>
- Gilgunn, S., El-sabbahy, H., Albrecht, S., Gaikwad, M., Corrigan, K., Deakin, L., Jellum, G., & Bones, J. (2019). Identification and tracking of problematic host cell proteins removed by a synthetic, highly functionalized nonwoven media in downstream bioprocessing of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*, 1595, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.056>
- Goldman, M. H., James, D. C., Ison, A. P., & Bull, A. T. (1997). Monitoring proteolysis of recombinant human interferon- $\gamma$  during batch culture of Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology*, 23, 103–111. <https://doi.org/10.1023/A:1007947130709>
- Gomez, N., Lull, J., Yang, X., Wang, Y., Zhang, X., Wieczorek, A., Harrahy, J., Pritchard, M., Martínez, D. C., Shearer, M., & Goudar, C. (2020). Improving product quality and productivity of bispecific molecules through the application of continuous perfusion principles. *Biotechnology Progress*, 36(4), e2973. <https://doi.org/10.1002/btpr.2973>
- Gronemeyer, P., Ditz, R., & Strube, J. (2014). Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. *Bioengineering*, 1(4), 188–212. <https://doi.org/10.3390/bioengineering1040188>
- Guadarrama-Pérez, V. (2021). *Plásmidos VGP en Drive (Respaldo\_VioletaGP)*. Google Drive. [https://drive.google.com/drive/folders/1K097A2sMxc4\\_oqG12kyReecukWwRozUg?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1K097A2sMxc4_oqG12kyReecukWwRozUg?usp=sharing)
- Guadarrama-Pérez, V., Aguilar, C., Porrás-Sanjuanico, A., Merino, E., Ramírez, O. T., Barona-Gómez, F., & Palomares,

- L. A. (2024). Expression in CHO cells of a bacterial biosynthetic pathway producing a small non-ribosomal peptide aldehyde prevents proteolysis of recombinant proteins. *Metabolic Engineering*, 82, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2024.01.005>
- Guadarrama-Pérez, V., Sánchez-Guevara, Y., Salcedo, M., Velasco, D., García, D., & Treviño, C. (2022). La salud en nuestra comunidad: el "Proyecto Héroes Universitarios" donde Mi salud también es mental. *Biología En Movimiento. Revista de Divulgación Del Instituto de Biología de La UNAM*, 31–4(Octubre-Diciembre), 1–7. [https://biotecmov.ibt.unam.mx/numeros/31/PDFs/bm\\_31\\_4.pdf](https://biotecmov.ibt.unam.mx/numeros/31/PDFs/bm_31_4.pdf)
- Haspel, J., Shaik, R. S., Ifedigbo, E., Nakahira, K., Dolinay, T., Englert, J. A., & Choi, A. M. K. (2011). Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay. *Autophagy*, 7(6), 629–642. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.15100>
- Henry, M., Gallagher, C., Kelly, R. M., Frye, C. C., Osborne, M. D., Brady, C. P., Barron, N., Clynes, M., & Meleady, P. (2018). Clonal variation in productivity and proteolytic clipping of an Fc-fusion protein in CHO cells: Proteomic analysis suggests a role for defective protein folding and the UPR. *Journal of Biotechnology*, 281, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.018>
- Hermeling, S., Crommelin, D. J. A., Schellekens, H., & Jiskoot, W. (2004). Structure-Immunogenicity Relationships of Therapeutic Proteins. *Pharmaceutical Research*, 21(6), 897–903. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000029275.41323.a6>
- Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., & Friess, W. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 100, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.005>
- Hishinuma, S., Komazaki, H., Tsukamoto, H., Hatahara, H., Fukui, H., & Shoji, M. (2018). Ca<sup>2+</sup>-dependent down-regulation of human histamine H1 receptors in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Neurochemistry*, 144(1), 68–80. <https://doi.org/10.1111/jnc.14245>
- Hu, L., Liu, S., Xia, L., Cong, X., Xu, C., Wang, L., & Li, Y. (2022). CHO cathepsin B identified as the protease responsible for a target bispecific antibody fragmentation. *Protein Expression and Purification*, 199, 106144. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106144>
- Hu, L., Tang, J., Zhang, X., & Li, Y. (2021). Sodium caprylate wash during Protein A chromatography as an effective means for removing protease(s) responsible for target antibody fragmentation. *Protein Expression and Purification*, 186, 105907. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105907>
- Huo, L., Hug, J. J., Fu, C., Bian, X., Zhang, Y., & Müller, R. (2019). Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. *Natural Product Reports*, 36(10), 1412–1436. <https://doi.org/10.1039/c8np00091c>
- Hussain, H., Maldonado-Agurto, R., & Dickson, A. J. (2014). The endoplasmic reticulum and unfolded protein response in the control of mammalian recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 36, 1581–1593. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1537-y>
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)
- Invitrogen. (2012). *pVAX1™*. Invitrogen User Guide. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pvax1\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pvax1_man.pdf)
- Ishikiori, T., Kawahara, F., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., & Umezawa, H. (1984). Production of acetyl-L-leucyl-L-argininal, inhibitor of dipeptidyl aminopeptidase III by bacteria. *The Journal of Antibiotics*, 37(6), 680–681. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.680>
- Jahn, M., Jahn, D., Wünschiers, R., Ries, S., & Dersch, P. (2012). Protein Biosynthesis, Modifications and Degradation. In G. Michal & D. Schomburg (Eds.), *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 210–260). <https://doi.org/10.1002/9781118657072.ch4>
- Kamiyama, T., Umino, T., Nakamura, Y., Iteazono, Y., Sawairi, S., Satoh, T., & Yokose, K. (1994). Bacithrocin A, B and C, novel thrombin inhibitors. *The Journal of Antibiotics*, 47(9), 959–968. <https://doi.org/https://doi.org/10.7164/antibiotics.47.959>
- Katz, A., Elgamal, S., Rajkovic, A., & Ibba, M. (2016). Non-canonical roles of tRNAs and tRNA mimics in bacterial cell

- biology. *Molecular Microbiology*, 101(4), 545–558. <https://doi.org/10.1111/mmi.13419>
- Kim, C. L., Bang, Y. L., Kim, Y. S., Jang, J. W., & Lee, G. M. (2016). Alleviation of proteolytic degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-4 by repeated batch culture of Chinese hamster ovary cells. *Process Biochemistry*, 51(8), 1078–1084. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.007>
- Kim, J. H., Komatsu, M., Shin-ya, K., Omura, S., & Ikeda, H. (2018). Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in Actinomycetales microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(26), 6828–6833. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800715115>
- Kinman, A. W. L., & Pompano, R. R. (2019). Optimization of enzymatic antibody fragmentation for yield, efficiency and binding affinity. *Bioconjugate Chemistry*, 30(3), 800–807. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00912>
- Knight, T. J., Povey, J. F., Vito, D., Mohindra, A., Jaques, C. M., & Smales, C. M. (2022). Manipulation of mRNA translation elongation influences the fragmentation of a biotherapeutic Fc-fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(12), 3408–3420. <https://doi.org/10.1002/bit.28230>
- Knight, T. J., Turner, S., Jaques, C. M., & Smales, C. M. (2021). Selection of CHO host and recombinant cell pools by inhibition of the proteasome results in enhanced product yields and cell specific productivity. *Journal of Biotechnology*, 337, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.06.019>
- Kol, S., Ley, D., Wulff, T., Decker, M., Arnsdorf, J., Schoffelen, S., Hansen, A. H., Jensen, T. L., Gutierrez, J. M., Chiang, A. W. T., Masson, H. O., Palsson, B. O., Voldborg, B. G., Pedersen, L. E., Kildegaard, H. F., Lee, G. M., & Lewis, N. E. (2020). Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity. *Nature Communications*, 11(1), 1908. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15866-w>
- Kumar, N., Gammell, P., & Clynes, M. (2007). Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture: a summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. *Cytotechnology*, 53, 33–46. <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9047-6>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- LaLonde, J. M., Zhao, B., Smith, W. W., Janson, C. A., Desjarlais, R. L., Tomaszek, T. A., Carr, T. J., Thompson, S. K., Oh, H., Yamashita, D. S., Veber, D. F., & Abdel-Meguid, S. S. (1998). Use of papain as a model for the structure-based design of cathepsin K inhibitors: crystal structures of two papain-inhibitor complexes demonstrate binding to S'-subsites. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(23), 4567–4576. <https://doi.org/10.1021/jm980249f>
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., & Walsh, C. T. (1996). A new enzyme transferases superfamily - the phosphopantetheinyl. *Chemistry and Biology*, 3(11), 923–936. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(96\)90181-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(96)90181-7)
- Laux, H., Romand, S., Nuciforo, S., Farady, C. J., Tapparel, J., Buechmann-Moeller, S., Sommer, B., Oakeley, E. J., & Bodendorf, U. (2018). Degradation of recombinant proteins by Chinese hamster ovary host cell proteases is prevented by matriptase-1 knockout. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(10), 2530–2540. <https://doi.org/10.1002/bit.26731>
- Lavoie, R. A., Fazio, A., Blackburn, R. K., Goshe, M. B., Carbonell, R. G., & Menegatti, S. (2019). Targeted capture of Chinese hamster ovary host cell proteins: peptide ligand discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1729. <https://doi.org/10.3390/ijms20071729>
- Lavoie, R. A., Fazio, A., Williams, T. I., Carbonell, R., & Menegatti, S. (2020). Targeted capture of Chinese hamster ovary host cell proteins: Peptide ligand binding by proteomic analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(2), 438–452. <https://doi.org/10.1002/bit.27213>
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(1), 21–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrd2399>
- Leonard, N. J., McDonald, J. J., & Reichmann, M. E. (1970). Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components, I. Adenine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67(1), 93–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.67.1.93>
- Lewis, C. A., & Wolfenden, R. (1977). Thiohemiacetal formation by inhibitory aldehydes at the active site of papain.

- Biochemistry*, 16(22), 4890–4895. <https://doi.org/10.1021/bi00641a023>
- Li, S. W., Wright, M., Healey, J. F., Hutchinson, J. M., O'Rourke, S., Mesa, K. A., Lollar, P., & Berman, P. W. (2020). Gene editing in CHO cells to prevent proteolysis and enhance glycosylation : Production of HIV envelope proteins as vaccine immunogens. *PLoS One*, 15(5), e0233866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233866>
- Li, S. W., Yu, B., Byrne, G., Wright, M., O'Rourke, S., Mesa, K., & Berman, P. W. (2019). Identification and CRISPR/Cas9 inactivation of the C1s protease responsible for proteolysis of recombinant proteins produced in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(9), 2130–2145. <https://doi.org/10.1002/bit.27016>
- Liang, K., Luo, H., & Li, Q. (2023). Enhancing and stabilizing monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary (CHO) cells with optimized perfusion culture strategies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1112349. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1112349>
- Libby, P., & Goldberg, A. L. (1978). Leupeptin, a protease inhibitor, decreases protein degradation in normal and diseased muscles. *Science*, 199(4328), 534–536. <https://doi.org/10.1126/science.622552>
- Lim, A., Doyle, B. L., Kelly, G. M., Reed-Bogan, A. M., Breen, L. H., Shamlou, P. A., & Lambooy, P. K. (2018). Characterization of a cathepsin D protease from CHO cell-free medium and mitigation of its impact on the stability of a recombinant therapeutic protein. *Biotechnology Progress*, 34(1), 120–129. <https://doi.org/10.1002/btpr.2530>
- Lipscomb, M. L., Palomares, L. A., Hernández, V., Ramírez, O. T., & Kompala, D. S. (2005). Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnology Progress*, 21(1), 40–49. <https://doi.org/10.1021/bp049761m>
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>
- López-Otín, C., & Matrisian, L. M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 800–808. <https://doi.org/10.1038/nrc2228>
- Lu, J.-T., Xiao, M.-K., Feng, Y.-Y., Wang, X.-Y., Qiu, L.-L., Chai, Y.-R., Wang, T.-Y., & Jia, Y.-L. (2023). Apilimod enhances specific productivity in recombinant CHO cells through cell cycle arrest and mediation of autophagy. *Biotechnology Journal*, 18(2), 2200147. <https://doi.org/10.1002/biot.202200147>
- Luo, H., Tie, L., Cao, M., Hunter, A. K., Pabst, T. M., Du, J., Field, R., Li, Y., & Wang, W. K. (2019). Cathepsin L causes proteolytic cleavage of Chinese-Hamster-Ovary cell expressed proteins during processing and storage: Identification, characterization, and mitigation. *Biotechnology Progress*, 35(1), e2732. <https://doi.org/10.1002/btpr.2732>
- Marinelli, F. (2009). From microbial products to novel drugs that target a multitude of disease indications. *Methods in Enzymology*, 458, 29–58. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04802-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04802-2)
- Markets and Markets. (2024). *Monoclonal Antibody Therapeutics Market*. Market-Reports. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/monoclonal-antibody-mabs-therapeutics-market-115323820.html#:~:text=The>
- Martensen, P. M., & Justesen, J. (2001). Specific inhibitors prevent proteolytic degradation of recombinant proteins expressed in High Five™ cells. *BioTechniques*, 30(4), 782–792. <https://doi.org/10.2144/01304st04>
- Mashahreh, B., Armony, S., Johansson, K. E., Chappleboim, A., Friedman, N., Gardner, R. G., Hartmann-Petersen, R., Lindorff-Larsen, K., & Ravid, T. (2022). Conserved degronome features governing quality control associated proteolysis. *Nature Communications*, 13(1), 7588. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35298-y>
- Matveev, E. V., Safronov, V. V., Ponomarev, G. V., & Kazanov, M. D. (2023). Predicting structural susceptibility of proteins to proteolytic processing. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10761. <https://doi.org/10.3390/ijms241310761>
- Maxson, T., Tietz, J. I., Hudson, G. A., Guo, X. R., Tai, H., & Mitchell, D. A. (2016). Targeting reactive carbonyls for identifying natural products and their biosynthetic origins. *Journal of the American Chemical Society*, 138(46), 15157–15166. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b06848>
- Mayer, R. J. (2000). The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2), 145–148. <https://doi.org/10.1038/35040090>

- MilliporeSigma. (2024). *Cell Counting Using a Hemocytometer*. <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-quantification>
- Minina, E. A., Moschou, P. N., & Bozhkov, P. V. (2017). Limited and digestive proteolysis: crosstalk between evolutionary conserved pathways. *New Phytologist*, *215*(3), 958–96. <https://doi.org/10.1111/nph.14627>
- Mols, J., Peeters-Joris, C., Agathos, S. N., & Schneider, Y. (2004). Origin of rice protein hydrolysates added to protein-free media alters secretion and extracellular proteolysis of recombinant interferon- $\gamma$  as well as CHO-320 cell growth. *Biotechnology Letters*, *26*, 1043–1046. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000032960.06112.31>
- Mols, J., Peeters-Joris, C., Wattiez, R., Agathos, S. N., & Schneider, Y. J. (2005). Recombinant interferon- $\gamma$  secreted by Chinese hamster ovary-320 cells cultivated in suspension in protein-free media is protected against extracellular proteolysis by the expression of natural protease inhibitors and by the addition of plant protein hydrol. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, *41*, 83–91. <https://doi.org/10.1290/0411075.1>
- Monti, B., Sparapani, M., & Contestabile, A. (1998). Differential toxicity of protease inhibitors in cultures of cerebellar granule neurons. *Experimental Neurology*, *153*(2), 335–341. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6858>
- Moorhouse, K. G., Nashabeh, W., Deveney, J., Bjork, N. S., Mulkerrin, M. G., & Ryskamp, T. (1997). Validation of an HPLC method for the analysis of the charge heterogeneity of the recombinant monoclonal antibody IDEC-C2B8 after papain digestion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *16*(4), 593–603. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(97\)00178-7](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(97)00178-7)
- Müller, M., Ausländer, S., Ausländer, D., Kemmer, C., & Fussenegger, M. (2012). A novel reporter system for bacterial and mammalian cells based on the non-ribosomal peptide indigoidine. *Metabolic Engineering*, *14*(4), 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.04.002>
- Murao, S., Shin, T., Katsu, Y., Nakatani, S., & Hirayama, K. (1985). Novel thiol proteinase inhibitor, thiolstatin, produced by a strain of *Bacillus cereus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *49*(3), 895–897. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866825>
- NC-IUBMB. (1992). *Enzyme Nomenclature*. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>
- Neitzel, J. J. (2010). Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nature Education*, *3*(9), 21. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/enzyme-catalysis-the-serine-proteases-nbsp-14398894/>
- Nguyen, M., & Zimmer, A. (2023). A reflection on the improvement of Chinese hamster ovary cell-based bioprocesses through advances in proteomic techniques. *Biotechnology Advances*, *65*, 108141. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108141>
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., & Yura, T. (1998). Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(5), 1694–1699. <https://doi.org/10.1128/aem.64.5.1694-1699.1998>
- Nishimura, Y., Kato, K., Furuno, K., & Himeno, M. (1995). Inhibitory effect of leupeptin on the intracellular maturation of lysosomal cathepsin L in primary cultures of rat hepatocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *18*(7), 945–950. <https://doi.org/10.1248/bpb.18.945>
- Noh, S. M., Shin, S., & Lee, G. M. (2018). Comprehensive characterization of glutamine synthetase-mediated selection for the establishment of recombinant CHO cells producing monoclonal antibodies. *Scientific Reports*, *8*(1), 5361. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23720-9>
- O’Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L. M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., & Butler, M. (2020). Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, *43*, 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
- Oda, K., Fukuda, Y., Murao, S., Uchida, K., & Kainosho, M. (1989). A novel proteinase inhibitor, tyrostatin, inhibiting some pepstatin-insensitive carboxyl proteinases. *Agricultural and Biological Chemistry*, *53*(2), 405–415. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869302>
- Ogura, K., Maeda, M., Nagai, M., Tanaka, T., Nomoto, K., & Murachi, T. (1985). Purification and structure of a novel cysteine proteinase inhibitor, strepin P-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, *49*(3), 799–805.

