

**“TRANSFECCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE
MAMÍFERO PARA LA CO-EXPRESIÓN DE GENES
CODIFICANTES DE UN ANTICUERPO
MONOCLONAL TERAPÉUTICO EN UNIDADES
TRANSCRIPCIONALES INDEPENDIENTES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA

PRESENTA
IBT. ROGER IVÁN GIL SOTO

Director.

Dr. Abel Gutiérrez Ortega

Codirector

Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez.

Asesores.

M. en C. Flor Yohana Flores Hernández.

Dr. Jorge Bravo Madrigal

Guadalajara, Jalisco a 09 de Julio del 2021



Guadalajara, Jalisco a 9 de julio de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Roger Iván Gil Soto**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “TRANSFECCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE MAMÍFERO PARA LA CO-EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL TERAPÉUTICO EN UNIDADES TRANSCRIPCIONALES INDEPENDIENTES” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica (Biotecnología Médica y Farmacéutica) durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 09 del mes de julio del año dos mil dieciséis.

Nombre y firma

Dr. Abel Gutiérrez Ortega

Nombre y firma

Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez

Nombre y firma

MC. Flor Yohana Flores Hernández

Nombre y firma

Dr. Jorge Bravo Madrigal

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado como parte de la Convocatoria de Becas Nacionales 2018 Segundo Periodo. No. De becario: 717485.

Al *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco* por permitirme tener esta oportunidad de desarrollo personal y profesional de llevar a cabo este proyecto de Maestría en Ciencia y Tecnología.

A mi director de Tesis, el Dr. Abel Gutiérrez Ortega, que me permitió formar parte de su equipo de investigación y confió en mi habilidad de desarrollar este proyecto.

A todo mi comité tutorial, el Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez como codirector, la M. en C. Flor Yohana Flores Hernández y el Dr. Jorge Bravo Madrigal como asesores; que me brindaron su apoyo, conocimientos y guía durante todo este tiempo para realizar el mejor trabajo posible.

Al resto de los investigadores y alumnos del *Centro* que me brindaron su apoyo y siempre estuvieron ahí para ayudarme.

En especial agradezco a M. en C. Lorena Zapata por su amistad e incansable guía y ayuda en el laboratorio. Sé que serás una increíble Doctora en Ciencias.

A mis amigos Iliany Martínez, Andrés Méndez y Jesús Muñoz por las incontables horas de buenos momentos que pasamos juntos.

A mi mamá, Irma, que me enseñó a nunca rendirme y siempre dar lo mejor de mi sin importar la situación. Y su apoyo incondicional, ante todo.

A mi familia, por siempre recibirme con brazos abiertos en cualquier lugar.

RESUMEN

Los métodos de producción de proteínas recombinantes como anticuerpos monoclonales terapéuticos han ido evolucionando en las últimas décadas. La constante optimización de líneas celulares y vectores para su transfección han llevado a desarrollar metodologías cada vez más robustas y especializadas. En este trabajo se utilizaron células de riñón de mono verde africano para ser transfectadas con dos agentes químicos lipídicos y se analizó su capacidad de expresar proteínas de interés para el sector farmacéutico. Utilizando Lipofectamina™ 2000 y Expifectamina™ CHO, se transfectó la línea celular VERO adherente, determinando que dicha línea puede ser transfectada con un agente optimizado para una línea celular diferente en suspensión. Se utilizó una construcción plasmídica basada en pViro1-Neo-MCS con genes codificantes para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal Cetuximab; un plásmido vector de control positivo de expresión de anticuerpo fabricado especialmente para sistemas celulares de mamífero; y un vector phMGFP codificante a una proteína fluorescente. Finalmente, encontramos que la línea celular VERO puede ser transfectada con el agente Expifectamina™ CHO y es capaz de expresar las proteínas de los genes del vector de control positivo de expresión de anticuerpo y el vector phMGFP.

PALABRAS CLAVE

- Anticuerpos Monoclonales
- Células de mamífero
- Cetuximab
- Expifectamina
- Lípidos catiónicos
- Lipofectamina
- Plásmido
- Proteínas recombinantes
- Transfección
- Vector plasmídico
- VERO

CONTENIDO

RESUMEN	i
PALABRAS CLAVE	ii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Anticuerpos monoclonales (mAbs)	3
Inmunoterapias con anticuerpos monoclonales	Error! Bookmark not defined.
Producción de anticuerpos monoclonales	8
I) Tecnología de hibridomas	8
II) Tecnología de despliegue en fagos	10
III) Producción mediante animales transgénicos	11
IV) Producción mediante sistemas de células de mamífero	12
Sistemas celulares de mamífero	14
I) <i>CHO</i>	16
II) <i>HEK-293</i>	17
III) <i>VERO</i>	18
Métodos de transfección para cultivos celulares	19
I) Métodos biológicos	19
II) Métodos físicos	19
III) Métodos químicos	19
Vectores plasmídicos para transfección celular	21
I) Vector <i>phMGFP</i>	22
II) Vector <i>pcDNA3.4</i>	23
III) Vector <i>pVitro1-Neo-MCS</i>	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26

JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos.....	29
MATERIALES Y METODOLOGÍA	30
Diseño de genes (<i>Cetuximab</i>).....	30
Recepción de genes (<i>Cetuximab</i>).....	31
Análisis de concentración de ADN.....	32
Amplificación de plásmidos <i>pUC57</i> con cadena ligera y pesada (<i>cetuximab</i>).....	33
Extracción de ADN plasmídico.....	33
Digestión de plásmidos <i>pUC57</i> con genes de cadenas ligera y pesada.....	34
Construcción de los plásmidos <i>pVitro1-Neo-MCS</i> con genes de cadena ligera y pesada (<i>cetuximab</i>).....	35
Transformación de <i>E. coli</i> con construcciones plasmídicas <i>pVitro1-Neo-MCS</i>	36
Confirmación de construcciones plasmídicas <i>pVitro1-Neo-MCS (HC y LC)</i>	37
Amplificación y purificación de construcciones plasmídicas <i>pVitro1-Neo-MCS</i>	38
Construcción del vector de transfección <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i>	40
Cultivo y proliferación de línea celular VERO.....	42
Transfección de cultivos celulares.....	42
1. Viabilidad de transfección celular con <i>Expifectamine</i> [™] CHO en células VERO.....	43
2. Transfección de células VERO con vectores plasmídicos <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i> y <i>AB</i> ⁺	44
3. Transfección de células VERO en placas de 6 pozos.....	46
Análisis de proteínas con SDS-PAGE.....	48

Análisis de anticuerpos monoclonales con Western Blot.....	48
RESULTADOS.....	51
Recuperación de genes <i>HC</i> y <i>LC</i> de <i>Cetuximab</i> del plásmido <i>pUC57</i>	51
Análisis inicial de concentración de plásmidos <i>pUC57</i> (<i>HC</i> y <i>LC</i>).....	51
Amplificación de plásmidos <i>pUC57</i> (<i>HC</i> y <i>LC</i>)	51
Reacciones de digestión para linealizar <i>pVitro1-Neo-MCS</i> y extraer genes <i>HC</i> y <i>LC</i> de <i>pUC57</i>	52
Construcción de plásmidos <i>pVitro1-Neo-HC</i> y <i>pVitro1-Neo-LC</i>	52
Confirmación de construcciones	52
Amplificación y purificación de construcciones <i>pVitro1-Neo-HC</i> y <i>pVitro1-Neo-LC</i>	53
Construcción del plásmido para transfección <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i>	55
Confirmación de construcción <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i>	55
Amplificación de <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i>	55
Transfección de cultivos celulares	57
Prueba de viabilidad de transfección de células VERO con Expifectamina™ CHO	57
Transfección de células VERO con vector plasmídico <i>phMGFP</i> en placas de 24 pozos.....	64
Transfección con vector <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i> en placas de 24 pozos.....	66
SDS-PAGE de VERO + <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i>	66
Western Blot de VERO + <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i>	67
Transfección de VERO con vector <i>AB+</i> en placas de 24 pozos.....	68
SDS-PAGE de VERO + vector <i>AB+</i>	68
Western Blot de VERO + vector <i>AB+</i>	69
Transfección de células VERO en placas de 6 pozos	71

DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	79
PERSPECTIVAS.....	80
REFERENCIAS.....	81

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Biofarmacéuticos y sus sistemas de expresión.....	15
TABLA 2. Sitios de clonación y genes digeridos con sus correspondientes enzimas de restricción para llevar a cabo las construcciones plasmídicas	40
TABLA 3. Concentraciones de los plásmidos <i>pUC57-HC</i> y <i>pUC57-LC</i>	51
TABLA 4. Resultados del análisis de concentración de plásmidos amplificados <i>pUC57-HC</i> y <i>pUC57-LC</i>	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura tradicional de un anticuerpo monoclonal IgG.....	4
FIGURA 2. Formatos alternativos de anticuerpos monoclonales	5
FIGURA 3. EGFR y método de acción de <i>Cetuximab</i>	7
FIGURA 4. Procedimiento para producción de hibridomas	9
FIGURA 5. Diseño y amplificación de biblioteca de anticuerpos mediante despliegue en fagos	11
FIGURA 6. Diagrama de transfección transitoria en un sistema de células de mamífero	14
FIGURA 7. Cultivo celular CHO	16
FIGURA 8. Cultivo celular HEK-293.....	17
FIGURA 9. Cultivo celular VERO	18

FIGURA 10. Mecanismo de formación de <i>lipoplexes</i> entre ADN plasmídico y lípido catiónico DOTMA para transfección celular	21
FIGURA 11. Estructura del plásmido <i>phMGFP</i> Monster Green® Fluorescent Protein	23
FIGURA 12. Estructura del plásmido <i>pcDNA3.4</i>	24
FIGURA 13. Plásmido <i>pViro1-Neo-MCS</i>	25
FIGURA 14. Secuencia del gen para la cadena pesada	30
FIGURA 15. Secuencia del gen para la cadena ligera	31
FIGURA 16. Mapa de <i>pUC-57</i>	32
FIGURA 17. Electroforesis de muestras de plásmidos y marcador de tamaño 1 kb plus.....	52
FIGURA 18. Construcciones plasmídicas con <i>pViro1-Neo-HC</i> y <i>pViro1-Neo-LC</i>	53
FIGURA 19. Resultados del análisis de concentración de plásmidos	54
FIGURA 20. Electroforesis de plásmidos <i>pViro1-Neo-HC</i> y <i>pViro1-Neo-LC</i>	54
FIGURA 21. Electroforesis de plásmidos <i>pViro1-Neo-LC</i> y <i>pViro1-Neo-Cetuxi</i>	55
FIGURA 22. Resultados del análisis de concentración del plásmido amplificado <i>pViro1-Neo-Cetuxi</i>	56
FIGURA 23. Electroforesis de plásmidos amplificados <i>pViro1-Neo-LC</i> y <i>pViro1-Neo-Cetuxi</i>	57
FIGURA 24. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con Lipofectamina 2000 y el vector <i>phMGFP</i>	59
FIGURA 25. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con 1.0 µl de Expifectamina™ CHO y el vector <i>phMGFP</i>	60
FIGURA 26. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con 1.5 µl de Expifectamina™ CHO y el vector <i>phMGFP</i>	61
FIGURA 27. . Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con 2.0 µl de Expifectamina™ CHO y el vector <i>phMGFP</i>	62

FIGURA 28. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con 2.5 µl de Expifectamina™ CHO y el vector <i>phMGFP</i>	63
FIGURA 29. . Cultivo VERO sin transfectar utilizado como control negativo	64
FIGURA 30. Ensayos por duplicado de transfección para control positivo con vector <i>phMGFP</i> en células VERO cultivadas en placas de 24 pozos	65
FIGURA 31. SDS-PAGE de muestras de transfección de células VERO con <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i> con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO en placas de 24 pozos.....	66
FIGURA 32. Western Blot de muestras de transfección de células VERO con <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i> con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO en placas de 24 pozos.....	67
FIGURA 33. Ensayo para control positivo de transfección con vector <i>phMGFP</i> en células VERO cultivadas en placas de 24 pozos	68
FIGURA 34. SDS-PAGE de muestras de transfección de células VERO con vector <i>AB+</i> con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO en placas de 24 pozos	69
FIGURA 35. Western Blot de muestras de transfección de células VERO con vector <i>AB+</i> con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO en placas de 24 pozos	70
FIGURA 36. Ensayo para control positivo de transfección con vector <i>phMGFP</i> en células VERO cultivadas en placa de 6 pozos. Volumen de Expifectame™ CHO correspondiente a 9.0 µl.....	72
FIGURA 37. Western Blot de muestras de transfección de células VERO con vectores <i>AB+</i> y <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i> en placa de 6 pozos	73
FIGURA 38. Western Blot de muestras de biomasa de los cultivos de transfección de células VERO con vectores <i>AB+</i> y <i>pVitro1-Neo-Cetuxi</i> en placa de 6 pozos	74

FIGURA 39. Visualización de la expresión de una proteína fluorescente recombinante en un sistema de cultivo en suspensión CHO; transfectado con Expifectamina™ CHO, a través de 72 horas..... 76

FIGURA 40. Rendimientos de producción de proteína recombinante (hlgG) obtenidos mediante transfección con Expifectamina™ CHO y PEI 77

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos monoclonales (mAbs, por sus siglas en inglés) son proteínas que tienen más de tres décadas de ser consideradas medicamentos para el tratamiento de enfermedades. Desde 1986 que fue aprobado el primer anticuerpo como agente inmunoterapéutico (Eno, 2017) (Ecker y cols., 2015) (Buss y cols., 2012) aproximadamente otros 100 mAbs han sido aprobados por la U.S. Food & Drug Administration (FDA) hasta la fecha con el mismo fin (Manis, 2020). Las ganancias generadas por el mercado de estos medicamentos han alcanzado más de \$100 mil millones de dólares anuales. Alrededor del mundo existen más de 500 diferentes proteínas que han sido estudiadas en pruebas clínicas por diferentes compañías (Lu, Hwang, & Liu, 2020). Sin duda, es clara la importancia de estas biomoléculas tanto para el presente como para el futuro de las ciencias de la salud.

Una buena parte de las inmunoterapias con mAbs van dirigidas a los tratamientos contra cáncer; aproximadamente 15 % del total de anticuerpos monoclonales aprobados son exclusivos para el área de oncología, volviéndolos el grupo más grande de aplicación médica. A este grupo le sigue hematología y dermatología con un 12 % y 9 %, respectivamente (Grilo & Mantalis, 2018).

Es evidente entonces la necesidad de desarrollar terapias efectivas contra estos tipos de patologías. Por su historial, los mAbs han demostrado ser agentes adecuados con alta eficacia anti-tumoral. Pero la efectividad de estas proteínas depende de la optimización de sus propiedades como su afinidad, la especificidad y conformación, de manera que su producción se vuelve un factor clave al momento de diseñarlas y aplicar inmunoterapias a los pacientes.

La ingeniería genética se ha vuelto una de las herramientas más importantes para diseñar y producir estas proteínas terapéuticas, permitiendo desarrollar anticuerpos con funcionalidades aumentadas como funciones efectoras, inmunomodulación, penetración tumoral y de tejidos, alta afinidad a blancos conservados, reducción de inmunogenicidad en pacientes durante las terapias, entre otras (Saeed y cols., 2017). Tecnologías como el despliegue en fagos e hibridomas han servido para la producción

de nuevos mAbs en diferentes formatos como IgG, scFV, diabodies, entre otros (Carter, 2006).

Sin embargo, estas tecnologías pueden presentar algunas desventajas al producir mAbs específicos. Por ejemplo, se ha reportado que los hibridomas no siempre producen proteínas monoespecíficas donde hasta >30 % de un lote contienen modificaciones vitales a la estructura peptídica de interés (Bradbury, y cols., 2018). Por lo tanto, nuevas técnicas para fabricación de mAbs, como transferencia de ADN recombinante a sistemas in vivo con células de mamífero han mostrado numerosas ventajas sobre sus contrapartes. La reducción de costos de producción, falta de necesidad de cadenas de frío y perfiles de seguridad clínica son solo algunos de éstos (Andrews y cols., 2017) y por supuesto, generación de isotipos y dominios de ligación únicos (Morrow y cols., 2008). Por lo anterior, estas técnicas se han convertido en una opción atractiva para el desarrollo de inmunoterapias.

Uno de los obstáculos que se presentan con la tecnología de ADN recombinante son las extensas metodologías para la producción de los mAbs. Esto se debe a que por lo general es necesario elaborar protocolos que requieren el uso de diversos vectores plasmídicos, diferentes unidades transcripcionales y posiblemente, diferentes líneas celulares, además de todos los procesos unitarios para clonar, expresar y recuperar cada una de las fracciones proteicas de interés (Dodev y cols., 2014).

Este trabajo propone el evaluar la modularidad de la tecnología de ADN recombinante con el propósito de investigar las metodologías de transfección celular y expandir los protocolos para la expresión y producción de mAbs recombinantes terapéuticos, utilizando un sistema comercial optimizado para cultivos en suspensión de la línea celular CHO en una línea celular adherente VERO.

ANTECEDENTES

Anticuerpos monoclonales (mAbs)

Derivados de los estudios de Emil Behring que datan de 1890 (Patlak & Longo, 2009) los primeros mAbs fueron descritos en 1975 (Kohler & Milstein, 1975) son uno de los principales agentes terapéuticos de la actualidad con al menos 100 moléculas diferentes aprobadas entre las regulaciones americanas y europeas (Mullard, 2021).

Los mAbs se derivan originalmente de los anticuerpos convencionales que son proteínas del sistema inmune que protegen al organismo contra bacterias, virus y cualquier agente externo al organismo que pudiera ser dañino. Son glicoproteínas presentes en tejidos, sistema circulatorio, mucosas y son las responsables de los efectos inmunológicos humorales en el cuerpo (Chaplin, 2010). Son producidas por los linfocitos B (células del sistema inmune adaptativo) y son altamente específicas a antígenos que pueden ser internos o externos del organismo al que pertenecen (Merlo & Mandik-Nayak, 2013).

La estructura de los mAbs convencionales es la clase de inmunoglobulina G (IgG) que se compone de dos cadenas polipeptídicas idénticas de aproximadamente 50 kDa cada una, denominadas cadenas pesadas; y dos cadenas polipeptídicas idénticas de aproximadamente 25 kDa, denominadas cadenas ligeras (Flaherty, 2012). Ambos pares de cadenas se encuentran unidas por enlaces disulfuro formando un tetrámero con forma de “Y” (ver **Figura 1**) y consiste entre el 82 – 96 % del esqueleto proteico. El otro 4 – 18 % se conforma por carbohidratos variables que pueden tener la forma de azúcares simples o complejas, aunque la mayoría se compone por oligosacáridos que se unen a los grupos amino de las cadenas mediante galactosa. Las cadenas ligeras de la estructura son las que poseen las mayores variaciones entre organismos, donde las diferencias más significativas se encuentran en el extremo N-terminal de la secuencia; entre las posiciones aminoacídicas 1ra y 110ma, por lo que esta región de aminoácidos se denomina *región variable*. Terminada esta secuencia, el resto de la estructura se mantiene mayormente sin cambios, por lo que se ha denominado *región constante*. De igual modo, las cadenas pesadas poseen regiones variables y constantes; éstas primeras con un tamaño similar al de las cadenas ligeras, entre 1 y

110 aminoácidos; las segundas tienen un tamaño tres veces mayor que sus contrapartes ligeras (Janeway y cols., 2001) (Chaplin, 2010).

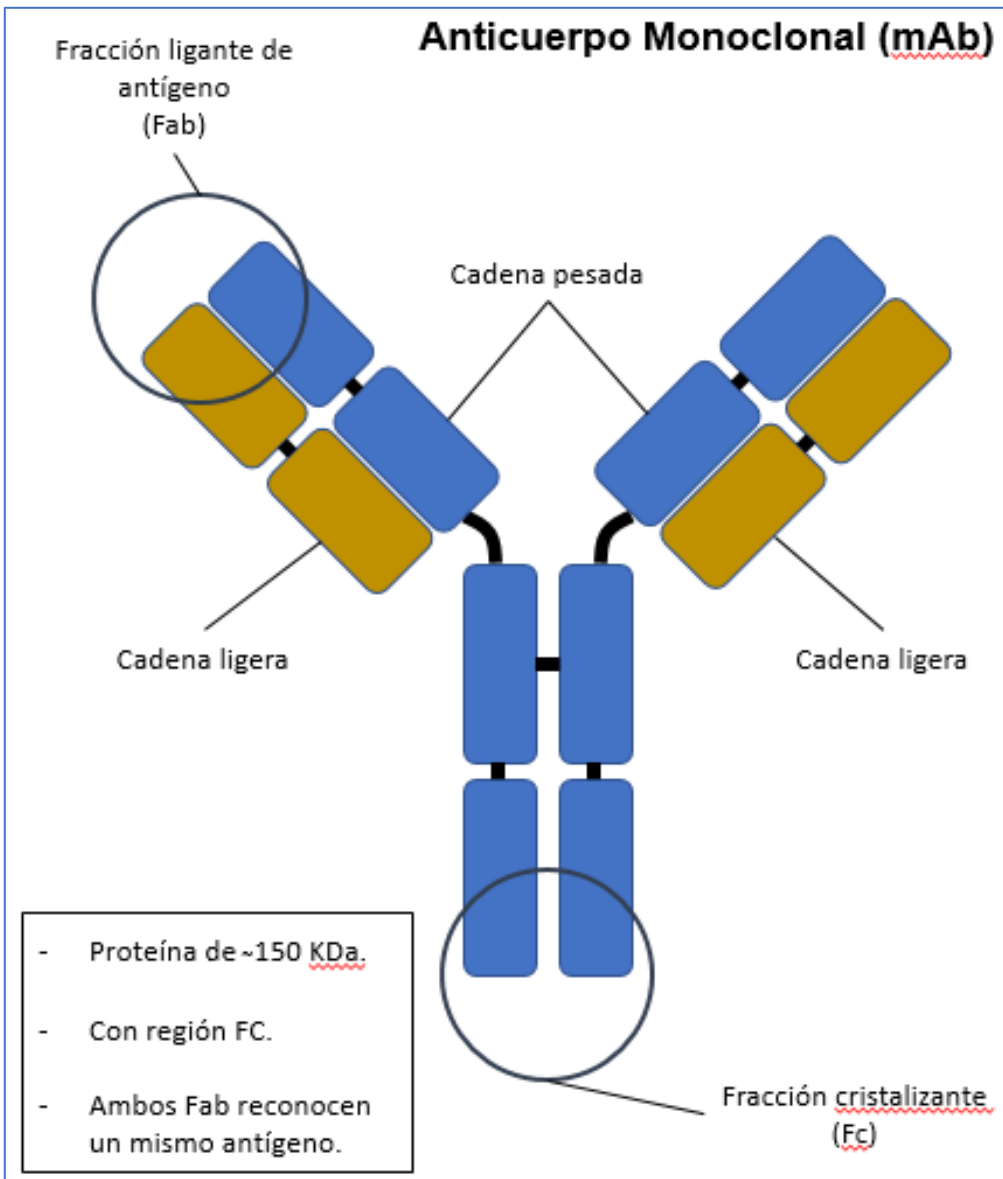


Figura 1. Estructura tradicional de un anticuerpo monoclonal IgG. Un par de cadenas ligeras y un par de cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro. Poseen una fracción variable (Fab) altamente específica a un antígeno y una fracción cristalizante (Fc) conservada que ayuda a funciones efectoras del sistema inmune.

A pesar de que la estructura de la IgG se consideraba el estándar para los mAbs, el éxito comercial de estos ha motivado la investigación, diseño y producción de formatos alternativos para estas proteínas terapéuticas (ver Figura 2); desde los novedosos anticuerpos biespecíficos como los Diabodies y los ScFv, hasta moléculas diminutas como las BiTe y los Nanobodies, cuyas propiedades (ej. una mayor capacidad de penetración de tejido tumoral) abren una nueva gama de posibilidades para las inmunoterapias (Smits & Sentman, 2016) (Spiess y cols., 2015) (Brinkmann & Kontermann, 2017) .

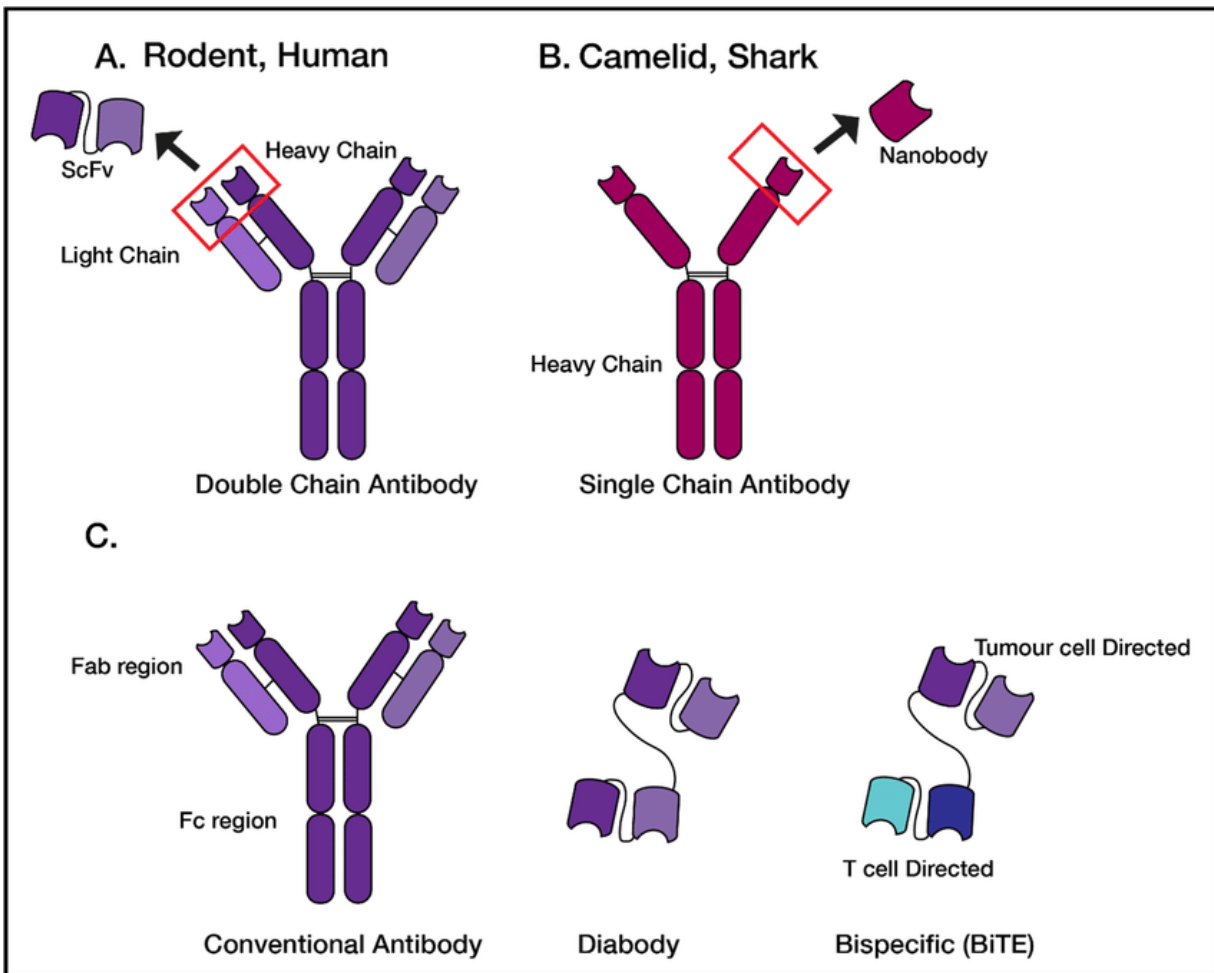


Figura 2. Formatos alternativos de anticuerpos monoclonales. A: Anticuerpo humanizado con doble cadena ligera y pesada. ScFv se conforma solamente de las regiones variables Fab. B: Anticuerpo de cadena pesada única. El *nanobody* se conforma solamente de la región Fab. C: Configuraciones de *Diabody* y *BiTE* conformados de las regiones variables de un anticuerpo convencional. (Figura tomada de (Abbot y cols., 2020).

Todas estas investigaciones y diseños se enfocan tanto en optimizar a los mAbs para las inmunoterapias, reduciendo las cantidades a administrar, aumentando su tiempo de vida, mejorando su afinidad a las células cancerígenas, así como reducir sus efectos secundarios como los riesgos de inmunogenicidad, que se asocia a los anticuerpos derivados de modelos animales (Kuramochi y cols., 2014). Sin embargo, uno de los puntos más importantes y estudiados para estas biomoléculas de gran interés es su producción. Debido a su constante demanda, la necesidad de evolucionar de los métodos, protocolos y formatos para producirlos se ha vuelto un punto clave en el desarrollo de los anticuerpos monoclonales, así como procedimientos personalizados para su expresión y purificación (De Marco, 2015).

Inmunoterapias con anticuerpos monoclonales

Debido a que los anticuerpos poseen la capacidad de reconocer y ligarse con alta afinidad a epítomos exclusivos, es decir, poseen especificidad hacia un solo fragmento de un antígeno en particular, el potencial para desarrollar terapias con estas proteínas depende sólo del diseño dado por el desarrollador. A pesar de que inmunoterapias contra cáncer son la principal área de aplicación de los mAbs, pocos de estos poseen actividad anti-tumoral. Sin embargo, debido a su propiedad antes descrita, resultan ser muy útiles como agentes terapéuticos cuando son utilizados en combinación con otros métodos, ya sea como auxiliares a quimioterapias y radioterapias, o conjugándolos a otras moléculas para formar inmunotoxinas que causen perturbaciones a las células tumorales y así interrumpir sus ciclos celulares o incluso destruirlas por completo (Martinelli y cols., 2009).

Sin embargo, algunos mAbs sí poseen propiedades anti-tumorales notables y han sido utilizados en inmunoterapias por sí mismos o en combinación con métodos auxiliares, particularmente aquellos anticuerpos diseñados para ser específicos al receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR, por sus siglas en inglés) en las células cancerígenas (Martinelli y cols., 2009). Dos proteínas recombinantes terapéuticas que reconocen y se ligan al EGFR ya han sido aprobadas en 2006 por la FDA: Cetuximab

(Figura 3, [Kirkpatrick y cols., 2004]) y Panitumumab (Wee & Wang, 2017).

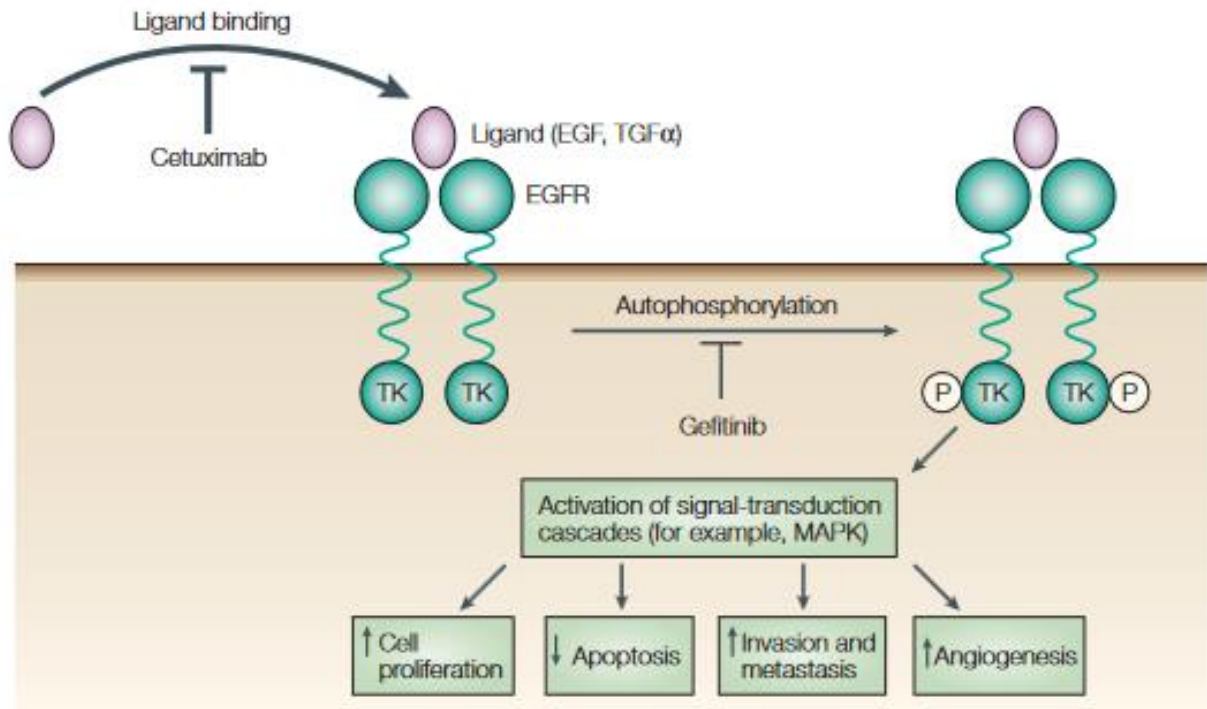


Figura 3. EGFR y método de acción de *Cetuximab*. (Figura tomada de (Kirkpatrick y cols., 2004)

El receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) es uno de cuatro miembros de la familia de receptores transmembranales de tirosina-quinasa erbB. Cuando un factor ligando se une a esta se inicia una cascada de señalizaciones que estimula la proliferación celular (predominante en cáncer colorrectal y cáncer de cabeza y cuello). Cuando el mAb *Cetuximab* se une a él, bloquea la capacidad del receptor de recibir ligandos inhibiendo la actividad de la tirosina-quinasa.

Este EGFR es una proteína que ha sido estudiada y catalogada como una de las principales precursoras de diferentes tipos de cánceres como pulmón, colon, páncreas, mama, cabeza y cuello, entre otros (Centers for Disease Control and Prevention, 2020). Tan sólo la incidencia de cánceres de mama, pulmón y colon puede llegar a sumar más de la mitad de los casos en ciertas poblaciones (Gatica, 2018). En México y el mundo, el cáncer colorrectal (CCR) es el cuarto tipo más común, siendo responsable de aproximadamente 700 mil muertes al año entre las cuales el 61% corresponde a hombres y el 39% a mujeres (Dimitrov, 2020).

Las técnicas de biología molecular como la tecnología de ADN recombinante han permitido incrementar y refinar las propiedades de las proteínas terapéuticas (Grilo & Mantalis, 2018).

Producción de anticuerpos monoclonales

I) Tecnología de hibridomas

Los primeros mAbs fueron producidos utilizando la tecnología de hibridomas (Kohler & Milstein, 1975) en donde se fusionan células inmortales de tumor (mieloma) con linfocitos B del sistema inmune de un mamífero (usualmente conejos) para obtener una línea celular capaz de producir constantes cantidades de anticuerpo específico a un solo epítipo de manera ilimitada. Las células resultantes de esta fusión se conocen como Hibridomas o Células Monoclonales (Khan, y cols., 2008) (Chronopoulou y cols., 2014).

La tecnología de hibridomas puede ser resumida en siete pasos: (1) Inmunización del conejo, donde el animal es inyectado con el antígeno a tratar y un adyuvante (adyuvante de Freund) para inmunizarlo. Esto causa la activación de los linfocitos B en el bazo; (2) Preparación de esplenocitos, donde las células del bazo son incubadas con buffer de lisis RBC y después lavadas; (3) Mezclado de células, donde se fusionan las células de mieloma con los esplenocitos. Se utiliza PEG para realizar esta fusión; (4) Selección de hibridomas, donde las mezclas de células monoclonales se someten a un ambiente selectivo con hipoxantina, aminopterina y timidina, en el cual solo aquellas células que se hayan hibridado con éxito pueden sobrevivir; (5) Selección clonal, donde se siembran células individuales en placas de 96 pozos. Una vez que las células

proliferan, comienza la producción de anticuerpos y se acumula en el sobrenadante. Entonces se pueden analizar para elegir aquel que tenga la mejor especificidad deseada; (6) Expansión clonal, donde la clona de interés es expandida *in vivo* (inyectadas en cavidad peritoneal de un ratón) o *in vitro* (sembradas en placas con agar) y congelada para su preservación; (7) Purificación, donde los anticuerpos son purificados bajo condiciones especiales utilizando columnas de cromatografía de afinidad (Parley, 2010). En la Figura 4 se muestra el diagrama del procedimiento.

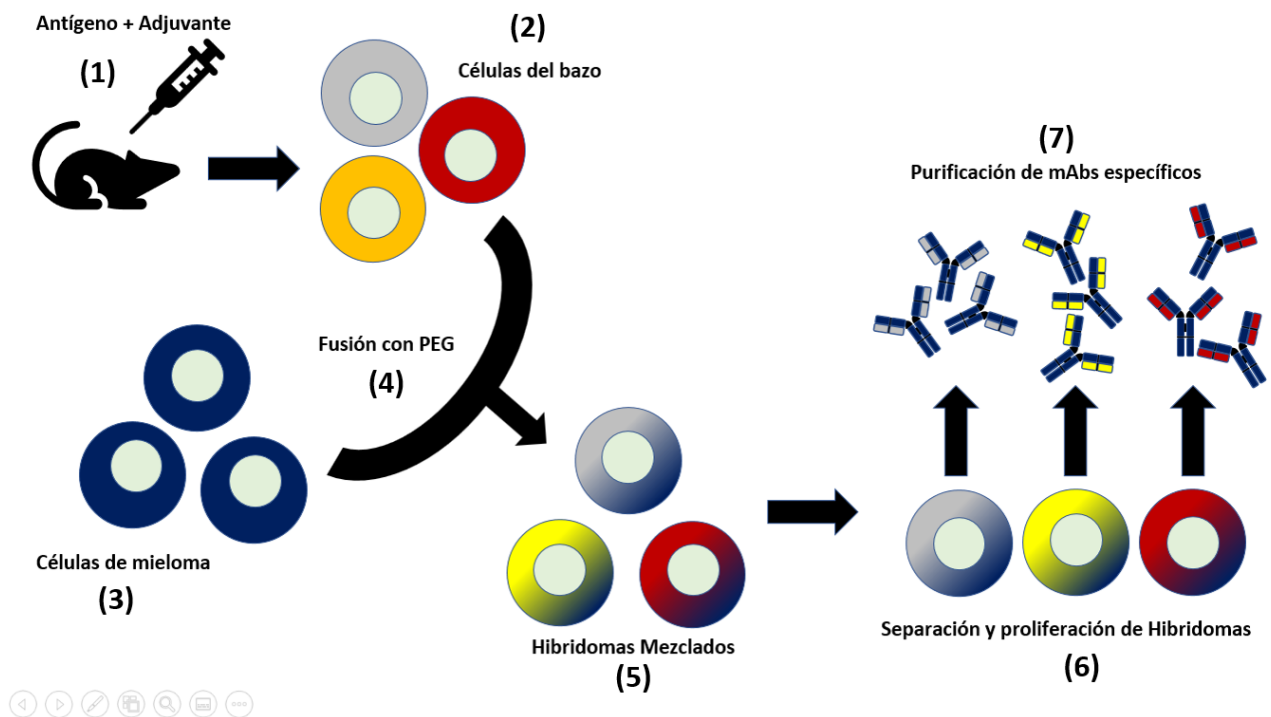


Figura 4. Procedimiento para producción de hibridomas.

- (1) Inoculación de ratón con antígeno y adyuvante.
- (2) Aislamiento de células de bazo (esplenocitos).
- (3) Preparación de células de mieloma inmortalizadas.
- (4) Fusión de líneas celulares de bazo y mieloma con PEG.
- (5) Recuperación de células fusionadas monoclonales inmortalizadas (hibridomas).
- (6) Expansión clonal de hibridomas generadores de anticuerpos.
- (7) Purificación de anticuerpos monoclonales de interés con especificidad a antígeno inicial.

II) Tecnología de despliegue en fagos

Gracias a los avances en las técnicas in vitro la producción de mAbs ya no tiene que depender sólo de la tecnología de hibridomas. El despliegue en fagos es un concepto que fue introducido en 1985 por George Smith (Smith, 1985) y se convirtió en una de las formas más comunes y mejor establecidas para la selección de anticuerpos debido a su robustez y simplicidad (Chen & Sidhu, 2014).

El desarrollo de mAbs con tecnología de despliegue en fagos es particularmente atractiva para aplicaciones terapéuticas porque se pueden obtener anticuerpos humanos directamente, sin la necesidad de humanizar anticuerpos murinos (Bradbury y cols., 2011). Debido a que se han podido aislar y replicar las fracciones genéticas que codifican para las regiones variables de los anticuerpos, estas pueden ser replicadas y expresadas en vectores biológicos como bacteriófagos (M13, f1 y fd, son los más comunes) (Bazan y cols., 2012) y ser utilizados para ligarse a un epítipo específico.

Sin embargo, aunque esta tecnología sea relativamente sencilla, depende ampliamente de cuatro factores: (1) construcción de una biblioteca amplia de anticuerpos con alta afinidad y actividad biológica; (2) expresión de fragmentos funcionales de anticuerpo en el periplasma de *E. coli*, seguido de un despliegue en la superficie de bacteriófagos; (3) relación precisa y eficiente de genotipo-fenotipo que facilite identificar los anticuerpos; y (4) una selección efectiva de los anticuerpos y una ampliación eficiente de los fagos (Chen & Sidhu, 2014).

Para poder diseñar una biblioteca amplia de anticuerpos primero se deben aislar los repertorios de las secuencias genéticas que codifican para las regiones variables de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) del anticuerpo específico de interés. Usualmente se comienza con la amplificación de este repertorio de genes por medio PCR (reacción en cadena de la polimerasa); se toma mRNA de linfocitos B humanos inmaduros y se someten a transcripción reversa para crear secuencias de ADN circular (cDNA). Este cDNA es insertado al genoma de un bacteriófago que servirán como vectores (fagémidos) para llevar el material genético a un cultivo procariótico, usualmente *E. coli*. Los genes VL y VH son ligados a la secuencia que codifica la cápside del fago

por lo que al ser expresados quedarán en el exterior de la envoltura proteica. Seguido, se extraen los fagos con los mAbs en su cápside y se someten a un monitoreo con los antígenos de interés; aquellos fagos con las secuencias que tengan actividad biológica adecuada se ligarán a los antígenos. Estos después se purifican y se utilizan para infectar nuevamente una cepa competente de *E. coli* para amplificarlos. Una vez amplificados, los fagos de interés pueden recuperarse y agregarse a la biblioteca (Lu y cols., 2020). En la Figura 5 se muestra un diagrama explicando la metodología para diseñar, y expandir la biblioteca de anticuerpos desplegados en fagos.

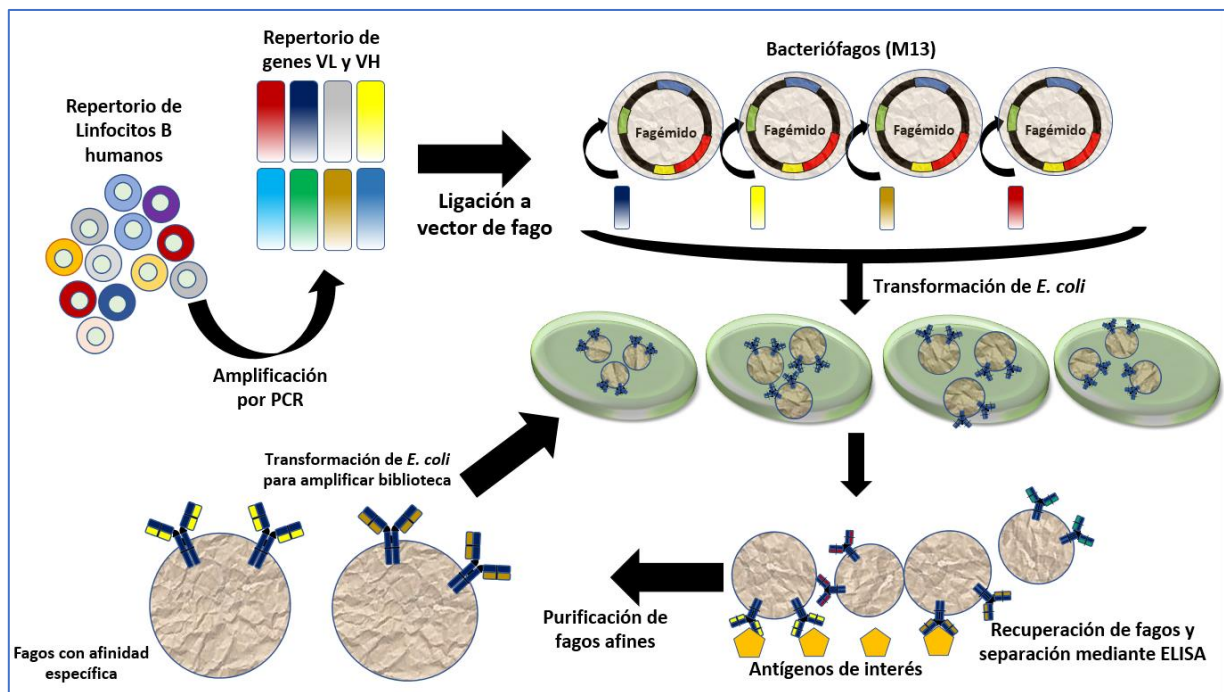


Figura 5. Diseño y amplificación de biblioteca de anticuerpos mediante despliegue en fagos.

III) Producción mediante animales transgénicos

Enfoques más recientes a las tecnologías para producción de mAbs han recurrido a técnicas más especializadas de ingeniería genética mediante la creación de líneas de animales transgénicos capaces de sintetizar los anticuerpos de interés ya humanizados (Longberg y cols., 1994) (Mendez y cols., 1997). Sin embargo, el desarrollo inicial de estas líneas de animales transgénicas probó ser difícil debido al gran número de loci de inmunoglobulinas humanas, sin mencionar los diversos

acomodos y alta expresión de los segmentos V, D y J humanos. Para sobrellevar estos retos se han utilizado diferentes estrategias (Bruggemann y cols., 2015).

Para producir los mAbs, las células del bazo de un murino fueron usadas para expresión transgénica y se detectó la proteína de interés en el suero del animal. Este transgén fue expresado tanto en las células B como en las T del ratón, combinando el esqueleto de la Ig humana con las cadenas ligeras del hospedero, formando un anticuerpo totalmente funcional. Esto se logra mediante la microinyección de un segmento grande de ADN (Translocus, aprox. 100 kB) que lleva el locus de una inmunoglobulina humana hacia el ratón. Cuando el animal es inmunizado con un antígeno, su sistema inmune produce los anticuerpos Ig específicos para este. Sin embargo, debido a que la proteína no posee regiones constantes de ratón, la generación de estas se ve disminuida y la hipermutación somática se mantiene baja (Masih y cols., 2013).

Otra estrategia ha sido la de anticuerpos quiméricos (mitad ratón, mitad humano) con la cual se busca resolver los problemas derivados del método anterior (mAbs completamente humanos producidos en ratones). Esto se logró mediante la microinyección de plásmidos con minilocus de las Ig en oocitos de ratón, mientras que los loci endógenos de las Ig del animal fueron silenciados utilizando la tecnología de nucleasa Zinc-Fingers. El resultado fue una línea de ratón que producía anticuerpos quiméricos con regiones Fab humanas y Fc del huésped. Conocido como OmniRat, este mantenía la capacidad de producir en altas concentraciones la proteína terapéutica reteniendo sus mutaciones somáticas pero que era específica y afín al antígeno de interés (Chiang y cols., 2014). Sin embargo, los anticuerpos quiméricos caen en la problemática de producir inmunogenicidad en los pacientes que reciben las inmunoterapias.

IV) Producción mediante sistemas de células de mamífero

Las técnicas de biología molecular e ingeniería genética modernas han permitido ir cada vez más lejos en la producción de biomoléculas aplicadas al sector de la salud. Así como se utilizan sistemas animales completos para producir mAbs, también se

indagó en el uso de sistemas celulares derivados de mamíferos para la generación de estas proteínas (Li & Zhu, 2010).

El proceso general de esta tecnología incluye la creación de líneas celulares de mamífero estables. La elección del hospedero es crucial a la hora de cumplir con los atributos necesarios para llevar un mAb al mercado terapéutico. Estos sistemas de mamífero se prefieren sobre otros (bacterias, hongos, insectos, etc.) debido a que tienen la propiedad de producir moléculas complejas con modificaciones postraduccionales, lo que genera anticuerpos que son similares a los producidos en los humanos (Schmidt, 2004) (Schirrmann, 2008) (Andersen & Krummen, 2002). La línea celular de mamífero más predominante para la producción de estas proteínas terapéuticas es la de Ovario de Hamster Chino (CHO, por sus siglas en inglés), aunque otras líneas como Riñón de Embrión Humano (HEK-293) (Wurm, 2004) y Riñón de Mono (VERO) (Kaufman, 2000) también son ampliamente utilizadas para este propósito.

El proceso comienza mediante la selección de una línea celular adecuada y un vector de transfección, para llevar el material genético al interior de las células. Este vector tendrá el gen de interés para que el sistema pueda expresar las proteínas que formarán a los anticuerpos. El material genético se lleva al interior de la célula por métodos de transfección como electroporación o lípidos cationicos (Mortimer, MacLachlan, & Tam, 1999); una vez que se introduce el material genético, las células podrán ser aisladas, gracias a un gen de selección presente en el vector plasmídico, y utilizadas para crear una línea estable que produzca el anticuerpo monoclonal. En la Figura 6 se muestra un diagrama con el proceso de transfección en células de mamífero para producir una línea estable.

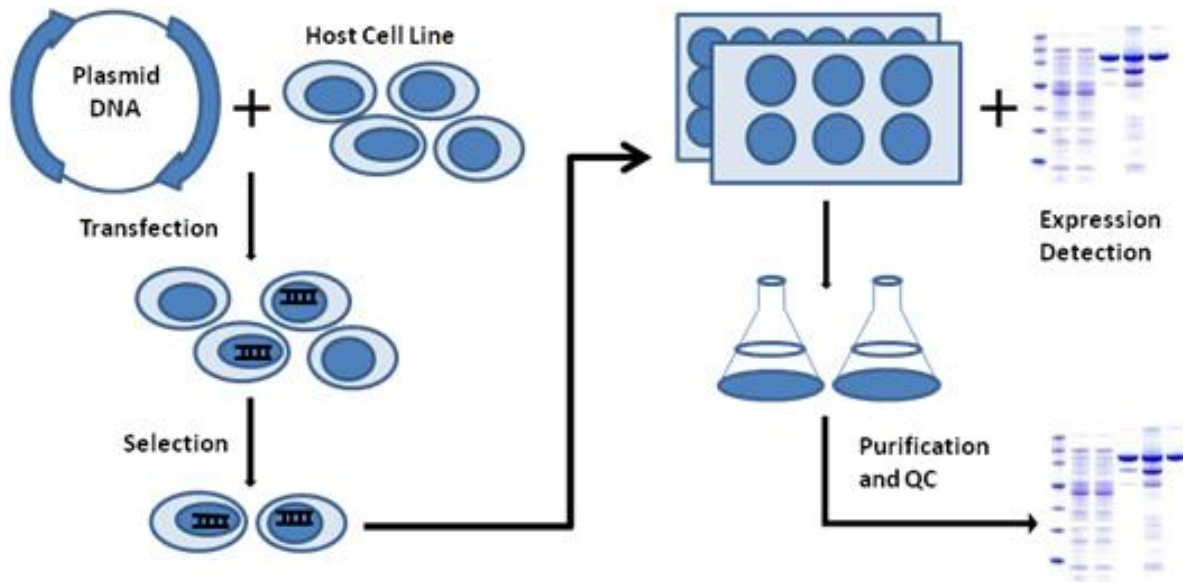


Figura 6. Diagrama de transfección transitoria en un sistema de células de mamífero. (Figura tomada de Biologics International Corp. *Transient transfection services*).

Sistemas celulares de mamífero

Inmunoglobulinas terapéuticas son usualmente producidas en células hospederas de mamífero. Este método se ha vuelto el predominante para la producción de proteínas recombinantes gracias a las técnicas de ingeniería genética; como la de diseño y transfección de vectores plasmídicos, que han permitido alcanzar rendimientos de hasta 15 g/L en anticuerpos monoclonales (Zhu, 2012). En la **Tabla 1** se describen algunos de los productos recombinantes producidos en diferentes sistemas celulares.

Tabla 1. Biofarmacéuticos y sus sistemas de expresión. (Zhu, 2012).

Producto Recombinante	Tipo	Sistema de expresión	Tratamiento
EPO	Hormona	Mamífero	Anemia
Insulinas	Hormona	<i>E. coli</i>	Diabetes
Interferones	Citocina	<i>E. coli</i> y levaduras	Infecciones virales y cáncer
Enbrel	Citocina (TNF)	Mamífero	Artritis reumatoide
Remicade	mAb	Mamífero	Artritis reumatoide
Rituxan	mAb	Mamífero	Leucemia
Neupogen	Citocina	<i>E. coli</i>	Quimioterapias
Herceptin	mAb	Mamífero	Cáncer
Avastin	mAb	Mamífero	Cáncer
Hormonas de crecimiento	Hormona	<i>E. coli</i>	Deficiencias de crecimiento
Prevenar	vacuna	Bacteriano	Prevención de infección por neumococos
Erbitux	mAb	Mamífero	Cáncer
Synagis	mAb	Mamífero	Infecciones respiratorias
Cerezyme	Enzima	Mamífero	Enfermedad de Gaucher

Sistemas celulares como CHO conforman aproximadamente el 70 % de la producción de proteínas recombinantes en sistemas de células de mamífero (Li y cols., 2010). Aunque otras líneas como HEK-293 (Wurm, 2004) y VERO (Kaufman, 2000) también son muy utilizadas.

I) CHO

El sistema celular de mamífero CHO (Figura 7) es el más utilizado para la producción de mAbs debido a que tiene una larga historia de haber sido sometida a experimentos y ha sido probada como segura por la FDA por más de 20 años; las células CHO son compatibles con numerosas técnicas de amplificación de genes (ej. DHFR y glutamina sintasa); poseen un repertorio molecular para modificaciones naturales y postraduccionales que son comparables a los humanos; son capaces de crecer a gran escala en múltiples ambientes como adheridas o en suspensión sin suero (Jayapal y cols., 2007) por lo que se pueden usar variados equipos desde bioreactores de acero inoxidable hasta desechables.

Esta línea celular ha sido sometida a modificaciones genéticas para incrementar su capacidad de producción de proteínas recombinantes y su eficiencia para alcanzar niveles aún mayores que sus contrapartes (Abbott y cols., 2015).

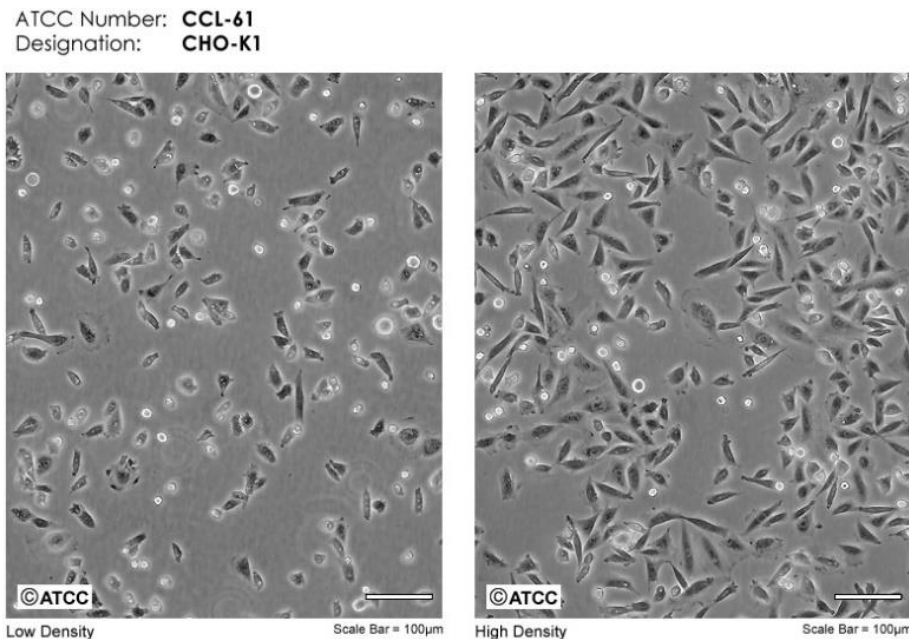


Figura 7. Cultivo celular CHO. Izquierda con baja densidad. Derecha con alta densidad. (Figura tomada de ATCC, Washington, DC. E.U.A.).

II) HEK-293

Las células HEK-293 (Figura 8) son una alternativa muy popular a las células CHO, y junto con estas, una de las líneas más estudiadas y utilizadas para la producción de proteínas recombinantes; no sólo anticuerpos monoclonales, sino también factores de crecimiento, citocinas y hormonas. (Dietmair y cols., 2012).

A pesar de que el sistema CHO es el más utilizado, tiene algunas desventajas como que este no es capaz de realizar todos los tipos de glicosilaciones que los humanos sí, ya que carecen de varias enzimas que transfieren azúcares (ej. $\alpha(2-6)$ sialiltransferasa y $\alpha(1-3/4)$ fucosiltransferasas) (Grabenhost y cols., 1999) y es conocida por agregar algunas estructuras de glucanos que resultan ser inmunogénicas y reducen la eficiencia de los fármacos (Durocher & Butler, 2009) . Es en estos casos donde la línea celular HEK-293 entra en juego y se vuelve una herramienta esencial para la producción de proteínas recombinantes.

Sin embargo, a pesar de estas diferencias, las células HEK-293 comparten muchas otras similitudes con CHO; ambas comparten factores transcripcionales basales que son susceptibles a promotores como el de citomegalovirus (CMV) y virus 40 del simio (SV40) (Goncalves y cols., 2014) (Geisse & Fux, 2009) por lo que son frecuentemente utilizadas en ensayos combinados para probar cual brinda mejores rendimientos.

ATCC Number: **CRL-1573**
Designation: **293**

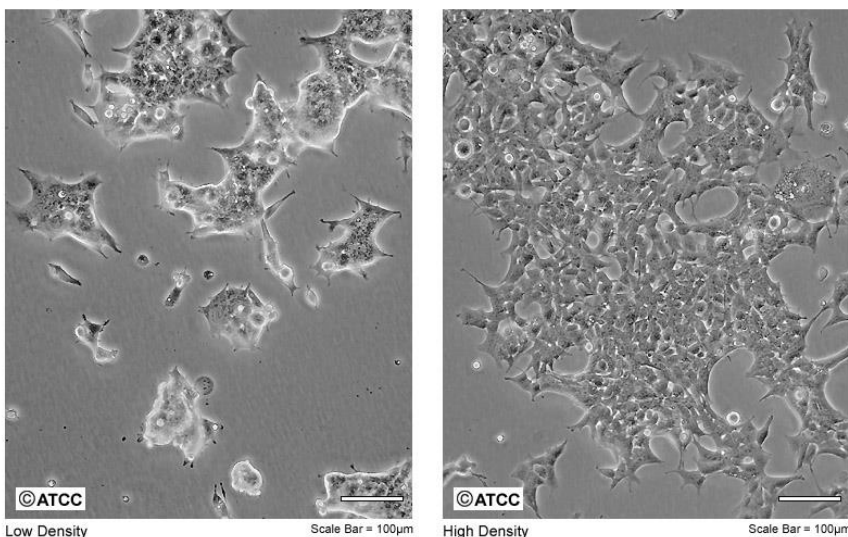


Figura 8. Cultivo celular HEK-293. Izquierda con baja densidad. Derecha con alta densidad. (Figura tomada de ATCC, Washington, DC. E.U.A.).