<https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866780>

- Okura, A., Morishima, H., Takita, T., Aoyagi, T., Takeuchi, T., & Umezawa, H. (1975). The structure of elastatinal, an elastase inhibitor of microbial origin. *The Journal of Antibiotics*, 28(4), 337–339. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.337>
- Olczak, M., & Szulc, B. (2021). Modified secreted alkaline phosphatase as an improved reporter protein for N-glycosylation analysis. *PLoS ONE*, 16(5), e0251805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251805>
- Orhan, Y. D., Dede, A. F. Ü., Duran, Ş., & Arslanyolu, M. (2024). Use of E-64 cysteine protease inhibitor for the recombinant protein production in *Tetrahymena thermophila*. *European Journal of Protistology*, 94, 126085. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2024.126085>
- Palomares, L. A., Kuri-breña, F., & Ramírez, O. T. (2002). Industrial recombinant protein production. *The Encyclopedia of Life Support Systems*, 6(3.8). <https://www.eolss.net/sample-chapters/C17/E6-58-05-07.pdf>
- Park, J. H., Jin, J. H., Lim, M. S., An, H. J., Kim, J. W., & Lee, G. M. (2017). Proteomic analysis of host cell protein dynamics in the culture supernatants of antibody-producing CHO cells. *Scientific Reports*, 7(1), 44246. <https://doi.org/10.1038/srep44246>
- Paul, A. J., Handrick, R., Ebert, S., & Hesse, F. (2018). Identification of process conditions influencing protein aggregation in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(5), 1173–1185. <https://doi.org/10.1002/bit.26534>
- Pavlou, A. K., & Reichert, J. M. (2004). Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1513–1519. <https://doi.org/10.1038/nbt1204-1513>
- Peppard, J. V., & Knap, A. K. (1999). Effect of selective and non-selective cysteine protease inhibitors on the intracellular processing of interleukin 6 by HepG2 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 35, 459–464. <https://doi.org/10.1007/s11626-999-0052-2>
- Pérez-Rodríguez, S., Wulff, T., Voldborg, B. G., Altamirano, C., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2021). Compartmentalized proteomic profiling outlines the crucial role of the classical secretory pathway during recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells. *ACS Omega*, 6(19), 12439–12458. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c06030>
- Pohlscheidt, M., Kiss, R., & Gottschalk, U. (2018). An introduction to „ recent trends in the biotechnology Industry: development and manufacturing of recombinant antibodies and proteins “. In *New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins* (Vol. 165, pp. 1–8). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/10\\_2017\\_39](https://doi.org/10.1007/10_2017_39)
- Praznik, A., Fink, T., Franko, N., Lonziari, J., Bencina, M., Jerala, N., Plaper, T., Roskar, S., & Jerala, R. (2022). Regulation of protein secretion through chemical regulation of endoplasmic reticulum retention signal cleavage. *Nature Communications*, 13(1323), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28971-9>
- Precedence Research. (2023). *Recombinant proteins market - global industry analysis, size, share, growth, trends, regional outlook, and forecast 2023-2032*. <https://www.precedenceresearch.com/recombinant-proteins-market>
- Puetz, J., & Wurm, F. M. (2019). Recombinant proteins for industrial versus pharmaceutical purposes: a review of process and pricing. *Processes*, 7(8), 476. <https://doi.org/10.3390/pr7080476>
- Qiagen. (2019). *RNeasy® Mini Handbook*. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
- QIAGEN. (2015). *RNAProtect® bacteria reagent handbook*. QIAGEN 2013–24. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=420ecb63-edb0-4cc6-8f40-22a5b3d20bad&lang=en>
- Qin, Y., Ma, R., Li, Y., Li, Y., Chen, G., & Zhou, W. (2022). Productivity and quality improvement for a symmetric bispecific antibody through the application of intensified perfusion cell culture. *Antibody Therapeutics*, 5(2), 111–120. <https://doi.org/10.1093/abt/tbac009>
- Quesada, V., Ordóñez, G. R., Sánchez, L. M., Puente, X. S., & López-Otín, C. (2009). The degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl\_1), 239–243. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn570>

- RAE. (2024). *Rendimiento, definición*. Real Academia Española. <https://dle.rae.es/rendimiento>
- Raju, S. T. (2019). Proteolysis of Proteins. In *Co-and Post-Translational Modifications of Therapeutic Antibodies and Proteins* (pp. 183–202). Wiley Online Library. <https://doi.org/10.1002/9781119053354.ch15>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Rhyner, M., Prestigiacomo, G., Kumar, K., & Lee, L. (2024). *Cellular Analysis using the Coulter Principle. Measurement with Great Accuracy and Speed*. Beckman Coulter Life Sciences. <https://www.mybeckman.ca/resources/reading-material/application-notes/cellular-analysis-using-the-coulter-principle>
- RIS. (2021). *Reglamento de Insumos para la Salud (RIS)*. Gobierno de México, DOF-31-05-2021. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/pdf/wo88318.pdf>
- Robert, F., Bierau, H., Rossi, M., Aguiaro, D., Soranzo, T., Broly, H., & Mitchell-Logean, C. (2009). Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: identification of a CHO cathepsin D protease. *Biotechnology and Bioengineering*, *104*(6), 1132–1141. <https://doi.org/10.1002/bit.22494>
- Rodríguez, M. (2014). *Estudio de la internalización en células de mamífero de nanotubos formados por la VP6 de rotavirus: explorando el camino hacia un nuevo sistema de entrega de material genético* [Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2014/mayo/0713170/index.html>
- Rudge, S. R., & Ladisch, M. R. (2020). Industrial challenges of recombinant proteins. *Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology*, *171*, 1–22. [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_120](https://doi.org/10.1007/10_2019_120)
- Rudzinska, M., Parodi, A., Maslova, V. D., Efremov, Y. M., Gorokhovets, N. V., Makarov, V. A., Popkov, V. A., Golovin, A. A., Zernii, E. Y., & Zamyatnin, A. A. (2020). Cysteine cathepsins inhibition affects their expression and human renal cancer cell phenotype. *Cancers*, *12*(5), 1310. <https://doi.org/10.3390/cancers12051310>
- Ryan, B. J. (2011). Avoiding proteolysis during protein chromatography. In *Protein Chromatography: Methods and Protocols* (Vol. 681, pp. 61–71). [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_4)
- Ryan, B. J., & Henehan, G. T. (2013). Overview of approaches to preventing and avoiding proteolysis during expression and purification of proteins. *Current Protocols in Protein Science*, *71*(1), 5–25. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0525s71>
- Ryan, B. J., & Henehan, G. T. (2017). Avoiding proteolysis during protein purification. In D. Walls & S. T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography: Methods and Protocols* (pp. 53–69). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_4)
- Saito, M., Kawaguchi, N., Hashimoto, M., Kodama, T., Higuchi, N., Tanaka, T., Nomoto, K., & Murachi, T. (1987). Purification and structure of novel cysteine proteinase inhibitors, staccopins P1 and P2, from *Staphylococcus tanabeensis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *51*(3), 861–968. <https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868093>
- Sandberg, H., Lütkemeyer, D., Kuprin, S., Wrangel, M., Almstedt, A., Persson, P., Ek, V., & Mikaelsson, M. (2006). Mapping and partial characterization of proteases expressed by a CHO production cell line. *Biotechnology and Bioengineering*, *95*(5), 961–971. <https://doi.org/10.1002/bit.21057>
- Sathyamurthy, M., Kim, C. L., Bang, Y. L., Kim, Y. S., Jang, J. W., & Lee, G. M. (2015). Characterization and expression of proprotein convertases in CHO cells: efficient proteolytic maturation of human bone morphogenetic protein-7. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(3), 560–568. <https://doi.org/10.1002/bit.25458>
- Schauer, N., Dinc, M., Raabe, B., Hummel, T., Müller, M., Sobek, H., & Mizaiakoff, B. (2018). Selective binding of matrix metalloproteases MMP-9 and MMP-12 to inhibitor-assisted thermolysin-imprinted beads. *RSC Advances*, *8*(57), 32387–32394. <https://doi.org/10.1039/c8ra04444a>
- Schellenberg, J., Ruhl, S., Bahnemann, J., Wohlenberg, O. J., Scheper, T., & Solle, D. (2022). Stress-induced increase of monoclonal antibody production in CHO cells. *Engineering in Life Sciences*, *22*(5), 427–436. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100062>
- Schlumbohm, W., Stein, T., Ullrich, C., Vater, J., Krause, M., Marahiel, M. A., Krufft, V., & Wittmann-Liebold, B. (1991). An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S

- synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), 23135–23141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54473-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54473-2)
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering. Basic Concepts* (Second). Prentice Hall International, Englewood Cliffs. [https://www.eng.uc.edu/~beaucag/Courses/ChEThermoBeaucage/Books/Michael L. Shuler, Fikret Kargi - Bioprocess Engineering\\_ Basic Concepts-Prentice Hall \(2001\).pdf](https://www.eng.uc.edu/~beaucag/Courses/ChEThermoBeaucage/Books/Michael L. Shuler, Fikret Kargi - Bioprocess Engineering_ Basic Concepts-Prentice Hall (2001).pdf)
- Siewers, V., Chen, X., Huang, L., Zhang, J., & Nielsen, J. (2009). Heterologous production of non-ribosomal peptide LLD-ACV in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 11(6), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.08.002>
- Sigma-Aldrich, M. (2022). *Leupeptin, product description*. SigmaAldrich.Com. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/127/263/l8511pis-mk.pdf>
- Singh, N., Vayer, P., Tanwar, S., Poyet, J., Tsaioun, K., & Villoutreix, B. O. (2023). Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups. *Frontiers in Drug Discovery*, 3, 1201419. <https://doi.org/10.3389/fddsv.2023.1201419>
- Strohl, W. R. (2018). Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein & Cell*, 9(1), 86–120. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0457-8>
- Suda, H., Aoyagi, T., Hamada, M., Takeuchi, T., & Umezawa, H. (1972). Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *The Japanese Journal of Antibiotics*, 25(4), 263–265. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.25.263>
- Taghavi, M., Parham, A., Dehghani, H., & Naderi-Meshkin, H. (2021). Optimizing lipofectamine LTX complex and G-418 concentration for improvement of transfection efficiency in human mesenchymal stem cells. *Archives of Razi Institute*, 76(5), 1315–1325. <https://doi.org/10.22092/ARI.2021.354659.1645>
- Tang, Y., Cain, P., Anguiano, V., Shih, J. J., Chai, Q., & Feng, Y. (2021). Impact of IgG subclass on molecular properties of monoclonal antibodies. *MAbs*, 13(1), 1993768. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1993768>
- Tannous, B. A., & Teng, J. (2011). Secreted blood reporters: insights and applications. *Biotechnol Adv*, 29(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>
- Tiburzi, F., Visca, P., & Imperi, F. (2007). Do nonribosomal peptide synthetases occur in higher Eukaryotes? *IUBMB Life*, 59(11), 730–733. <https://doi.org/10.1080/15216540601055349>
- Tietze, A., Shi, Y., Kronenwerth, M., & Bode, H. B. (2020). Nonribosomal peptides produced by minimal and engineered synthetases with terminal reductase domains. *ChemBioChem*, 21(19), 2750–2754. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000176>
- Torkashvand, F., & Vaziri, B. (2017). Main quality attributes of monoclonal antibodies and effect of cell culture components. *Iranian Biomedical Journal*, 21(3), 131–141. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijb.21.3.131>
- Torres, M., Akhtar, S., McKenzie, E. A., & Dickson, A. J. (2021). Temperature down-shift modifies expression of UPR-/ERAD-related genes and enhances production of a chimeric fusion protein in CHO cells. *Biotechnology Journal*, 16(2), 2000081. <https://doi.org/10.1002/biot.202000081>
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(9), 785–799. <https://doi.org/10.1038/nrd2092>
- Ulab360. (n.d.). *Leupeptin*. Retrieved October 31, 2024, from <http://www.ulab360.com/files/prod/manuals/201211/26/25223001.pdf>
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Kunimoto, S., Matsuzaki, M., Hamada, M., & Takeuchi, T. (1970). Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 23(8), 425–227. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.425>
- Umezawa, Hamao. (1973). Chemistry of enzyme inhibitors of microbial origin. *Pure Applied Chemistry*, 33(1), 129–144. <https://doi.org/10.1351/pac197333010129>
- Umezawa, Hamao. (1976). Structures and activities of protease Inhibitors of microbial origin. *Methods in Enzymology*, 45, 678–695. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(76\)45058-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(76)45058-9)
- Van der Burg, D., Josefsson, L., Emmer, Å., & Sanger-van de Griend, C. E. (2023). Recent capillary electrophoresis applications for upstream and downstream biopharmaceutical process monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 160, 116975. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.116975>

- Vlasak, J., & Ionescu, R. (2011). Fragmentation of monoclonal antibodies. *MAbs*, 3(3), 253–263. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.3.15608>
- Wang, M., Wang, X., & Ye, H. (2023). Measurement of Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase. *Bio-Protocol*, 13(03), e4600. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4600>
- Wi, K. D., Gyun, K. S., Seop, K. I., Kyu, L. B., Taik, R. Y., & Joon, L. K. (2006). Proteases and protease inhibitors produced in streptomycetes and their roles in morphological differentiation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(1), 5–14.
- Xie, P., Niu, H., Chen, X., Zhang, X., Miao, S., Deng, X., Liu, X., Tan, W.-S., Zhou, Y., & Fan, L. (2016). Elucidating the effects of pH shift on IgG1 monoclonal antibody acidic charge variant levels in Chinese hamster ovary cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 10343–10353. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7749-4>
- Yang, B., Li, W., Zhao, H., Wang, A., Lei, Y., Xie, Q., & Xiong, S. (2019). Discovery and characterization of CHO host cell protease-induced fragmentation of a recombinant monoclonal antibody during production process development. *Journal of Chromatography B*, 1112, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.02.020>
- Zhang, H., Zhu, L., Zou, E., Liang, Y., & Zou, L. (2023). Development of a method for producing Fab/F(ab')<sub>2</sub> fragments from a full-length monoclonal antibody for bioanalytical assays. *Antibody Therapeutics*, 6(Supplement\_1), tbad014-019. <https://doi.org/10.1093/abt/tbad014.019>
- Zhi-Gang, L., Jian-Bo, L., Yun, D., & Wei-Yuan, Y. (2005). Anti-proteolysis study of recombinant IIn-UK fusion protein in CHO cell. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 32(6), 544–550. <https://www.pibb.ac.cn/pibben/article/abstract/2004-0928>
- Zhou, Q., Wang, F., Zhang, Y., Yang, F., Wang, Y., & Sun, S. (2011). Down-regulation of Prdx6 contributes to DNA vaccine induced vitiligo in mice. *Molecular BioSystems*, 7(3), 809–816. <https://doi.org/10.1039/c0mb00181c>