III) VERO

Otro sistema celular de mamífero utilizado para la producción de proteínas recombinantes es el del riñón de mono verde africano (VERO). Esta línea fue establecida en Japón en 1962 y luego transferida a la Organización Mundial de la Salud (OMS) quien en 1990 estableció un banco celular validado como seguro para la producción de vacunas (Heraud, 1992), la cual se volvió su función predominante (Barret y cols., 2009) con millones de vacunas distribuidas alrededor del mundo (Vidor y cols., 1997). Toda esta experiencia ha llevado a reconocer a VERO como un sistema ideal para la producción de proteínas virales debido a su susceptibilidad a muchos virus (Rhim y cols., 1969).

A pesar de que VERO (Figura 9) no es un sistema muy utilizado para producir mAbs terapéuticos, sí se han utilizado los mismos vectores plasmídicos que para otras líneas como CHO y HEK-293 (Fliedl & Kaisermayer, 2011), así como los mismos agentes de transfección para llevar el material genético a su interior; como la Lipofectamina™ 2000 (Kyle & Tripp, 2020).

ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**

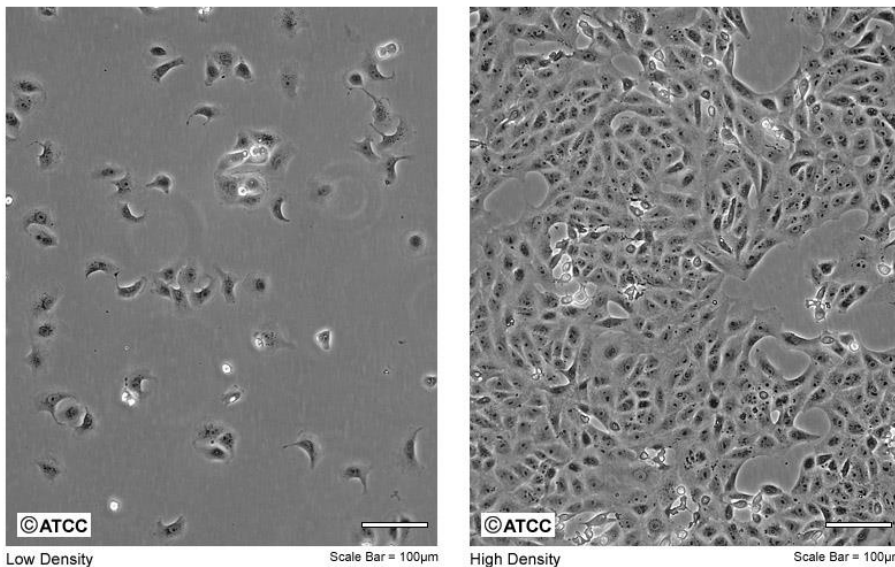


Figura 9. Cultivo celular VERO, *Cercopithecus aethiops*. Izquierda con baja densidad. Derecha con alta densidad. (Figura tomada de ATCC, Washington, DC. E.U.A.).

Métodos de transfección para cultivos celulares

Uno de los primeros pasos de cualquier estudio de expresión recombinante es la planeación del método para llevar el material genético al interior del sistema celular (Hashemi y cols., 2012). Existen varios métodos para este fin, tanto biológicos (como mediados por virus) como no-biológicos (físicos y químicos). Por lo tanto, es indispensable la elección y optimización de la metodología adecuada para cada tipo de sistema celular (Recillas-Targa, 2006).

I) Métodos biológicos

En la investigación clínica, el método más utilizado para transfección celular es el mediado por vectores virales. También conocido como 'transducción', es una forma efectiva y relativamente sencilla de lograr expresión transgénica. Gracias a la capacidad de los virus de integrar su ADN al genoma del hospedero, el material genético se segrega a las células hijas, permitiendo expresiones sustentables (Pfeifer & Verma, 2001).

Sin embargo, una de las mayores desventajas de este método es la alta tasa de citotoxicidad por la integración del ADN viral al genoma, ya que se pueden suprimir genes esenciales para la célula. Además, el vector viral es limitado en el tamaño del material genético a insertar para poder mantener la infectividad (Woods y cols., 2003).

II) Métodos físicos

Biobalística, microinyecciones, electroporación, fototransfección y sonoporación son ejemplos de métodos de transfección física y a pesar de que son efectivas y relativamente simples, usualmente requieren de equipos y herramientas costosas, así como de habilidad por parte del investigador y pueden llegar ser exhaustivas y laboriosas a causa de intensivas sesiones de trabajo (Mehier-Humbert & Guy, 2005) (Lo y cols., 1994) (O'Brien & Lummins, 2006) (Inoue & Krumlauf, 2001).

III) Métodos químicos

Estos métodos han tomado importancia en la investigación contemporánea gracias a que se ha demostrado que son efectivos para la transfección de sistemas de mamíferos (Schenborn & Goiffon, 2000). La popularidad del uso de polímeros

catiónicos, fosfato de calcio, aminoácidos y lípidos catiónicos (siendo este último el más utilizado) se ha dado por las diversas ventajas que ofrecen; baja citotoxicidad relativa, comparada con otros métodos; no causan mutagénesis; no acarrean ADN extra que sea innecesario; no hay un límite de tamaño para el paquete genético. Sin embargo, a pesar de que estos métodos son relativamente sencillos de aplicar en los sistemas celulares, son muy delicados en cuanto que dependen de la optimización de varios factores como el pH de las soluciones, proporciones de ADN/químico, condiciones de la membrana; y cada uno de ellos puede afectar significativamente la eficiencia de la transfección (Kim & Eberwine, 2010).

La transfección con lípidos catiónicos (lipofección) se ha convertido en el método químico más famoso para los estudios en sistemas celulares de mamífero y para terapia génica. Aunque en realidad no se conoce con certeza el mecanismo de transporte del ADN una vez dentro de la célula para su expresión, se ha estudiado el mecanismo en que se forman los complejos lipídicos (lipoplexes, ADN/lípido) y como llegan al interior de la célula (**Figura 10**) (Felgner & Ringold, 1989). Las células son capaces de endocitar eficientemente el lipoplex a través de su membrana mediante fusión; se ha estudiado que células en fase de crecimiento G0 que no son capaces de endocitar, tampoco son capaces de ser transfectadas con lipoplexes (Wrobel & Collins, 1995) (Mortimer y cols., 1999).

Entre los lípidos catiónicos, la Lipofectamina™ 2000 es considerada el “estándar de oro” debido a que tiene la capacidad de formar vesículas dentro del citoplasma celular y llevar la carga genética de manera segura por medio de movimientos Brownianos y evitar así la degradación del ADN (Cardarelli y cols., 2016). Además de que es capaz de transfectar una amplia gama de sistemas celulares de mamífero (Hashemi y cols., 2012) (Cardarelli y cols., 2016) (Spidel y cols., 2016) (Rahimi y cols., 2018).

Debido a las múltiples ventajas y resultados exitosos que se han obtenido con las transfecciones mediante lípidos catiónicos como la Lipofectamina™ 2000, es natural que el mercado esté constantemente iterando y optimizando este método para mejorar la eficiencia, rendimientos y reducir los contratiempos. Empresas como Thermofisher Scientific (Waltham, Massachusetts, E.U.A.) ya ofrecen múltiples opciones de

productos para realizar estos ensayos genéticos. Lipofectamina™ 3000, Expifectamina™ y Turbofect™ son solo algunos ejemplos de estos.

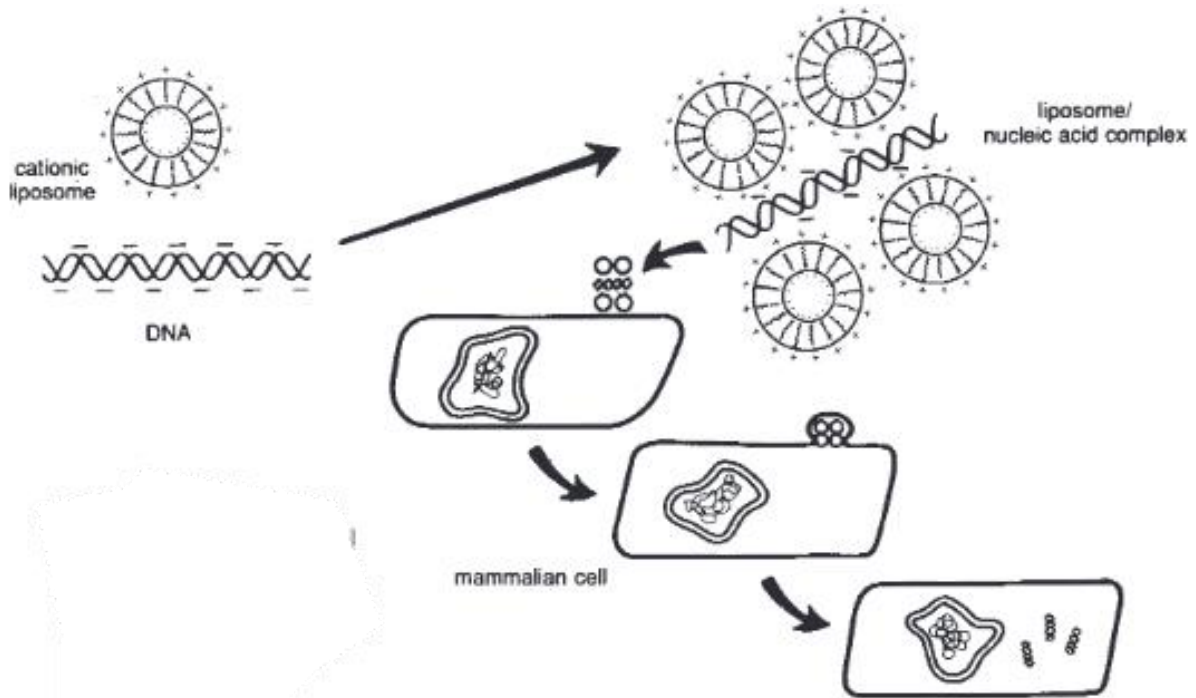


Figura 10. Mecanismo de formación de *lipoplexes* entre ADN plasmídico y lipido catiónico DOTMA para transfección celular. Figura tomada de (Felgner & Ringold, 1989).

Vectores plasmídicos para transfección celular

Otro punto importante que considerar para la transfección de sistemas celulares es el vector genético. Los vectores basados en plásmidos (pDNA) poseen algunas ventajas sobre sus contrapartes basadas en virus: un menor nivel de citotoxicidad, reducidos riesgos de inmunogenicidad y facilidad de fabricación son sólo algunas de ellas (Chira y cols., 2015). Estos pDNA se componen de moléculas sintéticas de ADN circular (cDNA) que tienen elementos de autoreplicación y expresión una vez dentro de la célula. La relación de un hospedero y un plásmido puede ser parasítica o simbiótica (Lodish y cols., 2000).

En su nivel más básico, un plásmido contiene un origen de replicación bacteriano, un gen marcador de selección (resistencia a antibiótico) y un sitio múltiple de clonación donde se insertará el gen de interés de la proteína recombinante. El origen de

replicación (replicón) le confiere al pDNA recombinante la capacidad de ser amplificado en una línea bacteriana como *E. coli*; en la actualidad la mayoría de los vectores plasmídicos poseen el replicón pMB1 (derivado de plásmidos bacterianos ColE1) y permite una alta tasa de producción de copias múltiples en bacterias (Bolívar y cols., 1977); el marcador de selección es una herramienta necesaria para el control y mantenimiento de los cultivos celulares. Gracias a este gen se pueden descartar aquellas células que no posean el plásmido. Uno de los marcadores más comunes es el de resistencia a ampicilina por β -lactamasa que destruye al antibiótico en unas horas; finalmente, el sitio múltiple de clonación es un punto en la cadena de ADN que puede ser digerido con enzimas de restricción definidas y es donde el gen de interés puede ser insertado por subsecuente ligación con otra enzima (Tolmachov, 2009).

Hay otros elementos importantes en una construcción plasmídica que determinan los niveles de expresión de la proteína recombinante de interés. Secuencias promotoras, enhancers y sitios de poliadenilación son cruciales para la transcripción; los promotores y enhancers son secuencias que ayudan a las enzimas ARN polimerasas a situarse correctamente para iniciar el proceso de transcripción; mientras que los sitios de poliadenilación marcan el punto de paro del mismo proceso. Algunos promotores muy utilizados en los plásmidos para transfección de mamíferos son el de Citomegalovirus (CMV) y el de Simiovirus 40 (SV40) (Tolmachov, 2009) (Gill y cols., 2009).

Existe una gran variedad de vectores plasmídicos con diferentes propósitos, configuraciones y aplicaciones; muchos de estos se encuentran disponibles comercialmente. A continuación, se describen los plásmidos utilizados en este trabajo:

I) Vector *phMGFP*

Llamado Monster Green® Fluorescent Protein (Promega), está diseñado para ser expresado en sistemas de células de mamífero y sintetiza una proteína reportera fluorescente derivada de *Montastrea cavernosa* (estrella coral). Posee baja citotoxicidad y alto nivel de brillo. En la **Figura 11** se muestran los elementos que lo conforman.

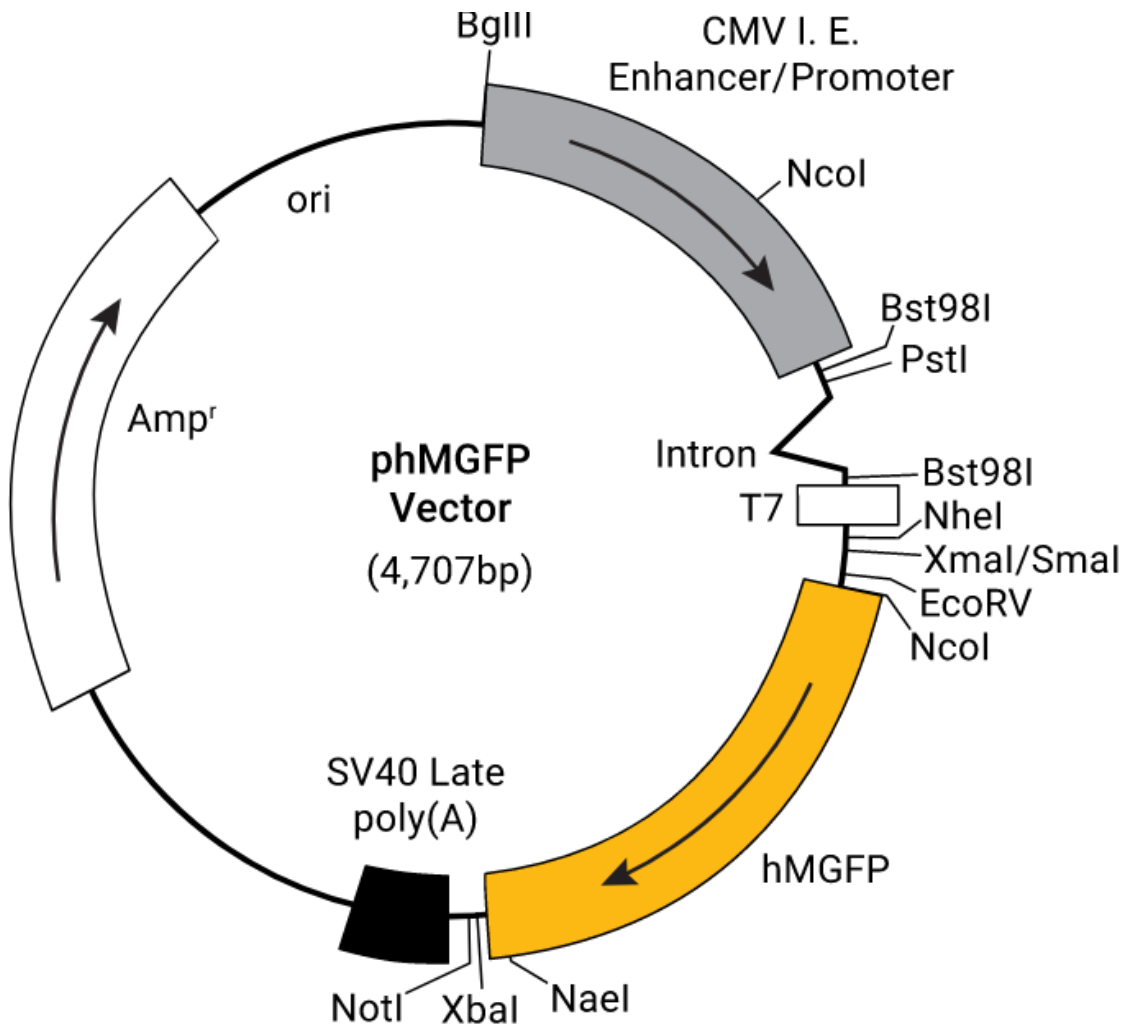


Figura 11. Estructura del plásmido *phMGFP* Monster Green® Fluorescent Protein (4 707 pb.). Posee una secuencia de promotor/*enhancer* de CMV, una secuencia de intrón quimérico, una sección de restricción compatible con varias enzimas de restricción, el gen *hMGFP* de la proteína fluorescente, el sitio de poliadenilación SV40 y un marcador de selección β -lactamasa que confiere resistencia ampicilina. Fuente: PROMEGA.

II) Vector *pcDNA3.4*

Este vector plasmídico sirve como el esqueleto para el control positivo de expresión de anticuerpos (Antibody-Expressing Positive Control Vector [AB⁺]; Gibco™). En la **Figura 12** se muestran los elementos que contiene esta construcción de ADN.

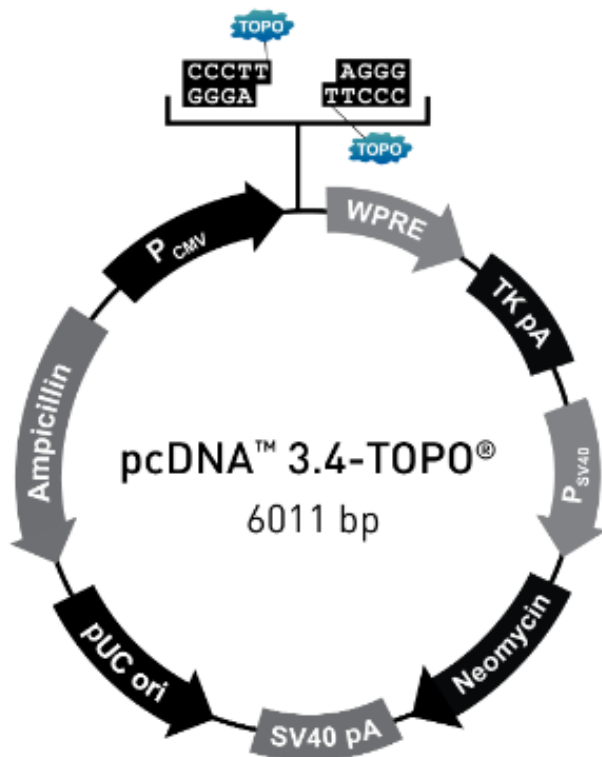


Figura 12. Estructura del plásmido *pcDNA3.4* (6 011 pb, Gibco™) utilizado en el control positivo de expresión de anticuerpo.

Posee un promotor/*enhancer* CMV humano, además de un *enhancer* WPRE para mejorar la expresión de transcripción; un sitio de clonación TOPO® que brinda una alta tasa de clonación para productos amplificados por PCR; un sitio de poliadenilación SV40 para finalizar la transcripción; un origen de replicación bacteriano derivado de *pUC* de *E. coli*; y, por último, dos genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos: ampicilina para bacterias y neomicina para cultivos de mamíferos.

III) Vector *pVitro1-Neo-MCS*

El vector *pVitro1-Neo-MCS* es un tipo especial de plásmido ya que contiene dos sitios múltiples de clonación independientes para la expresión simultánea de dos proteínas recombinantes. Esto es especialmente útil para la producción de anticuerpos monoclonales porque se puede hacer la co-transfección de ambos genes para cadena ligera y pesada del mAb de manera simultánea utilizando solo un esqueleto de pDNA.

Este plásmido contiene los siguientes elementos:

- Un sitio múltiple de clonación diseñado para ser digerido con un set de enzimas de restricción específicas. Este sitio es acompañado de una secuencia promotora fuerte *rEF1* derivada del factor de elongación alfa de rata con altos niveles de expresión en todos los ciclos de crecimiento celular. Además, un *enhancer* derivado de CMV humano; y un sitio de poliadenilación *EF1*.

- Un sitio múltiple de clonación diseñado para ser digerido con un set de enzimas de restricción específicas. Este sitio es acompañado de una secuencia promotora fuerte *mEF1* derivada del factor de elongación alfa de ratón con altos niveles de expresión en todos los ciclos de crecimiento celular. Además, un *enhancer* derivado de SV40 que mejora la expresión genética; y un sitio de poliadenilación basado en SV40.
- Un origen de replicación *pMB1* bacteriano basado en plásmidos de *E. coli*.
- Un sitio de entrada de ribosoma *FMDV IRES* que permite la traducción de dos ORFs (marcos de lectura abiertos) de una sola cadena de ARN.
- Un gen marcador Neo que confiere resistencia a kanamicina en bacterias (gracias al promotor *EM7*) y a geneticina G418 en cultivos de mamífero (promovido por el *rEF1-alfa* de rata).

En la **Figura 13** se muestra la estructura de este vector plasmídico.

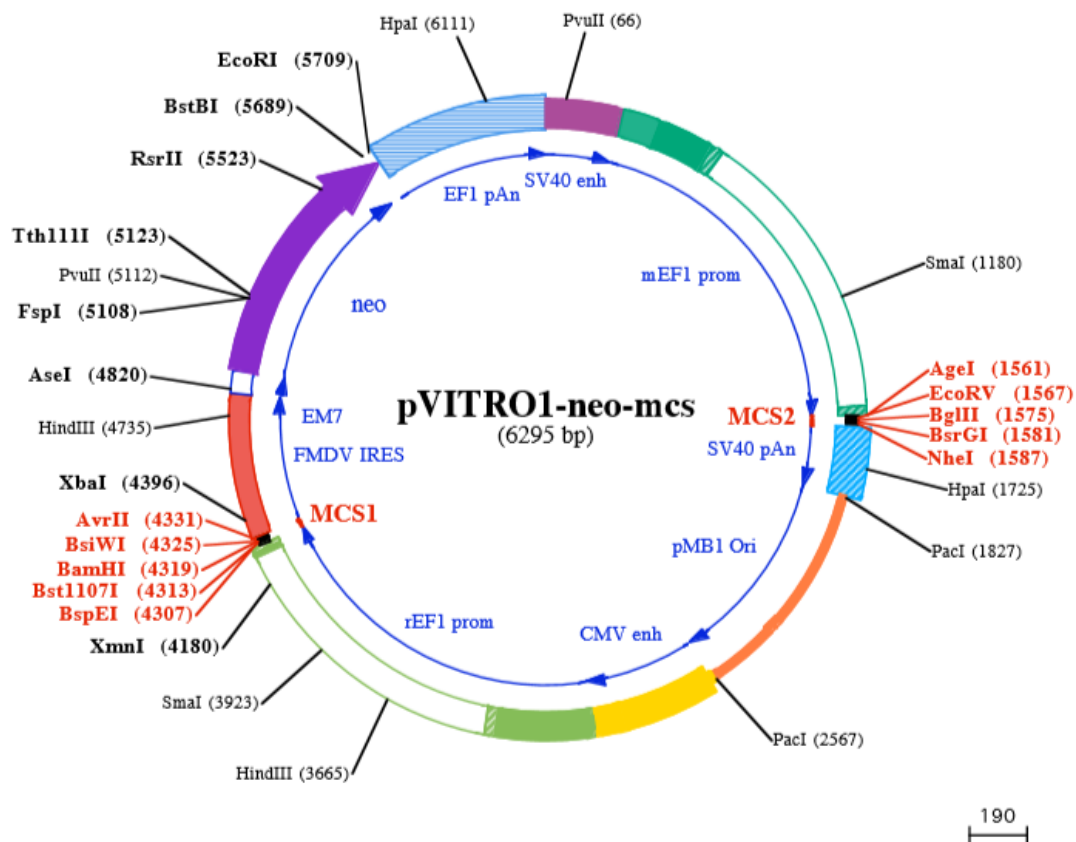


Figura 13. Plásmido *pVITRO1-Neo-MCS*. Fuente: <https://www.invivogen.com/pvitro1-mcs>

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema celular de mamífero VERO ha mostrado ser un candidato apto para la producción de proteínas y vacunas recombinantes (Hashemi y cols., 2012) (Barret y cols., 2009) y se ha estudiado su capacidad de ser transfectada con vectores plasmídicos y lípidos catiónicos como Lipofectamina™ 2000 (Hashemi y cols., 2012) (Fliedl & Kaisermayer, 2011).

Sin embargo, los procesos para la fabricación de anticuerpos monoclonales con el sistema celular VERO aún es limitado a pesar de compartir propiedades similares a otras líneas consideradas ideales para este fin como CHO y HEK-293 (Fliedl & Kaisermayer, 2011) (Kyle & Tripp, 2020).

Además, la evolución comercial de los métodos de transfección con lípidos cationicos ha llevado a la producción de iteraciones especializadas para cada línea celular, por ejemplo, Expifectamina™ CHO que esta optimizada para ser utilizado con las células del mismo nombre. Sin embargo, los mecanismos de acción de todos los lípidos cationicos son similares lo cual genera interrogantes sobre si estos químicos especializados pudieran ser utilizados en otros sistemas para los cuales no fueron diseñados, como VERO.

JUSTIFICACIÓN

Las técnicas modernas de transfección han permitido el uso de diversos sistemas celulares para la fabricación de anticuerpos monoclonales terapéuticos y otras proteínas recombinante de interés (Kim & Eberwine, 2010).

Probar la modularidad de los procesos de transfección celular con sistemas de mamífero y lípidos catiónicos serviría para estudiarlos y ampliarlos. Esto otorgaría a los investigadores la flexibilidad para desarrollar nuevas metodologías para la fabricación de mAbs y otras proteínas recombinantes que pudieran ser útiles a nivel laboratorio o escalarse a nivel industrial.

El sistema celular VERO ha sido probado compatible para transfección con lípidos catiónicos como Lipofectamina™ 2000 (Hashemi y cols., 2012) y vectores plasmídicos como pVitro1-Neo-CMS (Yang y cols., 2013) por lo tanto, es de interés analizar la posibilidad de transfectarlo con otros lípidos catiónicos que hayan sido fabricados para ser utilizados en otras líneas celulares y probar que exista compatibilidad; así como expandir los ensayos de producción de anticuerpos monoclonales en este mismo.

HIPÓTESIS

El sistema celular de mamífero VERO será capaz de ser transfectado con Expifectamina™ CHO y producir un anticuerpo monoclonal recombinante.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar ensayos de transfección celular en la línea celular de mamífero de riñón de mono verde africano (VERO) con lípidos catiónicos y vectores plasmídicos para producir anticuerpos monoclonales recombinantes.

Objetivos específicos

- Analizar la capacidad de la línea celular VERO para ser transfectada con Expifectamina™ CHO.
- Evaluar la capacidad del sistema celular de mamífero VERO de producir un anticuerpo monoclonal terapéutico utilizando el plásmido *pVitro1-Neo-MCS*.
- Determinar la presencia de proteínas recombinantes postransfección del sistema celular VERO.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Diseño de genes (*Cetuximab*)

Los genes correspondientes a las fracciones proteicas de las cadenas ligeras (LC) y pesadas (HC) del anticuerpo monoclonal *Cetuximab* fueron sintetizados por la compañía GenScript® (Piscataway, New Jersey, E.U.A.). Se optimizaron los codones de las secuencias para favorecer su expresión en *Cricetulus griseus* (CHO). Además, se ajustó el contenido de GC en los genes HC y LC a 56.72 % y 57.58 %, respectivamente, para ayudar a la estabilidad del material genético. En las **Figura 14** y **Figura 15** se muestran las secuencias correspondientes a los genes HC y LC, respectivamente.