## 11. Anexos

### 11.1 Plásmidos usados y generados

#### 11.1.1 Tabla de plásmidos

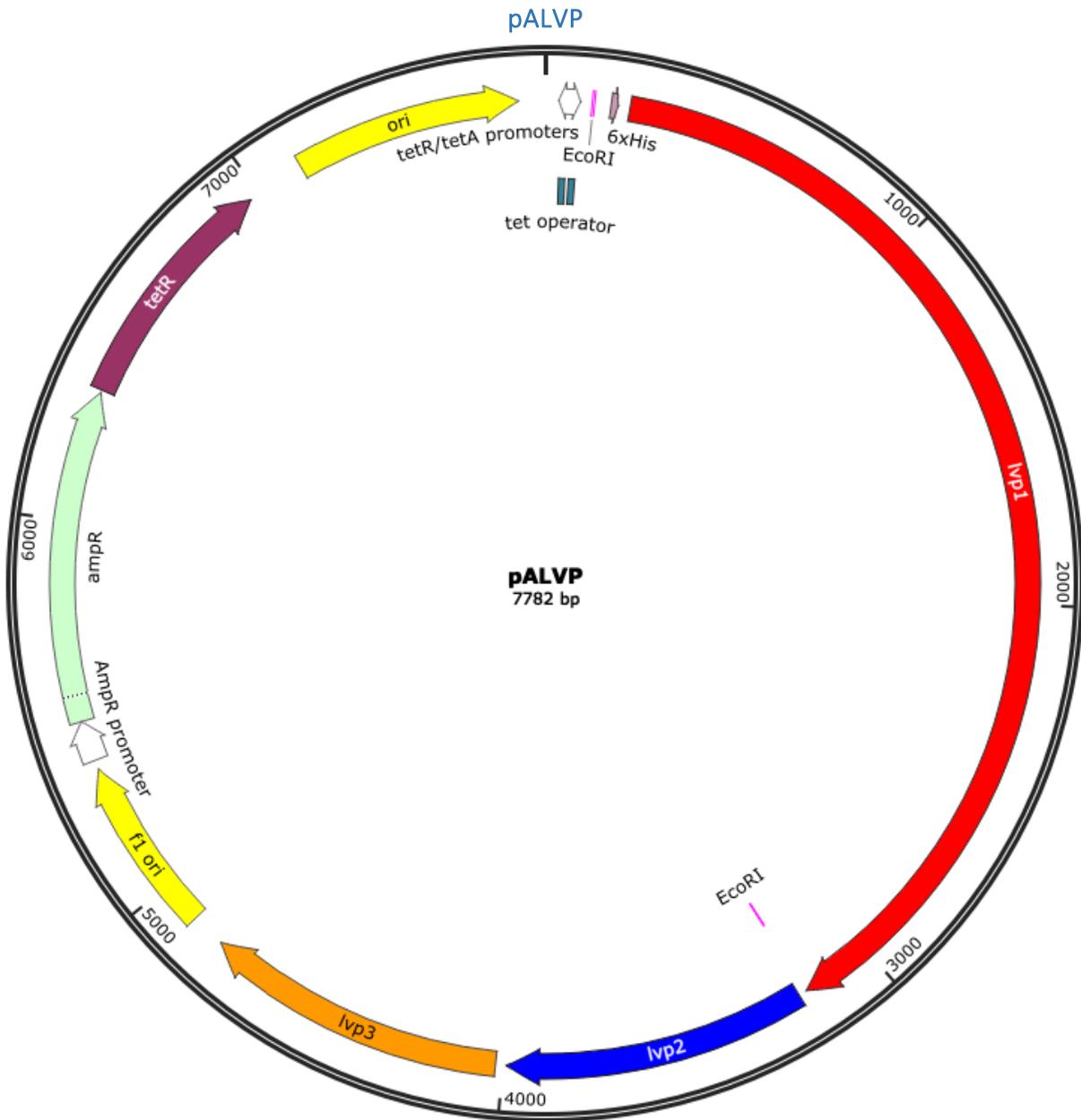
A continuación, se enlistan los plásmidos usados durante este proyecto que sirvieron para la expresión del sistema *lvp* para producir la livipeptina. En la siguiente sección se muestran sus mapas. La evaluación de la expresión del sistema *lvp* en bacterias se hizo con bacterias transformadas con pALVP, junto con el control pASK, que no contiene la ruta biosintética para producir el inhibidor. La expresión del sistema *lvp* en células CHO se logró mediante la amplificación de cada gen que compone la ruta, *lvp1*, *lvp2* y *lvp3*, usando el plásmido de transferencia pUC57\_LVP. Cada gen amplificado se clonó en el plásmido de expresión pVax1.0, dando lugar a los plásmidos independientes, pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3. Finalmente, la eficiencia de transfección se evaluó usando el plásmido pVax\_eGFP.

Nombre	Tamaño (pb)	Gen insertado	Gen de selección	Promotor (sistema de expresión)
pALVP o pLVP*	7782	Plásmidos que expresa todo el sistema <i>lvp</i> formado por los genes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>lvp1</i> (SLI0883, 2966 pb, 67% GC)</li> <li>• <i>lvp2</i> (SLI0884, 783 pb, 69% GC)</li> <li>• <i>lvp3</i> (SLI0885, 782 pb, 68% GC).</li> </ul>	AmpR	tetR/tetA (células bacterianas)
pASK	3544	Plásmido control. Acilfosfatasa 1 (ACYP1)	AmpR	tetR/tetA (células bacterianas)
pUC57_ <i>lvp</i>	7307	Sistema <i>lvp</i> ( <i>lvp1</i> , <i>lvp2</i> , <i>lvp3</i> o SLI0883, SLI0884 y SLI0885)	AmpR	Ninguno (vector de transferencia)
pVax1.0 (pVax1)	2999	Vacío	NeoR/KanR	CMV (células de mamífero)
pVax_LVP1	6018	<i>lvp1</i> o SLI0883 (sintetasa de péptido no-ribosomal)	NeoR/KanR	CMV (células de mamífero)
pVax_LVP2	3806	<i>lvp2</i> o SLI0884 (Leu/Phe-tRNA transferasa)	NeoR/KanR	CMV (células de mamífero)
pVax_LVP3	3806	<i>lvp3</i> o SLI0885 (acetiltransferasa)	NeoR/KanR	CMV (células de mamífero)

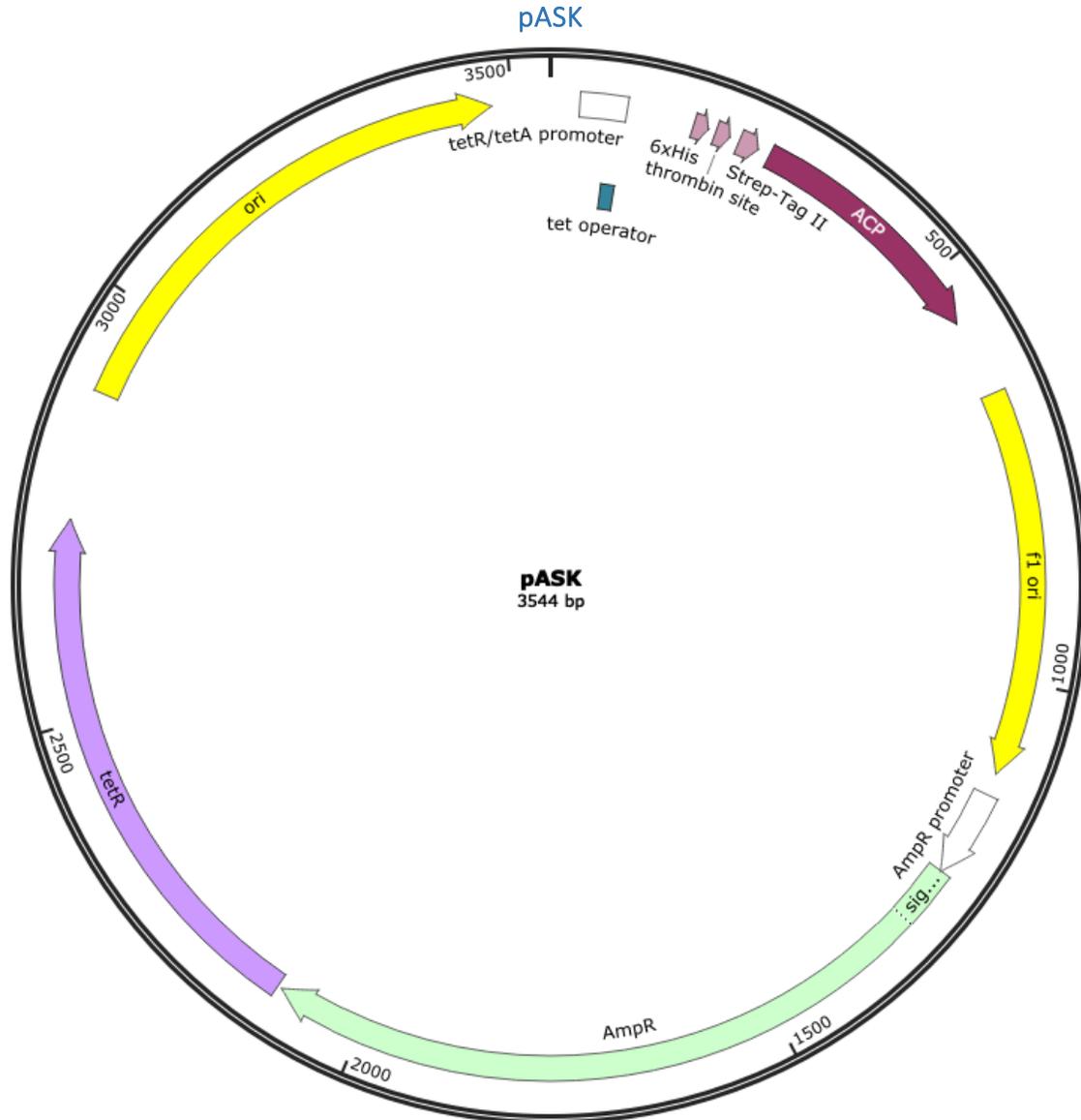
Nombre	Tamaño (pb)	Gen insertado	Gen de selección	Promotor (sistema de expresión)
pVax_eGFP	3761	eGFP (proteína verde fluorescente con fluorescencia aumentada, por sus siglas en inglés, <i>enhanced green fluorescence protein</i> ) (720 pb, 61% GC).	NeoR/KanR	CMV (células de mamífero)

\*El plásmido pALVP es el mismo que el nombrado como pLVP por el grupo de Langebio. Al inicio del proyecto, se nos transfirió este plásmido con el nombre de "pALVP" y después lo cambiaron a "pALVP" en su artículo (Aguilar et al., 2023).

## 11.1.2 Mapa de plásmidos



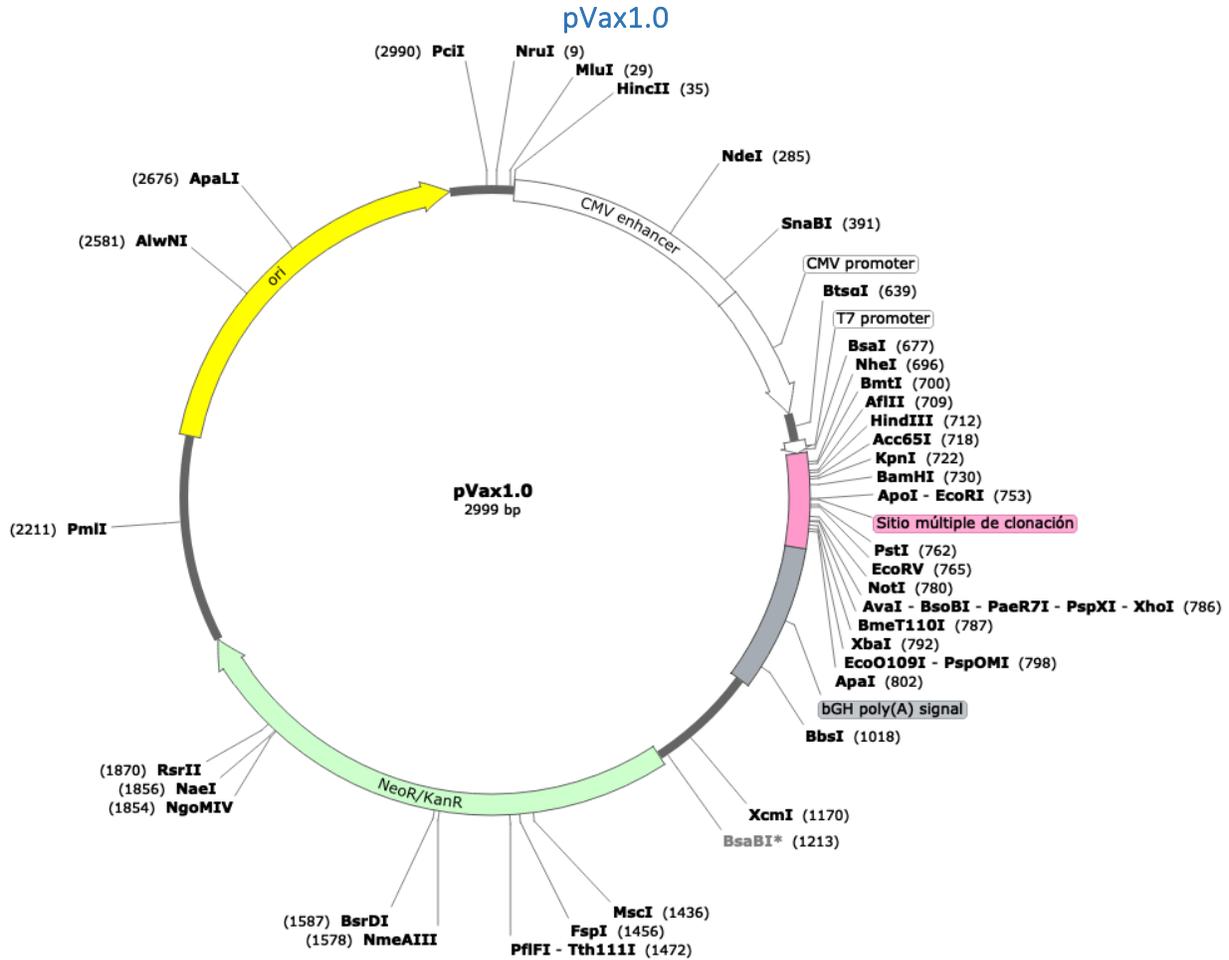
**Figura en anexo: 1.** Mapa del plásmido pALVP que contiene al sistema *lvp*, ruta biosintética que produce a la liveipeptina. El sistema *lvp* está compuesto por el gen *lvp1* o SLI0883 (rojo), *lvp2* o SLI0884 (azul) y *lvp3* o SLI0885 (naranja). La expresión de este sistema está controlada por el promotor *tetR/tetA* (*tetR/tetA promoters*, en blanco) y el represor *tetR* (morado). También contiene dos sitios de origen de replicación en bacterias (amarillo), y el gen de selección con ampicilina, *ampR* (verde), con su promotor (*AmpR promoter*). Las flechas indican el inicio y el fin de cada elemento (dirección 5'→3'). Esquema realizado con el software SnapGene®.



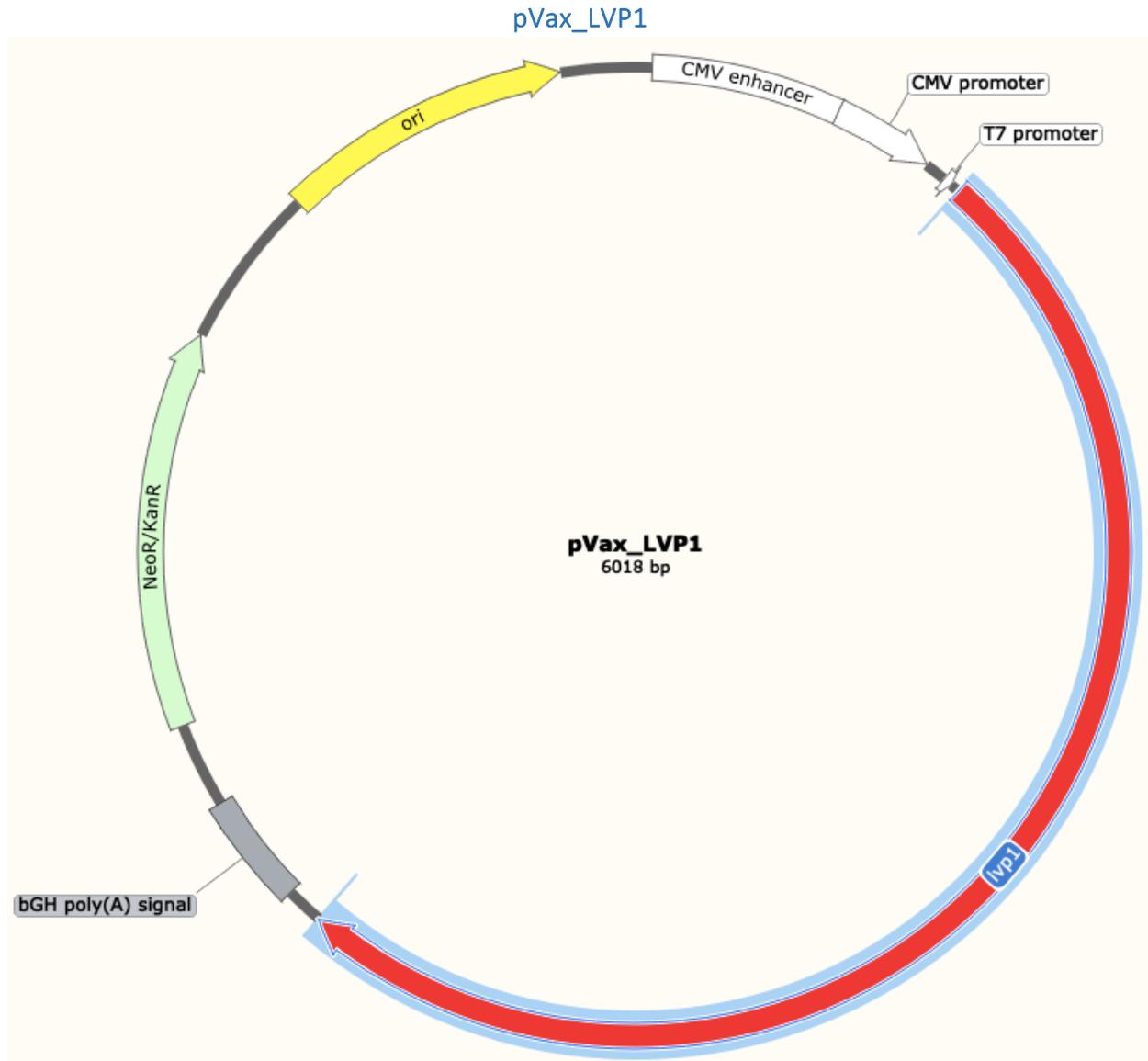
**Figura en anexo: 2.** Mapa del plásmido pASK, plásmido control. Este plásmido fue usado para clonar el sistema *lvp* para dar lugar al pALVP (figura anterior). El pASK fue usado como plásmido control y expresa el gen irrelevante acilfosfatasa 1 humana *ACYP1* (ACP, en púrpura). Al igual que pALVP, la expresión del gen de interés está controlada por el promotor *tetR/tetA* (blanco), el gen *tetR* (lila). También contiene dos sitios de origen de replicación en bacterias (amarillo), el gen de selección con ampicilina, *ampR* (verde), con su promotor (*AmpR promoter*). A diferencia del pALVP, éste contiene 3 etiquetas para identificar o purificar al gen de interés: 6 histidinas (*6xHis*), sitio de trombina (*thrombine site*) y una secuencia que codifica para 8 residuos de aminoácidos, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (*Strep-Tag II*). Las flechas indican el inicio y el fin de cada elemento (dirección 5' -> 3'). Esquema realizado con el software SnapGene®.



**Figura en anexo: 3.** Mapa del plásmido pUC57\_lvp, plásmido de transferencia. Este plásmido fue como templado para amplificar cada gen del sistema lvp. El sistema lvp está compuesto por el gen lvp1 (rojo), lvp2 (azul) y el lvp3 (naranja). Se usó este plásmido junto con oligonucleótidos específicos que flanquearon cada gen y que tuvieron sitios de enzimas de restricción para la clonación en el plásmido pVax1.0 (señalados en morado y descritos en la Tabla 9). El plásmido contiene un sitio de origen de replicación en bacterias (amarillo), el gen de selección con ampicilina, *AmpR* (verde), con su promotor (*AmpR promoter*). Las flechas indican el inicio y el fin de cada elemento (dirección 5'→3'). Esquema realizado con el software SnapGene®.



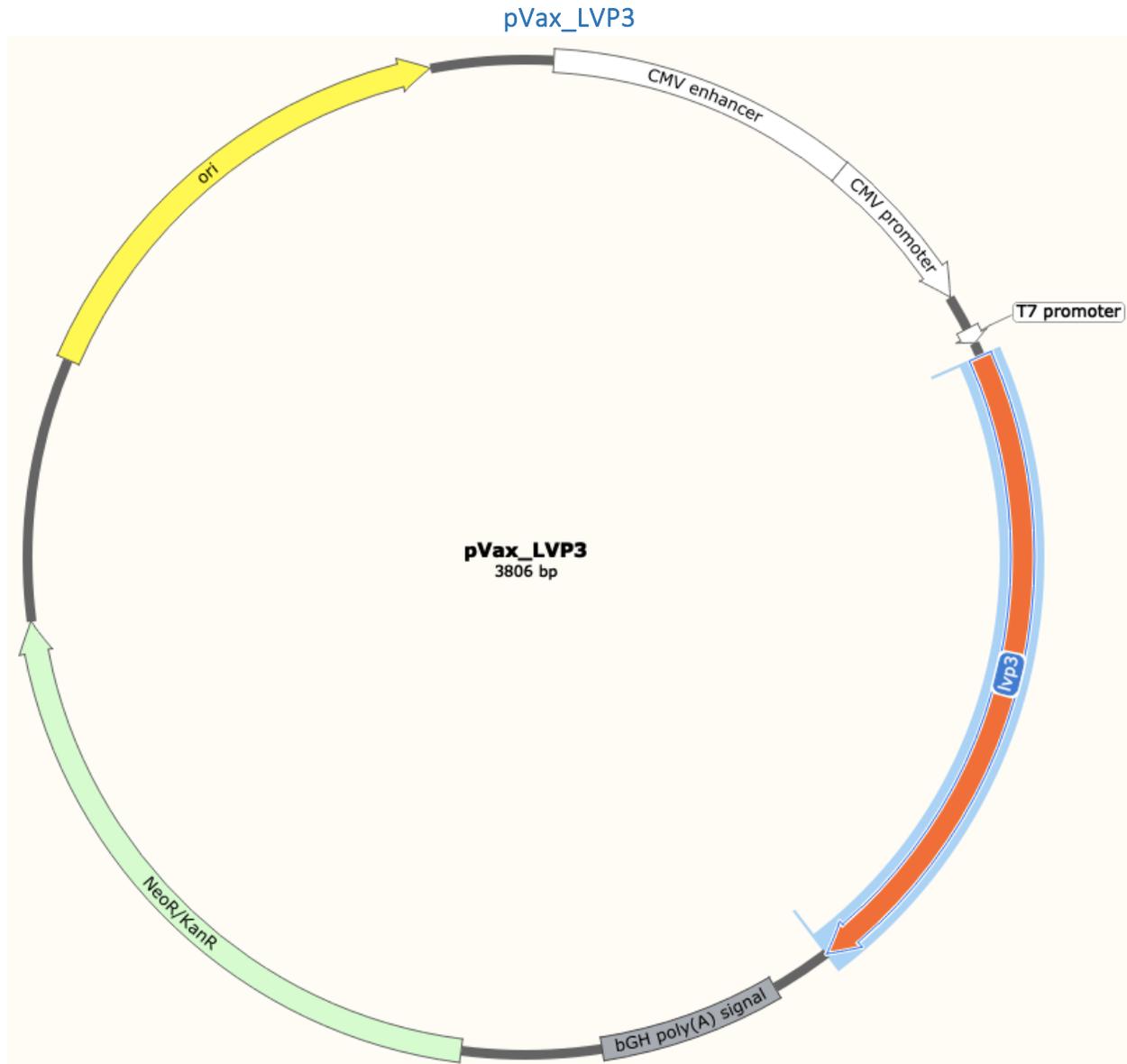
**Figura en anexo: 4.** Mapa del plásmido pVax1.0, plásmido vacío. Este plásmido fue usado para clonar el cada gen del sistema lvp de forma individual para dar lugar al conjunto de plásmidos: pVax\_LVP1, pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 (Figura 11). El pVax1.0 es un plásmido de expresión en células de mamífero que contiene el promotor CMV y una secuencia potenciadora (*CMV promoter* y *CMV enhancer*, en blanco). También contiene un sitio de origen de replicación en bacterias (amarillo), el gen de selección con neomicina o kanamicina, *NeoR/KanR* (verde) y el sitio múltiple de clonación río abajo de los promotores CMV y T7 (rosa). Después del sitio múltiple de clonación se encuentra la secuencia de terminación del gen de interés (*bGH poly(A) signal*, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina). Las flechas indican el inicio y el fin de cada elemento (dirección 5' → 3'). Esquema realizado con el software SnapGene®.



**Figura en anexo: 5.** Mapa del plásmido pVax\_LVP1, plásmido que expresa a la sintasa de péptidos no-ribosomales LVP1. Este plásmido fue usado junto con pVax\_LVP2 y pVax\_LVP3 debido a que expresa la NRPS que contribuye a la producción del péptido livipeptina (mecanismo de producción presentado en la Figura 4). El pVax\_LVP1 es un plásmido de expresión en células de mamífero que contiene el gen de interés, *lvp1* (en rojo delimitado en azul, con un tamaño de 2966 pb). Su expresión está controlada por el promotor CMV y una secuencia potenciadora (*CMV promoter* y *CMV enhancer*, en blanco). Róo abajo del gen *lvp1*, hay una secuencia señal de poliadenilación (*bGH poly(A) signal*, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina) para la terminación transcripcional del gen y la estabilidad de su mRNA. También contiene un sitio de origen de replicación para su amplificación en bacterias (amarillo) y el gen de selección con neomicina o kanamicina, *NeoR/KanR* (verde). Las flechas indican el inicio y el fin de cada elemento (dirección 5' → 3'). Esquema realizado con el software SnapGene®.



**Figura en anexo: 6.** Mapa del plásmido pVax\_LVP2, plásmido que expresa a la transferasa de Leu-Phe-tRNA LVP2. Este plásmido fue usado junto con pVax\_LVP1 y pVax\_LVP3 debido a que expresa la transferasa que contribuye a la producción del péptido livipeptina (mecanismo de producción presentado en la Figura 4). El pVax\_LVP2 es un plásmido de expresión en células de mamífero que contiene el gen de interés, *lvp2* (en azul, con un tamaño de 783 pb). Su expresión está controlada por el promotor CMV y una secuencia potenciadora (*CMV promoter* y *CMV enhancer*, en blanco). Río abajo del gen *lvp2*, hay una secuencia señal de poliadenilación (*bGH poly(A) signal*, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina) para la terminación transcripcional del gen y la estabilidad de su mRNA. También contiene un sitio de origen de replicación para su amplificación en bacterias (amarillo) y el gen de selección con neomicina o kanamicina, *NeoR/KanR* (verde). Las flechas indican el inicio y el fin de cada elemento (dirección 5' → 3'). Esquema realizado con el software SnapGene®.



**Figura en anexo: 7.** Mapa del plásmido pVax\_LVP3, plásmido que expresa a la acetiltransferasa LVP3. Este plásmido fue usado junto con pVax\_LVP1 y pVax\_LVP2 debido a que expresa la acetiltransferasa que contribuye a la producción del péptido livipeptina (mecanismo de producción presentado en la Figura 4). El pVax\_LVP3 es un plásmido de expresión en células de mamífero que contiene el gen de interés, *lvp3* (en naranja delimitado en azul, con un tamaño de 782 pb). Su expresión está controlada por el promotor CMV y una secuencia potenciadora (*CMV promoter* y *CMV enhancer*, en blanco). Río abajo del gen *lvp3*, hay una secuencia señal de poliadenilación (*bGH poly(A) signal*, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina) para la terminación transcripcional del gen y la estabilidad de su mRNA. También contiene un sitio de origen de replicación para su amplificación en bacterias (amarillo) y el gen de selección con neomicina o kanamicina, *NeoR/KanR* (verde). Las flechas indican el inicio y el fin de cada elemento (dirección 5' → 3'). Esquema realizado con el software SnapGene®



**Figura en anexo: 8.** Mapa del plásmido pVax\_eGFP, plásmido reportero. Este plásmido fue usado para evaluar el proceso de transfección de las células CHO, CHO-hSeAP y CHO-MAb ya que expresa la proteína verde fluorescente (eGFP, en verde delimitado en azul, con un tamaño de 720 pb). El pVax\_eGFP es un plásmido construido a partir del pVax1.0 por nuestro grupo de investigación (Rodríguez, 2014). Este plásmido es de expresión en células de mamífero y contiene el promotor CMV con una secuencia potenciadora (*CMV promoter* y *CMV enhancer*, en blanco). Ríe abajo del gen eGFP, hay una secuencia señal de poliadenilación (*bGH poly (A) signal*, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina) para la terminación transcripcional del gen y la estabilidad de su mRNA. También contiene un sitio de origen de replicación en bacterias (amarillo), el gen de selección con neomicina o kanamicina, *Neor/KanR* (verde). Las flechas indican el inicio y el fin de cada elemento (dirección 5' -> 3'). Esquema realizado con el software SnapGene®.

### 11.2 Artículo generado a partir de la investigación doctoral.

El artículo con los resultados experimentales fue publicado en enero del 2024 en la revista *Metabolic Engineering* y se anexa después de esta tesis.



## Expression in CHO cells of a bacterial biosynthetic pathway producing a small non-ribosomal peptide aldehyde prevents proteolysis of recombinant proteins

Violeta Guadarrama-Pérez<sup>a</sup>, César Aguilar<sup>c,d</sup>, Alberto Porras-Sanjuanico<sup>a</sup>, Enrique Merino<sup>b</sup>, Octavio T. Ramírez<sup>a</sup>, Francisco Barona-Gómez<sup>c,e</sup>, Laura A. Palomares<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor, 62210, México

<sup>b</sup> Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor, 62210, Mexico

<sup>c</sup> Evolution of Metabolic Diversity Laboratory, Unidad de Genómica Avanzada (LANGEBIO), Cinvestav-IPN, Irapuato, Guanajuato, Mexico

<sup>d</sup> Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907, USA

<sup>e</sup> Institute of Biology, Leiden University, Leiden, 2333, BE, the Netherlands

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Natural products biosynthesis  
Small peptide aldehyde  
Proteolysis  
CHO cells  
Livipeptin/thiolstatin

### ABSTRACT

A significant problem during recombinant protein production is proteolysis. One of the most common preventive strategies is the addition of protease inhibitors, which has drawbacks, such as their short half-life and high cost, and their limited prevention of extracellular proteolysis. Actinomycetes produce the most commonly used inhibitors, which are non-ribosomal small aldehydic peptides. Previously, an unprecedented biosynthetic route involving a condensation-minus non-ribosomal peptide synthetase (NRPSs) and a tRNA utilizing enzyme (tRUE) was shown to direct the synthesis of one of these inhibitor peptides, livipeptin. Here, we show that expression of the livipeptin biosynthetic pathway encoded by the *lvp* genes in CHO cells resulted in the production of this metabolite with cysteine protease inhibitory activity, implying that mammalian tRNAs were recruited by the *lvp* system. CHO cells transiently expressing the biosynthetic pathway produced livipeptin without affecting cell growth or viability. Expression of the *lvp* system in CHO cells producing two model proteins, secreted alkaline phosphatase (hSeAP) and a monoclonal antibody, resulted in higher specific productivity with reduced proteolysis. We show for the first time that the expression of a bacterial biosynthetic pathway is functional in CHO cells, resulting in the efficient, low-cost synthesis of a protease inhibitor without adverse effects on CHO cells. This expands the field of metabolic engineering of mammalian cells by expressing the overwhelming diversity of actinomycetes biosynthetic pathways and opens a new option for proteolysis inhibition in bioprocess engineering.