TCCGGAGCCGCCACC

```
ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGGTGTTCCCTGGTGGCCCTGTTTAGAGGCGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTGAAGCAG
AGCGGCCCCAGGACTGGTGCAGCCTTCCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACAGTGTCCGGCTTCAGCCTGACCAAC
TACGGAGTGCAGTGGGTGAGGCAGAGCCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGTCTGGCGGCAAC
ACAGACTATAATACCCCTTTTACATCTCGGCTGTCCATCAACAAGGATAAATCCAAGAGCCAGGTGTTCTTTAAG
ATGAACAGCCTGCAGTCTAATGACACCGCCATCTACTATTGCGCCCGCTCTGACATACTATGATTACGAGTTC
GCTTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCGCCGCTCCACCAAGGGACCTTCCGTGTTCCCACTGGCT
CCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCCTG
ACCGTGTCTTGGAAGTCCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCATACATTTCTGCTGTGCTGCAGTCTTCCGGCCTG
TACTCTCTGAGCTCTGTGGTGACCGTGCCATCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCAC
AAGCCTTCTAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCAAAGTCTGTGATAAGACCCATACATGCCCCCTTGT
CCTGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCC
AGGACCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGATCCCGAGGTGAAGTTTAACTGGTACGTG
GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCAAGGGAGGAGCAGTACAACCTCACCTATCGGGTGGTGAGC
GTGCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCTAATAAGGCCCTGCCC
GCTCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCACAGGTGTACACACTGCCTCCATCC
CGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCTGTG
GAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTTC
TTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTTCTGTGATGCAT
GAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCCGGCAAGTGA
```

CCTAGG

Figura 14. Secuencia del gen para la cadena pesada (1426 pb). En azul se muestran la secuencia aminoacídica para restricción con la enzima BspEI + la secuencia de Kozak en vertebrados en el extremo 5' y la secuencia de restricción con la enzima AvrII en el extremo 3'

ACCGGTGCCGCCACC

ATGAAGTACCTGCTGCCTACCGCTGCTGCTGGACTGCTGCTGCTGGCTGCCAGCCAGCTATGGCCGACATCCTG
CTGACACAGTCCCCAGTGATCCTGAGCGTGTCTCCAGGAGAGAGGGTGTCTTCAGCTGCAGGGCTTCTCAGTCC
ATCGGCACCAATATCCACTGGTACCAGCAGAGAACAACCGGCTCTCCCAGGCTGCTGATCAAGTATGCCAGCGAG
TCTATCTCCGGCATCCCTTCCAGATTCAGCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAGCATCAATTCTGTG
GAGTCCGAGGACATCGCTGATTACTATTGCCAGCAGAACAATAACTGGCCAACCACATTTCGGCGCCGGCACCAAG
CTGGAGCTGAAGAGGACAGTGGCTGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTTCCCCCTAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGC
ACCGCTTCTGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTTTACCCTCGGGAGGCTAAGGTGCAGTGGAAGGTGGATAATGCC
CTGCAGAGCGGCAACTCTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGATTCTACATATTCCCTGTCCAGCACC
CTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCCTGCGAGGTGACCCATCAGGGCCTGTCTTCC
CCAGTGACAAAGTCTTTTAACCGCGGCGAGTGTGA

GCTAGC

Figura 15. Secuencia del gen para la cadena ligera (732 pb). En azul se muestran la secuencia aminoacídica para restricción con la enzima AgeI + la secuencia de Kozak en vertebrados en el extremo 5' y la secuencia de restricción con la enzima NheI en el extremo 3'

Recepción de genes (*Cetuximab*)

Ambos genes fueron sintetizados y entregados cada uno en un plásmido pUC57 (mostrado en la Figura 16) contenido en un filtro de celulosa. Cada filtro fue remojado durante 1 minuto con 120 µl de buffer de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, Thermofisher Scientific) para extraer los plásmidos con los genes de las cadenas ligera y pesada de Cetuximab. Los filtros remojados fueron colocados cada uno en un microtubo de 0.6 ml perforado en su parte inferior y posteriormente colocado dentro de microtubo de 1.5 ml y se sometió a centrifugación (10 000 rpm, 1 minuto) para extraer el material genético resuspendido en el buffer de elución. Una vez extraídos los plásmidos, se almacenaron a -20 °C para su conservación.

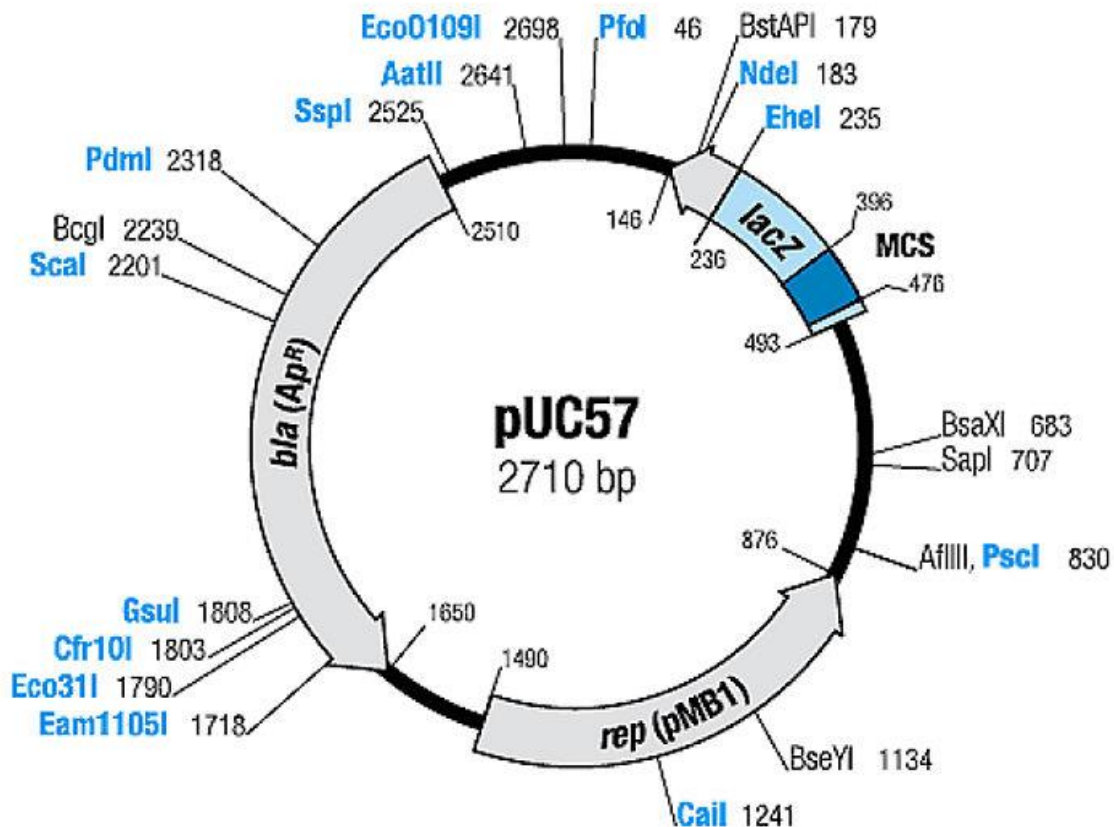


Figura 16. Mapa de pUC-57 (2710 pb). Imagen obtenida de GenScript® (Piscataway, New Jersey, E.U.A.).

Análisis de concentración de ADN

Los plásmidos con las cadenas pesada y ligera de Cetuximab fueron analizados con un equipo NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.A.) para determinar su concentración. Se utilizó el buffer de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, ThermoFisher Scientific) como blanco para calibrar el equipo. Se determinó la concentración en ng/μl de los plásmidos, así como sus relaciones 260/280 y 260/230 para determinar su pureza ante proteínas y compuestos orgánicos, respectivamente.

Amplificación de plásmidos *pUC57* con cadena ligera y pesada (cetuximab)

Para amplificar los plásmidos *pUC57* que contenían los genes de las cadenas ligera y pesada se realizó la transformación de células *E. coli* OneShot™ TOP10 electrocompetentes utilizando cubetas de electroporación de 0.1 cm de Bio-Rad (Hercules, California, E.U.A.). Se añadieron 50 µl de células electrocompetentes y 0.5 µl de plásmido a cada cubeta para llevar a cabo la reacción. Las condiciones de electroporación fueron: 1.75 KV, 25 µF, 200 – 1000 Ω. Posteriormente se añadieron 500 µl de medio S.O.C (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a la cubeta de electroporación y se recuperaron las bacterias en un tubo de 15 ml estéril, el cual se mantuvo en agitación a 250 rpm, 37 °C durante 1 h. Se procedió a centrifugar las bacterias a 14 000 rpm por 30 segundos, se descartó el sobrenadante y la biomasa fue resuspendida en 100 µl del medio remanente; enseguida se procedió a realizar el sembrado de las bacterias por extensión, empleando toda la biomasa resuspendida, en una placa Petri con medio agar-LB (agar 1.5%, triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 100 µg/ml de ampicilina) y se incubó a 37° C durante 16 h.

Extracción de ADN plasmídico

Una vez pasado el tiempo de incubación, con la ayuda de palillos estériles, se tomaron 2 colonias de cada placa Petri y se colocaron cada una en tubos (4 en total) con 3 mL de medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 100 µg/ml de ampicilina) y se dejaron incubar con agitación a 250 rpm, 37 °C, por 16 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se utilizó un kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific™) para realizar la extracción del material genético: los tubos fueron centrifugados a 14 000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente para formar la pastilla de biomasa, se resuspendió utilizando 250 µl de Buffer de Resuspensión incluido en el kit GeneJet™. Una vez resuspendida la biomasa, se añadieron 250 µl de Solución de Lisis, incluida en el kit, para liberar los plásmidos de interés de las bacterias. Se mezcló por inversión 6 veces para asegurar el máximo contacto de la solución con el resuspendido. Inmediatamente se añadieron 350 µl de Solución de

Neutralización, incluida en el kit, para evitar la desnaturalización del ADN plasmídico. Se mezcló por inversión 6 veces, asegurando de cumplir con las recomendaciones del fabricante para evitar cualquier daño al material genético. Después, se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos para formar una pastilla de residuos lisados y el sobrenadante fue transferido a una columna GenJet™ para separar el plásmido de interés del resto de la solución. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 500 µl de Solución de Lavado, incluido en el kit y adicionado con etanol según las instrucciones del fabricante, centrifugando entre cada uno durante 1 minuto y descartando el filtrado. Se centrifugó una vez más (tercera vez) por 1 minuto para asegurar que todos los residuos de Solución de Lavado fueran eliminados de la columna. Las columnas fueron transferidas a microtubos de 1.5 ml y se les añadió 50 µl de Buffer de Elución, incluido en el kit, y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Finalmente se centrifugó a 14 000 rpm para permitir al plásmido eluído transferirse de las columnas a los microtubos. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C para su conservación. Las muestras fueron analizadas con un equipo NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.A.) para determinar su concentración.

Digestión de plásmidos *pUC57* con genes de cadenas ligera y pesada

Para extraer los genes correspondientes a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal Cetuximab se realizaron reacciones de digestión con las enzimas de restricción correspondientes para cada gen. El gen de la cadena pesada posee sitios en su secuencia que pueden ser digeridos con el par de enzimas BspEI y AvrII y el gen de la cadena ligera puede ser cortado con las enzimas AgeI y NheI. Cada reacción se llevó a cabo en un microtubo de 1.5 ml con un volumen total de 50 µl y una cantidad de plásmido total de 1 µg. El gen de la cadena ligera fue digerido con 0.5 µl de la enzima AgeI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) y 0.5 µl de la enzima NheI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) utilizando el buffer CutSmart® (Acetato de potasio 50 mM, Tris-Acetato 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9) incubando durante 2 horas a 37 °C. Mientras que el gen de la cadena pesada fue digerido con 1 µl de la enzima BspEI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) utilizando el buffer NEBuffer3.1® (NaCl 100

mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9) incubando durante 2 horas a 37 °C y posteriormente, fue purificado utilizando el kit QIAquick™ PCR Purification (QIAGEN, Venlo, Países Bajos) y digerido nuevamente con 1 µl de la enzima AvrII (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) utilizando el buffer CutSmart® (Acetato de potasio 50 mM, Tris-Acetato 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9) incubando durante 2 horas a 37 °C.

Las reacciones de digestión fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0.8 % a 80 V durante 1 hora; utilizando un marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Waltham, Massachusetts, E.U.A.) como patrón y visualizadas en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imager - Bio-Rad) para observar los fragmentos correspondientes a los plásmidos pUC57 y los genes de las cadenas ligera y pesada.

Construcción de los plásmidos *pVITRO1-Neo-MCS* con genes de cadena ligera y pesada (*cetuximab*)

Para construir el vector plasmídico que se utilizaría para la producción del anticuerpo monoclonal Cetuximab, primero se realizaron las construcciones plasmídicas del vector pVITRO1-Neo-MCS (Figura 13) y cada uno de los genes individuales para la cadena ligera y pesada. El plásmido pVITRO1-Neo-MCS fue sometido a reacciones de digestión con enzimas de restricción de igual manera que realizaron con los genes de las cadenas ligera y pesada. Las reacciones se hicieron en microtubos de 1.5 ml con un volumen total de 30 µl y una cantidad total de plásmido de 0.75 µg. La primera reacción se hizo con plásmido pVITRO1-Neo-MCS, 1.5 µl de enzima AgeI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) y 1.5 µl de la enzima NheI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) utilizando el buffer CutSmart® (Acetato de potasio 50 mM, Tris-Acetato 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9) incubando durante 2 horas a 37 °C. La segunda reacción se preparó nuevamente con plásmido pVITRO1-Neo-MCS y 1.5 µl de enzima AvrII (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) utilizando el buffer CutSmart® (Acetato de potasio 50 mM, Tris-Acetato 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9) incubando durante 2 horas a 37 °C; posteriormente se purificó utilizando el kit MinElute™ PCR Purification (QIAGEN, Venlo, Países Bajos) y digerido nuevamente

con 1.5 µl de la enzima BspEI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) utilizando el buffer NEBuffer3.1® (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9) incubando durante 2 horas a 37 °C.

Una vez terminadas las reacciones de digestión, los plásmidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 0.8 % a 80 V durante 1 hora para separar los fragmentos linealizados de ADN de interés para ser ligados a los genes de las cadenas ligera y pesada. Se utilizó un marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Waltham, Massachusetts, E.U.A.) como patrón y un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imager - Bio-Rad) para visualizar las bandas de los fragmentos.

Ya separados los plásmidos linealizados en el gel de agarosa 0.8 %, se sometieron a una reacción de purificación con el kit MinElute™ Gel Extraction (QIAGEN, Venlo, Países Bajos) para extraer el material genético del gel. Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de ligación entre los plásmidos linealizados y los genes de las cadenas ligera y pesada. Se utilizó 1 µl de buffer de ligación 10X (Tris-HCl 300mM, pH 7.8, MgCl₂ 100mM, DTT 100mM y ATP 10mM) y 1 µl de la enzima T4 DNA ligasa; las reacciones se llevaron a un volumen final de 10 µl manteniendo una relación de 3:1 entre gen y vector, incubándose a 16 °C durante 16 horas y después se cambió a 4 °C pasado ese tiempo, dando un total de 18 horas de incubación. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20 °C para su conservación.

Transformación de *E. coli* con construcciones plasmídicas pViro1-Neo-MCS

Las muestras de ligación fueron insertadas en bacterias *E. coli* OneShot™ TOP10 electrocompetentes utilizando cubetas de electroporación de 0.1 cm de Bio-Rad (Hercules, California, E.U.A.). Se añadieron 50 µl de células electrocompetentes y 0.5 µl de plásmido a cada cubeta para llevar a cabo la reacción. Las condiciones de electroporación fueron: 1.75 KV, 25 µF, 200 – 1000 Ω. Posteriormente se añadieron 500 µl de medio S.O.C (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a la cubeta de electroporación y se recuperaron las bacterias en un tubo de 15 ml estéril, el cual se mantuvo en agitación a 250 rpm, 37 °C durante 1 h. Se procedió a centrifugar las bacterias a 14 000 rpm por 30 segundos, se descartó el sobrenadante y la biomasa fue resuspendida

en 100µl del medio remanente; enseguida se procedió a realizar el sembrado de las bacterias por extensión, empleando toda la biomasa resuspendida, en una placa Petri con medio agar-LB (agar 1.5%, triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 50 µg/ml de kanamicina) y se incubó a 37° C durante 16 h.

Confirmación de construcciones plasmídicas p*Vitro*1-Neo-MCS (HC y LC)

Utilizando palillos estériles se tomaron muestras de las colonias transformadas con las construcciones de *pVitro1-Neo-MCS* y los genes de las cadenas ligera y pesada de *Cetuximab*. Se picaron 3 colonias con *pVitro + HC* y 3 colonias con *pVitro + LC*. Todas las muestras se colocaron en tubos con 3 ml de medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 50 µg/ml de kanamicina) y se dejaron incubar por 16 horas a 37 °C, 250 rpm. Una vez transcurrida la incubación, las muestras se sometieron a reacciones de extracción de ADN con el kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific™). Los tubos fueron centrifugados a 14 000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente para formar la pastilla de biomasa, se resuspendió utilizando 250 µl de Buffer de Resuspensión incluido en el kit GeneJet™. Una vez resuspendida la biomasa, se añadieron 250 µl de Solución de Lisis, incluida en el kit, para liberar los plásmidos de interés de las bacterias. Se mezcló por inversión 6 veces para asegurar el máximo contacto de la solución con el resuspendido. Inmediatamente se añadieron 350 µl de Solución de Neutralización, incluida en el kit, para evitar la desnaturalización del ADN plasmídico. Se mezcló por inversión 6 veces, asegurando de cumplir con las recomendaciones del fabricante para evitar cualquier daño al material genético. Después, se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos para formar una pastilla de residuos lisados y el sobrenadante fue transferido a una columna GeneJet™ para separar el plásmido de interés del resto de la solución. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 500 µl de Solución de Lavado, incluido en el kit y adicionado con etanol según las instrucciones del fabricante, centrifugando entre cada uno durante 1 minuto y descartando el filtrado. Se centrifugó una vez más (tercera vez) por 1 minuto para asegurar que todos los residuos de Solución de Lavado fueran eliminados de la columna. Las columnas fueron transferidas a microtubos de 1.5 ml y se les añadió 50 µl de Buffer de Elusión, incluido en el kit, y se dejó incubar a temperatura ambiente por

2 minutos. Finalmente se centrifugó a 14 000 rpm para permitir el eluido transferirse de las columnas a los microtubos. Finalizada la extracción, se utilizó un equipo NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.A.) para determinar las concentraciones de las muestras.

Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0.8 % a 80 V durante 1 hora, utilizando un marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Waltham, Massachusetts, E.U.A.) como patrón y se utilizó un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imager - Bio-Rad) para visualizar las bandas de los fragmentos.

Amplificación y purificación de construcciones plasmídicas pVITRO1-Neo-MCS

Una vez confirmado que las construcciones plasmídicas de *pVITRO1* con los genes *HC/LC* se llevó a cabo una amplificación para tener concentraciones adecuadas para los procesos de transfección en células de mamífero. Se utilizó un kit Endofree® Plasmid Maxiprep (QIAGEN, Venlo, Países Bajos) y el procedimiento fue el siguiente:

Utilizando palillos estériles se picaron colonias transformantes confirmadas de poseer las construcciones pVITRO1+LC y pVITRO1+HC y fueron colocadas cada uno en frascos con 200 ml de medio de cultivo LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 50 µg/ml de kanamicina) y se incubaron a 37 °C, 250 rpm durante 16 horas. Con la ayuda de tubos de 50 ml estériles, se centrifugó el contenido total de los frascos a 6 000g, 4 °C durante 15 minutos para formar pastilla de biomasa. Una vez hecho esto, toda la biomasa de cada frasco fue resuspendida en 10 ml totales de Buffer de Resuspensión P1 (Tris-Cl 50 mM; pH 8.0, EDTA 10 mM, ARNasa A 100 µg/ml). Después, se añadió 10 ml de Buffer de Lisis P2 (NaOH 200 mM, 1 % SDS [p/v]) a cada muestra y se mezcló por inversión 6 veces. La reacción se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y después a cada uno se agregó 10 ml de Buffer de Estabilización P3 (Acetato de potasio 3.0 M, pH 5.5) y se mezcló por inversión 6 veces. El contenido lisado de cada muestra se vertió en un cartucho QIAFilter™ incluido en el kit y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos antes de ser filtrado y recibido en tubos nuevos de 50 ml. El material filtrado se le añadió 2.5 ml de Buffer ER (Acetato de potasio 1.0 M, pH 5.0) y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos. Durante este tiempo de incubación, se prepararon dos columnas QIAGEN-Tip™ a las

cuales se les agregaron a cada una 10 ml de Buffer de Estabilización QBT (NaCl 750 mM, buffer MOPS 50 mM; pH 7.0, 15 % isopropanol [v/v], 0.15 % Triton X-100 [v/v]) y se dejó filtrar por gravedad a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación y estando estabilizadas las columnas, se agregaron las muestras en las columnas. Seguido se realizaron 2 lavados con 30 ml de Buffer e lavado QC (NaCl 10 mM, buffer MOPS 50 mM; pH 7.0, 15 % isopropanol [v/v]) cada uno. Seguido, se añadió a cada columna 15 ml de Buffer de Elución QN (NaCl 1.6 M, buffer MOPS 50 mM; pH 7.0, 15 % isopropanol [v/v]) y se recibió el eluido en tubos nuevos de 50 ml. Se agregó a cada una de las muestras eluidas 10.5 ml de isopropanol y se mezcló por inversión 10 veces. Las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm, 4 °C, durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante cuidadosamente y se añadió a cada una 5 ml de etanol 70 % (v/v) para resuspender la pastilla de ADN. Se volvió a centrifugar a 15 000 rpm, 4 °C, por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Las pastillas de material genético se dejaron secar al aire a temperatura ambiente hasta quedar casi transparentes. Por último, cada pastilla se resuspendió en 250 µl de Buffer TE (Tris-Cl 10 mM; pH 8.0, EDTA 1 mM) y se almacenaron a -20 °C para su conservación.

La cuantificación de cada muestra con plásmido y gen se realizó con un equipo NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.A.). Se llevaron a cabo reacciones de digestión con enzimas de restricción para confirmar que las construcciones plasmídicas fuera adecuadas. Cada reacción se llevó a cabo en un microtubo de 1.5 ml con un volumen total de 50 µl y una cantidad de plásmido total de 1 µg. El gen de la cadena ligera fue digerido con 1.5 µl de la enzima Agel (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) utilizando el buffer CutSmart® (Acetato de potasio 50 mM, Tris-Acetato 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9). Mientras que el gen de la cadena pesada fue digerido con 1.5 µl de la enzima BspEI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.) utilizando el buffer NEBuffer3.1® (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9) incubando durante 2 horas a 37 °C

Las reacciones de digestión fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0.8 % a 80 V durante 1 hora; utilizando un marcador de peso molecular 1 kb plus DNA

Ladder (Waltham, Massachusetts, E.U.A.) como patrón y visualizadas en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imager - Bio-Rad) para observar los fragmentos correspondientes a los plásmidos *pVidro1+ HC* y *pVidro1+LC*.

Construcción del vector de transfección *pVidro1-Neo-Cetuxi*

Para construir el vector plasmídico que se utilizaría para transfectar las células de mamífero y expresar el anticuerpo monoclonal Cetuximab, se tomó la primera construcción de *pVidro1-LC* y se sometió a reacciones de digestión con las enzimas de restricción BspEI y AvrII (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.). Estas se hicieron en microtubos de 1.5 ml utilizando los buffers CutSmart® y NEBuffer3.1® (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, E.U.A.). Las reacciones se llevaron a cabo por separado debido al requerimiento de diferentes buffers para cada enzima (BspEI con NEBuffer3.1 y AvrII con buffer CutSmart). Entre reacciones se utilizó el kit QIAquick™ PCR Purification (QIAGEN, Venlo, Países Bajos) para recuperar el material genético. En la Tabla 2 se muestran las enzimas utilizadas para sitio múltiple de clonación y gen correspondiente.

Sitio Múltiple de Clonación	Gen de <i>Cetuximab</i>	Enzima de restricción	Buffer utilizado
MCS 1	Cetuxi-HC	AvrII	Cutsmart®
		BspEI	NEBuffer3.1®
MCS 2	Cetuxi-LC	AgeI	Cutsmart®
		NheI	

Tabla 2. Sitios de clonación y genes digeridos con sus correspondientes enzimas de restricción para llevar a cabo las construcciones plasmídicas.

Una vez linealizado el plásmido *pVidro1-LC* se agregó el gen *HC* (digerido con las mismas enzimas de restricción BspEI y AvrII) a razón de 1:1 junto con la enzima Ligasa T4, las reacciones se llevaron a un volumen final de 10 µl incubándose a 16 °C durante

16 horas y después se cambió a 4 °C pasado ese tiempo, dando un total de 18 horas de incubación. Finalmente, la construcción se almacenó a -20 °C para su conservación.

Esta construcción fue utilizada para transformar células *E. coli* OneShot™ TOP10 electrocompetentes utilizando cubetas de electroporación de 0.1 cm de Bio-Rad (Hercules, California, E.U.A.). Se añadieron 50 µl de células electrocompetentes y 0.7 µl de plásmido a una cubeta para llevar a cabo la reacción. Las condiciones de electroporación fueron: 1.75 KV, 25 µF, 200 – 1000 Ω. Posteriormente se añadieron 500 µl de medio S.O.C (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a la cubeta de electroporación y se recuperaron las bacterias en un tubo de 15 ml estéril, el cual se mantuvo en agitación a 250 rpm, 37 °C durante 1 h. Se procedió a centrifugar las bacterias a 14 000 rpm por 30 segundos, se descartó el sobrenadante y la biomasa fue resuspendida en 100 µl del medio remanente; enseguida se procedió a realizar el sembrado de las bacterias por extensión, empleando toda la biomasa resuspendida, en una placa Petri con medio agar-LB (agar 1.5%, triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 50 µg/ml de kanamicina) y se incubó a 37° C durante 16 h.

Pasada esta incubación, se utilizaron palillos estériles para picar 6 colonias transformadas diferentes de la placa Petri y sembrados en tubos con 3 ml de medio LB extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 50 µg/ml de kanamicina) durante 16 horas. Para someterlas al proceso de extracción de ADN con el kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific™). Las muestras fueron almacenadas a -20 °C para su conservación. Las muestras fueron analizadas con un equipo NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.A.) para determinar su concentración.

Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0.8 % a 80 V durante 1 hora, utilizando un marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Waltham, Massachusetts, E.U.A.) como patrón y se utilizó un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imager - Bio-Rad) para visualizar las bandas de los fragmentos.

De igual manera que las construcciones individuales, el plásmido *pVITRO1+HC-LC* fue amplificado y sometido a una extracción con el kit Endofree® Plasmid Maxiprep (QIAGEN, Venlo, Países Bajos).

Cultivo y proliferación de línea celular VERO

Ambas líneas celulares CHO (ATCC® CCL-61™) y VERO (ATCC® CCL-61™) fueron cultivadas y proliferadas utilizando medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose; Gibco™) suplementado con 10 % [v/v] de suero fetal bovino (SFB) y frascos ventilados T-25 (Corning® 25cm² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap) y T-75 (Nest® 250ml Cell Culture Flask T-75 with Vent Cap). Los cultivos fueron incubados a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % humedad relativa. Se hicieron cambios de medio cada 48 horas. Se realizaron pasajes una vez que las células alcanzaban una confluencia aproximada del 90 %, decantando el medio de cultivo y realizando lavados con PBS 1X (Sigma-Aldrich™, cat. P4417) esterilizado y filtrado para retirar los restos celulares y SFB residual. Se utilizó Tripsina-EDTA 0.25 % (Gibco™, cat. R001100) para desprender las células del frasco y hacer la Todos los cultivos se visualizaron utilizando un microscopio invertido de contraste de fases (Optika, microscopes, Italy).

Transfección de cultivos celulares

Se utilizaron tres vectores plasmídicos diferentes para realizar las transfecciones de los cultivos celulares. El primero fue un vector de expresión Monster Green® Fluorescent Protein pHMGFP (Promega) que serviría como control positivo de transfección para las células de mamífero. El segundo vector fue un control positivo de expresión de anticuerpo (Antibody-Expressing Positive Control Vector [AB⁺]; Gibco™, cat. A14662). Y el tercero, el vector *pVITRO1-Neo-Cetuxi* para la expresión del anticuerpo monoclonal *Cetuximab*. En todos los ensayos de transfección se utilizó un cultivo sin transfectar como control negativo.

Como agentes transfectantes se utilizaron lípidos catiónicos Lipofectamina 2000® (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent; Invitrogen™, cat. 11668030) y Expifectamine™ CHO (Gibco™, cat. A29133) para formar los complejos lipídicos (*lipoplex*) que permitirían al ADN ingresar a las células de mamífero. Estos fueron

preparados utilizando el medio OptiPRO™ SMF (Gibco™, cat. 12309019) para estabilizar el material genético y los agentes lipídicos, y permitir la interacción entre ellos para la formación de los *lipoplex*.

Todas las reacciones de transfección se llevaron a cabo basándose en las indicaciones del protocolo para la Lipofectamina 2000® (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent; Invitrogen™, cat. 11668030).

Las reacciones de transfección se llevaron a cabo en tres partes: la primera en placa de 96 pozos para confirmar que el cultivo VERO fuera compatible con el lípido catiónico Expifectamine™ CHO y pudiera ser transfectado

1. Viabilidad de transfección celular con *Expifectamine*™ CHO en células VERO

En la primera parte se realizó una transfección en una placa de 96 pozos (Corning™ Costar™ 96-Well, Cell Culture-Treated, Flat-Bottom Microplate, cat. 07-200-90) utilizando células VERO (ATCC® CCL-61™) para verificar que el agente Expifectamine™ CHO (Gibco™, cat. A29133) fuera capaz de llevar el material genético al interior de las células adherentes. Se utilizó el vector plasmídico Monster Green® Fluorescent Protein phMGFP (Promega) para demostrar que las células eran viables para ser transfectadas. Se usó el agente de transfección Lipofectamina 2000® (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent; Invitrogen™, cat. 11668030) como control positivo y al mismo tiempo se utilizó el agente de transfección Expifectamine™ CHO (Gibco™, cat. A29133).

Un día anterior a la transfección, se sembraron células VERO (ATCC® CCL-61™) en 16 pozos a razón de 20 000 células/pozo para garantizar una confluencia de aproximadamente 70 – 90 % el día de la reacción. En cada pozo se colocaron 100 µl de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose; Gibco™) suplementado con 10 % [v/v] de suero fetal bovino (SFB), 1X Glutamax™ (Gibco™, cat. 35050061) y 1X penicilina-estreptomycin, neomicina (PSN) (Gibco™, 15640055).

En el día de la transfección, se decantó el medio de cultivo de cada pozo y se realizaron 2 lavados con 200 µl de PBS 1X (Sigma-Aldrich™, cat. P4417) esterilizado y filtrado

para retirar residuos de SFB y antibiótico. Después, se agregaron 100 µl de medio DMEM suplementado 10 % con SFB y 1X Glutamax™.