### 1. Introduction

Proteolysis is still challenging the production of susceptible proteins by reducing productivity and impeding their efficient recombinant production (Laux et al., 2018; Li et al., 2019; Robert et al., 2009). Simple fed-batch production can result in protein degradation as host proteases accumulate and residence times are long (Park et al., 2017). Intracellular clipping can also occur (Henry et al., 2018), an issue that has been poorly investigated. Common practices to reduce proteolysis by

reducing temperature or using perfusion can reduce cell growth rate, productivity, and complicate the production process or increase its cost (Chakrabarti et al., 2016). The alternative of knocking-out proteases (Kol et al., 2020; Laux et al., 2018; Li et al., 2019) may not target relevant proteases, can affect critical cellular processes, and can be time-consuming. The most common strategy is the addition of protease inhibitors during harvest or downstream (Chakrabarti et al., 2016; Martensen and Justesen, 2001), which can have a substantial cost, as protease inhibitors are expensive and unstable, and must be removed

\* Corresponding author. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor, 62210, Mexico.

E-mail addresses: [violeta.guadarrama@ibt.unam.mx](mailto:violeta.guadarrama@ibt.unam.mx) (V. Guadarrama-Pérez), [caaguila@purdue.edu](mailto:caaguila@purdue.edu) (C. Aguilar), [alberto.porras@ibt.unam.mx](mailto:alberto.porras@ibt.unam.mx) (A. Porras-Sanjuanico), [enrique.merino@ibt.unam.mx](mailto:enrique.merino@ibt.unam.mx) (E. Merino), [tonatiuh.ramirez@ibt.unam.mx](mailto:tonatiuh.ramirez@ibt.unam.mx) (O.T. Ramírez), [f.barona.gomez@biology.leidenuniv.nl](mailto:f.barona.gomez@biology.leidenuniv.nl) (F. Barona-Gómez), [laura.palomares@ibt.unam.mx](mailto:laura.palomares@ibt.unam.mx) (L.A. Palomares).

<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2024.01.005>

Received 17 August 2023; Received in revised form 19 December 2023; Accepted 21 January 2024

Available online 28 January 2024

1096-7176/© 2024 International Metabolic Engineering Society. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

during purification.

Frequently used protease inhibitors, such as leupeptin, chymostatin, and antipain, are aldehydic small peptides produced by Gram-positive bacteria of the genus *Streptomyces*. They have molecular weights between 313 and 856 Da, they lack an N-terminal group, as it is protected by an acyl group of one or two carbons, and have an aldehyde in their carboxy-terminus, which is responsible for their protease inhibiting activity (Aoyagi et al., 1969; Maxson et al., 2016). The terminal aldehyde interacts with the active site of a protease, forming a hemiacetal with the catalytic amino acid, often Ser or Cys, impeding the protease activity (Brayer et al., 1979; LaLonde et al., 1998; Lewis and Wolfenden, 1977). Small aldehydic peptides are typically synthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) pathways with a reductase domain responsible for aldehyde formation and release of the nascent peptide (Tietze et al., 2020). An unusual 3-gene cluster (4.6 kbp) consisting of an NRPS-like Condensation-minus domain and a tRNA-utilizing enzyme (tRUE) directing the synthesis of the dipeptide aldehydic livepeptin with antiprotease activity in *Streptomyces lividans* 66 has recently been confirmed (Cruz-Morales et al., 2013; Aguilar et al., 2023). The small size of the *lvp* gene cluster makes it ideal for its expression in other biological systems.

The *lvp* system is constituted by three genes (Fig. 1); *lvp1*, the C-minus NRPS (SLI0883); *lvp2*, a tRUE annotated as a leucyl/phenylalanyl-tRNA transferase (SLI0884); and *lvp3*, an acetyltransferase (SLI0885). *Lvp1* contains an adenylation domain that recognizes arginine, a phosphopantetheinyl carrier protein (PCP) domain, and a reductase domain. *Lvp2* is believed to transfer phenylalanine or leucine to the arginine attached to *Lvp1*, and *Lvp3* adds an acetyl group to the dipeptide's primary amine. Finally, the reductase domain of *Lvp1* releases the small dipeptide aldehyde (Aguilar et al., 2023). Livepeptin, which is similar to thiolstatin, inhibits the cysteine protease papain (Aguilar et al., 2023; Murao et al., 1985).

Previous attempts at the heterologous expression of NRPS in eukaryotic cells are scarce. NRPSs are naturally found in bacteria, archaea, and lower eucaryotes. Their expression can be challenging as NRPSs are large multimodular megaenzymes with genes from 10 kb to 100 kb in size, with modules that incorporate a monomeric unit into a final product (Huo et al., 2019). There are few studies on the expression of NRPSs in non-bacterial systems (Müller et al., 2012; Siewers et al., 2009). In addition, NRPS must be post-translationally activated through phosphopantethenylation by a phosphopantetheinyl transferase

(PPTase) (Kim et al., 2018; Lambalot et al., 1996; Schlumbohm et al., 1991).

In this study, we propose the expression of the *lvp* system in CHO cells for the *in vivo* production of a protease inhibitor peptide aldehyde. We found that CHO cells can produce the non-ribosomal small aldehyde peptide through their native enzymatic machinery. Through the production of livepeptin in CHO cells, the proteolysis of two recombinant model proteins, human-secreted placental alkaline phosphatase (hSeAP) and a monoclonal antibody (MAB), was reduced. This study lays the foundation for using the *lvp* system for different applications in the biotechnology field.

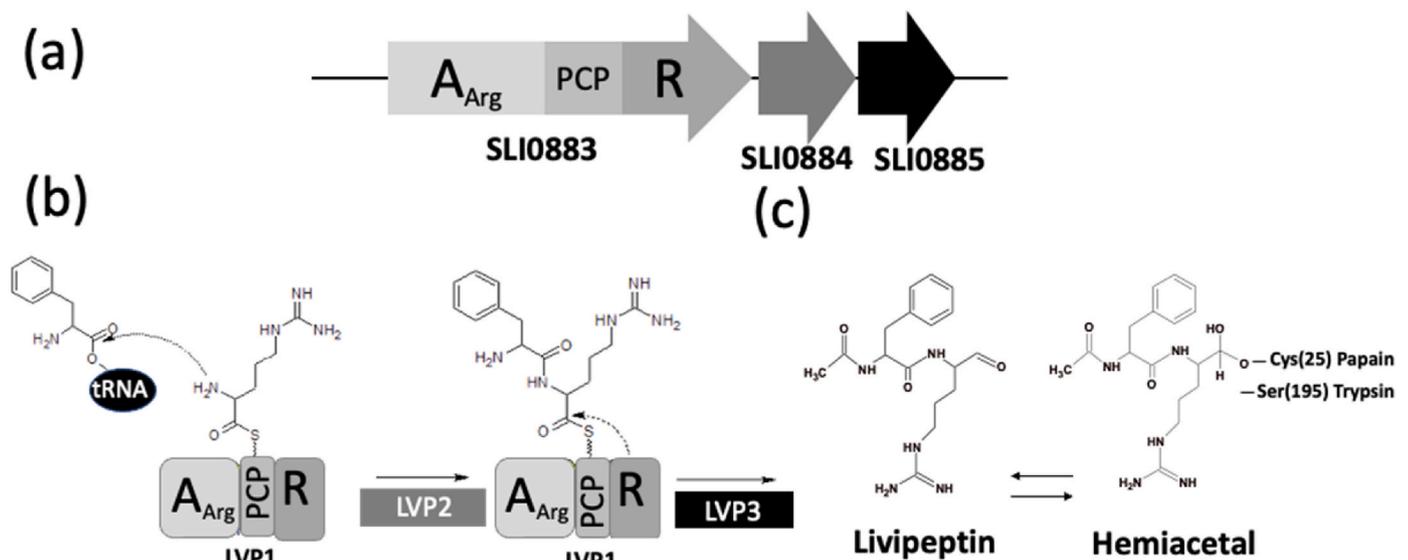
## 2. Materials and methods

### 2.1. Plasmid construction

The plasmids used in this study are listed in Table 1. The *lvp* system consists of three genes, the non-ribosomal peptide synthetase, SLI0883 or *lvp1*; the Phe/Leu tRNA transferase SLI0884 or *lvp2*, and the acetylase SLI0885 or *lvp3* (Cruz-Morales et al., 2013) (Fig. 1). Independent plasmids for each transgene were constructed from plasmid pUC57\_LVP, which contained the *lvp* genes synthesized by GeneScript (Aguilar et al., 2023). The *lvp1*, *lvp2*, and *lvp3* transgenes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned under the CMV promoter in pVax1.0 (Invitrogen, 2012), resulting in three independent plasmids: pVax\_LVP1, pVax\_LVP2, and pVax\_LVP3 (pVax\_LVPS). A pVax containing the enhanced green fluorescent protein gene (pVax\_eGFP) was a reporter control plasmid. All plasmids were amplified in *E. coli* DH5 $\alpha$  strain and purified using the Qiafilter Plasmid Maxi Kit (12263, Qiagen).

### 2.2. Cell culture transfection assays and culture conditions

CHO-hSeAP cells (Chinese hamster ovary cells, stably expressing secreted human serum alkaline phosphatase, hSeAP) and CHO-Mab cells (stably expressing a human monoclonal antibody (Mab) IgG type 1) were cultivated in serum-free medium (CD FortiCHO™, Thermo Fisher) supplemented with 6 mM L-glutamine. Cells were transiently transfected with an equimolar mixture of the three plasmids containing the *lvp* system (pVax\_LVPS) with either lipofectamine LTX (15338-100, Invitrogen) for static cultures, or FreeStyle™ MAX reagent (16447-100, Gibco) for suspension cultures. Transfection reactions were performed



**Fig. 1. Livepeptin biosynthetic pathway.** (a) The pathway (*lvp* system) contains only three genes (4531 bp), SLI0883 (2966 bp, LVP1), SLI0884 (783 bp, LVP2), and SLI0885 (782 bp, LVP3). (b) Livepeptin synthesis by LVP1, phe-tRNA or leu-tRNA, LVP2, and LVP3. (c) Proteases are inhibited when the aldehyde group of livepeptin forms a hemiacetal structure with either a cysteine or a serine at the catalytic site.

**Table 1**  
Plasmids used in this study for the expression of the *lvp* system in CHO cells.

Plasmid	Gen expressed	Plasmid size (pb)	1 pmol <sup>a</sup> (μg)	2 pmol <sup>a</sup> (μg)	6 pmol <sup>a</sup> (μg)	0.33 pmol <sup>a</sup> (μg)	0.66 pmol <sup>a</sup> (μg)	2 pmol <sup>a</sup> (μg)
pUC57_LVP	None	7307	–	–	–	1 pmol	2 pmol	6 pmol
pVax1.0	Empty	2999	2	4	12	–	–	–
pVax_eGFP	eGFP	3761	2.5	5	15	–	–	–
pVax_LVP1	lvp1 (SLI0883)	6018	–	–	–	1.3	2.6	7.9
pVax_LVP2	lvp2 (SLI0884)	3806	–	–	–	0.8	1.7	5
pVax_LVP3	lvp3 (SLI0885)	3806	–	–	–	0.8	1.7	5

$$\mu\text{g DNA} = \text{pmol DNA} \left( \frac{660 \text{ pg}}{\text{pmol}} \right) \left( \frac{1 \mu\text{g}}{10^6 \text{ pg}} \right) N$$

N is the plasmid size and 660 pg/pmol relation is the mean molecular weight of a nucleotide pair.

<sup>a</sup> Calculated with.

according to the manufacturers' protocols, with 1, 2, or 6 pmol equimolar mix of pVax\_LVPs (0.33 pmol, 0.66 pmol, or 2 pmol of each plasmid, see Table 1). As controls, cells were transfected with pVax1.0 (empty vector) or pVax\_eGFP to determine transfection efficiency. 750,000 cells per well were seeded in six-well culture plates. Transfected cells were incubated at 37 °C in an atmosphere of 8 % CO<sub>2</sub> and harvested at different post-transfection times. CHO-MAB cells were seeded at 1 x 10<sup>6</sup> cell/mL in 15 mL of working volume in shake flasks, transfected with 6 pmol of pVax\_LVPs, and incubated in agitation at 130 rpm. As a control, leupeptin was added to a culture every 24 h (1 μg/mL). Cell morphology of transfected cells was observed in a TE 3000 inverted microscope (Nikon Co.). Total cell concentrations were quantified in a Coulter Counter MS3 (Beckman Coulter). Fluorescent cells were quantified to determine the transfection efficiency, and viability was measured using trypan blue exclusion (Strober, 2015). Cell pellets and supernatants were separated by centrifugation (3000×g for 10 min) and stored at –80 °C for subsequent characterization.

### 2.3. Gene expression of *lvp* system by end-point RT-PCR

Expression of each of the *lvp* system genes in CHO cells was confirmed by end-point reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA was isolated from transfected cells using TRIzol (15596026, Invitrogen™). Genomic and plasmidic DNA was eliminated with the TURBO DNA-free™ kit (Invitrogen™). cDNA was synthesized with the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific™). PCR was performed using Taq pol DNA polymerase, dNTPs, 10X buffer following the manufacturer's protocol (New England Biolabs) in a thermal cycler (Bio-Rad). Primers and temperatures are listed in Table 2. RT-PCR reactions were analyzed by electrophoresis in a 1 % (w/v) agarose gel (BIO-41025, Bioline) in TAE buffer 1X and stained with HydraGreen™ (ACTGene, USA). Gel images were taken with ChemiDoc™ XRS+ and ImageLab 4.1™ software (Bio-Rad).

*In vitro* experiments to determine if the bacterial *lvp* system can utilize mammalian tRNA to produce livepeptin.

Bacterial extracts were prepared from 50 mL cultures of *E. coli* C41 pGroEL/GroES strain transformed with a plasmid that contained the *lvp* system under the control of the tetR/tetA promoter, pLVP (Aguilar et al., 2023). Cultures in Luria-Bertani medium were induced with 20 ng/mL

of anhydrotetracycline (37919, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at an optical density (600 nm) of 0.5 and incubated at 30 °C for 12 h. Extracts were prepared according to Kigawa et al. (2004). The cell extract was centrifuged at 4000×g for 10 min at 4 °C, and supernatants were frozen and stored at –80 °C until used. To inactivate tRNAs, bacterial extracts were incubated with RNase (20 mg/mL) and 100 μM CaCl<sub>2</sub> for 30 min at 37 °C as previously described (Aguilar et al., 2023). The RNase was inactivated by adding 0.1 % (v/v) DEPC (diethyl-pyrocabonate; D5758, Sigma-Aldrich) and incubated for 2 h at 37 °C. Next, a bacterial extract was incubated with CHO cell extracts that contained eukaryotic tRNAs. The following essential cofactors were added to activate the *lvp* system (all from Sigma-Aldrich): 100 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 10 mM L-lysine, 10 mM L-leucine, 10 mM L-arginine, 10 mM L-phenylalanine, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 5 mM ATP, and 5 mM NADPH, in a final volume of 200 μL. As a control, a reaction was prepared by adding 20 μL of 0.1 mg/mL of antipain (A619, Sigma-Aldrich). Subsequently, reactions were incubated for 5 h at 37 °C and centrifuged at maximum speed to remove any precipitate. Supernatants were analyzed by reverse-phase chromatography.

### 2.4. Protease inhibitory activity assays with papain as a model of cysteine-protease

Fractions collected from RP-HPLC runs, culture supernatants, and sonicated cell pellets were tested for the presence of protease inhibitors with an *in vitro* protease activity test. Cell pellets were resuspended in 100 μL of lysis buffer (40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM EDTA-Na, 20 % (w/v) sucrose, pH 7.4) and sonicated (6 cycles: 90 % amplitude, 2 min process, 20 s on, 20 s off; QSonica, Sonicators). Fractions collected from RP-HPLC runs and culture supernatants were tested directly. For protease activity, the following reactions were prepared in black 96-well plates with clear-bottom: 8 μL of buffer (500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.0), 5 μL of 60 mM disodium EDTA, 5 μL of 100 mM DTT, 20 μL of 5 μg/mL papain, 20 μL of 0.01 mg/mL PABNA (phenyl-arginyl-β-naphthylamide, papain substrate; P4157, Sigma-Aldrich), 20 μL of the sample, and ultrafiltered water for a total volume of 160 μL. 20 μL of different leupeptin concentrations (0.01 μg/mL, 0.02 μg/mL, 0.05 μg/mL, 0.1 μg/mL, and 0.2 μg/mL) were used as positive controls (L2884, Sigma-Aldrich) (Fig. S1). Fluorescence intensity was acquired in a microplate reader (TECAN,

**Table 2**  
Primers used to confirm the expression of genes of the *lvp* system.

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Primer size (nt)	Expected amplicon (bp)	Alignment temperature (°C)
lvp1 (SLI0883)	Forward	AGCTCACTTCCAATCACGGG	20	656	56.2
	Reverse	TTCGCATCCTTTGTGCCGA	20		
lvp2 (SLI0884)	Forward	GATATAGCTAGCATGGTCCGAACGCAGGATCGAG	34	750	60.3
	Reverse	GATATAGAATTCCTCGGTGAGCCGCT	27		
lvp3 (SLI0885)	Forward	TCTCACCAGCACCGATCT	18	703	52.6
	Reverse	CACCGCGTAGTCGTGCT	17		
B-actin	Forward	AGCTGAGAGGGAAATGTGCG	21	100	60
	Reverse	AGGAAGAGGATGCAGCAGTG	20		

M1000) every minute for 30 min ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 402 \text{ nm}$ ). The results were plotted against time. The slopes (initial reaction rates) were calculated by linear regression and compared by assigning 100 % activity to the papain reaction without inhibitor. Results were statistically analyzed by a one-way ANOVA test in GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), where differences were considered significant when the p-value was  $\leq 0.01$ .

### 2.5. RP-HPLC and RP-UPLC coupled with MS to detect livepeptin

The presence of livepeptin was assessed by HPLC in an Agilent 1200 system with a quaternary pump and a diode array detector at 25 °C; using a Discovery® HS F5-5 column (5  $\mu\text{m}$  particle size, 4.6  $\times$  150 mm, 567516-U, Supelco). Phase A was ultrafiltered water and phase B was 100 % methanol. The gradients used were from 0 % to 10 % of phase B from 0 to 5 min, from 10 % to 100 % of phase B from 5 min to 35 min, followed by 10 min at 100 % of phase A. Absorbances at 257 nm and 280 nm were monitored. Two fractions were collected (F-1: 3.7–4.2 min, and F-2: 4.25–4.8 min), concentrated in a vacuum concentrator, and resuspended in ultrafiltered water to measure antiprotease activity.

Alternatively, CHO culture supernatants or soluble fractions of sonicated cell pellets were analyzed by UPLC. Samples were prepared with 5 % acetonitrile and 0.1 % formic acid to precipitate proteins. Then, they were centrifuged at max speed for 10 min. Supernatants were analyzed in a UPLC coupled to a QDa mass detector (Waters) with a 2.1 mm  $\times$  100 mm Acquity UPLC® peptide BEH C18 column (Waters). The injection volume was 10  $\mu\text{L}$ , and the reverse-phase method was isocratic with 97 % formic acid and 3 % acetonitrile.

### 2.6. Quantification of recombinant proteins, hSeAP and MAb

hSeAP in culture supernatants was quantified by an enzymatic colorimetric assay in 96-well plates, as detailed in Bulté et al. (2020). The MAb was quantified from supernatants of CHO-MAb cell cultures by affinity chromatography in an HPLC system with a quaternary pump coupled to a photo array diode detector (Alliance, Waters) and a MAB-Pac™ Protein A column (4  $\times$  35 mm, Thermo Scientific™) using two mobile phases (Phase A, equilibrium buffer: 0.05 M sodium phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.5. Phase B, elution buffer: 0.05 M sodium phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 2.5). The flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 50  $\mu\text{L}$ . A calibration curve was prepared using an in-house reference monoclonal antibody IgG type1 (2, 4, 6, 8, and 10  $\mu\text{g}$ ).

The specific hSeAP or MAb production rates ( $q_{\text{hSeAP}}$  or  $q_{\text{MAb}}$ , pg/[cell $\cdot$ h]) were calculated by dividing the recombinant protein concentration by the area under the cell growth curve.

### 2.7. SDS PAGE gels and Western blot to detect hSeAP and MAb

Total protein concentrations in supernatants and cell pellets were determined using the Bradford method with bovine serum albumin as a standard (BSA, USBiological) (Bradford, 1976). For Western blots, proteins were precipitated with an equal volume of acetone. Supernatants from CHO-hSeAP cultures were resuspended in Laemmli sample buffer 5X (Laemmli, 1970) and boiled for 7 min at 99 °C. Supernatants from CHO-MAb cultures were resuspended in native sample buffer 4X (8 % (w/v) SDS, 0.4 % (w/v) bromophenol blue, and 40 % (v/v) glycerol) and boiled for 7 min at 99 °C. Proteins from CHO-hSeAP were separated on 10 % SDS-PAGE gels and proteins from CHO-MAb in 8 % SDS-PAGE gels at 60 mA and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (B0149, Sigma). Proteins in gels were transferred to PVDF membranes (Immobilon®-P PVDF membrane, IPVH304F0, Millipore) using a wet electroblotting system (Bio-Rad). A mouse monoclonal anti-alkaline phosphatase PLAP antibody (SC-271431, Santa Cruz) and a HRP-anti-mouse IgG were used as primary and secondary antibodies to detect hSeAP. A goat anti-human IgG-HRP (109-035-003, Jackson) was

used for MAb detection. Gel images, Western blots, and densitometric analysis were performed in a ChemiDoc™ XRS + system with the ImageLab 4.1™ software (Bio-Rad). The relative abundance of hSeAP and MAb protein bands and their fragments was reported as percentage for each lane. No internal control protein was used for Western blots of culture supernatants, as no suitable cellular protein is present at a constant concentration in supernatants.

### 2.8. MAb analysis by capillary electrophoresis

The MAb was purified from culture supernatants by protein A chromatography using the KANEKA KanCapA™ resin (D55, PALL), equilibrated with 10 column volumes of equilibration buffer (PBS, 0.3 M NaCl), incubated with samples for 2 h at room temperature under agitation, and packed in a preparative column. The column was washed with 10 vol of equilibration buffer and then eluted with elution buffer (Glycine 0.1 M, pH 3.0). pH of eluates was immediately neutralized with neutralization buffer (Tris-base 1.0 M, pH 9.0) to avoid MAb degradation. Purified MAb samples were concentrated to 0.1 mg/mL using centrifugal concentrators with a 10 kDa cut-off membrane (431483, Corning) and analyzed by non-reduced SDS-gel MW (A10663, Sciex) capillary electrophoresis. The relative abundance of each species was calculated as a percentage of the total area as determined by densitometry.

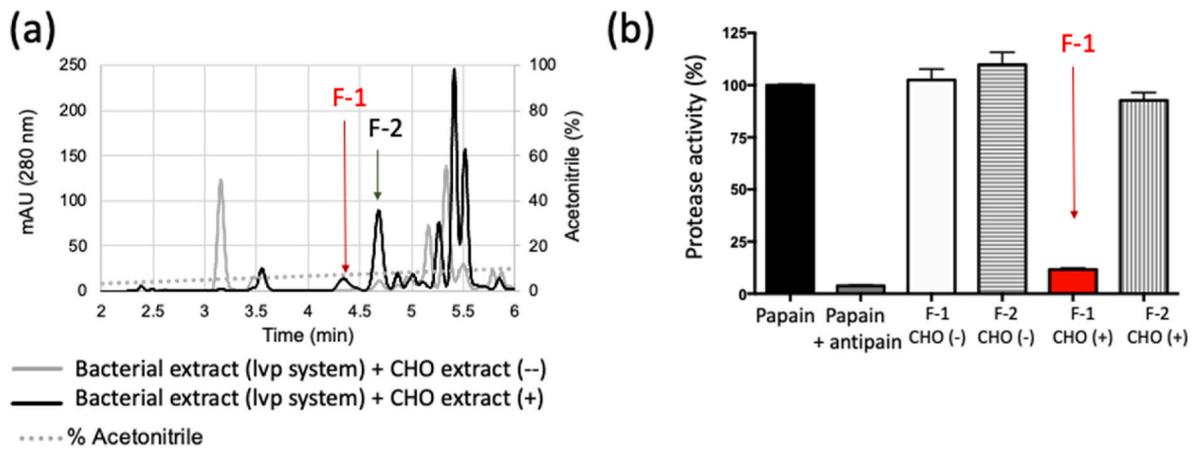
## 3. Results

### 3.1. The bacterial biosynthetic pathway *lvp* system incorporates eukaryotic aminoacyl-tRNA to produce livepeptin

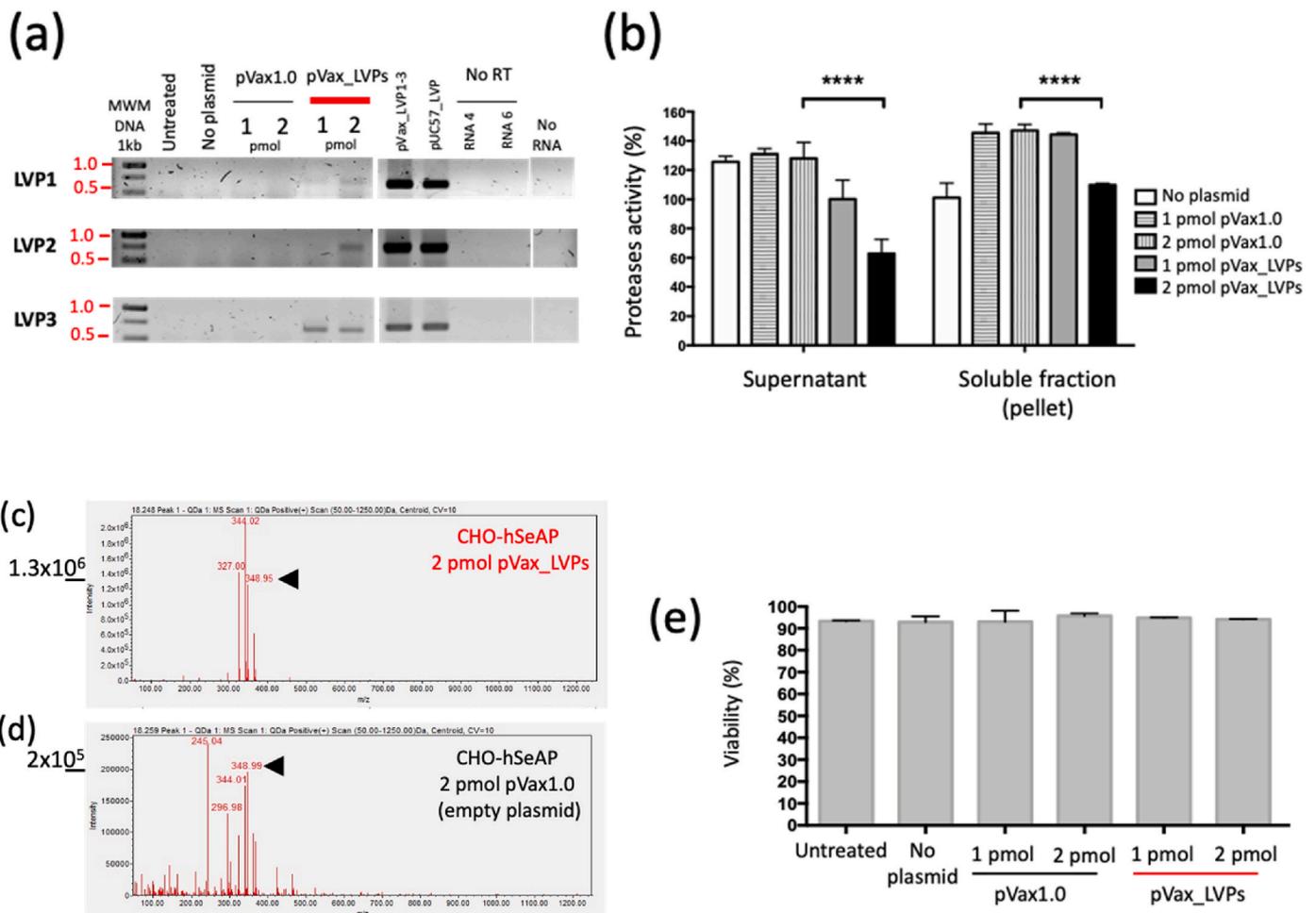
An *in vitro* assay was performed to determine if the bacterial *lvp* system can use eukaryotic aminoacyl-tRNA to synthesize a peptide aldehyde. CHO cell extracts were added to bacterial extracts containing the *lvp* system without tRNAs. Previously, bacterial tRNAs were eliminated by incubation with a RNase. Two fractions were collected from reverse-phase HPLC (Fig. 2a, F-1, and F-2). These fractions were tested for papain inhibition activity as a model of cysteine-protease (Fig. 2b). Fraction 1 from the CHO cell extract expressing the *lvp* system inhibited 90.8 % of papain activity, similar to the positive antipain control (Fig. 2, papain + antipain). This result shows that the *lvp* bacterial system can use eukaryotic tRNAs to produce livepeptin. To the best of our knowledge, this is the first recorded instance of synthesizing a bacterial non-ribosomal peptides using eukaryotic tRNAs.

### 3.2. CHO cells expressing the *lvp* system produce the protease inhibitor without compromising cell viability

The *lvp* system was transiently expressed in CHO cells that stably produce hSeAP (CHO-hSeAP). One pmol or two pmol equimolar concentrations of the three plasmids containing the *lvp* system were compared. Expression of the three genes was observed in both conditions (Fig. 3a). To detect the extracellular and intracellular presence of the protease inhibitor, supernatants and soluble fractions of transfected cell pellets were evaluated with an *in vitro* protease activity assay. We observed a reduction of protease activity in both conditions compared to transfection with the empty plasmid pVax1.0 (Fig. 3b). Supernatants of CHO cells transfected with 2 pmol of pVax\_LVPs inhibited 65 % of the protease activity compared to the empty plasmid pVax1.0 (Fig. 3b, protease activities: 128.04 %  $\pm$  10.97 with the empty plasmid, 62.90 %  $\pm$  9.76 with pVax\_LVPs transfection). Furthermore, UPLC-mass spectrometry analysis showed the increased presence of a molecule with the ionization pattern expected for the arginine-containing version of livepeptin, 348.2 m/z (Fig. 3c and d). Interestingly, the production of the protease inhibitor did not compromise cell viability (Fig. 3e). These results show the innocuous production of a non-ribosomal bacterial peptide with a protease inhibitory activity in mammalian cells.



**Fig. 2.** The bacterial *lvp* system recognizes eukaryotic tRNAs and produces *in vitro* a papain inhibitor. A bacterial extract without tRNAs expressing the *lvp* system was incubated with a CHO cell extract. (a) Reverse-phase HPLC analysis of bacterial extracts expressing *lvp* system with CHO cell extract (black line) and without CHO cell extract (grey line). Differential fractions, F-1 and F-2, were collected. (b) Papain protease activity assay. Antipain was used as a papain inhibitor positive control (grey bar, papain + antipain). F-1 obtained with the CHO cell extract inhibited protease activity. Error bars represent standard deviations between triplicate experiments.