Para la preparación de los *lipoplex* se tomaron 5 microtubos de 1.5 ml estériles y en cada uno se colocaron 25 µl de medio OptiPRO™ SMF (Gibco™, cat. 12309019), a uno de los microtubos se le agregó 1.0 µl de Lipofectamina 2000® (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent; Invitrogen™, cat. 11668030) y a los otros 4 se les agregó 1.0 µl, 1.5 µl, 2.0 µl y 2.5 µl de Expifectamine™ CHO (Gibco™, cat. A29133), respectivamente. Del mismo modo, se tomaron 2 microtubos de 1.5 ml estériles y se les colocaron 125 µl de medio OptiPRO™ y se agregaron 2.5 µg del vector Monster Green® Fluorescent Protein pHMGFP (Promega) a cada uno. Se mezclaron a razón 1:1 los contenidos de los microtubos, es decir 25 µl [OptiPRO™ + Lipofectamina/Expifectamine] y 25 µl [OptiPRO™ + vector plasmídico]. Se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 10 µl de las mezclas *lipoplex* a cada pozo con células, esto con el objetivo de tener reacciones por triplicado de cada combinación de agente lipídico/vector.

En total se tuvieron las siguientes reacciones por pozo:

- 3x Lipofectamina 2000® (1.0 µl) + vector Monster Green®
- 3x Expifectamine™ CHO (1.0 µl) + vector Monster Green®
- 3x Expifectamine™ CHO (1.5 µl) + vector Monster Green®
- 3x Expifectamine™ CHO (2.0 µl) + vector Monster Green®
- 3x Expifectamine™ CHO (2.5 µl) + vector Monster Green®
- 1x cultivo de control negativo

Las transfecciones se dejaron incubar a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % humedad relativa, durante 72 horas. Los cultivos fueron revisados utilizando un microscopio invertido de fluorescencia (ZEISS® Axio™ Vert.A1).

2. Transfección de células VERO con vectores plasmídicos *pViro1-Neo-Cetuxi* y *AB*⁺

La segunda parte se llevó a cabo en una placa de 24 pozos y consistió en hacer la transfección de un cultivo de células VERO (ATCC® CCL-61™) utilizando el vector

Monster Green® Fluorescent Protein pHMGFP (Promega) como control positivo de transfección y el vector *pVitro1-Neo-Cetuxi* para la producción del anticuerpo monoclonal *Cetuximab*.

Un día antes de la transfección se sembraron células en 18 pozos de la placa a razón de aproximadamente 100 000 células/pozo para garantizar una confluencia de 70 – 90 % el día de la reacción. En cada pozo se colocaron 500 µl de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose; Gibco™) suplementado con 10 % [v/v] de suero fetal bovino (SFB), 1X Glutamax™ (Gibco™, cat. 35050061) y 1X PSN (Gibco™, 15640055). Se dejaron incubar a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % humedad relativa, durante 24 horas.

El día de la transfección; se decantó el medio de los pozos y se realizaron dos lavados con 1.0 ml de PBS 1X (Sigma-Aldrich™, cat. P4417) esterilizado y filtrado para remover residuos de SFB y antibiótico. Se adicionó 1.0 ml de DMEM suplementado con 10 % [v/v] de suero fetal bovino (SFB), 1X Glutamax™ (Gibco™, cat. 35050061) a cada pozo.

Para la preparación de los *lipoplex* se tomaron 8 microtubos de 1.5 ml estériles y en cada uno se colocaron 50 µl de medio OptiPRO™ SMF (Gibco™, cat. 12309019) en dos de ellos se colocaron 2.0 µl de Expifectamine™ CHO (Gibco™, cat. A29133), en otros dos se colocaron 3.0 µl, en los siguientes dos se colocaron 4.0 µl y en los últimos dos se agregaron 5.0 µl. De igual forma, se tomaron 2 microtubos de 1.5 ml estériles y en cada uno se adicionaron 250 µl de medio OptiPRO™ SMF; a uno se le agregaron 5 µg de vector Monster Green® y al otro 5 µg de vector *pVitro1-Neo-Cetuxi*. Se mezclaron a razón 1:1 los contenidos de los microtubos, es decir 50 µl [OptiPRO™ + Expifectamine] y 50 µl [OptiPRO™ + vector plasmídico]. Se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 50 µl de las mezclas *lipoplex* a cada pozo con células, esto con el objetivo de tener reacciones por duplicado de cada combinación de agente lipídico/vector.

En total se tuvieron las siguientes reacciones por pozo:

- 2x Expifectamine™ CHO (2.0 µl) + vector Monster Green®
- 2x Expifectamine™ CHO (3.0 µl) + vector Monster Green®
- 2x Expifectamine™ CHO (4.0 µl) + vector Monster Green®
- 2x Expifectamine™ CHO (5.0 µl) + vector Monster Green®
- 1x cultivo control negativo para Monster Green®
- 2x Expifectamine™ CHO (2.0 µl) + vector *pVitro1-Neo-Cetuxi*
- 2x Expifectamine™ CHO (3.0 µl) + vector *pVitro1-Neo-Cetuxi*
- 2x Expifectamine™ CHO (4.0 µl) + vector *pVitro1-Neo-Cetuxi*
- 2x Expifectamine™ CHO (5.0 µl) + vector *pVitro1-Neo-Cetuxi*
- 1x cultivo de control negativo para *pVitro1-Neo-Cetuxi*
- 2x Expifectamine™ CHO (2.0 µl) + vector AB⁺
- 2x Expifectamine™ CHO (3.0 µl) + vector AB⁺
- 2x Expifectamine™ CHO (4.0 µl) + vector AB⁺
- 2x Expifectamine™ CHO (5.0 µl) + vector AB⁺
- 1x cultivo de control negativo para AB⁺

Las transfecciones se dejaron incubar a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % humedad relativa, durante 72 horas. Los cultivos fueron revisados utilizando un microscopio invertido de fluorescencia (ZEISS® Axio™ Vert.A1).

3. Transfección de células VERO en placas de 6 pozos

En la tercera fase se realizó la transfección del cultivo celular a una escala mayor utilizando placas de 6 pozos. Para este ensayo se utilizaron los vectores Monster Green® Fluorescent Protein pHMGFP (Promega) como control positivo de transfección, el vector *pVitro1-Neo-Cetuxi* para la producción del anticuerpo monoclonal *Cetuximab* y el vector de control positivo de expresión de anticuerpo (Antibody-Expressing Positive Control Vector [AB⁺]; Gibco™, cat. A14662).

Un día antes de la transfección se sembraron células en 4 pozos de la placa a razón de aproximadamente 500 000 células/pozo para garantizar una confluencia de 70 – 90 % el día de la reacción. En cada pozo se colocaron 1 ml de medio DMEM (Dulbecco's

Modified Eagle's Medium - high glucose; Gibco™) suplementado con 10 % [v/v] de suero fetal bovino (SFB), 1X Glutamax™ (Gibco™, cat. 35050061) y 1X PSN (Gibco™, 15640055). Se dejaron incubar a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % humedad relativa, durante 24 horas.

El día de la transfección; se decantó el medio de los pozos y se realizaron dos lavados con 1.0 ml de PBS 1X (Sigma-Aldrich™, cat. P4417) esterilizado y filtrado para remover residuos de SFB y antibiótico. Se adicionó otro 1.0 ml de DMEM suplementado con 10 % [v/v] de suero fetal bovino (SFB), 1X Glutamax™ (Gibco™, cat. 35050061) a cada pozo.

Para la preparación de los *lipoplex* se tomaron 6 microtubos de 1.5 ml estériles y en cada uno se colocaron 150 µl de medio OptiPRO™ SMF (Gibco™, cat. 12309019) y 12.0 µl de Expifectamine™ CHO (Gibco™, cat. A29133). De igual forma, se tomaron 3 microtubos de 1.5 ml estériles y en cada uno se adicionaron 700 µl de medio OptiPRO™ SMF; a uno se le agregaron 14 µg de vector Monster Green®, otro 14 µg de vector *pVitro1-Neo-Cetuxi* y al último se agregaron 14 µg de vector control positivo de expresión de anticuerpo (Antibody-Expressing Positive Control Vector [AB⁺]; Gibco™, cat. A14662). Se mezclaron a razón 1:1 los contenidos de los microtubos, es decir 150 µl [OptiPRO™ + Expifectamine] y 150 µl [OptiPRO™ + vector plasmídico]. Se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 250 µl de las mezclas *lipoplex* a cada pozo con células, esto con el objetivo de tener una reacción por cada combinación de agente lipídico/vector, según indicaciones del protocolo para Lipofectamina 2000®.

En total se tuvieron las siguientes reacciones por pozo:

- 1x Expifectamine™ CHO (6.0 µl) + vector Monster Green®
- 1x Expifectamine™ CHO (6.0 µl) + vector control positivo de expresión de anticuerpo (AB⁺)
- 1x Expifectamine™ CHO (9.0 µl) + vector control positivo de expresión de anticuerpo (AB⁺)
- 1x Expifectamine™ CHO (6.0 µl) + vector *pVitro1-Neo-Cetuxi*

- 1x Expifectamine™ CHO (9.0 µl) + vector *pVitro1-Neo-Cetuxi*
- 1x cultivo control negativo

Las transfecciones se dejaron incubar a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % humedad relativa, durante 120 horas para llegar a la concentración máxima de proteína en el cultivo, siguiendo las indicaciones del protocolo para Lipofectamina 2000®. Los cultivos fueron revisados utilizando un microscopio invertido de fluorescencia (ZEISS® Axio™ Vert.A1).

Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE

Una vez concluido el tiempo de incubación de cada fase de transfección, se recolectaron el medio de cultivo y la biomasa para analizarlos mediante electroforesis SDS-PAGE; utilizando geles de poliacrilamida 12 % para llevar a cabo la separación de las proteínas por su peso molecular. Se utilizó un patrón de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, cat. 1610374) para distinguir las bandas de las proteínas de interés.

Utilizando microtubos de 1.5 ml se prepararon las muestras tomando 20 µl de medio de cultivo o biomasa y se mezclaron con 20 µl de buffer de muestra 2X (Trizma base 12M, SDS 0.12M, Glicerol 2M, pH 6.8). Cada muestra se calentó a 95 °C durante 5 minutos con un Thermoblock (Benchmark Scientific™, BSH1000). Posteriormente, cada muestra se cargó en el gel de poliacrilamida 12 % y se sometió a electroforesis SDS-PAGE; con una fuente de poder (Bio-Rad PowerPac 300) se administró un voltaje de 160 V durante 5 minutos para concentrarlas y un voltaje de 120 V durante 60 minutos para separarlas.

Al término de la electroforesis, los geles fueron teñidos utilizando azul de Coomasie (Coomasie blue 0.05 %, ácido acético 10 %, metanol 50 %, agua 40 %) durante 4 horas para su tinción y subsecuentemente desteñidos en agua bidestilada toda la noche. Ambos procesos fueron hechos a temperatura ambiente a 80 rpm.

Análisis de anticuerpos monoclonales con Western Blot

Para identificar las proteínas de interés de los anticuerpos monoclonales, se utilizó la técnica de Western Blot. Se utilizó un marcador de peso molecular Precision Plus

Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards (Bio-Rad, cat. 1610375) para identificar las bandas proteicas.

Después de realizar una electroforesis SDS-PAGE de las muestras de transfección, tanto medio de cultivo y biomasa, las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida 12 % fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, cat.1620213) utilizando una cámara de transferencia húmeda sumergida en buffer de transferencia (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % v/v). Se aplicó un voltaje de 100 V durante 60 minutos. Pasado este tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas sumergiéndolas en una solución de leche en polvo (Svelty®, Nestlé©) al 5 % en PBS-Tween 20 al 0.05 % e incubándolas durante toda la noche a 4 °C.

Después de ser bloqueadas, las membranas fueron lavadas por triplicado sumergiéndolas en una solución PBS-Tween 20 al 0.1 % durante 5 minutos con agitación manual leve. Seguido, fueron cortadas cuidadosamente utilizando un bisturí para separar los carriles de las diferentes proteínas de interés. Estos fragmentos fueron incubados con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa con afinidad a las regiones constantes de los anticuerpos monoclonales sintetizados por las transfecciones.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron IgG Anti-Humano (Goat Anti-Human (H+L)-HRP conjugate, Bio-Rad #1721050) e IgG Anti-Conejo (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad #1706516) y se colocaron cada uno en diluciones 1:1000 en una solución de leche en polvo (Svelty®, Nestlé©) al 2.5 % en PBS-Tween 20 al 0.05 %. Los fragmentos de membrana de nitrocelulosa correspondientes al anticuerpo monoclonal de interés fueron sumergidos en la solución correspondiente a su anticuerpo secundario con afinidad específica y se dejaron incubar por 2 horas a 37 °C, realizando ligeras agitaciones manuales cada 20 minutos; durante 1 minuto.

Pasada esta incubación, los fragmentos de membrana de nitrocelulosa fueron lavados por triplicado sumergiéndolos en una solución PBS-Tween 20 al 0.1 % durante 5 minutos con agitación manual leve.

Se prepararon 10 ml de solución reveladora mezclando una solución "A" (5 mg HRP Color Development Reagent, Bio-Rad #1706534, 1.66 ml metanol 100 % [frío], cubriéndola de la luz) y una solución "B" (8.33 ml de PBS 1X (Sigma-Aldrich™, cat. P4417)], 10 ml de peróxido de hidrógeno 35 %) y se agregó a los fragmentos de membrana de nitrocelulosa bloqueados con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa. Se dejaron incubar protegidos de la luz durante 15 minutos (y hasta 2 horas) para revelar las bandas correspondientes a las proteínas de interés.

RESULTADOS

Recuperación de genes *HC* y *LC* de *Cetuximab* del plásmido *pUC57*

Análisis inicial de concentración de plásmidos *pUC57* (*HC* y *LC*)

El análisis de la concentración de los plásmidos *pUC57* que contenían los genes de la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo monoclonal *Cetuximab* dio como resultado 55.1 ng/μl para *HC* y 62.7 ng/μl para *LC* (**Tabla 3**).

Tabla 3. Concentraciones de los plásmidos *pUC57-HC* (55.1 ng/μl) y *pUC57-LC* (62.7 ng/μl) recibidos por GenScript® (Piscataway, New Jersey, E.U.A.).

Plásmido	Concentración	260/280	260/230
<i>pUC57-HC</i>	55.1 ng/μl	1.88	2.16
<i>pUC57-LC</i>	62.7 ng/μl	1.80	2.14

Amplificación de plásmidos *pUC57* (*HC* y *LC*)

Una vez llevado a cabo el proceso de amplificación mediante la transformación de células *E. coli* TOP10 electrocompetentes y extracción del material genético con el kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific™) se analizaron las muestras con el equipo NanoDrop 2000™ y se obtuvieron las concentraciones de los plásmidos *pUC57-HC* y *pUC57-LC* de 245.1 ng/μl y 130.9 ng/μl (**Tabla 4**), respectivamente, las cuales correspondieron a las muestras con mayor concentración de ADN por lo que se utilizarían para los siguientes procesos.

Tabla 4. Resultados del análisis de concentración de plásmidos amplificados *pUC57-HC* (245.1 ng/μl) y *pUC57-LC* (130.9 ng/μl).

Plásmido	Concentración	260/280	260/230
<i>pUC57-HC</i>	245.1 ng/μl	1.92	2.20
<i>pUC57-LC</i>	130.9 ng/μl	1.90	2.21

Reacciones de digestión para linealizar *pVitro1-Neo-MCS* y extraer genes *HC* y *LC* de *pUC57*

Tras los procesos de digestión con enzimas de restricción, los plásmidos y genes fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. En la **Figura 17** se muestran los resultados con las bandas observadas correspondientes al material genético.



Figura 17. Electroforesis de muestras de plásmidos y marcador de tamaño 1 kb plus. El carril (A) corresponde al marcador 1 kb plus, el (B) al plásmido *pVitro1-Neo-MCS*, el (C) al plásmido *pUC57-CetuxiLC* digerido con “NheI” y “AgeI”, el (D) al plásmido *pVitro1-Neo-MCS* (E) al plásmido *pUC57-CetuxiHC* digerido con “BspI” y “AvrII”.

(1): Banda esperada para plásmido *pVitro* digerido con “NheI” y “AgeI” linealizado. Tamaño de plásmido: **6,295 pb**.

(2): Banda esperada para *pUC57* linealizado sin gen *CetuxiLC*. Tamaño de plásmido: **2,710 pb**.

(3): Banda esperada para gen *CetuxiLC* sin plásmido. Tamaño de plásmido: **732 pb**.

(4): Banda esperada para plásmido *pVitro* digerido con “BspI” y “AvrII” linealizado. Tamaño de plásmido: **6,295 pb**.

(5): Banda esperada para *pUC57* linealizado sin gen *CetuxiHC*. Tamaño de plásmido: **2,710 pb**.

(6) Banda esperada para gen *CetuxiHC* sin

Construcción de plásmidos *pVitro1-Neo-HC* y *pVitro1-Neo-LC*

Confirmación de construcciones

Después de llevar a cabo los procesos de ligación entre los plásmidos *pVitro1-Neo-MCS* digeridos con las enzimas de restricción correspondientes a los genes de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal *Cetuximab*, se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 0.8 % para identificar las bandas correspondientes al material genético de interés. En la **Figura 18** se muestran los resultados observados.

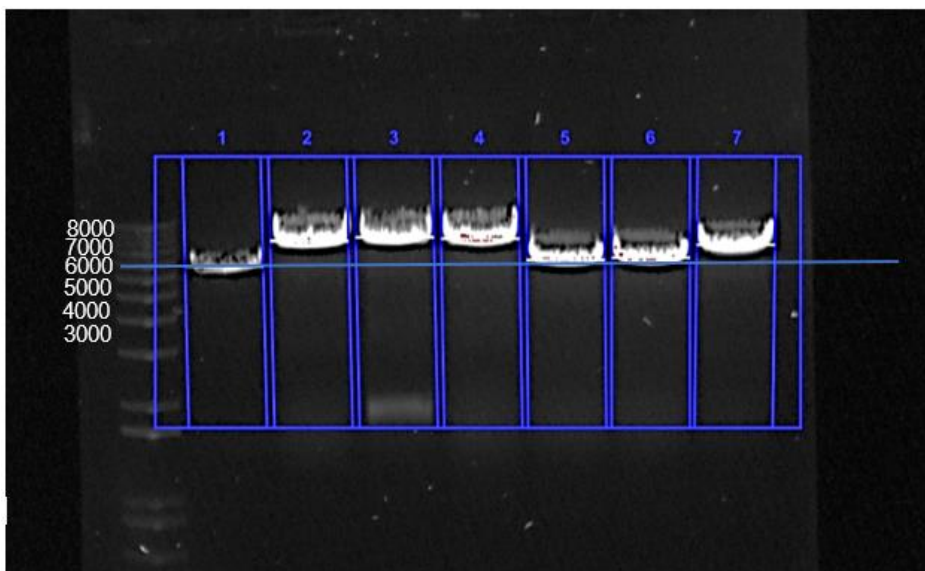


Figura 18. Construcciones plasmídicas con *pVito1-Neo-HC* y *pVito1-Neo-LC*.

El carril (1) muestra el plásmido *pVito* linealizado sin ningún gen, el carril (2) muestra el plásmido *pVito-CetuxiHC1*, el carril (3) muestra *pVito-CetuxiHC2*, el carril (4) muestra *pVito-CetuxiHC3*, el carril (5) muestra *pVito-LC1*, el carril (6) muestra *pVito-CetuxiLC2* y el carril (7) muestra *pVito-LC3*. Se puede observar que las bandas correspondientes a HC (1-3) son más grandes que el plásmido vacío por lo que se considera que poseen el gen. De misma forma, solo la banda correspondiente a LC3 muestra ser de mayor tamaño al plásmido sin gen

Amplificación y purificación de construcciones *pVito1-Neo-HC* y *pVito1-Neo-LC*

Seguido a la confirmación de las construcciones plasmídicas, se realizó una amplificación con el kit Endofree® Plasmid Maxiprep (QIAGEN, Venlo, Países Bajos). Este procedimiento permitió tener una concentración de los plásmidos apropiada para procesos de transfección; el plásmido *pVito1-Neo-HC* mostró una concentración de 2.126 µg/µl, mientras que el plásmido *pVito1-Neo-LC* resultó con 2.386 µg/µl. En la **Figura 19** se muestran los resultados mostrados por el software del equipo NanoDrop 2000™.

Tras los procesos de digestión con enzimas de restricción, los plásmidos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. En la **Figura 20** se muestran los resultados con las bandas observadas correspondientes al material genético.

Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type
pViro1-Neo-HC	BSLIII	20/02/2019 02:50 p.m.	2126.5	ng/μl	42.531	22.311	1.91	2.22	DNA
pViro1-Neo-LC	BSLIII	20/02/2019 02:54 p.m.	2386.9	ng/μl	47.738	25.056	1.91	2.23	DNA

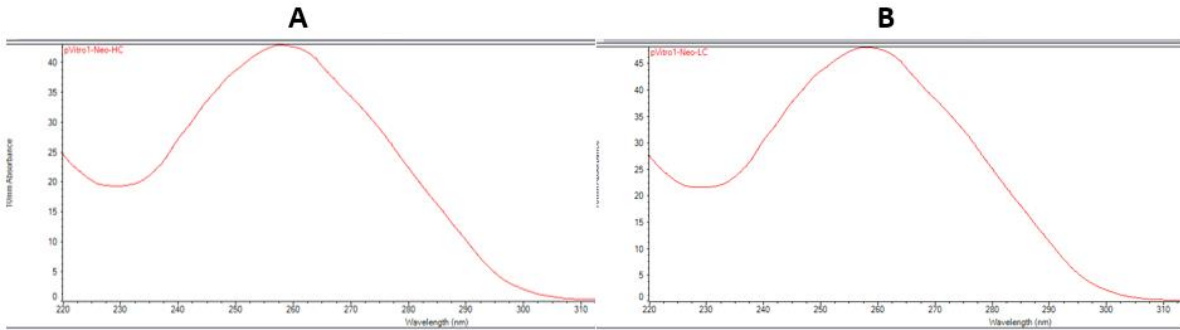


Figura 19. Resultados del análisis de concentración de plásmidos *pViro1-Neo-HC* (2 126 ng/μl) y *pViro1-Neo-LC* (2 386 ng/μl). (A) absorbancia y longitud de onda de *pViro1-Neo-HC*. (B) absorbancia y longitud de onda de *pViro1-Neo-LC*.

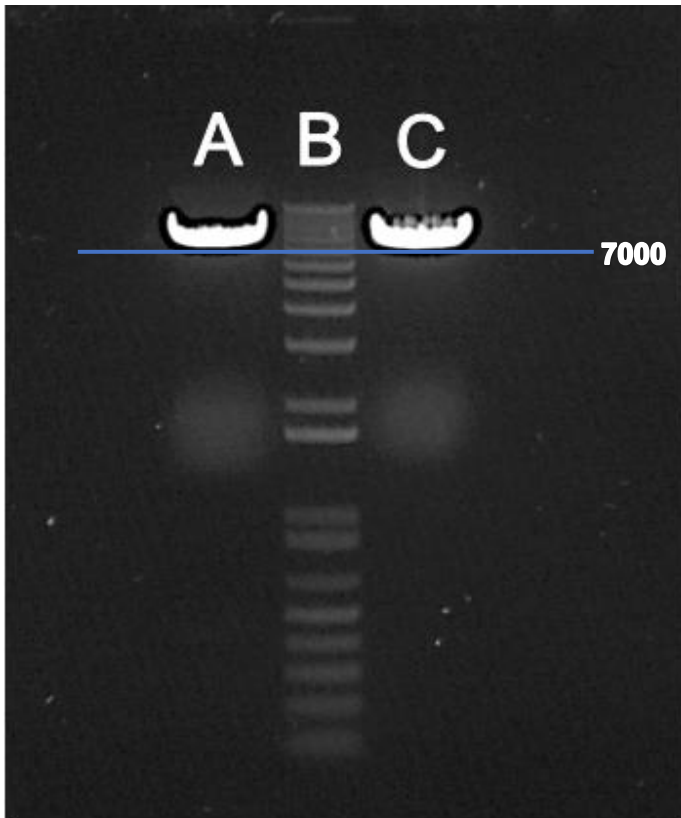


Figura 20. Electroforesis de plásmidos *pViro1-Neo-HC* y *pViro1-Neo-LC*.

El carril (A) muestra la banda correspondiente al plásmido *pViro1-Neo-HC* linealizado y el carril (B) muestra el marcador 1 kb plus y el carril (C) muestra el plásmido *pViro1-Neo-LC* linealizado.

Se puede observar en la banda A al plásmido con el gen *HC* es de tamaño un poco mayor que la banda del carril C que tiene al plásmido con el gen *LC*. Esto corresponde a los tamaños respectivos de cada plásmido + gen, **7 723 pb** y **7 027 pb**.

Construcción del plásmido para transfección *pVITro1-Neo-Cetuxi*

Confirmación de construcción *pVITro1-Neo-Cetuxi*

Además de las construcciones individuales *pVITro1-Neo-HC* y *pVITro1-Neo-LC*, se construyó el vector *pVITro1-Neo-Cetuxi* que contenía ambos genes de las cadenas ligera y pesada (*HC* y *LC*) en ambos sitios múltiples de clonación. Los resultados de la extracción de plásmidos con el kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific™) se muestran en la **Figura 21** donde se observan las bandas correspondientes a las 6 colonias muestreadas de la transformación.

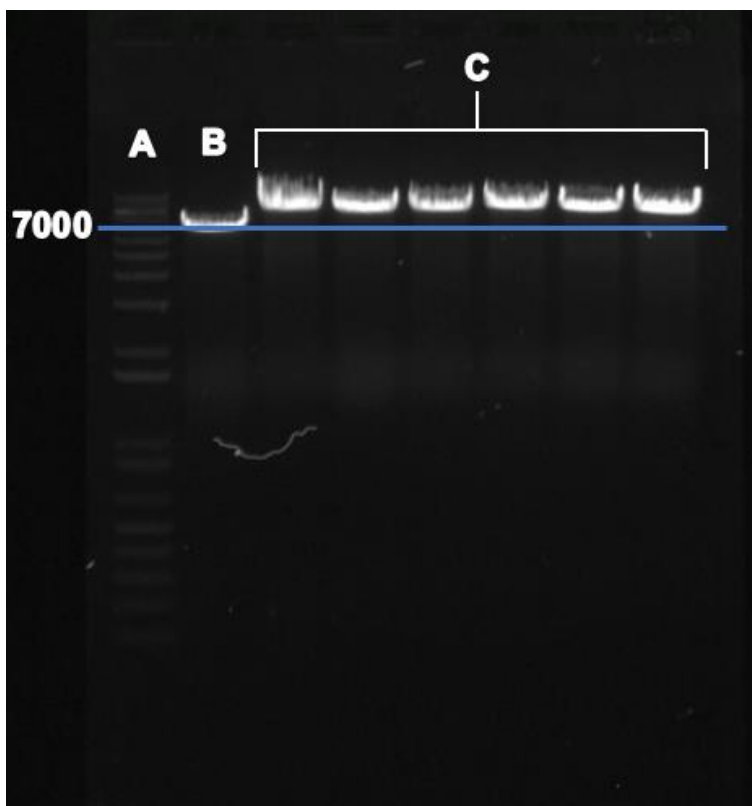


Figura 21. Electroforesis de plásmidos *pVITro1-Neo-LC* y *pVITro1-Neo-Cetuxi*.

El carril (A) muestra el marcador de peso molecular 1 kb plus. El carril (B) muestra la banda correspondiente al plásmido *pVITro1-Neo-LC* linealizado (7 027 pb). Los carriles (C) muestran las extracciones de las colonias transformadas con el plásmido *pVITro1-Neo-Cetuxi* (8 453 pb)

Todas las muestras de las colonias transformadas muestran tener la construcción plasmídica del *pVITro1-Neo-Cetuxi* con ambos genes *HC* y *LC*.

Amplificación de *pVITro1-Neo-Cetuxi*

Una vez confirmada la construcción del vector *pVITro1-Neo-Cetuxi* se utilizó el kit Endofree® Plasmid Maxiprep (QIAGEN, Venlo, Países Bajos) para amplificar su concentración a niveles requeridos para transfección celular.

La concentración del plásmido *pVITro1-Neo-Cetuxi* amplificado fue de 2.341 µg/µl. En la **Figura 22** se muestra el resultado del software del equipo NanoDrop 2000™.

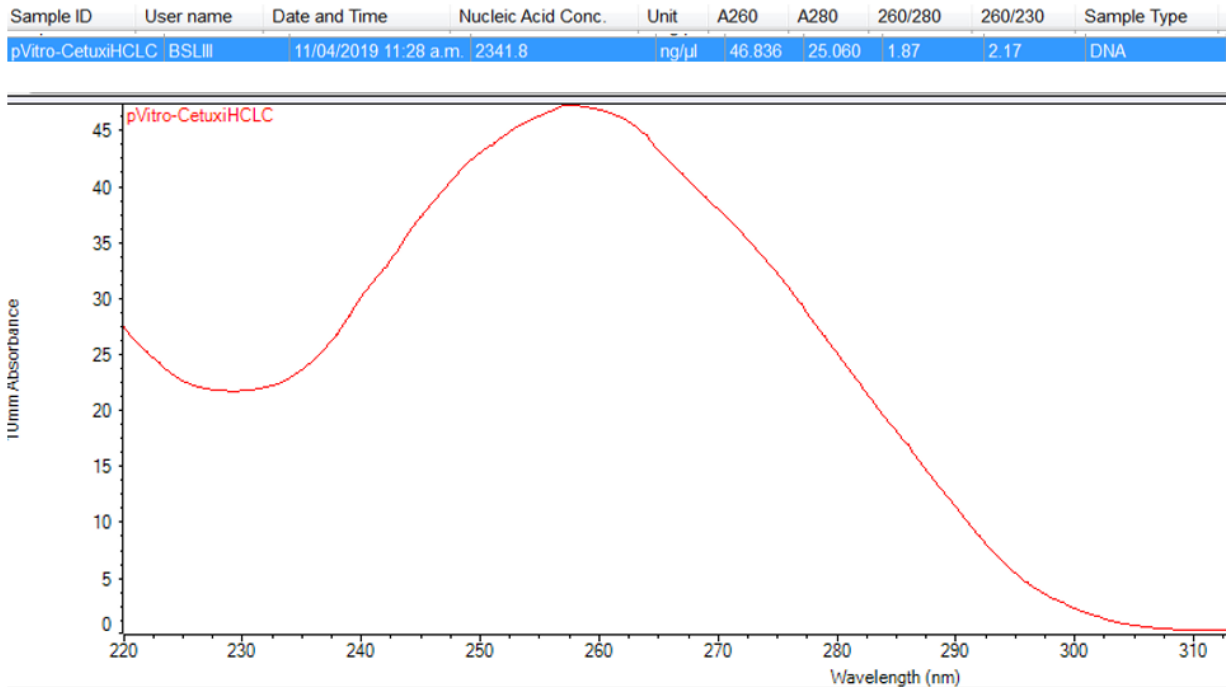


Figura 22. Resultados del análisis de concentración del plásmido amplificado *pVitro1-Neo-Cetuxi* (**2 341.8 ng/μl**). Absorbancia y longitud de onda de *pVitro1-Neo-HC*. (B) absorbancia y longitud de onda de *pVitro1-Neo-Cetuxi*.