**Fig. 3.** Production of liveipeptin in CHO-hSeAP cells transfected with the *lvp* system (pVax\_LVPs). CHO cells stably expressing human-secreted alkaline phosphatase (CHO-hSeAP) were transfected with 1 or 2 pmol of pVax LVPs (equimolar mix) and evaluated after 48 h. (a) LVP transgene expression. MWM: molecular weight marker. No RT: no reverse transcriptase. No RNA: without RNA template. (b) Inhibition of protease activity. Significant lower protease activity was detected in supernatants and soluble fractions of cell pellets transfected with 2 pmol of pVax\_LVPs. (c and d) Detection of liveipeptin by UPLC mass spectrometry. A peak with the expected 348.20 m/z for Arg-liveipeptin had an intensity 6.5 times higher in CHO cells transfected with pVax\_LVPs ( $1.3 \times 10^6$ ) than in empty plasmid cells ( $0.2 \times 10^6$ ). (e) cell viability at 48h. Error bars correspond to standard deviations. N = 3. \*\*\*\* Statistically significant difference,  $p < 0.0001$ .

### 3.3. Expression of the *lvp* system increased specific protein productivity by reducing proteolysis in CHO cells expressing hSeAP

No change in proteolysis, volumetric, or specific productivity of hSeAP was observed at 48 h post-transfection with the *lvp* system (Fig. S2). Thus, the effect up to 144 h post-transfection was evaluated. At 72 h post-transfection, cells transfected with the *lvp* system grew only half as much as cells with the empty plasmid or with the reporter plasmid eGFP, but without affecting cell viability (Fig. 4). This difference was not statistically significant and may be related to a deleterious effect of transfection. After 72h, cell growth was restored. Nevertheless, at the harvest time (144 h), the transient transfection reduced cell concentration regardless of the type of plasmid transfected (Fig. 4a and b). Importantly, the viability of cells transfected with pVax\_LVPs remained the same as in any other condition (Fig. 4c).

When analyzing the production of hSeAP, we observed a significant difference in the specific production of cells transfected with the *lvp* system (Fig. 5a). Cells transfected with pVax\_LVPs had a significantly higher specific production rate (129 %) than cells transfected with the reporter or the empty plasmids (Table 3, Fig. 5b). Interestingly, analysis of the integrity of hSeAP by Western blot showed a reduction of hSeAP fragments in the supernatants of cells transfected with the *lvp* system, compared to those transfected with the empty plasmid (Fig. 5c and d). Reduced fragmentation can cause the higher specific productivity of cells expressing the *lvp* system.

### 3.4. Expression of the *lvp* system in CHO cells reduced clipping of a monoclonal antibody

Transient expression of the *lvp* system (pVax\_LVPs) was evaluated in cells that stably express a human IgG1 monoclonal antibody (CHO-MAB cells). Transfections were performed in cell suspension cultures (Fig. S3). In contrast with what was observed in CHO-hSeAP cells (Fig. 4), no reduction in cell growth, viability, or volumetric production of the MAb was observed after transfection of suspension cultures of CHO-MAB cells (Fig. S3). Still, analysis of the integrity of the MAb by non-reducing Western blot showed that the complete form of the

antibody was 10.2 % more abundant in cells expressing the *lvp* system, compared with cells transfected with the empty plasmid (69.3 % vs 59.1 %, respectively) (Fig. 6 a-b). In fact, the pattern of antibody fragments was similar to that obtained when the protease inhibitor positive control (leupeptin) was added to cultures every 24 h (Fig. 6 a-b; NP + leupeptin vs no plasmid (NP); 65.1 % vs 54.5 %, respectively). This result was confirmed by the analysis of the purified MAb by capillary electrophoresis. The complete MAb peak was 10 % more abundant in cells expressing the *lvp* system than in cells transfected with the empty plasmid (86.8 % vs 77.1 %, respectively) (Fig. 6 c-d). No significant change was observed in the MAb specific production rate in cells expressing the *lvp* system ( $p = 0.9563$ , Fig. 6e). However, it must be considered that the transfection efficiency rate was 20 %, even when a significant decrease in clipping was observed, comparable to when the positive control leupeptin was added to cultures every 24 h. These results show that expression of the *lvp* system in CHO-MAB cells reduced fragmentation of the antibody produced, generating a complete product in greater abundance. An interesting result was an increase in specific productivity in cultures with added leupeptin. As can be observed in Supplementary Fig. 3, leupeptin addition decreased cell growth without impacting viability. Nevertheless, MAb concentration was not affected, resulting in a higher specific productivity. The increase is probably caused by a reduced proteolysis when leupeptin was added, but further experiments are needed to explain this observation.

## 4. Discussion

Despite the different strategies implemented to reduce host cell protease activity during recombinant protein production, proteolysis continues to be a problem that generates low yields and low product quality (Chakrabarti et al., 2016; Clincke et al., 2011; Kol et al., 2020; Laux et al., 2018; Li et al., 2019; Lim et al., 2018; Martensen and Justesen, 2001). In this study, the problem of proteolysis was addressed by generating a novel strategy in which CHO cells produced a bacterial protease inhibitor by expressing the unusual C-minus non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) and tRUE *lvp* system. Our results show that the expression of this bacterial pathway in mammalian CHO cells is

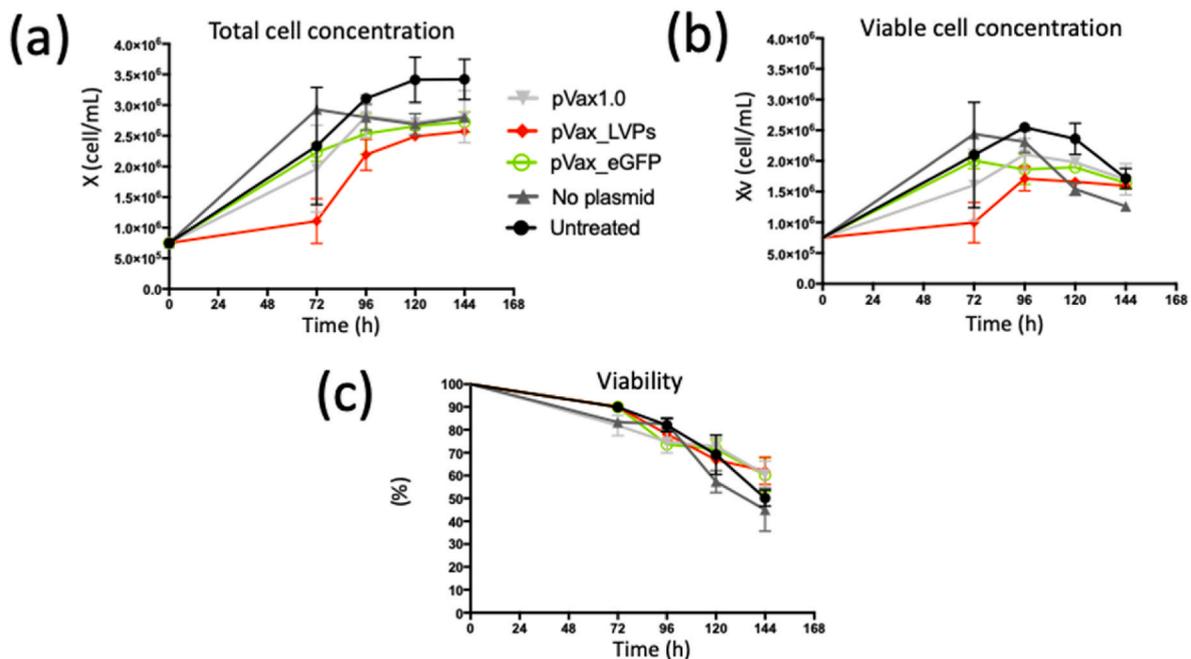
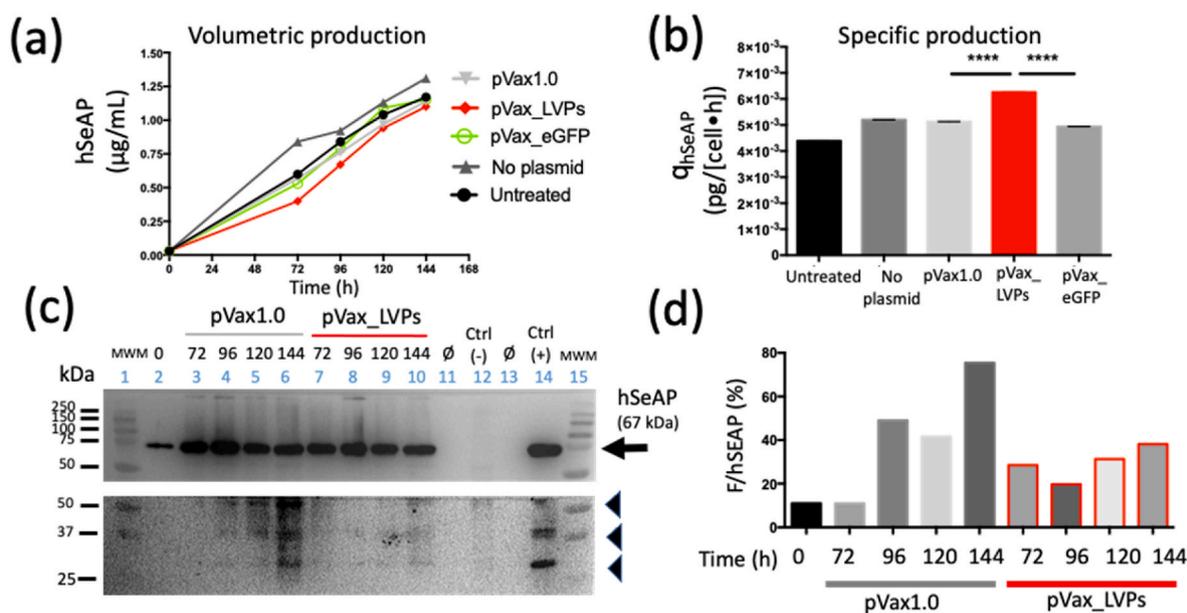


Fig. 4. Cell concentration and viability were not affected by the expression of the *lvp* system in CHO-hSeAP cells. CHO-hSeAP cells were transfected with an equimolar 2 pmol mix of pVax\_LVPs plasmids, with an empty pVax plasmid, mock-transfected (no plasmid), or untreated. No significant difference was observed between the growth or viability of transfected cells. Error bars show standard deviations. N = 4.



**Fig. 5.** Expression of the *lvp* system increased the specific productivity of hSeAP protein by preventing its fragmentation. CHO cells stably expressing hSeAP were transfected with an equimolar mix of 2 pmol of pVax\_LVPs plasmids. After 48 h post-transfection, we evaluated: (a) hSeAP volumetric production. CHO-hSeAP transfected with 2 pmol of: ▼ pVax1.0 empty plasmid, ◆ equimolar mix of pVax\_LVPs, ○ reporter plasmid pVax\_eGFP, ▲ without plasmid only with FreeStyle™ and ● without treatment (no plasmid, no cationic lipid). (b) hSeAP specific production rate, and (c) hSeAP integrity by Western blot (culture supernatants 72 h–144 h). To avoid overexposure of the intact hSeAP bands, the membrane was cut, incubated independently, and treated under the same conditions with longer exposure times. (d) Densitometric analysis of (c). Arrowheads: hSeAP fragments. Ø: empty well. MWM: Molecular Weight Marker. Ctrl (–): CHO mock-transfected cell supernatant. Ctrl (+): CHO-hSeAP culture supernatant. F/hSeAP refers to cleaved SEAP. Error bars correspond to standard deviations. N = 3, (\*\*\*\*) statistically significant difference  $p < 0.0001$ .

**Table 3**  
hSeAP specific production rates.

	pVax1.0 (empty plasmid)	pVax_eGFP (reporter plasmid)	pVax_LVPs ( <i>lvp</i> system)
qhSeAP (pg/cell.h)	$5.1 \times 10^{-3} \pm 2.6 \times 10^{-6}$	$4.9 \times 10^{-3} \pm 3.2 \times 10^{-6}$	$6.3 \times 10^{-3} \pm 3.7 \times 10^{-6}$
Increase	104 %	100 %	129 %****

\*\*\*\* $p < 0.01$ .

possible, and that a peptide aldehyde protein inhibitor was produced *in vivo*, protecting two model recombinant proteins from proteolysis.

The expression of bacterial biosynthetic pathways in mammalian cells has been scarcely explored before. To our knowledge, this is the first time that a non-ribosomal peptide is produced in CHO cells. Before starting this project, several questions had to be addressed, such as the capability of the bacterial system to utilize mammalian tRNA and the capacity of mammalian cells to post-translationally activate the bacterial NRPS by phosphopantethenylation. CHO cells expressed the NRPS system and produced the peptide aldehyde livipeptin through transient transfection. Our work expands the possibility of expressing other useful bacterial biosynthetic pathways in mammalian cells.

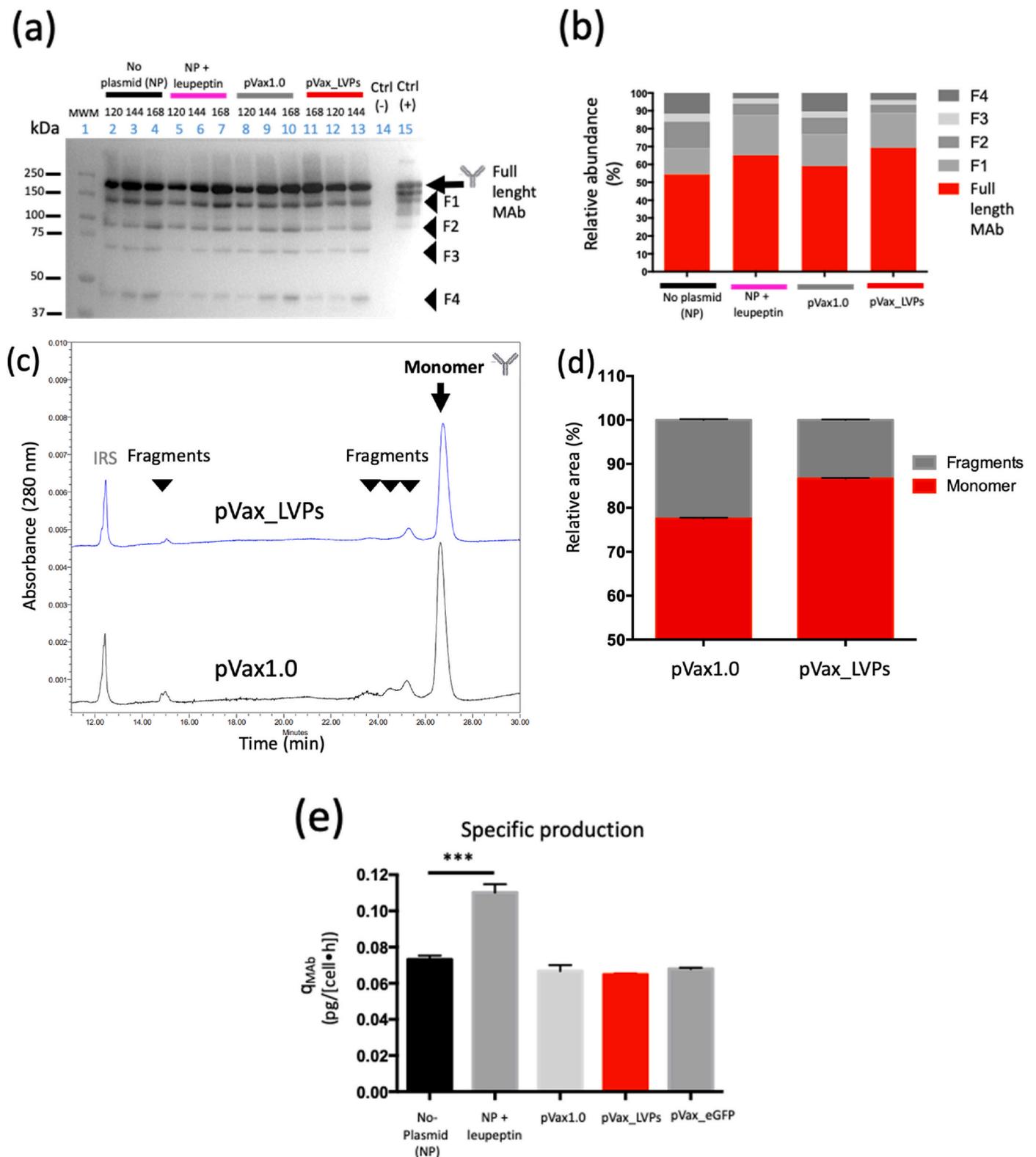
The heterologous expression of NRPSs has been mostly reported in lower eukaryotic cells, fungi (Siewers et al., 2009). The *lvp* system, in comparison to other NRPSs (Huo et al., 2019), offers the practical advantage of its small size (4.6 kbp), making it suitable for recombinant expression. There is only one study in which a NRPS biosynthetic pathway is expressed in mammalian cells (Müller et al., 2012). In such report, the non-ribosomal peptide indigoidine was produced by co-expressing the NRPS of *Streptomyces lavendulae*, BpsA; as well as the NRPS activator 4'-phosphopantetheinyl transferase (PPTase) Svp of *Streptomyces verticillus* in HEK293-T cells, FreeStyle293-F cells and human stem cells (hMSC-TERT). In our study we found that the non-ribosomal peptide livipeptin was produced by expressing only the NRPS *lvp* system, without co-expression of an auxiliary PPTase,

suggesting that the presence of an endogenous PPTase in CHO cells capable of activating it. Actually, it is known that this enzyme is conserved in all kingdoms due to its fundamental role in fatty acid metabolism (Beld et al., 2014).