Por último, se realizó una electroforesis con gel de agarosa 0.8 % para comparar los tamaños de los plásmidos amplificados *pVitro1-Neo-LC* (7 027 pb) y *pVitro1-Neo-Cetuxi* (8 453 pb). En la **Figura 23** se muestran los resultados observados.

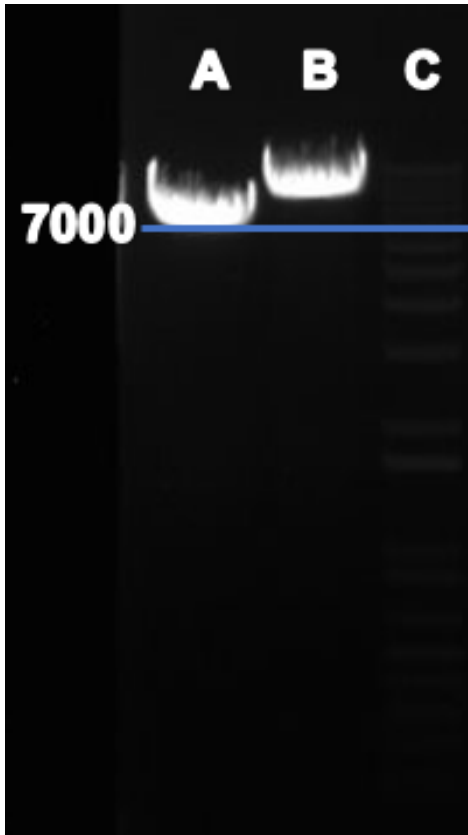


Figura 23. Electroforesis de plásmidos amplificados *pVitro1-Neo-LC* y *pVitro1-Neo-Cetuxi*.

El carril (A) muestra la banda correspondiente al plásmido *pVitro1-Neo-LC* linealizado (**7 027 pb**) y el carril (B) muestra el plásmido *pVitro1-Neo-Cetuxi* linealizado (**8 453 pb**) y el carril (C) muestra el marcador 1 kb plus.

Se puede observar en la banda A al plásmido con el gen *LC* es de tamaño menor que la banda del carril B que tiene al plásmido con ambos genes *HC* y *LC* simultáneamente.

Transfección de cultivos celulares

Prueba de viabilidad de transfección de células VERO con Expifectamine™

CHO

Para probar que el sistema celular VERO pudiera ser transfectado con el lípido catiónico Expifectamine™ CHO se realizó un ensayo utilizando el vector de expresión Monster Green® Fluorescent Protein pHMGFP (Promega) y el lípido catiónico Lipofectamina 2000® (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent; Invitrogen™, cat. 11668030) como control positivo de transfección.

Siguiendo las recomendaciones del proveedor, en este ensayo se determinó qué concentración de Expifectamine™ CHO daría el mejor rendimiento de transfección. Las concentraciones utilizadas fueron (1) 1.0 µl, (2) 1.5 µl, (3) 2.0 µl, (4) 2.5 µl en 125 µl de medio OptiPRO™ SMF (Gibco™, cat. 12309019). Mientras que la concentración de Lipofectamina 2000 como control positivo fue de 1.0 µl en la misma cantidad de medio. Todas las transfecciones fueron realizadas por triplicado.

En la **Figura 24** se muestran los resultados del ensayo de control positivo de los cultivos VERO transfectados con Lipofectamina 2000 y el vector *phMGFP*; dando una fluorescencia verde indicativa de una transfección exitosa con el plásmido Monster Green®. Esto demostró que el sistema celular VERO es capaz de recibir y expresar de manera adecuada el material genético del vector plasmídico.

En la **Figura 25** se observan los resultados del ensayo de transfección utilizando 1.0 µl de Expifectamina™ CHO y el vector *phMGFP*. La fluorescencia mostrada por el cultivo demostró que el lípido catiónico a esta concentración transfectó las células VERO exitosamente. La **Figura 26** muestra el ensayo con 1.5 µl de Expifectamina, el cual mostró un resultado exitoso. De mismo modo, el ensayo con 2.0 µl de Expifectamina mostró resultados satisfactorios (**Figura 27**) y el ensayo con 2.5 µl también (**Figura 28**). Además, en la **Figura 29** se muestra un cultivo sin transfectar que se utilizó como control negativo.

Se encontró que el lípido catiónico Expifectamine™ CHO es capaz de llevar el material genético de los vectores al interior de la célula para su expresión. En general, la eficiencia fue superior a la Lipofectamina 2000, incluso en el ensayo de 1.0 µl. Por lo que se decidió escalar el volumen del cultivo para realizar ensayos de transfección con el plásmido del anticuerpo monoclonal *Cetuximab*, *pVitro1-Neo-Cetuxi*.

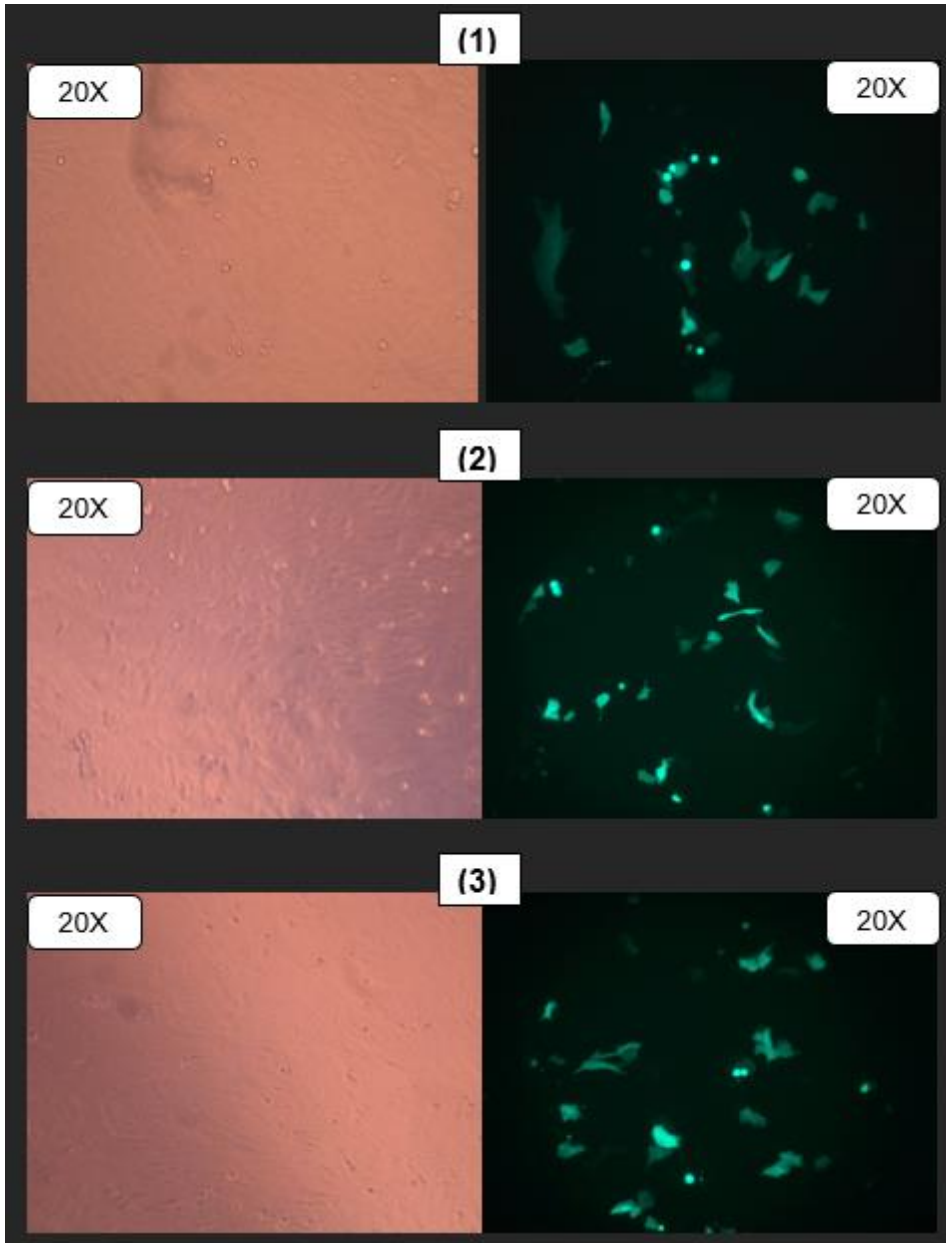


Figura 24. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con Lipofectamina 2000 y el vector *phMGFP*.

La fluorescencia observada en los cultivos muestra que la transfección del vector plasmídico fue exitosa en los ensayos realizados (1), (2) y (3).

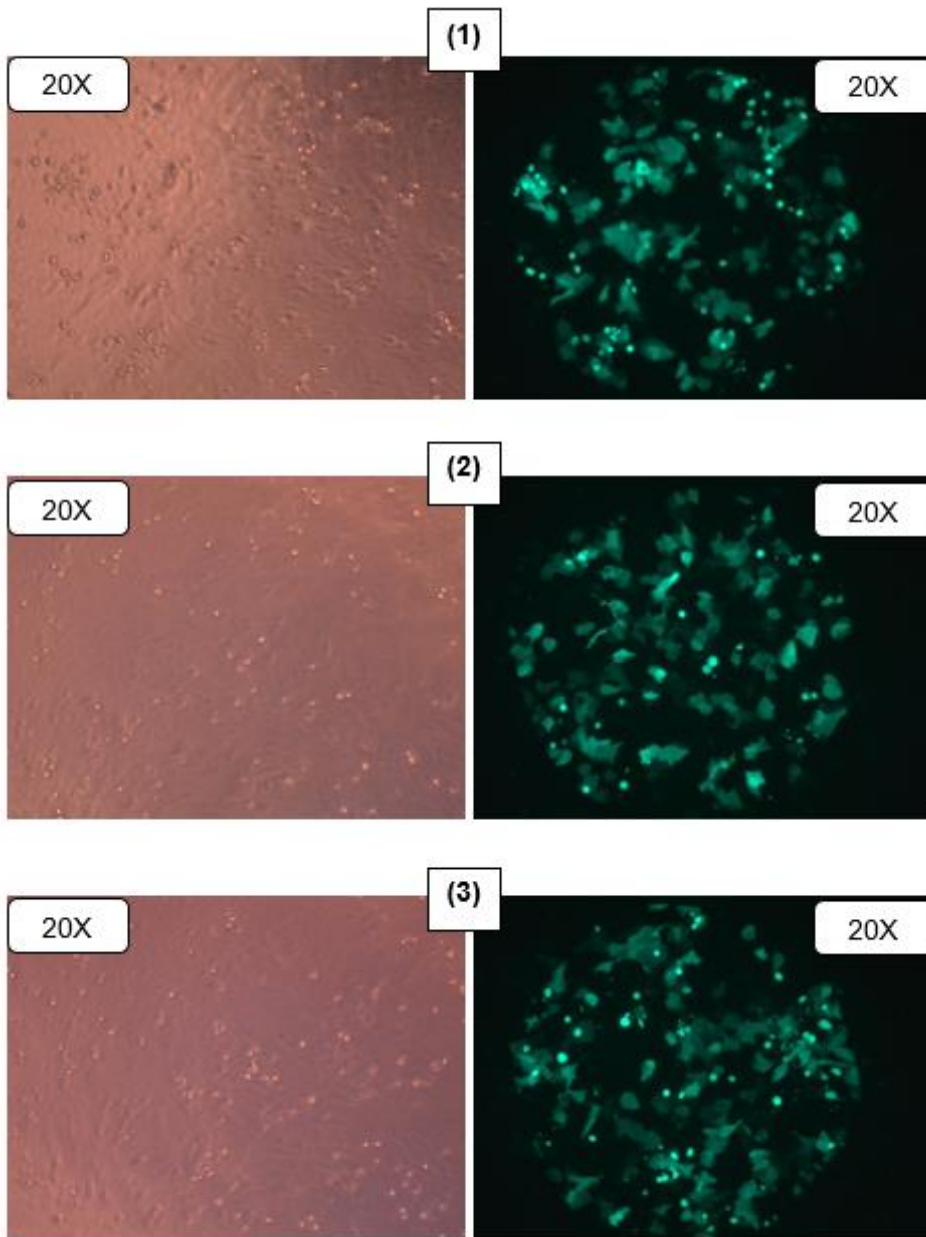


Figura 25. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con 1.0 μ l de Expifectamina™ CHO y el vector *phMGFP*.

La fluorescencia observada en los cultivos muestra que la transfección del vector plasmídico fue exitosa en los ensayos realizados (1), (2) y (3).

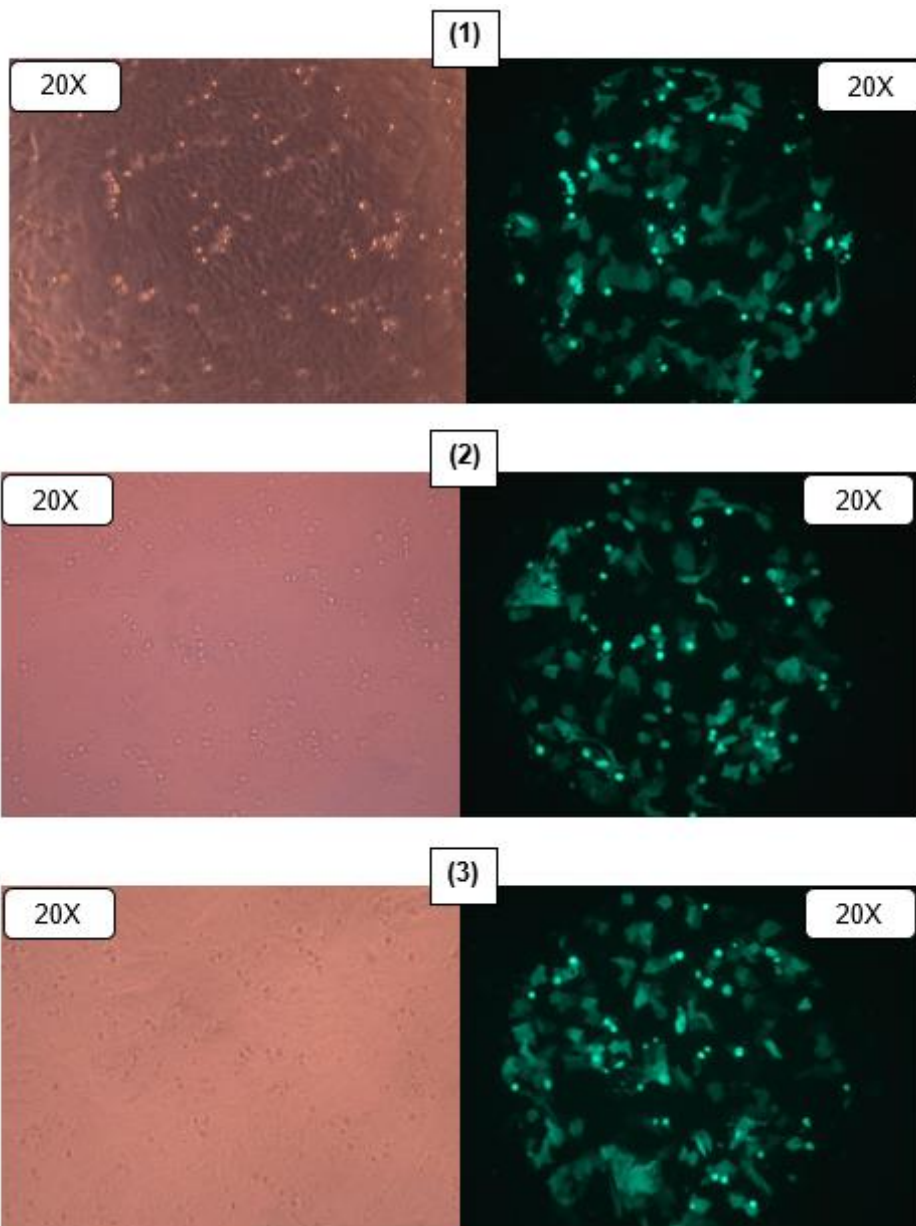


Figura 26. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con 1.5 μ l de Expifectamina™ CHO y el vector *phMGFP*.

La fluorescencia observada en los cultivos muestra que la transfección del vector plasmídico fue exitosa en los ensayos realizados (1), (2) y (3).

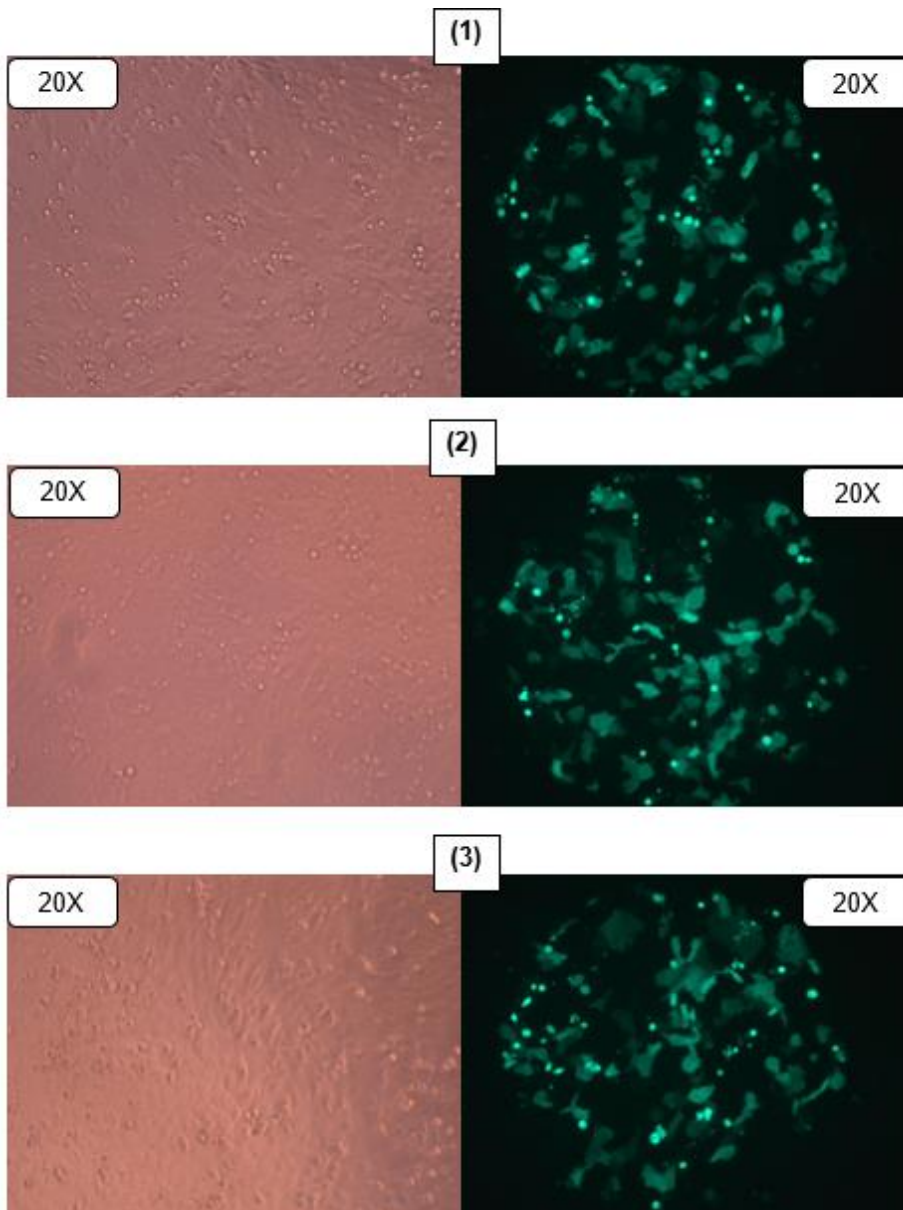


Figura 27. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con 2.0 μ l de Expifectamina™ CHO y el vector *phMGFP*.

La fluorescencia observada en los cultivos muestra que la transfección del vector plasmídico fue exitosa en los ensayos realizados (1), (2) y (3).

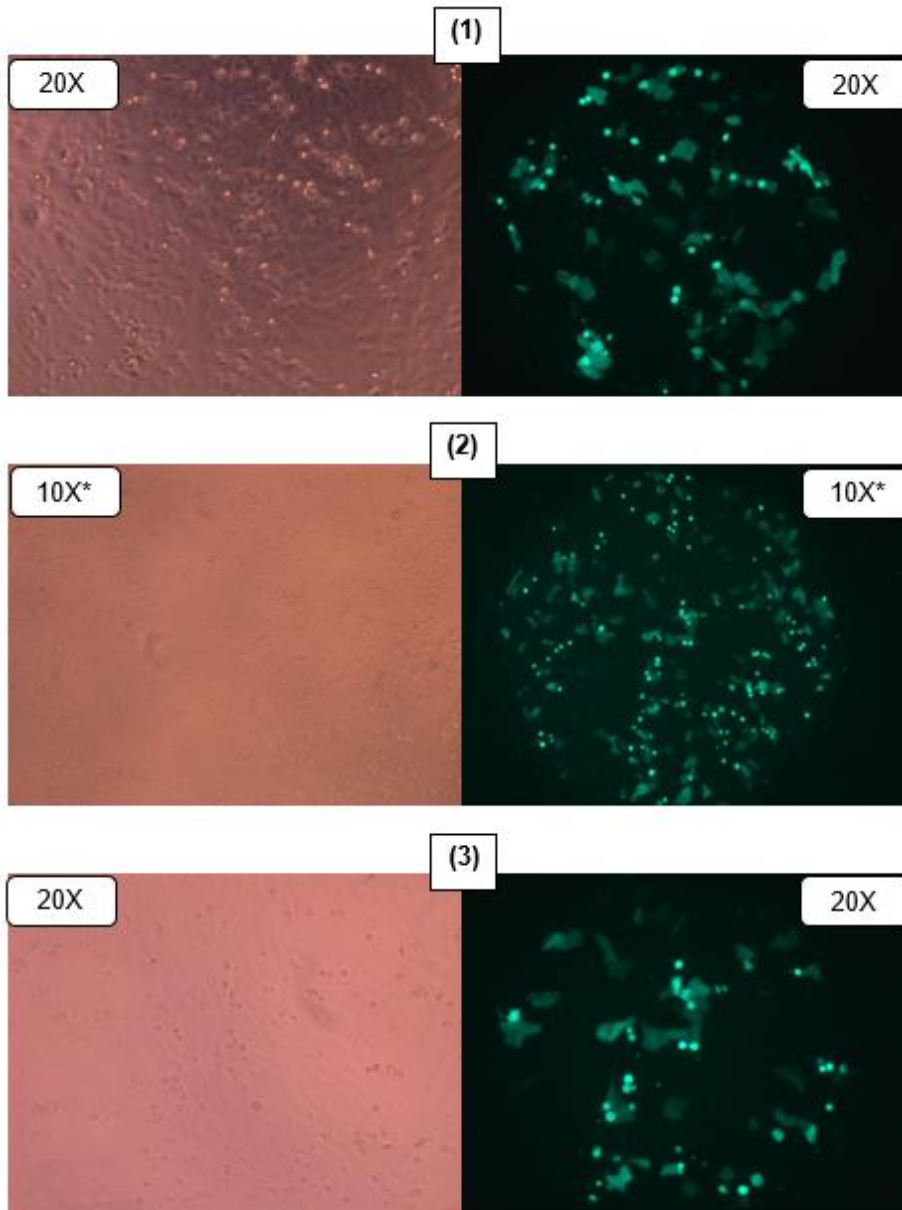


Figura 28. Ensayos de transfección por triplicado de cultivos celulares VERO con 2.5 μ l de Expifectamina™ CHO y el vector *phMGFP*.

La fluorescencia observada en los cultivos muestra que la transfección del vector plasmídico fue exitosa en los ensayos realizados (1), (2) y (3).

*NOTA: Se muestran imágenes del microscopio con aumento 10X debido a que el formato de las capturas 20X se corrompió.

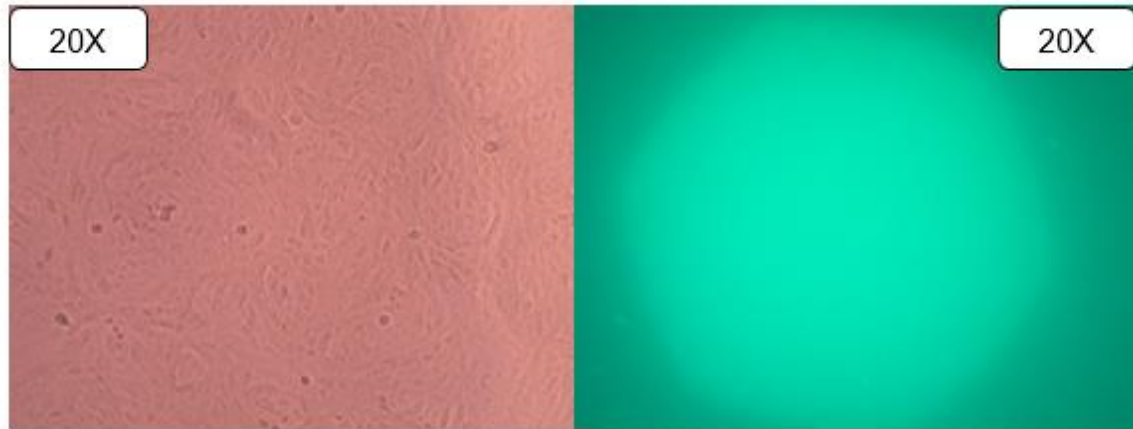


Figura 29. Cultivo VERO sin transfectar utilizado como control negativo. La ausencia de colonias fluorescentes demuestra que el cultivo no se encontraba transfectado con anterioridad con un plásmido generador de fluorescencia.

Transfección de células VERO con vector plasmídico *phMGFP* en placas de 24 pozos

Una vez confirmado que el cultivo celular VERO podía ser transfectado utilizando la Expifectamine™ CHO, se realizó un ensayo de transfección en un volumen más grande utilizando una placa de 24 pozos. Se utilizó el vector *phMGFP* como control positivo de la transfección en un formato de placa de 24 pozos.

En la **Figura 30** se muestran los resultados de la transfección con el vector *phMGFP* y la fluorescencia emitida por el cultivo celular. Estos ensayos se hicieron por duplicado.

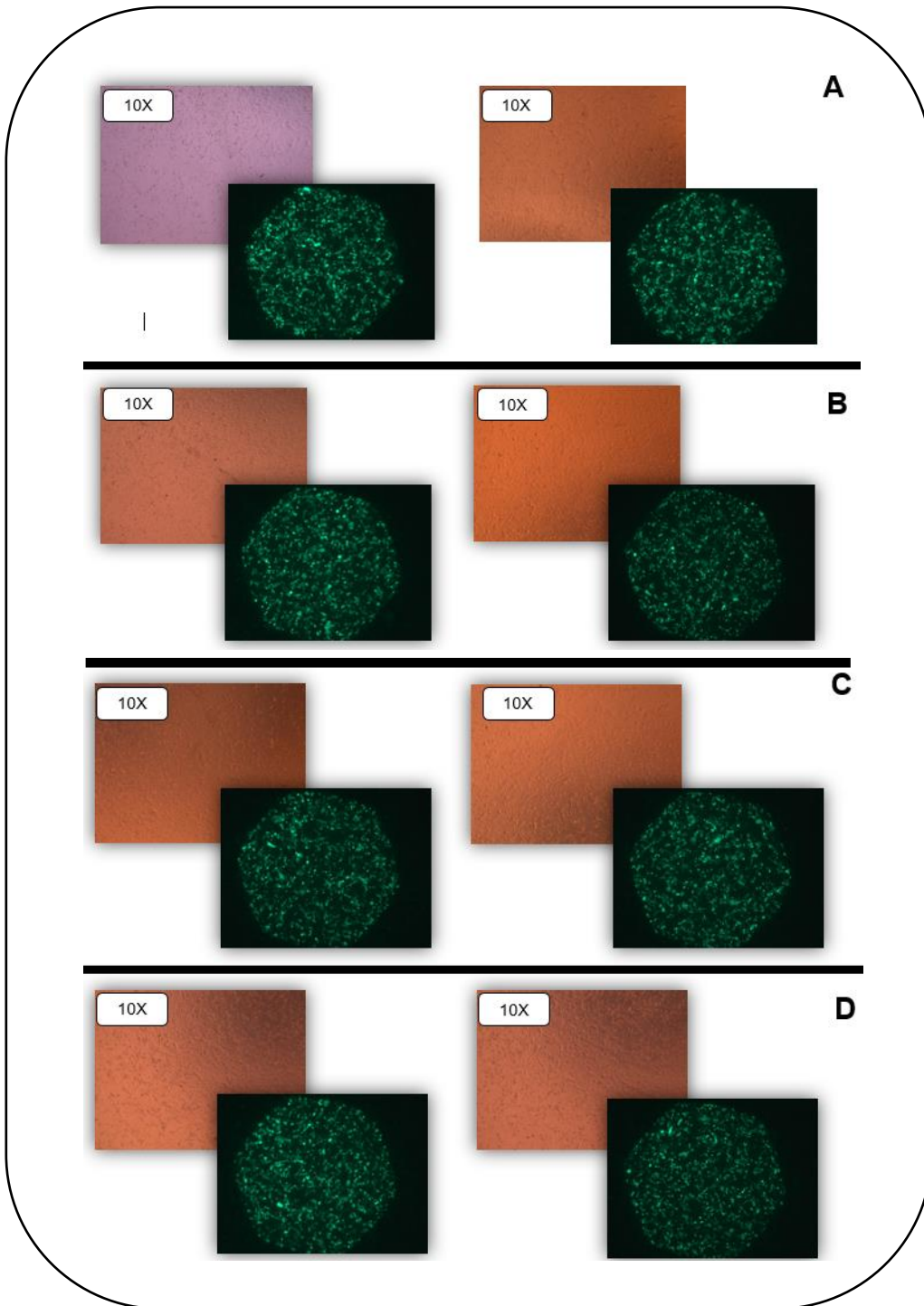


Figura 30. Ensayos por duplicado de transfección para control positivo con vector *phMGFP* en células VERO cultivadas en placas de 24 pozos. Diferentes volúmenes de Expifectame™ CHO correspondientes a (A) 2.0 µl, (B) 3.0 µl, (C) 4.0 µl y (D) 5.0 µl.

Transfección con vector *pVITro1-Neo-Cetuxi* en placas de 24 pozos

SDS-PAGE de VERO + *pVITro1-Neo-Cetuxi*

Dado que todas las transfecciones con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO mostraron ser efectivos para transfección de las células VERO; para economizar recursos, se decidió hacer la electroforesis SDS-PAGE solo con uno de los ensayos de transfección en las placas de 24 pozos y no con los duplicados.

Debido a que la cantidad de proteína en las muestras fue muy elevada; el análisis con SDS-PAGE no permitió observar claramente bandas que correspondieran a las cadenas ligeras o pesadas del anticuerpo monoclonal *Cetuximab*. En la **Figura 31** se muestran los resultados observados en el gel de poliacrilamida 12 %.

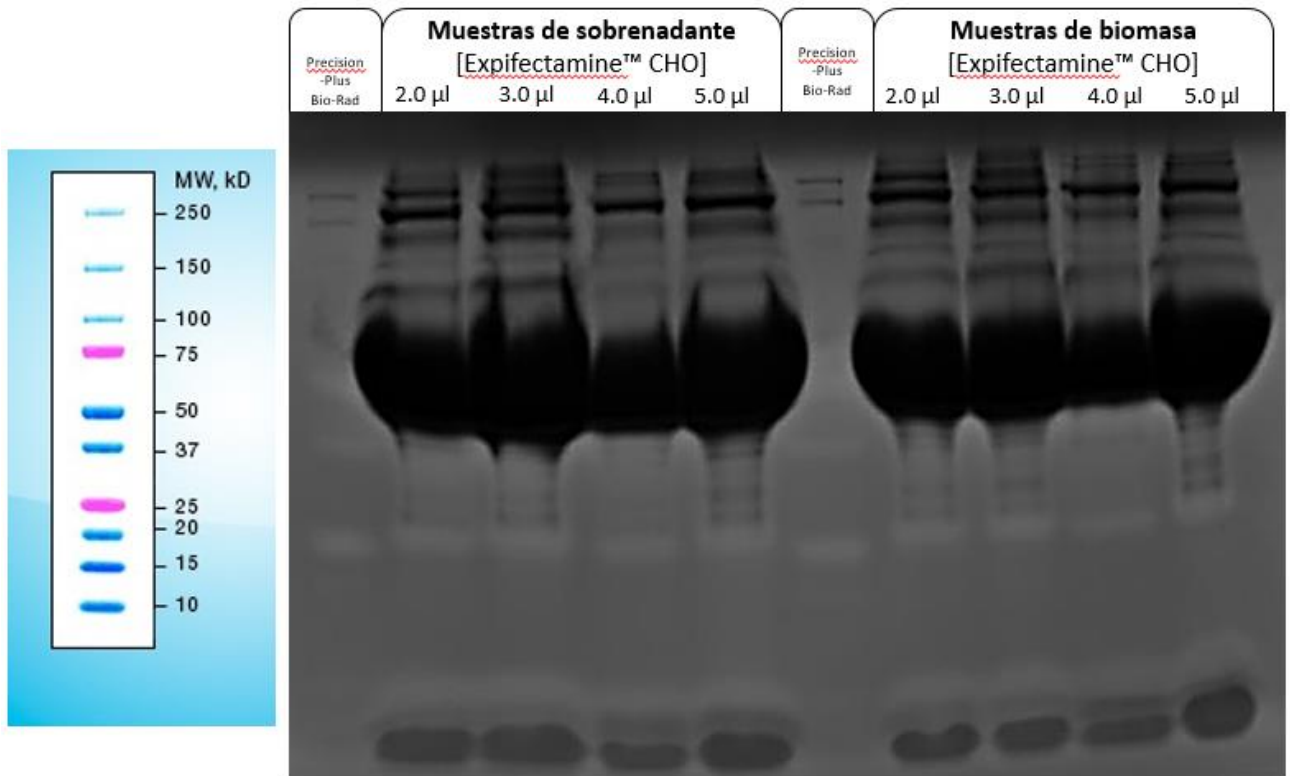


Figura 31. SDS-PAGE de muestras de transfección de células VERO con *pVITro1-Neo-Cetuxi* con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO en placas de 24 pozos.

Western Blot de VERO + *pViro1-Neo-Cetuxi*

Se llevó a cabo el procedimiento de Western Blot para las muestras de la transfección del cultivo VERO en las placas de 24 pozos (Figura 32), con la expectativa de tener suficiente cantidad de fragmentos proteicos para que el anticuerpo IgG Anti-Humano (Goat Anti-Human (H+L)-HRP conjugate, Bio-Rad #1721050) pudiera mostrar una señal positiva.

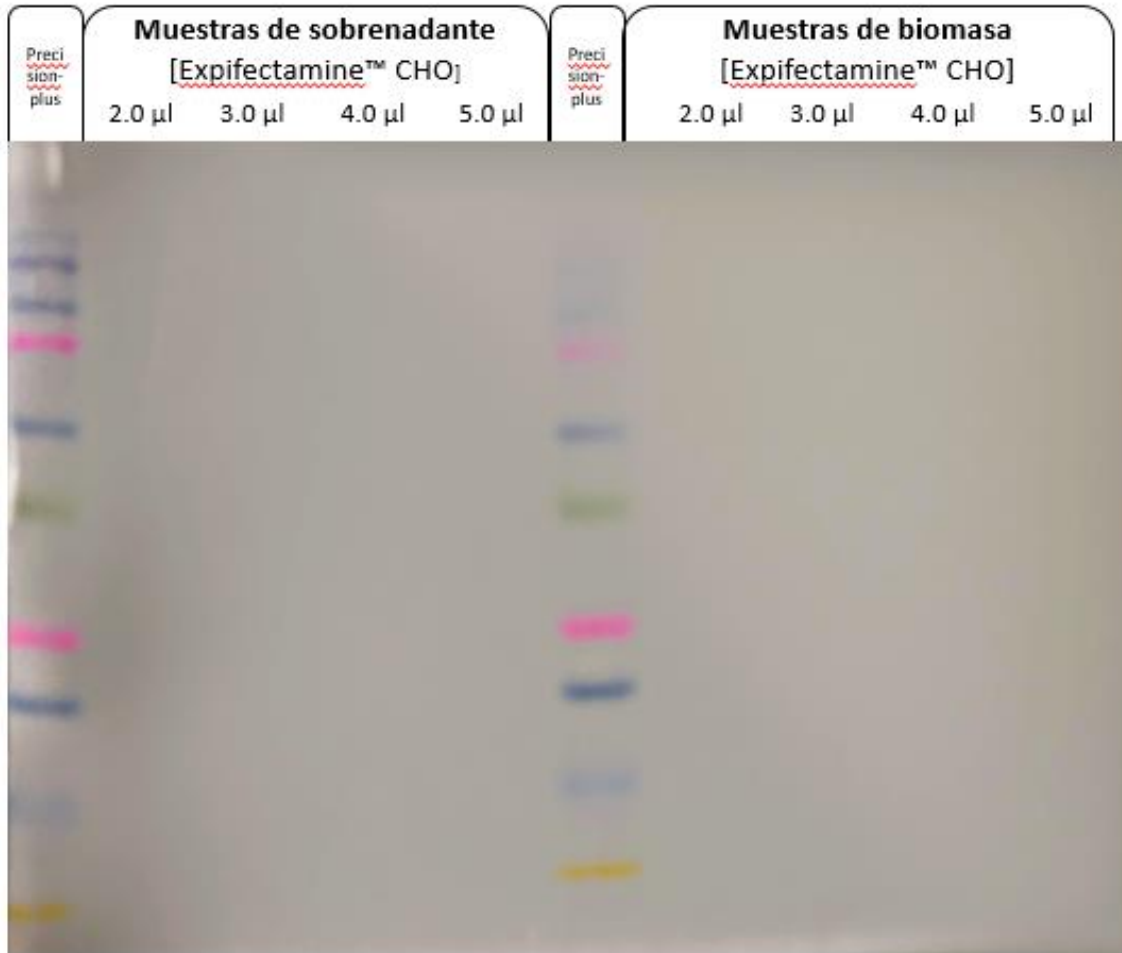


Figura 32. Western Blot de muestras de transfección de células VERO con *pViro1-Neo-Cetuxi* con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO en placas de 24 pozos. Revelados con anticuerpo secundario IgG Anti-Humano (Goat Anti-Human (H+L)-HRP conjugate, Bio-Rad #1721050).

Transfección de VERO con vector AB^+ en placas de 24 pozos

Debido al resultado negativo en la prueba de Western Blot, se decidió utilizar el vector AB^+ para llevar a cabo otra transfección y determinar si el sistema VERO podía sintetizar un anticuerpo monoclonal. Se utilizó el plásmido *phMGFP* como control positivo de transfección; para economizar reactivos, solo se hizo una reacción utilizando 2.0 μ l de Expifectamine™ CHO y no por duplicado. En la **Figura 33** se muestra el resultado de este ensayo. Se detectó fluorescencia en el cultivo a las 72 horas por lo que se considera que la transfección con el lípido catiónico fue exitosa.

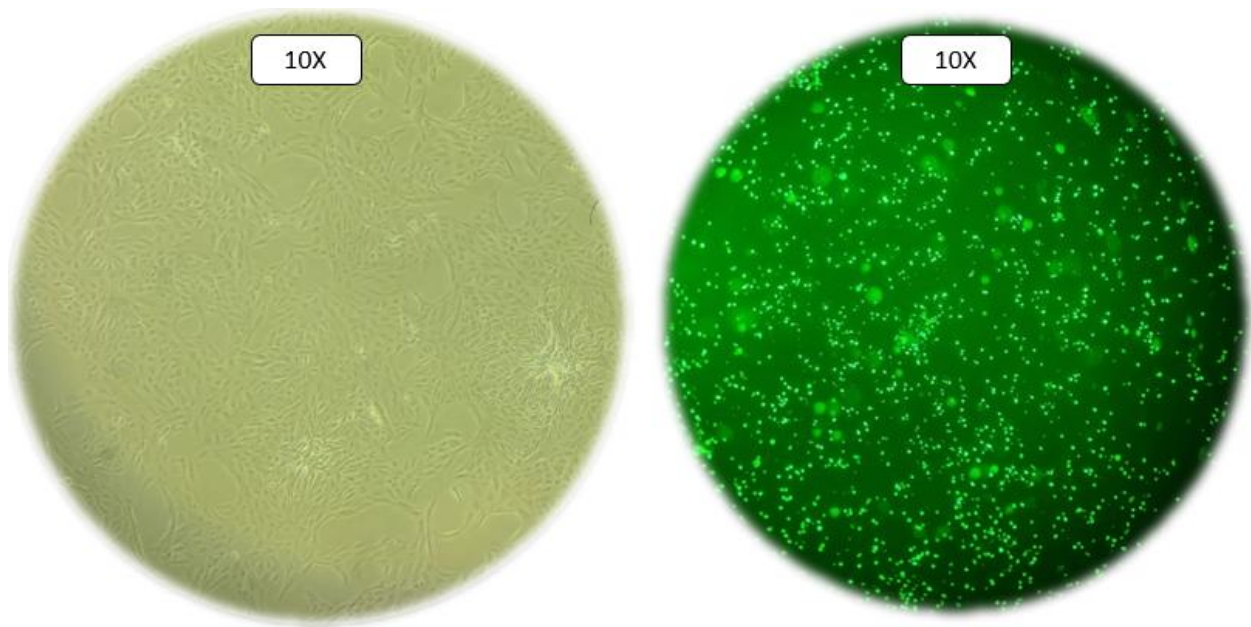


Figura 33. Ensayo para control positivo de transfección con vector *phMGFP* en células VERO cultivadas en placas de 24 pozos. Volumen de Expifectame™ CHO correspondiente a 2.0 μ l.

SDS-PAGE de VERO + vector AB^+

Para llevar a cabo los análisis PAGE-SDS y Western Blot se utilizó un anticuerpo policlonal IgG de conejo (Mouse anti-Dengue virus antibody, Bio-Rad # MCA2277) que fungió como control positivo de los procedimientos. Además, para evitar aglomeración de proteínas en el gel de poliacrilamida 12 %, las muestras tomadas del sobrenadante se diluyeron 1:20 y 1:40 esperando contar con cantidad suficiente de anticuerpo

monoclonal para tener una señal positiva en la prueba de Western Blot. Con el fin de economizar reactivos; solo se llevó a cabo la transfección con las concentraciones de 2.0 μl y 3.0 μl de Expifectamine™ CHO y solo un ensayo en vez por duplicado. En la **Figura 34** se observan los resultados obtenidos.

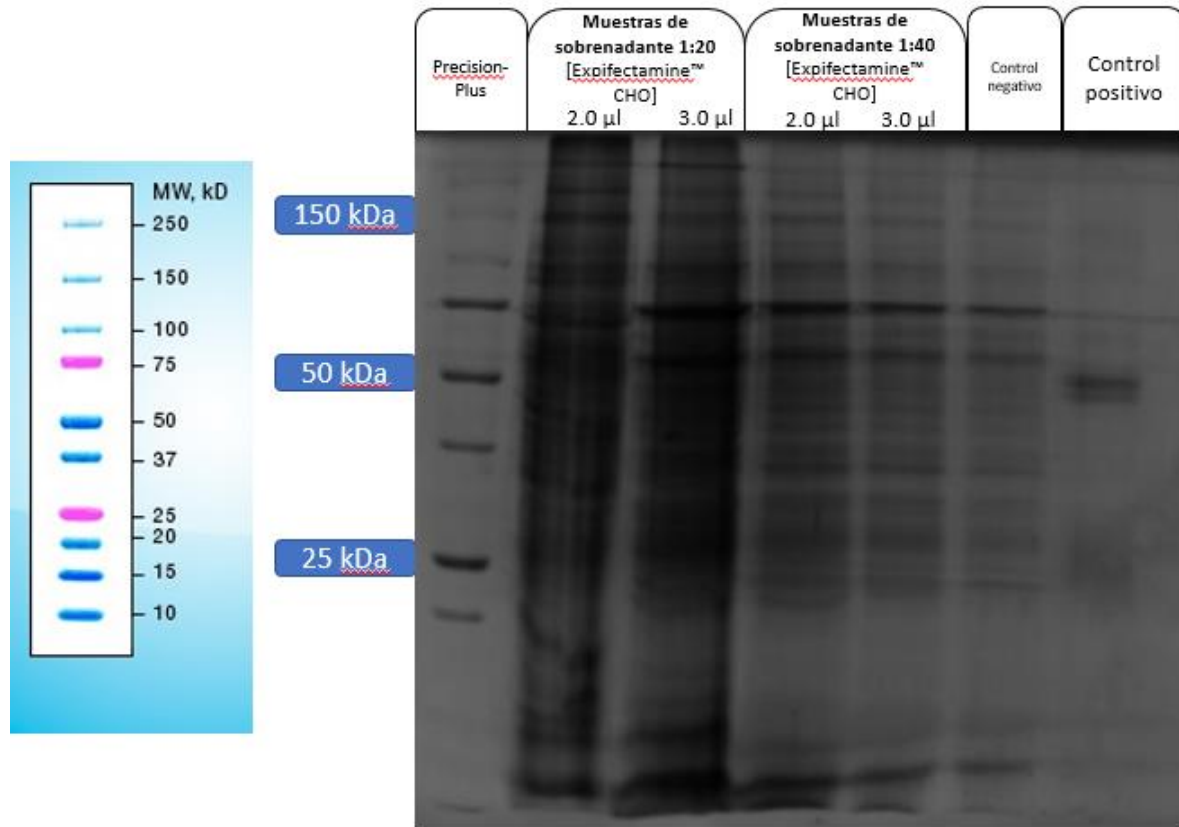


Figura 34. SDS-PAGE de muestras de transfección de células VERO con vector AB^+ con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO en placas de 24 pozos. El penúltimo carril (izquierda a derecha) corresponde a una muestra de un pozo sin transfectar y representa al control negativo. El último carril (izquierda a derecha) representa las bandas de una muestra de anticuerpo policlonal IgG de conejo (Mouse anti-Dengue virus antibody, Bio-Rad # MCA2277) que serviría como control positivo para la prueba de Western Blot.

Western Blot de VERO + vector AB^+

Se llevó a cabo el procedimiento de Western Blot para detectar si existían los fragmentos proteicos de las cadenas ligeras o pesadas del anticuerpo monoclonal del vector AB^+ . No se tuvo ninguna señal de color por parte del anticuerpo IgG Anti-Conejo (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad #1706516) en las muestras de

los ensayos de transfección con el vector AB^+ . Sin embargo, sí hubo señal de color en el control positivo de Western Blot, por lo que se considera que el sistema celular VERO no expresó el anticuerpo monoclonal. En la **Figura 35** se muestran los resultados observados.

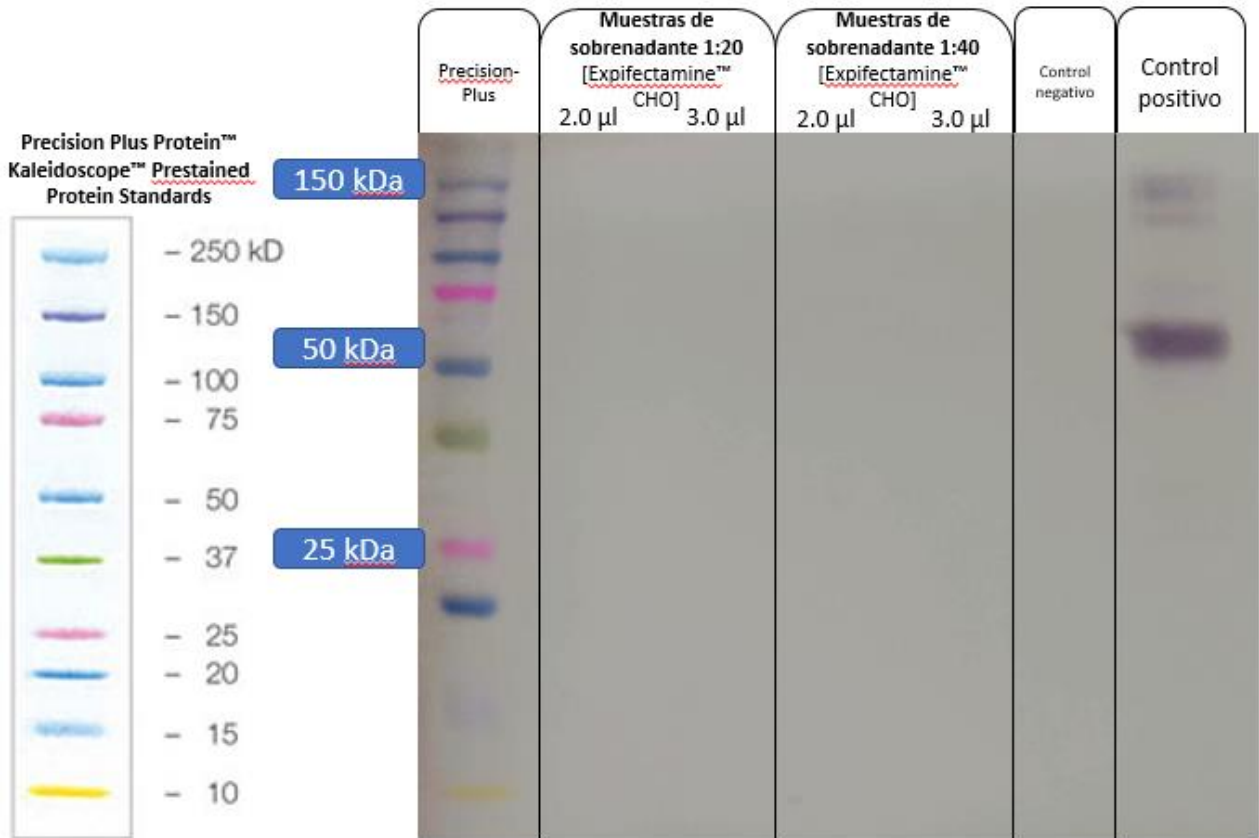


Figura 35. Western Blot de muestras de transfección de células VERO con vector AB^+ con diferentes concentraciones de Expifectamine™ CHO en placas de 24 pozos. Revelados con anticuerpo secundario IgG Anti-Conejo (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad #1706516)

Transfección de células VERO en placas de 6 pozos

Tras los resultados negativos obtenidos en la fase anterior de los ensayos de transfección, se propuso realizar un escalamiento más al formato de cultivo celular debido a que probablemente la cantidad de proteína recombinante en los otros formatos era muy poca como para ser detectada por el método de Western Blot.

Se decidió realizar ensayos de transfección en una placa de 6 pozos y análisis con Western Blot para tratar de maximizar la cantidad de proteína recombinante producida por los cultivos celulares.

Se realizó una transfección con los vectores *phMGFP*; como control positivo de transfección, *AB⁺*; como control positivo de expresión de anticuerpo y *pVITro1-Neo-Cetuxi*. Estos ensayos se realizaron utilizando 6.0 µl y 9.0 µl de Expifectamine™ CHO y se observó a las 72 horas. El cultivo mostró fluorescencia por lo que se considera que la transfección fue exitosa; en la **Figura 36** se muestra este resultado observado.

El resto de las transfecciones fue sometido a un Western Blot con anticuerpos secundarios IgG Anti-Humano (Goat Anti-Human (H+L)-HRP conjugate, Bio-Rad #1721050) e IgG Anti-Conejo (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad #1706516)) para tratar de detectar alguna banda de las fracciones proteicas de las cadenas ligeras o pesadas de los anticuerpos *AB⁺* y/o *pVITro1-Neo-Cetuxi*.

En la **Figura 37** se muestran un par de bandas tenues al nivel de los 50 kDa; reveladas en los carriles correspondientes a las muestras de sobrenadante de los cultivos transfectados con el vector *AB⁺*. Estas indican la presencia de fragmentos proteicos con regiones constantes de IgG de conejo. Sin embargo, no se encontraron bandas que indicaran la presencia del anticuerpo monoclonal *Cetuximab*.

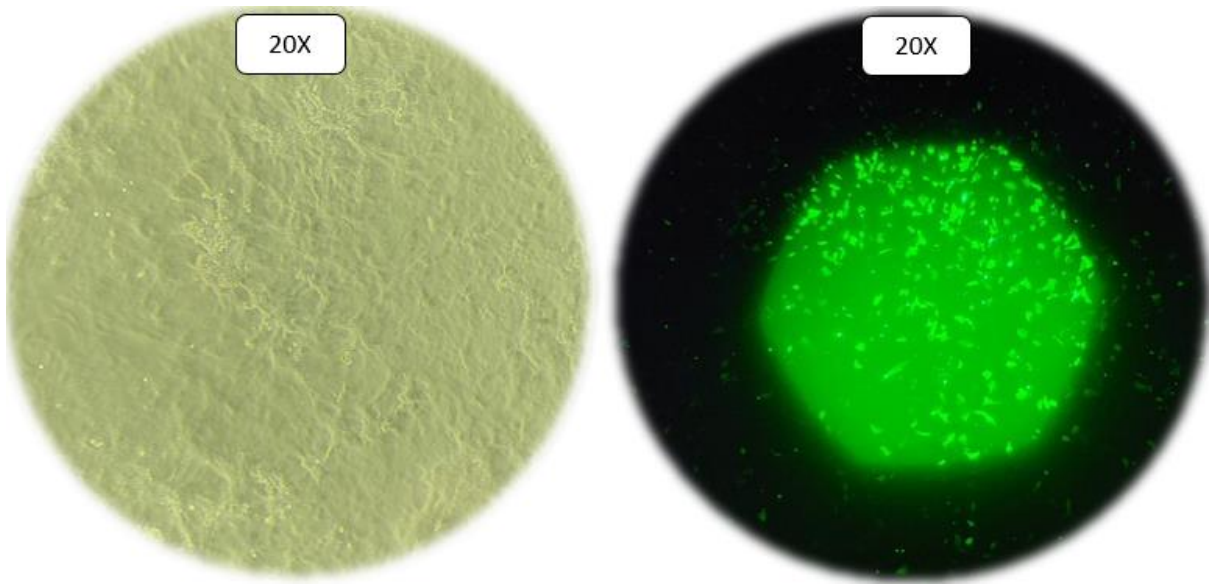


Figura 36. Ensayo para control positivo de transfección con vector *phMGFP* en células VERO cultivadas en placa de 6 pozos. Volumen de Expifectame™ CHO correspondiente a 9.0 μ l.

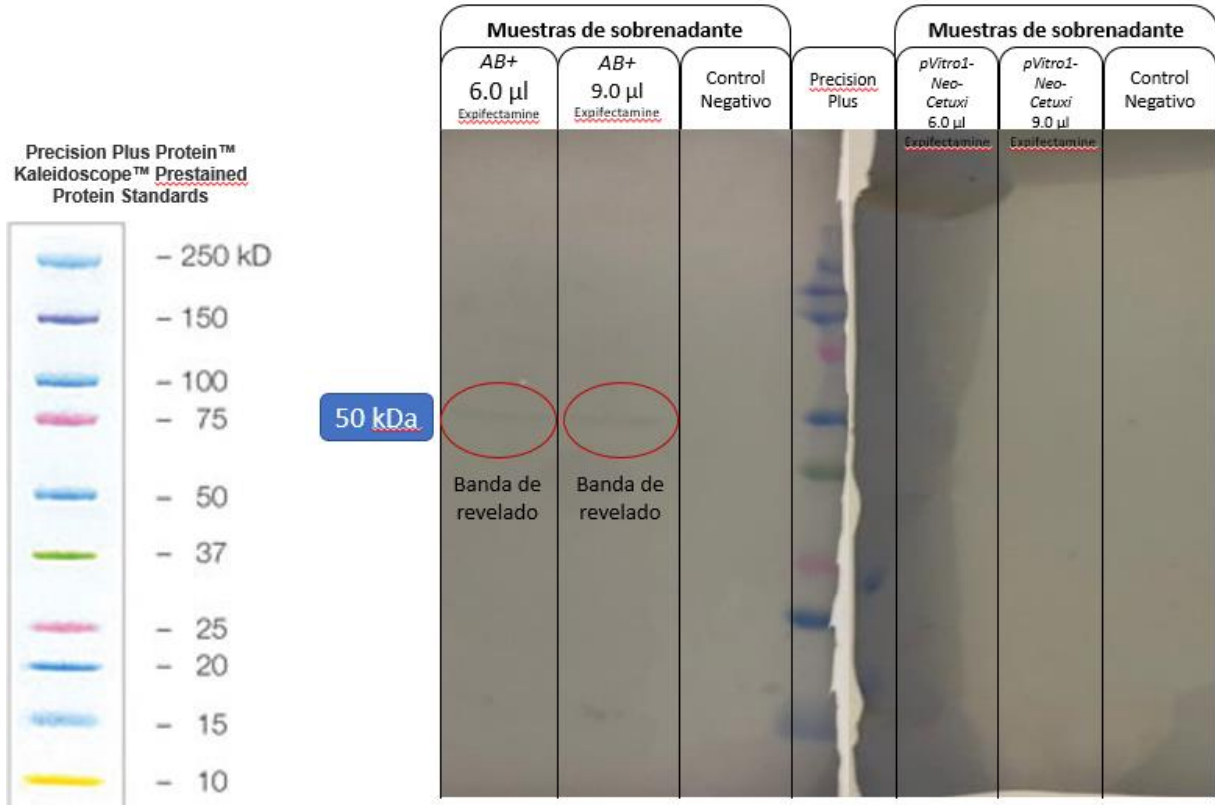


Figura 37. Western Blot de muestras de transfección de células VERO con vectores *AB+* y *pViro1-Neo-Cetuxi* en placa de 6 pozos. Para cada vector fue transfectado con 6.0 µl y 9.0 µl de Expifectamine™ CHO, respectivamente. El revelado se hizo con anticuerpos secundarios IgG Anti-Humano (Goat Anti-Human (H+L)-HRP conjugate, Bio-Rad #1721050) e IgG Anti-Conejo (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad)

Se encontraron bandas tenues al nivel de 50 kDa para las transfecciones hechas con el vector *AB+*

De igual manera, se hizo el procedimiento de Western Blot para las muestras extraídas de la biomasa de los cultivos transfectados. En la **Figura 38** se muestran los resultados obtenidos. No se encontró ninguna banda que indicara la presencia de fragmentos proteicos de anticuerpos recombinantes.