The highest protease inhibition activity (up to 50 % of inhibition compared to the empty plasmid pVax1.0) was found in the culture supernatants of hSeAP-CHO cells expressing the *lvp* system, which suggests a greater presence of livipeptin in the extracellular medium. This result implies that livipeptin was secreted by a mechanism that remains to be identified by future studies. This is an advantage for preventing proteolysis of secreted recombinant proteins, which accumulate in the extracellular medium and are susceptible to proteolytic degradation due to the presence of extracellular proteases and long residence times (Chakrabarti et al., 2016; Clincke et al., 2011; Kol et al., 2020; Laux et al., 2018; Li et al., 2019; Lim et al., 2018; Park et al., 2017).

In our study, the prevention of proteolytic fragmentation of hSeAP and a greater abundance of the complete form of a monoclonal antibody demonstrate the utility of expressing the bacterial *lvp* system to reduce proteolysis easily and cheaply in mammalian cell cultures. Interestingly, protease inhibition by livipeptin did not affect cell growth or viability, when compared to transfection with the irrelevant plasmid coding for eGFP. Livipeptin, a cysteine protease inhibitor, could have affected cell growth and viability by inhibiting proteases that participate in essential biological processes, such as protein turnover (inhibition of proteases at the lysosomal level) and cellular apoptosis (caspases). The absence of changes in cell viability at 144 h post-transfection shows that the cell contended with its presence. Livipeptin contains an aldehyde group that can participate in other chemical reactions besides the binding with cysteine proteases. Nevertheless, it is known that mammalian cells can neutralize aldehydes through the glutathione system (Fritz and Petersen, 2013). Even when the integrity of livipeptin could be reduced by the endogenous cellular redox-control glutathione system, we show that it remained functional both in the intracellular and extracellular spaces.

One limitation of this study is that the expression of the *lvp* system was transient with a transfection efficiency of around 30 %. Therefore,



**Fig. 6.** Expression of the *lyp* system reduced fragmentation of a MAb produced by CHO-MAb cells. CHO cells stably expressing a recombinant monoclonal antibody (MAb) were transfected with an equimolar mix of 6 pmol of pVax\_LVPs plasmids or with the empty plasmid. (a) MAb integrity by non-reducing Western blot (culture supernatants 120 h–168 h post-transfection); (b) Relative abundance of MAb bands at 168 h post-transfection by densitometric analysis of blots; (c) Integrity of MAb purified by affinity chromatography analyzed by capillary electrophoresis (168 h post-transfection); (d) Relative area analysis of MAb signal from (c); (e) MAb specific production at 168 h post-transfection. Arrowhead: MAb fragments. Arrow: full-length MAb. MWM: Molecular Weight Marker. Ctrl (-): CHO mock cell supernatant. Ctrl (+): 2  $\mu$ g of standard MAb. IRS: Internal reference standard of 10 kDa. Error bars correspond to difference between duplicates. N = 2. \*\*\* Significant difference  $p < 0.001$ .

the expression of the *hvp* system and livipeptin production is gradually lost. Furthermore, generating a stable cell line remains to be investigated as an alternative to producing livipeptin in CHO cells. Another limitation is that the cell lines used are academic and have a lower productivity than industrial cell lines. The efficiency of the proposed strategy remains to be investigated in the latter setting.

The strategy presented here to inhibit cysteine-type proteases is a practical and general way to inhibit this type of enzymes intracellularly and extracellularly, without extensive cell engineering and without the risk of affecting cell physiology by a continuous protease inhibition that would be present in cells stably expressing the *hvp* system. The positive results generated here open the door to generating stable cell lines that express the *hvp* system. This study is a proof of concept that adds knowledge to the existing alternatives to control the proteolytic activity in cell cultures and improve the production of recombinant proteins.

## 5. Conclusions

Our research shows that the strategy of expressing a microbial system that produces a cysteine protease inhibitor, livipeptin, in CHO cell cultures is effective for preventing proteolysis of two different model proteins, secreted alkaline phosphatase (hSeAP) and a MAbs. This strategy has the potential to improve the production of other recombinant proteins. Our work contributes to the efforts made to improve the production and quality of recombinant proteins. Furthermore, this research adds to the knowledge of the production of non-ribosomal peptides with biological activity in mammalian cells. It is important to note that creating a stable cell line producing livipeptin could further enhance its production, thereby improving the prevention of proteolysis by cysteine proteases in CHO cell cultures.

## CRedit authorship contribution statement

**Violeta Guadarrama-Pérez:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft. **César Aguilar:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Alberto Porrás-Sanjuánico:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Enrique Merino:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Resources, Writing – review & editing. **Octavio T. Ramírez:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Writing – review & editing. **Francisco Barona-Gómez:** Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Laura A. Palomares:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgments

Violeta Guadarrama Pérez is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a CONAHCyT fellowship 244042. Carlos Aguilar was supported by a CONAHCyT postdoctoral fellowship 730043. Technical support by Martha Contreras, Vanessa Hernández, Ruth Pastor, Hilda E. Ramos-Aboites, and Karina Verdel-Aranda. UNAM supported this study. Livipetin work in the FBG laboratory was funded by CONAHCyT (FINNOVA No. 214716), Laboratorios Liomont, and the UK Royal Society via a Newton Advanced Fellowship (NAF\R2\180631).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2024.01.005>.

## Abbreviations

C domain	Condensation
CHO cells	(Chinese hamster ovary cells)
CMV	cytomegalovirus
eGFP	enhanced green fluorescent protein
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
hSeAP	human secreted alkaline phosphatase
MS	Mass spectrometry
NRPS	non-ribosomal peptide synthetase
PPTase	phosphopantetenylyl transferase
RP-UPLC	Reversed Phase Ultra High-Performance Liquid Chromatography
tTRUE	tRNA-utilizing enzyme

## References

- Aguilar, C., Verdel-Aranda, K., Ramos-Aboites, H.E., Licona-Cassani, C., Barona-Gómez, F., 2023. *Streptomyces lividans* 66 produces a protease inhibitor via a tRNA-utilizing enzyme interacting with a C-minus NRPS. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 50 (1), kuad021. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad021>.
- Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K., Kondo, S., 1969. Leupeptins, new protease inhibitors from actinomycetes. *J. Antibiot.* 22 (6), 283–286. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.22.283>.
- Beld, J., Sonnenschein, E.C., Vickery, C.R., Noel, J.P., Burkart, M.D., 2014. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a posttranslational modification crucial for life. *Nat. Prod. Rep.* 31 (1), 61–108. <https://doi.org/10.1039/c3np70054b>. The.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1–2), 248–254.
- Brayer, G.D., Delbaere, L.T.J., James, M.N.G., Bauer, C.-A., Thompson, R.C., 1979. Crystallographic and kinetic investigations of the covalent complex formed by a specific tetrapeptide aldehyde and the serine protease from *Streptomyces griseus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1), 96–100. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.96>.
- Bulté, D.B., Palomares, L.A., Gómez Parra, C., Martínez, J.A., Contreras, M., Noriega, L. G., Ramírez, O.T., 2020. Overexpression of the mitochondrial pyruvate carrier reduces lactate production and increases recombinant protein productivity in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* 1–15. <https://doi.org/10.1002/bit.27439>. April.
- Chakrabarti, S., Barrow, C.J., Kanwar, R.K., Ramana, V., Kanwar, J.R., 2016. Studies to prevent degradation of recombinant fc-fusion protein expressed in mammalian cell line and protein characterization. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (903), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms17060913>.
- Clinck, M., Guedon, E., Yen, F.T., Ogier, V., Goergen, J., 2011. Characterization of metalloprotease and serine protease activities in batch CHO cell cultures: control of human recombinant IFN- $\gamma$  proteolysis by addition of iron citrate. *BMC Proc.* 5 (Suppl. 8), P115. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P115>.
- Cruz-Morales, Pablo, Vijgenboom, E., Iruegas-Bocardo, F., Girard, G., Yáñez-Guerra, L.A., Ramos-Aboites, H.E., Pernodet, J.-L., Anné, J., Van Wezel, G.P., Barona-Gómez, F., 2013. The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. *Genome Biol. Evol.* 5 (6), 1165–1175. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt082>.
- Fritz, K.S., Petersen, D.R., 2013. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 59, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.025>.
- Henry, M., Gallagher, C., Kelly, R.M., Frye, C.C., Osborne, M.D., Brady, C.P., Barron, N., Clynes, M., Meleady, P., 2018. Clonal variation in productivity and proteolytic clipping of an Fc-fusion protein in CHO cells: proteomic analysis suggests a role for defective protein folding and the UPR. *J. Biotechnol.* 281 (May), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.018>.
- Huo, L., Hug, J.J., Fu, C., Bian, X., Zhang, Y., Müller, R., 2019. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.* 36, 1412–1436. <https://doi.org/10.1039/c8np00091c>.
- Invitrogen, 2012. pVAX1™. Invitrogen User Guide 1 (25), 8. [https://doi.org/10.1007/SpringerReference\\_27988](https://doi.org/10.1007/SpringerReference_27988).
- Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., Yokoyama, S., 2004. Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J. Struct. Funct. Genom.* 5 (1–2), 63–68. <https://doi.org/10.1023/B:JSPG.0000029204.57846.7d>.
- Kim, J.H., Komatsu, M., Shin-ya, K., Omura, S., Ikeda, H., 2018. Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in Actinomycetales microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115 (26), 6828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800715115>. LP – 6833.

- Kol, S., Ley, D., Wulff, T., Decker, M., Arnsdorf, J., Schoffelen, S., Hansen, A.H., Jensen, T.L., Gutierrez, J.M., Chiang, A.W.T., Masson, H.O., Palsson, B.O., Voldborg, B.G., Pedersen, L.E., Kildegaard, H.F., Lee, G.M., Lewis, N.E., 2020. Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity. *Nat. Commun.* 11 (1) <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15866-w>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- LaLonde, J.M., Zhao, B., Smith, W.W., Janson, C.A., Desjarlais, R.L., Tomaszek, T.A., Carr, T.J., Thompson, S.K., Oh, H., Yamashita, D.S., Veber, D.F., Abdel-Meguid, S.S., 1998. Use of papain as a model for the structure-based design of cathepsin K inhibitors: crystal structures of two papain-inhibitor complexes demonstrate binding to S'-Subsites. *J. Med. Chem.* 41 (23), 4567–4576. <https://doi.org/10.1021/jm980249f>.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., Walsh, C.T., 1996. A new enzyme transferases superfamily - the phosphopantetheinyl. *Chem. Biol.* 3 (11), 923–936.
- Laux, H., Romand, S., Nuciforo, S., Farady, C.J., Tapparel, J., Buechmann-Moeller, S., Sommer, B., Oakeley, E.J., Bodendorf, U., 2018. Degradation of recombinant proteins by Chinese hamster ovary host cell proteases is prevented by matriptase - 1 knockout. *Biotechnol. Bioeng.* 2530–2540. <https://doi.org/10.1002/bit.26731>.
- Lewis, C.A., Wolfenden, R., 1977. Thiohemiacetal Formation by inhibitory aldehydes at the active site of papain. *Biochemistry* 16 (22), 4890–4895. <https://doi.org/10.1021/bi00641a023>.
- Li, S.W., Yu, B., Byrne, G., Wright, M., O'Rourke, S., Mesa, K., Berman, P.W., 2019. Identification and CRISPR/Cas9 inactivation of the C1s protease responsible for proteolysis of recombinant proteins produced in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* 116 (9), 2130–2145. <https://doi.org/10.1002/bit.27016>.
- Lim, A., Doyle, B.L., Kelly, G.M., Reed-bogan, A.M., Breen, L.H., Shamlou, P.A., Lambooy, P.K., 2018. Characterization of a cathepsin D protease from CHO cell-free medium and mitigation of its impact on the stability of a recombinant therapeutic protein. *Biotechnol. Prog.* 34 (1), 120–129. <https://doi.org/10.1002/btpr.2530>.
- Martensen, P.M., Justesen, J., 2001. Specific inhibitors prevent proteolytic degradation of recombinant proteins expressed in High Five™ cells. *Biotechniques* 30 (4), 782–792. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(200104\)30:4<782::AID-BTE782>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-4644(200104)30:4<782::AID-BTE782>3.0.CO;2-1).
- Maxson, T., Tietz, J.I., Hudson, G.A., Guo, X.R., Tai, H., Mitchell, D.A., 2016. Targeting reactive carbonyls for identifying natural products and their biosynthetic origins. *J. Am. Chem. Soc.* 138 (46), 15157–15166. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b06848>.
- Müller, M., Ausländer, S., Ausländer, D., Kemmer, C., Fussenegger, M., 2012. A novel reporter system for bacterial and mammalian cells based on the non-ribosomal peptide indigoidine. *Metab. Eng.* 14 (4), 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.04.002>.
- Murao, S., Shin, T., Katsu, Y., Nakatani, S., Hirayama, K., 1985. Novel thiol proteinase inhibitor, thiolstatin, produced by a strain of *Bacillus cereus*. *Agric. Biol. Chem.* 49 (3), 895–897. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866825>.
- Park, J.H., Jin, J.H., Lim, M.S., An, H.J., Kim, J.W., Lee, G.M., 2017. Proteomic analysis of host cell protein dynamics in the culture supernatants of antibody-producing CHO cells. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep44246>. November 2016.
- Robert, F., Bierau, H., Rossi, M., Agugiaro, D., Soranzo, T., Broly, H., Mitchell-Logean, C., 2009. Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: identification of a CHO cathepsin D protease. *Biotechnol. Bioeng.* 104 (6), 1132–1141. <https://doi.org/10.1002/bit.22494>.
- Schlumbohm, W., Stein, T., Ullrich, C., Krause, M., Marahiel, M.A., Krufft, V., Wittmann-lieboldll, B., 1991. An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. *J. Biol. Chem.* 266 (34), 23135–23141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54473-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54473-2).
- Siewers, V., Chen, X., Huang, L., Zhang, J., Nielsen, J., 2009. Heterologous production of non-ribosomal peptide LLD-ACV in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 11 (6), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.08.002>.
- Strober, W., 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 111 (1) <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>. A3.B.1-A3.B.3.
- Tietze, A., Shi, Y., Kronenwerth, M., Bode, H.B., 2020. Nonribosomal peptides produced by minimal and engineered synthetases with terminal reductase domains. *ChemBiochem* 21, 2750–2754. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000176>.