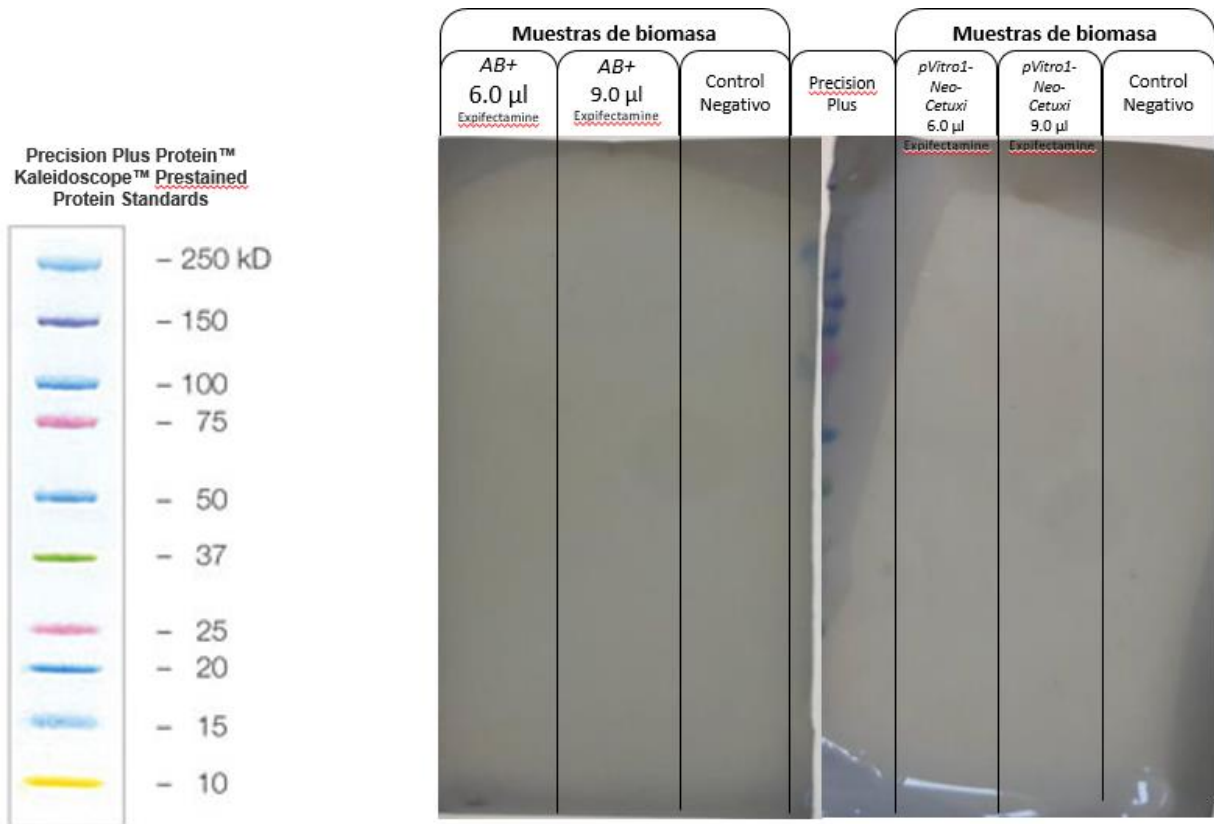


Figura 38. Western Blot de muestras de biomasa de los cultivos de transfección de células VERO con vectores *AB+* y *pViro1-Neo-Cetuxi* en placa de 6 pozos. Para cada vector fue transfectado con 6.0 µl y 9.0 µl de Expifectamine™ CHO, respectivamente. El revelado se hizo con anticuerpos secundarios IgG Anti-Humano (Goat Anti-Human (H+L)-HRP conjugate, Bio-Rad #1721050) e IgG Anti-Conejo (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad #1706516) No se encontraron que indicaran la presencia de fragmentos proteicos de anticuerpos recombinantes.

DISCUSIÓN

La producción de anticuerpos monoclonales y otras proteínas recombinantes es una de las áreas más importantes para la industria farmacéutica. Por lo tanto, es de gran interés el desarrollo de metodologías utilizando factores conocidos y estudiados que permitan optimizar estos procesos.

La línea celular VERO tiene aproximadamente tres décadas de ser considerada una línea aprobada y segura para la fabricación de vacunas y proteínas recombinantes (Barret y cols., 2009); al igual que la metodología de transfección con lípidos catiónicos en células de mamífero (Felgner & Ringold, 1989).

En este estudio se logró llevar a cabo la transfección del sistema celular de mamífero VERO utilizando los lípidos catiónicos Lipofectamina 2000® (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent; Invitrogen™, cat. 11668030) y Expifectamine™ CHO (Gibco™, cat. A29133). Se detectó satisfactoriamente la presencia de proteína fluorescente expresada con el vector pHMGFP Monster Green® Fluorescent Protein (Promega).

Es importante señalar que se observó una intensidad de fluorescencia mayor en los cultivos transfectados con Expifectamina™ CHO comparado contra el cultivo transfectado con Lipofectamina™ 2000; a las 72 horas. Esto sugiere que el primer lípido catiónico posee mejores propiedades como menos citotoxicidad para el cultivo, una mayor tasa de expresión de proteína recombinante y un mayor tiempo de retención de expresión que su contraparte.

Debido a que se trata de una formulación comercial propietaria, no se conoce realmente el método en que la Expifectamina™ CHO interacciona con el ADN plasmídico para formar los lipoplex que entran en las células. Pero de acuerdo a su fabricante (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.A.) éste está diseñado para tener una eficiencia de transfección mayor al 90 % (Figura 39) utilizando menos de la mitad de cantidad de pDNA; y hasta 30 veces más rendimiento de expresión proteica en cultivos en suspensión, que otros agentes lipídicos (Figura 40). Aquí demostramos que este agente es eficaz para realizar ensayos de transfección en cultivos adherentes también, manteniendo sus ventajas y propiedades. Estos mismos

resultados se observaron a través de las tres diferentes escalas en que se realizaron las transfecciones del cultivo celular VERO; 96, 24 y 6 pozos.

Sin embargo, una vez que realizamos el escalamiento al formato de 24 pozos para realizar el ensayo de transfección del plásmido pVtro1-Neo-MCS no pudimos observar evidencia de que la proteína Cetuximab estuviera presente en el medio de cultivo sobrenadante o en la biomasa celular. Esto pudo deberse a que la cantidad de mAb recombinante fue muy baja para ser detectada; sin mencionar la interferencia obtenida por las proteínas del medio de cultivo y el suero fetal bovino.

Aunque intentamos mantener la interferencia de proteínas exógenas del cultivo al mínimo realizando diluciones, no pudimos encontrar señal colorimétrica de la proteína de interés en los ensayos de Western Blot para las transfecciones con el vector de control positivo de expresión de anticuerpo, a pesar de que sí confirmamos que nuestra metodología era la adecuada utilizando un anticuerpo IgG de conejo como control positivo el cual sí dio señal colorimétrica.

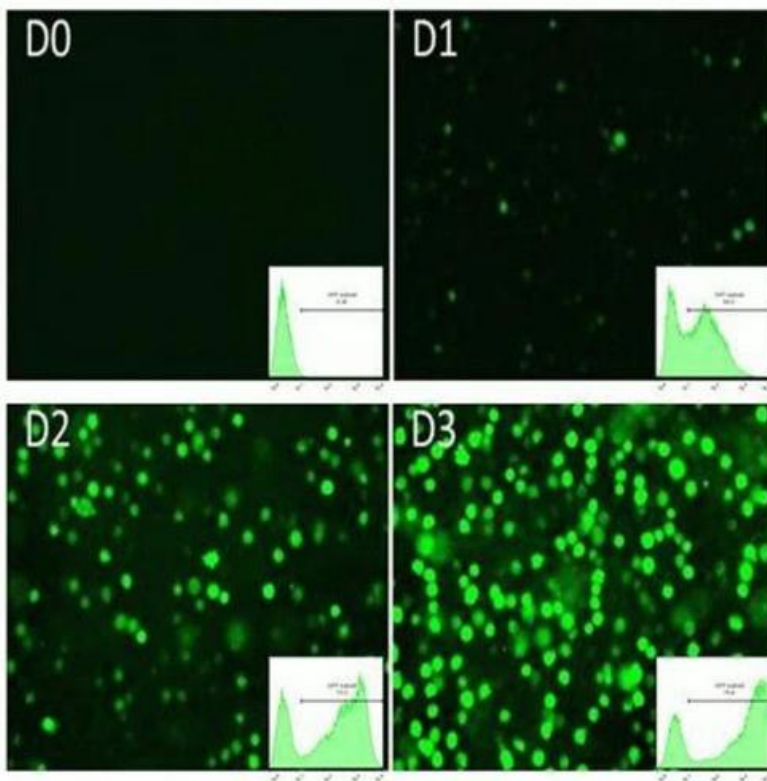


Figura 39. Visualización de la expresión de una proteína fluorescente recombinante en un sistema de cultivo en suspensión CHO; transfectedo con Expifectamina™ CHO, a través de 72 horas.

D0 a D3 representan los días cero de transfección hasta el tercer día posttransfección.

Se logró hasta un 90 % de eficiencia.

Figura tomada de ThermoFisher Scientific®.

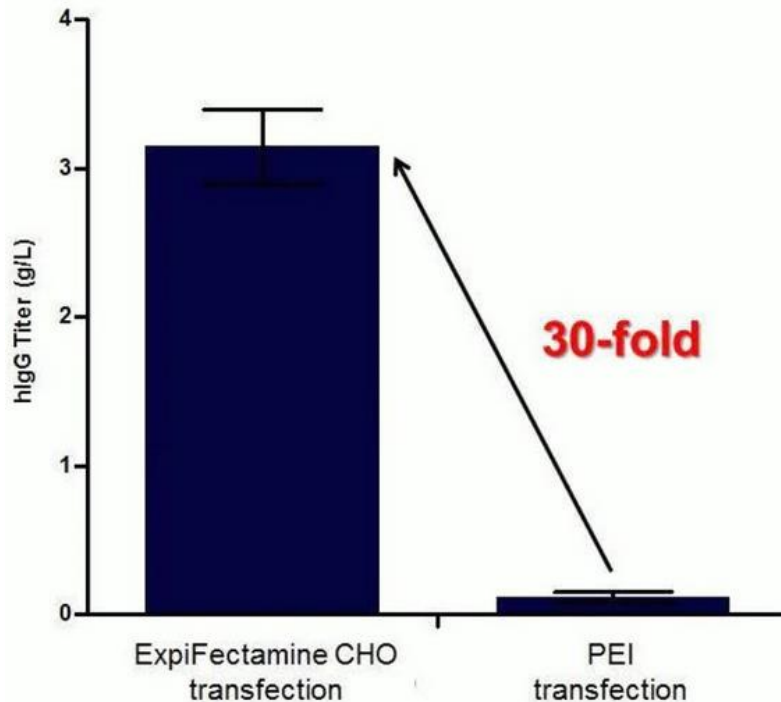


Figura 40. Rendimientos de producción de proteína recombinante (hlgG) obtenidos mediante transfección con ExpiFectamina™ CHO y PEI.

El agente ExpiFectamina™ CHO logra tener hasta 30 veces más rendimiento (g/L) que otros agentes transfectantes lipídicos.

Figura tomada de ThermoFisher Scientific®.

Intentamos escalar el formato a placas de 6 pozos para tratar de incrementar la cantidad de proteína recombinante que pudiéramos obtener y detectarla en los ensayos de Western Blot. Esta vez, logramos obtener una señal leve para las transfecciones con el plásmido de *control positivo de expresión de anticuerpo* lo que indica que fue exitosa, aunque la cantidad de proteína era aún baja. El hecho de solo encontrar la banda correspondiente a los 50 kDa indica que la transfección del cultivo fue más exitosa para el plásmido que contenía la cadena pesada del anticuerpo control. Cabe mencionar que, según el fabricante, el vector del AB+ (Antibody-Expressing Positive Control Vector [AB⁺]; Gibco™) es en realidad una mezcla de dos plásmidos que contienen cada uno un gen correspondiente a la cadena ligera o cadena pesada (Fuente: ThermoFisher), por lo que se puede dar el caso que un cultivo no sea transfectado con ambos a la vez o que la concentración de uno sea mayor que el otro.

No pudimos encontrar señal colorimétrica para el anticuerpo Cetuximab en el ensayo de placas de 6 pozos. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el formato siga siendo insuficiente para la detección de un anticuerpo monoclonal completo. Según la bibliografía, la optimización de ensayos de transfección para proteínas recombinantes en VERO se ha hecho hasta en formatos con matraces de 75 cm² (Hashemi y cols.,

2012). Por lo que un siguiente paso podría ser probar ensayos de transfección en volúmenes mayores a los realizados en este trabajo.

Otro punto a considerar es que las construcciones plasmídicas *pVitro1-Neo-MCS-Cetuxi* poseen genes con características optimizadas para ser expresados en la línea celular *Cricetulus griseus* (CHO); tanto su contenido GC como los codones con los que están fabricados, tienen una actividad promedio de 90 % en dicha línea celular. Por lo tanto, es posible considerar que el sistema VERO pueda necesitar tiempos de incubación mayor y métodos continuos de alimentación de medio para poder expresar una cantidad de anticuerpo monoclonal recombinante suficiente para ser detectada en ensayos inmunoblot.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo pudimos demostrar que los procesos de transfección con el lípido catiónico Expifectamine™ CHO optimizados para las líneas celulares CHO en suspensión, son efectivos para otros sistemas de células de mamífero como VERO adherentes. Incluso con mayores rendimientos que los reportados por agentes más estudiados como Lipofectamina™ 2000.

Concluimos también que el sistema celular VERO es capaz de recibir y expresar plásmidos que contienen genes de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos monoclonales, por lo que pudieran ser una opción más para ensayos de investigación; junto con otras líneas como CHO y HEK-293; ya que se considera como una línea validada y segura para expresión constante de proteínas recombinantes.

PERSPECTIVAS

El sistema celular VERO puede ser utilizado para la expresión de mAbs y otras proteínas recombinantes. Sin embargo, un factor muy importante que hemos visto aquí es el volumen del ensayo de transfección. Con base en este trabajo, se pueden planear nuevas investigaciones con el objetivo de optimizar este proceso; dado que podríamos considerar que el volumen de cultivo y el tiempo de incubación son variables más fáciles de controlar a comparación de otras que afectan mucho más los rendimientos de estos ensayos, como el pH del cultivo, las cantidades o proporciones de pDNA o agente lipídico y los tiempos de incubación.

El lípido catiónico Expifectamina™ podría considerarse como un agente de transfección que pudiera ser utilizado para otros tipos de cultivos que no sean necesariamente CHO o HEK-293 en suspensión. Sistemas celulares adherentes de otras líneas de mamífero más accesibles también podrían ser viables para desarrollar metodologías de producción de anticuerpos monoclonales y otras proteínas recombinantes.

REFERENCIAS

- Abbot, Cross, & Jenkins. (2020). Finding the Keys to the CAR: Identifying Novel Target Antigens for T Cell Redirection Immunotherapies. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:21. 515. 10.3390/ijms21020515.
- Abbott, W. M., Middleton, B., Kartberg, F., Claesson, J., Roth, R., & Fisher, D. (2015). Optimisation of a simple method to transiently transfect a CHO cell line in high-throughput and at large scale. *Protein Expression and Purification*, 116, 113-119. doi:doi:10.1016/j.pep.2015.08.016
- Andersen, D. C., & Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol*, 13(2): 117–123.
- Andrews, C. D., Luo, Y., Sun, M., Yu, J., Goff, A., Glass, P. J., . . . Ho, D. D. (2017). In Vivo Production of Monoclonal Antibodies by Gene Transfer via Electroporation Protects against Lethal Influenza and Ebola Infections. *American Society of Gen and Cell Therapy*.
- Barret, P. N., Mundt, W., Kistner, O., & Howard, M. (2009). Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(5): 607-618. doi:doi:10.1586/erv.09.19
- Bazan, J., Calkosinski, I., & Gamian, A. (2012). Phage display—A powerful technique for immunotherapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(12):1817-1828. doi:https://doi.org/10.4161/hv.21703
- Bolivar, F., Rodriguez, R., Betlach, M., & Boyer, H. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. *Gene*, 2(2), 75-93. doi:doi:10.1016/0378-1119(77)90074-9
- Bradbury, A. R., Trinklein, N. D., Thie, H., Wilkinson, I. C., Tandon, A. T., & Anderson, S. (2018). When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *mAbs*, 10(4), 539-546. doi:doi:10.1080/19420862.2018.1445456

- Bradbury, A., Sidhu, S., & Dubel, S. (2011). Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. *Nat Biotechnol*, (29), 245-254.
- Brinkmann, U., & Kontermann, R. E. (2017). The making of bispecific antibodies. *mAbs*, 9(2), 182–212. doi:<https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>
- Bruggemann, M., Osborn, M. J., Ma, B., Hayre, J., Avis, S., & Lundstrom, B. (2015). Human antibody production in transgenic animals. *Arch Immunol Ther Exp*, 63:101–8.
- Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., & Haan, L. (2012). Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(5), 615–622. doi:[doi:10.1016/j.coph.2012.08.001](https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001)
- Cardarelli, F., Digiaco, L., Marchini, C., Amici, A., Salomone, F., Fiume, G., . . . Caracciolo, G. (2016). The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci rep*, 25879. doi:<https://doi.org/10.1038/srep25879>
- Carter, P. J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews*, 6(5), 343-357. doi:[doi:10.1038/nri1837](https://doi.org/10.1038/nri1837)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Cancer Incidence Among African Americans, United States—2007–2016*. Atlanta, GA.: Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services. Obtenido de <https://www.cdc.gov/cancer/uscs/about/data-briefs/no15-cancer-incidence-African-Americans-2007-2016.htm>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125(2), 1-41.
- Chen, G., & Sidhu, S. S. (2014). Design and generation of synthetic antibody libraries for phage display. *Methos Mol Biol*, 1131:113-31. doi:[doi:10.1007/978-1-62703-992-5_8](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_8).

- Chen, G., & Sidhu, S. S. (2014). Design and Generation of Synthetic Antibody Libraries for Phage Display. En N. Motamedi, *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pág. (1131)). Totowa, N.J.: Humana Press. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_8
- Chiang, L., Liang, Q., Ali, H., Bayliss, L., Beasley, A., Bloomfield-Gerdes, T., . . . Wong, V. (2014). Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol*, 32(4):356-63. doi:doi: 10.1038/nbt.2825
- Chira, S., Jackson, C. S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M. S., Diaconu, I., . . . Berindan-Neagoe, I. (2015). Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget*, 6(31): 30675-30703. doi: doi: 10.18632/oncotarget.5169
- Chronopoulou, E., Uribe-Bninghoff, A., Corbertt, C. R., & Berry, J. D. (2014). Hybridoma technology for the generation of rodent mabs via classical fusion. En N. Motamedi, *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pág. (1131)). New York: Springer Science. doi:DOI 10.1007/978-1-62703-992-5_4
- De Marco, A. (2015). Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. *Microbial Cell Factories*, 14(1). doi:doi:10.1186/s12934-015-0320-7
- Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L., Timmins, N. E., Gray, P., & Nielsen, L. (2012). A Multi-Omics Analysis of Recombinant Protein Production in Hek293 Cells. *PLoS One*, 7(8), e43394. doi:<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043394>
- Dimitrov, D. (2020). Therapeutic Proteins. *Methods Mol Biol.*, 899: 1-26. doi:https://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_1

- Dodev, T., & Karagiannis, P. (2014). A tool kit for rapid cloning and expression of recombinant antibodies. *Sci Rep*, (4), 5885.
doi:<https://doi.org/10.1038/srep05885>
- Durocher, Y., & Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, 20(6): 700-7.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.008>
- Ecker, D. M., Jones, S. D., & Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*, 7(1), 9–14.
doi:<https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>
- Eno, J. (2017). Immunotherapy Through the Years. *Journal of the advanced practitioner in oncology*, 8(7), 747–753.
- Felgner, P. L., & Ringold, G. M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, 337(6205): 387-388. doi:[doi:10.1038/337387a0](https://doi.org/10.1038/337387a0)
- Flaherty, D. (2012). Chapter 9: Antibodies. Immunology for Pharmacy. *Elsevier, China*, 70-79.
- Fliedl, L., & Kaisermayer, C. (2011). Transient gene expression in HEK293 and vero cells immobilised on microcarriers. *Journal of Biotechnology*, 153(1-2):15-21.
doi:[doi:10.1016/j.jbiotec.2011.02.007](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.02.007)
- Gatica, G. (2018). ¿Sabías que... el cáncer de colon es la cuarta causa de muerte en México? Obtenido de CienciaMX:
<https://www.cienciamx.com/index.php/sabias-que/14540-sabias-que-el-cancer-de-colon-es-la-cuarta-causa-de-muerte-en-mexico>
- Geisse, S., & Fux, C. (2009). Recombinant protein production by transient gene transfer into mammalian cells. En *Guide to protein purification, 2nd Edition*. (págs. 223-238). Elsevier. doi:DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63015-9

- Gill, D. R., Pringle, I. A., & Hyde, S. C. (2009). Progress and prospects: The design and production of plasmid vectors. *Gene Therapy*, 16(2), 165-171.
doi:doi:10.1038/gt.2008.183
- Goncalves, C., Gross, F., Guégan, P., Chedaram, H., & Midou, P. (2014). A robust transfection reagent for the transfection of CHO and HEK293 cells and production of recombinant proteins and lentiviral particles - PTG1. *Biotechnology Journal*, 9(11), 1380-1388. doi:doi:10.1002/biot.201400324
- Grabenhost, E., Schlenke, P., Pohl, S., Nimtz, M., & Conradt, H. S. (1999). Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconj J*, 16: 81-97.
doi:https://doi.org/10.1023/a:1026466408042
- Grilo, A. L., & Mantalis, A. (2018). The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends in Biotechnology*.
doi:doi:10.1016/j.tibtech.2018.05.014
- Hashemi, A., Roohvan, F., Ghahremani, M., Aghasadeghi, M., Vahabpour, R., Motevali, F., & Memarnejadian, A. (2012). Optimization of transfection methods for Huh-7 and Vero cells: A comparative study. *Cytology and Genetics*, 46(6), 347-353. doi:doi:10.3103/s0095452712060035
- Horad, F. (1992). Absence of viral sequences in the WHO-Vero cell bank. A collaborative study,. *Dev Biol Stand*, 76: 43-6. doi:PMID: 1478353
- Inoue, T., & Krumlauf, R. (2001). An impulse to the brain--using in vivo electroporation. *Nat Neurosci*, 4, 1165-8. doi:https://doi.org/10.1038/nn1101-1156
- Janeway, C. A., Travers, P., & Walport, M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science.
- Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W. S., & Yap, M. G. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem. Eng.*, 103, 40-47.

- Kaufman, R. J. (2000). Overview of vector design for mammalian gene expression. *Molecular Biotechnology*, 16(2), 151-160. doi:doi:10.1385/mb:16:2:151
- Khan, B., Horsnell, M., Rogers, I., Mikel, L., Dinn, A., & Watson, I. (2008). *Chapter 5: Monoclonal antibodies as therapeutic agents*. New York: Springer.
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397(8): 3173-3178.
doi:https://dx.doi.org/10.1007%2Fs00216-010-3821-6
- Kirkpatrick, P., Graham, J., & Muhsin, M. (2004). Cetuximab. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(7), 549-550. doi:doi:10.1038/nrd1445
- Kohler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497.
doi:https://doi.org/10.1038/256495a0
- Kuramochi, T., Igawa, T., Tsunoda, H., & Hattori, K. (2014). *Humanization and Simultaneous Optimization of Monoclonal Antibody*. Hatfield, Hertfordshire: Springer Science.
- Kyle, V., & Tripp, R. A. (2020). Vero Cells as a Mammalian Cell Substrate for Human Norovirus. *Viruses*, 12(4): 439. doi:https://dx.doi.org/10.3390%2Fv12040439
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., & Amanullah, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2(5), 466-477.
- Li, j., & Zhu, Z. (2010). Research and development of next generation of antibody-based therapies. *Acta Pharmacol Sin*, 31:1198–1207.
- Lo, D. C., McAllister, A. K., & Katz, L. C. (1994). Neuronal transfection in brain slices using particle-mediated gene transfer. *Neuron*, 13(6): 1263-8.
doi:https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90412-x
- Lodish, H., Berk, A., & Zipursky, S. (2000). Section 7.1, DNA Cloning with Plasmid Vectors. In *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York.

- Longberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Trounstein, M., Higgins, K. M., & Schramm, S. M. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, 368:856–9. doi:doi:10.1038/368856a0
- Lu, R. M., Hwang, Y. C., & Liu, I. J. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*, 27, 1. doi:https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z
- Manis, J. P. (16 de Diciembre de 2020). *Overview of therapeutic monoclonal antibodies*. Obtenido de UpToDate: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-therapeutic-monoclonal-antibodies>
- Martinelli, E., De Palma, R., Orditura, M., De Vita, F., & Ciardiello, F. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol*, 158(1): 1–9. doi:https://dx.doi.org/10.1111%2Fj.1365-2249.2009.03992.x
- Masih, S., Jain, P., El Baz, R., & Khan, Z. K. (2013). Transgenic Animals and their Applications. *Animal Biotechnology*, 407-423. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00022-5
- Mehier-Humbert, S., & Guy, R. H. (2005). Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(5): 733-53. doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.007
- Mendez, M. J., Green, L. L., Corvalan, J. R., Xia, X. C., Maynard-Currie, M. D., & Yang, X. D. (1997). Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet*, 15:146–56.
- Merlo, L. M., & Mandik-Nayak, L. (2013). Adaptive Immunity. *Cancer Immunotherapy*, 25-40. doi:doi:10.1016/b978-0-12-394296-8.00003-8
- Morrow, M. P., Pankhong, P., & Weiner, D. B. (2008). Design and characterization of a plasmid vector system capable of rapid generation of antibodies of multiple

isotypes and specificities. *Biotechnology Letters*, 31(1), 13-22.

doi:doi:10.1007/s10529-008-9826-y

Mortimer, I., MacLachlan, I., & Tam, P. (1999). Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene*, 6, 403-411.

doi:https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300837

Mullard, A. (2021). *FDA approves 100th monoclonal antibody product*. *Nature*.

O'Brien, J., & Lummins, S. C. (2006). Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun. *Nat Protoc*, 1(2): 977-81.

doi:https://dx.doi.org/10.1038%2Fnpot.2006.145

Parley, S. (2010). Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Int. J. Pharm Sci*, (2) 88-94.

Patlak, M., & Longo, D. L. (2009). *Magic Bullets and Monoclonals: An Antibody Tale*. Bethesda, MD.: FASEB.

Pfeifer, A., & Verma, M. (2001). Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2:177-211.

doi:https://doi.org/10.1146/annurev.genom.2.1.177

Rahimi, P., Mobarakeh, I., Kamalzare, S., SajadianFard, F., Vahapour, R., & Zabihollahi, R. (2018). Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. *Bratisl Lek Listy*, 119(11): 701-705.

doi:doi: 10.4149/BLL_2018_125

Recillas-Targa, F. (2006). Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown and chromatin influence in mammalian celllines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology*, 34(3), 337-354.

doi:doi:10.1385/mb:34:3:337

Rhim, J. S., Schell, K., Creasy, B., & Case, W. (1969). Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero). *Proc Soc Exp Biol Med*, 132(2): 670-8. doi:https://doi.org/10.3181/00379727-132-34285

- Saeed, A., Wang, R., Ling, S., & Wang, S. (2017). Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. *Frontiers in Microbiology*, (8), 495.
doi:10.3389/fmicb.2017.00495
- Schenborn, E. T., & Goiffon, V. (2000). DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Methods Mol Biol*, 130:147-53. doi:https://doi.org/10.1385/1-59259-686-x:147
- Schirrmann, T. (2008). Production systems for recombinant antibodies. *Font Biosci*, 13: 4576–4594.
- Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(4):363–372 .
- Smith, G. P. (1985). filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228:1315–1317.
- Smits, N. C., & Sentman, C. L. (2016). Smits, N. C., & Sentman, C. L. (2016). Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs) as Treatment of B-Cell Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(10), 1131–1133.
doi:https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64
- Spidel, J., Vaessen, B., Chan, Y. Y., Grasso, L., & Kline, B. (2016). Rapid high-throughput cloning and stable expression of antibodies in HEK293 cells. *Journal of Immunological Methods*, 50-58.
doi:https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.09.007
- Spiess, C., Zhai, Q., & Carter, P. J. (2015). Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Molecular Immunology*, 67(2), 95–106. doi:doi:10.1016/j.molimm.2015.01.003
- Tolmachov, O. (2009). Designing Plasmid Vectors. *Methods in Molecular Biology*, 117-129. doi:doi:10.1007/978-1-59745-561-9_6

- Vidor, E., Meschievitz, S., & Plotkin, C. (1997). Fifteen years of experience with Vero-produced enhanced potency inactivated poliovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J.*, 16(3): 312-22. doi:<https://doi.org/10.1097/00006454-199703000-00011>
- Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*, 9(5): 52. doi:<https://dx.doi.org/10.3390%2Fcancers9050052>
- Woods, N. B. (2003). Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood*, 101(4): 1284-1289. doi:doi: 10.1182/blood-2002-07-2238
- Wrobel, I., & Collins, D. (1995). Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1235(2): 296-304. doi:doi:10.1016/0005-2736(95)80017-a
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature*, 22(11), 1393-1398. doi:doi:10.1038/nbt1026
- Yang, Q., Chen, H., Wei, T., & Wei, P. (2013). Inhibition of Toll-Like Receptor 2–Mediated NF-κB Activation in Vero Cells with Herpesvirus of Turkeys. *Avian Diseases*, 57(21), 409-415. doi:doi:10.1637/10327-081712-reg.1
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1158-1170. doi:doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.022